



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**DESARROLLO DE UN SUPLEMENTO ALIMENTICIO A BASE
DEL HONGO MEDICINAL *Ganoderma lucidum* Y SEMILLAS DE
AMARANTO: SU IMPACTO POTENCIAL EN LA REGIÓN
CENTRAL DE MÉXICO**

VLADIMIR MITZI DÁVILA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2015



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN
CAMPUS PUEBLA

CAMPUE- 43-2-03

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Vladimir Mitzi Dávila**, alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección de la Profesora **Dra. Mercedes Sobal Cruz.**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Desarrollo de un suplemento alimenticio a base del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* y semillas de amaranto: su impacto potencial en la región central de México**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, la Consejera y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, 30 de julio de 2015

Vladimir Mitzi Dávila

Dra. Mercedes Sobal Cruz
Vo. Bo. Profesora Consejera

La presente tesis, titulada: **Desarrollo de un suplemento alimenticio a base del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* y semillas de amaranto: su impacto potencial en la región central de México**, realizada por el alumno: **Vladimir Mitzi Dávila** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:



DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESOR:



DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESOR:



DR. ISAAC TELLO SALGADO

Puebla, Puebla, México, 30 de julio del 2015

DESARROLLO DE UN SUPLEMENTO ALIMENTICIO A BASE DEL HONGO MEDICINAL *GANODERMA LUCIDUM* Y SEMILLAS DE AMARANTO: SU IMPACTO POTENCIAL EN LA REGIÓN CENTRAL DE MÉXICO

Vladimir Mitzi Dávila, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

Los estudios realizados sobre las funcionalidades de hongos basidiomicetos han demostrado que presentan actividad biológica. Los extractos acuosos y alcohólicos de *Ganoderma lucidum* se han utilizado por sus propiedades medicinales y funcionales. Los reportes científicos sobre amaranto sugieren que la planta contiene agentes potencialmente beneficiosos para la salud, lo que parece darle un valor agregado a este alimento. En este trabajo se desarrollaron alimentos funcionales a base de extractos del hongo *G. lucidum* y semillas de amaranto nieves y nutrisol. Las semillas de amaranto se clasificaron por tamaños, enteras y molidas, se maceraron y se obtuvieron extractos hidroalcohólicos los cuales se caracterizaron. Se seleccionó la mejor muestra de amaranto por tamaño, entera o molidas. Se elaboraron los suplementos alimenticios con mezclas del hongo *G. lucidum* en diferentes proporciones (volumen/volumen) de 0:2, 0.5:1.5, 1:1, 1.5:0.5 y 2:0 mL, identificados con claves. El suplemento alimenticio con clave F (1.5 mL de *G. lucidum*: 0.5 mL de amaranto nieves) presentaron los mejores resultados de rendimiento y polifenoles totales de 103.350 ± 0.84 mg/mL y 1.85 ± 0.10 mgEAG/g, respectivamente. El suplemento C (1.5 mL de *G. lucidum*: 0.5 mL de amaranto nutrisol) presentó el mejor contenido de proteína (242.005 ± 6.536 µg/g), una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en la dilución D4 de 6.35 mg/mL y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) en la dilución D3, con 12.70 mg/mL contra la bacteria CPB-4 de *Streptococcus agalactiae*. De las mezclas de *G. lucidum* con amaranto en relación peso/peso, el suplemento alimenticio con clave J (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g) obtuvo un rendimiento de $807.08 \pm 0.1.50$ mg/g y proteína de 2143.72 ± 21.77 µg/g, y mayor CMI contra las cepas CPB-4 de *S. agalactiae* y CPB-11 de *Listeria monocytogenes* en su D4, y la CMB fue en la D4 contra la cepa CPB-4. En contenido de polifenoles del suplemento alimenticio L (4 g de *G. lucidum*) fue el más alto (17.86 mgEAG/g). Se desarrollaron suplementos alimenticios con las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de *G. lucidum* y las del amaranto.

Palabras clave: *Ganoderma lucidum*, polifenoles, amaranto y suplemento alimenticio.

**ELABORATION OF A FOOD SUPPLEMENT BASED ON THE
MEDICINAL MUSHROOM *GANODERMA LUCIDUM* AND
AMARANTH SEEDS: POTENTIAL IMPACT ON THE CENTRAL
REGION OF MEXICO**

Vladimir Mitzi Dávila, M.C.

Colegio de Postgraduados 2015

Studies on the functionalities of the basidiomycetes mushrooms have shown to present some biological activity. Aqueous and alcoholic extracts of *Ganoderma lucidum* has been used due to their medicinal and functional properties. Scientific reports about the amaranth suggest that the plant contains potential agents benefits to health that give it more value to this food. In the present research, functional foods based on the mushroom extract of *G. lucidum* and “nieves” and “nutrisol” amaranth seeds were elaborated. Amaranth seeds were classified on the basis of size, grounded and non-grounded, then macerated and the hydroalcoholic extracts were obtained and characterized. The best of these samples were selected for further studies of total polyphenols, protein and yield of the extract. Supplements food with different proportions of *G. lucidum* and amaranth seeds (volume/volume) of 0:2, 0.5:15, 1:1, 1.5:0.5 and 2:0 mL were prepared. To each mixture a key letter (A to F) was assigned. The mixtures in proportion 1.5:0.5 mL (F) showed the best yield, and total polyphenols with 103.350 ± 0.84 and 1.85 ± 0.10 mgEAG/g, respectively. Supplement C (1.5 mL of *G. lucidum*: 0.5 mL “nutrisol amaranth”) showed the best protein content with 242.005 ± 6.536 $\mu\text{g/g}$, and Minimum Concentration Inhibitory (MCI) in the dilution D4 with 6.35 mg/mL and a Minimum Bactericidal Concentration (MBC) in the dilution D3 with 12.70 mg/mL against the bacteria CPB-4 of *Streptococcus agalactiae*. In the mixture of *G. lucidum* with amaranth seeds (weight/weight ratio) the supplement food named J (*G. lucidum* 2 g: “nieves” amaranth seeds 2 g) a yield and protein content of 807.08 ± 1.50 mg/g and 2143.72 ± 21.77 $\mu\text{g/g}$ was obtained. The MCI against the strains CPB-4 of *S. agalactiae* and the CPB-11 of *Listeria monocytogenes* in the dilution D4 and the MBC against the strain CPB-4 of *Streptococcus agalactiae* in the dilution D4. The highest polyphenol content was obtained in the supplements food named L (4 g of *G. lucidum*) with 17.86 mgEAG/g. Supplements food with antioxidant and antimicrobial properties of *G. lucidum* and amaranth seeds were developed.

Key words: *Ganoderma lucidum*, polyphenols, amaranth, food supplements.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*, por abrirme las puertas y darme la atención en todo momento para realizar la Maestría en Ciencias en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional.

A Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo para realizar el proyecto de investigación.

A la Línea Prioritaria de Investigación 5, Biotecnología Microbiana Vegetal y Animal, por el apoyo para la realización de este trabajo de investigación.

A mis padres y toda mi familia por estar conmigo en momentos buenos y malos, a pesar de la distancia.

A los integrantes del Consejo Particular, integrado por la Dra. Mercedes Sobal Cruz, Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera, Dr. Porfirio Morales Almora y Dr. Isaac Tello Salgado, quienes aportaron en la formación de mi proyecto de investigación, gracias por todos esos consejos, apoyos, observaciones, pláticas, orientación, conocimiento y por estar muy al pendiente de mi investigación en los momentos fáciles y difíciles.

A mis compañeros y estimados amigos del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales: al Biól. Wilfrido Martínez Sánchez y M.C. Myrna Bonilla Quintero, por su amistad y las atenciones dentro y fuera del laboratorio. Al M.C. Alan Helios Escudero Uribe, por brindarme orientación, consejos y al compañero Ivan Castillo Sebastián por todo el apoyo.

A mis amigos del Colegio de Postgraduados: al M. C. Apolo Gilmar Rendón Hernández, Alfonso Rosado Espinoza de los Monteros, M. C. Zulma Bolaños García y Samuel A. Torres Méndez.

| CONTENIDO | | Página |
|------------------|--|--------|
| I. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. | MARCO TEÓRICO | 2 |
| 2.1 | Biotechnología de alimentos..... | 2 |
| 2.2 | Biotechnología y desarrollo | 2 |
| 2.3 | Biotechnología y desarrollo de los hongos comestibles, medicinales y funcionales..... | 3 |
| 2.4 | Importancia del cultivo de los hongos comestibles..... | 3 |
| 2.5 | Cultivo del hongo medicinal <i>Ganoderma lucidum</i> | 5 |
| 2.6 | Plantas nativas comestibles y funcionales de México..... | 5 |
| 2.6.1 | El amaranto..... | 6 |
| 2.6.2 | Valor nutricional y funcional del amaranto..... | 7 |
| 2.6.3 | Norma Mexicana NMX- FF-114-SCFI-2009, denominada “Grano de amaranto” | 9 |
| 2.7 | Cultivo e importancia económica del amaranto..... | 10 |
| 2.8 | Productos elaborados de amaranto..... | 13 |
| 2.9 | Comercialización de productos a base de amaranto..... | 13 |
| 2.10 | Origen del concepto de alimento funcional..... | 15 |
| 2.11 | Suplementos alimenticios..... | 17 |
| 2.12 | Propiedades antimicrobianas..... | 18 |
| 2.13 | Bacterias nocivas para el hombre..... | 19 |
| 2.14 | Mecanismos de la inmunización bacteriana..... | 22 |
| 2.15 | Mecanismos de resistencia de las bacterias..... | 22 |
| III. | MARCO DE REFERENCIA | 24 |
| 3.1 | Propiedades del hongo <i>Ganoderma lucidum</i> | 24 |
| 3.2 | Alimentos y bebidas con hongos..... | 24 |
| 3.3 | Propiedades del amaranto..... | 25 |
| 3.3.1 | Actividad antimicrobiana del amaranto..... | 26 |
| 3.3.2 | Actividad antioxidante del amaranto..... | 26 |
| 3.4 | Propiedades de los alimentos elaborados con las semillas de amaranto.. | 26 |
| 3.5 | Obtención de los extractos hidroalcohólicos..... | 28 |
| IV. | PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 30 |
| V. | HIPÓTESIS | 31 |
| VI. | OBJETIVOS | 31 |
| 6.1 | Objetivo general..... | 31 |
| 6.2 | Objetivos particulares..... | 31 |
| VII. | MATERIALES Y MÉTODOS | 32 |
| 7.1 | Cultivo del hongo medicinal <i>Ganoderma lucidum</i> (CP-145)..... | 32 |
| 7.2 | Procedencia del material vegetal..... | 32 |
| 7.2.1 | Semilla criolla de amaranto conocida como “nieves”..... | 32 |

| | | |
|--------------|--|----|
| 7.2.2 | Semilla mejorada de amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.) variedad nutrisol..... | 32 |
| 7.3 | Caracterización de las semillas de amaranto..... | 33 |
| 7.4 | Preparación de las muestras..... | 35 |
| 7.5 | Maceración de las muestras en solución hidroalcohólica..... | 35 |
| 7.6 | Concentración de los macerados hidroalcohólicos en el rotavapor..... | 37 |
| 7.7 | Obtención de los extractos..... | 37 |
| 7.8 | Esterilización de los extractos por filtración..... | 37 |
| 7.9 | Caracterización de los extractos hidroalcohólicos de las muestras estudiadas..... | 38 |
| 7.9.1 | Determinación de polifenoles totales..... | 38 |
| 7.9.2 | Determinación de proteínas..... | 39 |
| 7.10 | Cálculo del rendimiento de los extractos (mg/g)..... | 40 |
| 7.11 | Selección de los extractos y elaboración de los suplementos alimenticios..... | 40 |
| 7.12 | Análisis estadístico (SAS)..... | 44 |
| 7.13 | Prueba de susceptibilidad bacteriana de los suplementos alimenticios... | 44 |
| 7.13.1 | Recursos genéticos bacterianos usados en los bioensayos..... | 44 |
| 7.13.1.1 | Obtención del inóculo bacteriano..... | 45 |
| 7.13.2 | Arreglo de las muestras en la microplaca..... | 46 |
| 7.13.3 | Método de microdilución en microplaca para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los suplementos alimenticios..... | 47 |
| 7.13.4 | Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los suplementos alimenticios..... | 50 |
| 7.14 | Selección del mejor suplemento alimenticio..... | 51 |
| VIII. | RESULTADOS | 52 |
| 8.1 | Basidiocarpos de la CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> | 52 |
| 8.2 | Características del material biológico vegetal..... | 52 |
| 8.2.1 | Semilla de amaranto criollo conocida como “nieves”..... | 52 |
| 8.2.2 | Semilla de amaranto mejorada variedad “nutrisol”..... | 53 |
| 8.3 | pH de los macerados hidroalcohólicos de las semillas de amaranto sin clasificar por tamaño (enteras y molidas)..... | 55 |
| 8.4 | pH de los macerados hidroalcohólicos de las semillas de amaranto clasificadas por tamaño (enteras y molidas)..... | 56 |
| 8.5 | Caracterización de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de amaranto sin clasificar por tamaño (enteras y molidas)..... | 56 |
| 8.5.1 | Polifenoles totales de los extractos..... | 56 |
| 8.5.2 | Proteínas de los extractos..... | 57 |
| 8.5.3 | Rendimiento de los extractos..... | 57 |
| 8.6 | Caracterización de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de amaranto clasificadas por tamaño (enteras y molidas)..... | 58 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 8.6.1 | Polifenoles totales de los extractos..... | 58 |
| 8.6.2 | Proteínas de los extractos..... | 59 |
| 8.6.3 | Rendimientos de los extractos..... | 61 |
| 8.7 | Selección de los extractos hidroalcohólicos de las semillas molidas de amaranto nieves y nutrisol clasificadas por tamaño para elaborar los suplementos alimenticios (v/v)..... | 61 |
| 8.8 | Caracterización de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos de <i>G. lucidum</i> y amaranto nieves y nutrisol (v/v)..... | 61 |
| 8.8.1 | pH de los suplementos alimenticios (v/v)..... | 61 |
| 8.8.2 | Conductividad y resistividad de los suplementos alimenticios (v/v)..... | 62 |
| 8.8.3 | Polifenoles totales de los suplementos alimenticios (v/v)..... | 63 |
| 8.8.4 | Proteína de los suplementos alimenticios (v/v)..... | 64 |
| 8.8.5 | Rendimiento de los suplementos alimenticios (v/v)..... | 64 |
| 8.9 | Análisis estadístico (SAS)..... | 65 |
| 8.10 | Prueba de susceptibilidad bacteriana de los suplementos alimenticios (v/v) usando una cepa bacteriana..... | 69 |
| 8.10.1 | Bioensayo con la cepa CPB-4 de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 69 |
| 8.10.1.1 | Confirmación del inóculo..... | 69 |
| 8.10.1.2 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 0.5 mL de extracto de <i>G. lucidum</i> y 1.5 mL de extracto de amaranto nieves (Clave A)..... | 70 |
| 8.10.1.3 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 1.0 mL de extracto de <i>G. lucidum</i> y 1.0 mL de extracto de amaranto nieves (Clave B)..... | 71 |
| 8.10.1.4 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 1.5 mL de extracto de <i>G. lucidum</i> y 0.5 mL de extracto de amaranto nieves (Clave C)..... | 72 |
| 8.10.1.5 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 0.5 mL de extracto de <i>G. lucidum</i> y 1.5 mL de extracto de amaranto nutrisol (Clave D)..... | 73 |
| 8.10.1.6 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 1.0 mL de extracto de <i>G. lucidum</i> y 1.0 mL de extracto de amaranto nutrisol (Clave E)..... | 74 |
| 8.10.1.7 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 1.5 mL de extracto de <i>G. lucidum</i> y 0.5 mL de extracto de amaranto nutrisol (Clave F)..... | 75 |
| 8.10.1.8 | Efecto del suplemento elaborado con 2.0 mL de extracto de <i>G. lucidum</i> (Clave G)..... | 76 |
| 8.10.1.9 | Efecto del suplemento elaborado con 2.0 mL de extracto de amaranto nieves (Clave H)..... | 77 |
| 8.10.1.10 | Efecto del suplemento elaborado con 2.0 mL de extracto de amaranto nutrisol (Clave I)..... | 78 |
| 8.11 | Selección de los extractos liofilizados de las semillas molidas de amaranto nieves y nutrisol clasificadas por tamaño para elaborar los suplementos alimenticios (p/p)..... | 82 |
| 8.12 | Caracterización de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos liofilizados de <i>G. lucidum</i> y de las semillas molidas de amaranto nieves y nutrisol y (p/p)..... | 82 |
| 8.12.1 | pH de los suplementos alimenticios (p/p)..... | 82 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 8.12.2 | Conductividad y resistividad de los suplementos alimenticios (p/p)..... | 83 |
| 8.12.3 | Polifenoles totales de los suplementos alimenticios (p/p)..... | 84 |
| 8.12.4 | Proteína de los suplementos alimenticios (p/p)..... | 84 |
| 8.12.5 | Rendimiento de los suplementos alimenticios (p/p)..... | 85 |
| 8.13 | Análisis estadístico (SAS)..... | 86 |
| 8.14 | Prueba de susceptibilidad bacteriana de los suplementos alimenticios elaborados con extractos liofilizados (p/p)..... | 90 |
| 8.14.1 | Bioensayo con la cepa CPB-1 de <i>Salmonella thypi</i> | 90 |
| 8.14.1.1 | Confirmación del inóculo..... | 90 |
| 8.14.1.2 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)..... | 91 |
| 8.14.1.3 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)..... | 91 |
| 8.14.1.4 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de <i>G. lucidum</i> (Clave L)..... | 92 |
| 8.14.1.5 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)..... | 93 |
| 8.14.1.6 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)..... | 94 |
| 8.14.2 | Bioensayo con la cepa CPB-4 de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 95 |
| 8.14.2.1 | Confirmación del inóculo..... | 95 |
| 8.14.2.2 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)..... | 96 |
| 8.14.2.3 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)..... | 97 |
| 8.14.2.4 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de <i>G. lucidum</i> (Clave L)..... | 98 |
| 8.14.2.5 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)..... | 99 |
| 8.14.2.6 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)..... | 100 |
| 8.14.3 | Bioensayo con la cepa CPB-6 de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 101 |
| 8.14.3.1 | Confirmación del inóculo..... | 101 |
| 8.14.3.2 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)..... | 101 |
| 8.14.3.3 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)..... | 102 |
| 8.14.3.4 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de <i>G. lucidum</i> (Clave L)..... | 103 |
| 8.14.3.5 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)..... | 104 |
| 8.14.3.6 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)..... | 105 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 8.14.4 | Bioensayo con la cepa CPB-7 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 106 |
| 8.14.4.1 | Confirmación del inóculo..... | 106 |
| 8.14.4.2 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)..... | 107 |
| 8.14.4.3 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)..... | 108 |
| 8.14.4.4 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de <i>G. lucidum</i> (Clave L)..... | 109 |
| 8.14.4.5 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)..... | 110 |
| 8.14.4.6 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)..... | 110 |
| 8.14.5 | Bioensayo con la cepa CPB-8 de <i>Escherichia coli</i> | 112 |
| 8.14.5.1 | Confirmación del inóculo..... | 112 |
| 8.14.5.2 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)..... | 112 |
| 8.14.5.3 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)..... | 113 |
| 8.14.5.4 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de <i>G. lucidum</i> (Clave L)..... | 114 |
| 8.14.5.5 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)..... | 115 |
| 8.14.5.6 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)..... | 116 |
| 8.14.6 | Bioensayo con la cepa CPB-9 de <i>Bacillus subtilis</i> | 117 |
| 8.14.6.1 | Confirmación del inóculo..... | 117 |
| 8.14.6.2 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)..... | 118 |
| 8.14.6.3 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)..... | 119 |
| 8.14.6.4 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de <i>G. lucidum</i> (Clave L)..... | 120 |
| 8.14.6.5 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)..... | 121 |
| 8.14.6.6 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)..... | 122 |
| 8.14.7 | Bioensayo con la cepa CPB-10 de <i>Staphilococcus aureus</i> | 123 |
| 8.14.7.1 | Confirmación del inóculo..... | 123 |
| 8.14.7.2 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)..... | 123 |
| 8.14.7.3 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)..... | 124 |

| | | |
|-------------|---|-----|
| 8.14.7.4 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de <i>G. lucidum</i> (Clave L)..... | 125 |
| 8.14.7.5 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)..... | 126 |
| 8.14.7.6 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)..... | 127 |
| 8.14.8 | Bioensayo con la cepa CPB-11 de <i>Listeria monocytogenes</i> | 128 |
| 8.14.8.1 | Confirmación del inóculo..... | 128 |
| 8.14.8.2 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)..... | 129 |
| 8.14.8.3 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)..... | 130 |
| 8.14.8.4 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de <i>G. lucidum</i> (Clave L)..... | 131 |
| 8.14.8.5 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)..... | 132 |
| 8.14.8.6 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)..... | 133 |
| 8.14.9 | Bioensayo con la cepa CPB-13 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 133 |
| 8.14.9.1 | Confirmación del inóculo..... | 134 |
| 8.14.9.2 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)..... | 134 |
| 8.14.9.3 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de <i>G. lucidum</i> y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)..... | 135 |
| 8.14.9.4 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de <i>G. lucidum</i> (Clave L)..... | 136 |
| 8.14.9.5 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)..... | 137 |
| 8.14.9.6 | Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)..... | 138 |
| 8.15 | Comparación del efecto bacteriostático de los suplementos alimenticios (p/p) contra cada cepa bacteriana..... | 139 |
| 8.16 | Comparación del efecto bactericida de los suplementos alimenticios (p/p) contra cada cepa bacteriana..... | 145 |
| IX. | DISCUSIÓN | 151 |
| X. | CONCLUSIONES | 155 |
| XI. | ESTRATEGIA PARA LA ELABORACIÓN DE SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS CON EXTRACTOS DEL HONGO <i>GANODERMA LUCIDUM</i> Y SEMILLAS DE AMARANTO | 156 |
| XII. | LITERATURA CITADA | 162 |

LISTA DE FIGURAS

| | | Página |
|-------------------|---|--------|
| Figura 1. | Superficie sembrada a nivel nacional, tomado de Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)..... | 10 |
| Figura 2. | Superficie sembrada de amaranto en el Estado de Puebla. Tomado de Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)..... | 11 |
| Figura 3. | Producción de amaranto en el Estado de Puebla. Tomado de Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)..... | 11 |
| Figura 4. | Superficie sembrada de amaranto en el Estado de Morelos. Tomado de Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)..... | 12 |
| Figura 5. | Producción de amaranto en el estado de Morelos. Tomado de Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)..... | 12 |
| Figura 6. | Cultivo de la semilla criolla de amaranto conocida como “nieves” en Huazulco, Temoac, Morelos..... | 32 |
| Figura 7. | Cultivo de amaranto de la variedad nutrisol perteneciente a la especie <i>Amaranthus hypochondriacus</i> en el municipio de Calpan, Puebla..... | 33 |
| Figura 8. | Semillas limpias de amaranto: a) variedad nutrisol especie <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y b) criolla conocida como nieves (<i>Amaranthus</i> spp.)..... | 33 |
| Figura 9. | Diagrama que se siguió para la obtención de las semillas de amaranto no clasificadas y clasificadas por tamaño según el tamiz empleado..... | 34 |
| Figura 10. | Diagrama de flujo para la obtención de los extractos del hongo <i>Ganoderma lucidum</i> y semillas de amaranto..... | 36 |
| Figura 11. | Potenciómetro para medir el pH, temperatura, conductividad y resistividad de los extractos obtenidos de todas las muestras en estudio..... | 37 |
| Figura 12. | Concentración de los extractos del hongo <i>Ganoderma lucidum</i> y semillas de amaranto en el rotavapor..... | 37 |
| Figura 13. | Metodología para la determinación antioxidantes basada en la cantidad de polifenoles totales presentes en los extractos de las muestras en estudio..... | 37 |
| Figura 14. | Metodología para determinar proteínas en microplaca de las muestras elaboradas en este trabajo..... | 40 |
| Figura 15. | Liofilizadora con los extractos de amaranto congelados..... | 41 |
| Figura 16. | Suplementos alimenticios elaborados a base de extractos liofilizados del hongo <i>Ganoderma lucidum</i> y amaranto nieves (a) y de amaranto nutrisol (b)..... | 42 |
| Figura 17. | Elaboración de los suplementos alimenticios de <i>Ganoderma lucidum</i> (CP-145) y amaranto nieves y nutrisol en base a los extractos hidroalcohólicos (volumen/volumen) y extractos hidroalcohólicos liofilizados (peso/peso). CMI= Concentración mínima inhibitoria. CMB= Concentración mínima bactericida..... | 43 |
| Figura 18. | Ajuste de la cantidad de las bacterias a una concentración de 1×10^8 bact./mL para el diseño experimental y, de 1×10^4 bact./mL para verificar el inóculo con 50 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en cajas de Petri con medio de cultivo Agar Mueller Hinton..... | 46 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 19. | Distribución de las microdiluciones en la microplaca para la prueba de susceptibilidad bacteriana..... | 47 |
| Figura 20. | Especificaciones de la inoculación de la bacteria en estudio para realizar la prueba de susceptibilidad bacteriana en esta investigación..... | 48 |
| Figura 21. | Vista longitudinal de la forma en que se realizó la microdilución de los suplementos alimenticios en la microplaca. El valor que está indicado dentro de cada pozo representa la dilución (%) del suplemento alimenticio (tratamiento) o del solvente, el 100 fue el valor de la concentración inicial, el 50 fue el valor de la concentración diluida a la mitad, y así sucesivamente. El volumen total de la microdilución de cada pozo fue de 200 µL..... | 49 |
| Figura 22. | Forma en que se colocó la microplaca para evitar la pérdida de humedad (a) e incubadora donde se colocó la microplaca durante 24 horas (b)..... | 49 |
| Figura 23. | Representación de los pozos de la microplaca donde se tomaron las muestras para evaluar los efectos bactericida y bacteriostático de los suplementos alimenticios (tratamientos)..... | 50 |
| Figura 24. | Modo de inoculación de la caja de Petri con agar Mueller Hinton para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los suplementos alimenticios de <i>Ganoderma lucidum</i> y amaranto, sembrado con la cepa bacteriana en estudio. C.E.= Control de esterilidad. C.C.= Control de crecimiento bacteriano (Blanco positivo de la bacteria). B.P.T= Blanco positivo del tratamiento..... | 51 |
| Figura 25. | Basidiocarpos de <i>Ganoderma lucidum</i> CP-145, cultivados con la formulación COLPOS-17..... | 52 |
| Figura 26. | Proporciones (%) de la semilla de amaranto criollo conocido como nieves durante la limpieza..... | 52 |
| Figura 27. | Clasificación por tamaños (%) de la semilla de amaranto criolla conocida como nieves usando diferentes tamices y 5 Kg de muestra..... | 53 |
| Figura 28. | Proporciones (%) de la semilla de amaranto variedad nutrisol durante la limpieza..... | 54 |
| Figura 29. | Clasificación por tamaños (%) de la semilla de amaranto variedad nutrisol usando diferentes tamices y 5 Kg de muestra..... | 55 |
| Figura 30. | pH de los macerados hidroalcohólicos de las semillas de amaranto sin clasificar por tamaños (enteras y molidas). NIE = Nieves entera; NIM= Nieves molida; NUE= Nutrisol entera; NUM= Nutrisol molida..... | 55 |
| Figura 31. | pH de los macerados hidroalcohólicos de las semillas de amaranto clasificadas por tamaños (enteras y molidas). NIE18= Nieves entera tamaño 18; NIE20= Nieves entera tamaño 20; NIE>20= Nieves entera tamaño >20; NUE18= Nutrisol entera tamaño 18; NUE20= Nutrisol entera tamaño 20; NUE>20= Nutrisol entera tamaño >20; NIM18= Nieves molida tamaño 18; NIM20= Nieves molida tamaño 20; NIM>20= Nieves molida tamaño >20; NUM18= Nutrisol molida tamaño 18; NUM20= Nutrisol molida tamaño 20; NUM>20= Nutrisol molida tamaño >20..... | 56 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 32. | Polifenoles totales de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de amaranto sin clasificar por tamaños (enteras y molidas). NIE = Nieves entera; NIM= Nieves molida; NUE= Nutrisol entera; NUM= Nutrisol molida..... | 57 |
| Figura 33. | Concentraciones de proteína µg/g de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de amaranto sin clasificar por tamaños (enteras y molidas). NIE = Nieves entera; NIM= Nieves molida; NUE= Nutrisol entera; NUM= Nutrisol molida..... | 57 |
| Figura 34. | Rendimientos de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de amaranto sin clasificar por tamaños (enteras y molidas). NIE = Nieves entera; NIM= Nieves molida; NUE= Nutrisol entera; NUM= Nutrisol molida..... | 58 |
| Figura 35. | Curva de ácido gálico (AG) para determinar la concentración de polifenoles totales..... | 58 |
| Figura 36. | Polifenoles totales de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de amaranto clasificadas por tamaños (enteras y molidas). NIE18= Nieves entera tamaño 18; NIE20= Nieves entera tamaño 20; NIE>20= Nieves entera tamaño >20; NUE18= Nutrisol entera tamaño 18; NUE20= Nutrisol entera tamaño 20; NUE>20= Nutrisol entera tamaño >20; NIM18= Nieves molida tamaño 18; NIM20= Nieves molida tamaño 20; NIM>20= Nieves molida tamaño >20; NUM18= Nutrisol molida tamaño 18; NUM20= Nutrisol molida tamaño 20; NUM>20= Nutrisol molida tamaño >20..... | 59 |
| Figuro 37. | Curva de calibración para proteínas usando el método de Bradford..... | 60 |
| Figuro 38. | Contenido de proteína de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de amaranto clasificadas por tamaños (enteras y molidas). NIE18= Nieves entera tamaño 18; NIE20= Nieves entera tamaño 20; NIE>20= Nieves entera tamaño >20; NUE18= Nutrisol entera tamaño 18; NUE20= Nutrisol entera tamaño 20; NUE>20= Nutrisol entera tamaño >20; NIM18= Nieves molida tamaño 18; NIM20= Nieves molida tamaño 20; NIM>20= Nieves molida tamaño >20; NUM18= Nutrisol molida tamaño 18; NUM20= Nutrisol molida tamaño 20; NUM>20= Nutrisol molida tamaño >20..... | 60 |
| Figura 39. | Rendimiento de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de amaranto clasificadas por tamaños (enteras y molidas). NIE18= Nieves entera tamaño 18; NIE20= Nieves entera tamaño 20; NIE>20= Nieves entera tamaño >20; NUE18= Nutrisol entera tamaño 18; NUE20= Nutrisol entera tamaño 20; NUE>20= Nutrisol entera tamaño >20; NIM18= Nieves molida tamaño 18; NIM20= Nieves molida tamaño 20; NIM>20= Nieves molida tamaño >20; NUM18= Nutrisol molida tamaño 18; NUM20= Nutrisol molida tamaño 20; NUM>20= Nutrisol molida tamaño >20..... | 61 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 40. | pH de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos de <i>Ganoderma lucidum</i> (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). A= <i>G. lucidum</i> 0.5 mL: nieves 1.5 mL; B= <i>G. lucidum</i> 1 mL: nieves 1 mL; C= <i>G. lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL; D= <i>G. lucidum</i> 0.5 mL: nutrisol 1.5 mL; E= <i>G. lucidum</i> 1 mL: nutrisol 1 mL; F= <i>G. lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL; G= <i>G. lucidum</i> 2 mL: nieves 0 mL; H= <i>G. lucidum</i> 0 mL: nieves 2 mL; I= <i>G. lucidum</i> 0 mL: nutrisol 2 mL..... | 62 |
| Figura 41. | Conductividad de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos de <i>Ganoderma lucidum</i> (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). A= <i>G. lucidum</i> 0.5 mL: nieves 1.5 mL; B= <i>G. lucidum</i> 1 mL: nieves 1 mL; C= <i>G. lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL; D= <i>G. lucidum</i> 0.5 mL: nutrisol 1.5 mL; E= <i>G. lucidum</i> 1 mL: nutrisol 1 mL; F= <i>G. lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL; G= <i>G. lucidum</i> 2 mL: nieves 0 mL; H= <i>G. lucidum</i> 0 mL: nieves 2 mL; I= <i>G. lucidum</i> 0 mL: nutrisol 2 mL..... | 63 |
| Figura 42. | Polifenoles totales de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos de <i>Ganoderma lucidum</i> (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). A= <i>G. lucidum</i> 0.5 mL: nieves 1.5 mL; B= <i>G. lucidum</i> 1 mL: nieves 1 mL; C= <i>G. lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL; D= <i>G. lucidum</i> 0.5 mL: nutrisol 1.5 mL; E= <i>G. lucidum</i> 1 mL: nutrisol 1 mL; F= <i>G. lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL; G= <i>G. lucidum</i> 2 mL: nieves 0 mL; H= <i>G. lucidum</i> 0 mL: nieves 2 mL; I= <i>G. lucidum</i> 0 mL: nutrisol 2 mL..... | 63 |
| Figura 43. | Contenido de proteína de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos de <i>Ganoderma lucidum</i> (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). A= <i>G. lucidum</i> 0.5 mL: nieves 1.5 mL; B= <i>G. lucidum</i> 1 mL: nieves 1 mL; C= <i>G. lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL; D= <i>G. lucidum</i> 0.5 mL: nutrisol 1.5 mL; E= <i>G. lucidum</i> 1 mL: nutrisol 1 mL; F= <i>G. lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL; G= <i>G. lucidum</i> 2 mL: nieves 0 mL; H= <i>G. lucidum</i> 0 mL: nieves 2 mL; I= <i>G. lucidum</i> 0 mL: nutrisol 2 mL..... | 64 |
| Figura 44. | Rendimiento de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos de <i>Ganoderma lucidum</i> (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). A= <i>G. lucidum</i> 0.5 mL: nieves 1.5 mL; B= <i>G. lucidum</i> 1 mL: nieves 1 mL; C= <i>G. lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL; D= <i>G. lucidum</i> 0.5 mL: nutrisol 1.5 mL; E= <i>G. lucidum</i> 1 mL: nutrisol 1 mL; F= <i>G. lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL; G= <i>G. lucidum</i> 2 mL: nieves 0 mL; H= <i>G. lucidum</i> 0 mL: nieves 2 mL; I= <i>G. lucidum</i> 0 mL: nutrisol 2 mL..... | 65 |
| Figura 45. | Concentración de bacterias en 50 µL de inóculo de la CPB-4 (<i>Streptococcus agalactiae</i>)..... | 70 |
| Figura 46. | Efecto del suplemento alimenticio con clave A (<i>Ganoderma lucidum</i> 0.5 mL: nieves 1.5 mL), sobre el crecimiento bacteriano de la CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 70 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 47. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave A (<i>Ganoderma lucidum</i> 0.5 mL: nieves 1.5 mL), sobre la bacteria en estudio CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 71 |
| Figura 48. | Efecto suplemento alimenticio con clave B (<i>Ganoderma lucidum</i> 1 mL: nieves 1 mL) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 71 |
| Figura 49. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave B (<i>Ganoderma lucidum</i> 1 mL: nieves 1 mL) sobre la bacteria en estudio CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 72 |
| Figura 50. | Efecto del suplemento alimenticio con clave C (<i>Ganoderma lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL), sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 72 |
| Figura 51. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave C (<i>Ganoderma lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL), sobre la bacteria en estudio CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 73 |
| Figura 52. | Efecto del suplemento alimenticio con clave D (<i>Ganoderma lucidum</i> 0.5 mL: nieves 1.5 mL) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 73 |
| Figura 53. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave D (<i>Ganoderma lucidum</i> 0.5 mL: nieves 1.5 mL) sobre la bacteria en estudio CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 74 |
| Figura 54. | Efecto del suplemento alimenticio con clave E (<i>Ganoderma lucidum</i> 1mL: nieves 1 mL) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 74 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 55. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave E (<i>Ganoderma lucidum</i> 1 mL: nieves 1 mL) sobre la bacteria en estudio CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 75 |
| Figura 56. | Efecto del suplemento alimenticio con clave F (<i>Ganoderma lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL), sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 75 |
| Figura 57. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave F (<i>Ganoderma lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL), sobre la bacteria en estudio CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 76 |
| Figura 58. | Efecto del suplemento con clave G (<i>Ganoderma lucidum</i> 2 mL) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 76 |
| Figura 59. | Efecto bactericida del suplemento con clave G (<i>Ganoderma lucidum</i> 2 mL), sobre la bacteria en estudio CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 77 |
| Figura 60. | Efecto del suplemento con clave H (Nieves 2 mL), sobre el crecimiento bacteriano de la CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 77 |
| Figura 61. | Efecto bactericida del suplemento con clave H (Nieves 2 mL), sobre la bacteria CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 78 |
| Figura 62. | Efecto del suplemento con clave I (Nutrisol 2 mL), sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria..... | 78 |
| Figura 63. | Efecto bactericida del suplemento con clave I (Nutrisol 2 mL), sobre la bacteria en estudio CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 79 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 64. | Nivel del efecto bacteriostático de cada microdilución de los suplementos alimenticios elaborados con extractos hidroalcohólicos del hongo <i>Ganoderma lucidum</i> y semillas de amaranto nieves y nutrisol sobre la bacteria <i>S. agalactiae</i> . A= <i>G. lucidum</i> 0.5 mL: nieves 1.5 mL; B= <i>G. lucidum</i> 1 mL: nieves 1 mL; C= <i>G. lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL; D= <i>G. lucidum</i> 0.5 mL: nutrisol 1.5 mL; E= <i>G. lucidum</i> 1 mL: nutrisol 1 mL; F= <i>G. lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL; G= <i>G. lucidum</i> 2 mL: nieves 0 mL; H= <i>G. lucidum</i> 0 mL: nieves 2 mL; I= <i>G. lucidum</i> 0 mL: nutrisol 2 mL..... | 81 |
| Figura 65. | Nivel del efecto bactericida de cada microdilución de los suplementos alimenticios elaborados con extractos hidroalcohólicos del hongo <i>Ganoderma lucidum</i> y semillas de amaranto nieves y nutrisol sobre la bacteria <i>S. agalactiae</i> . A= <i>G. lucidum</i> 0.5 mL: nieves 1.5 mL; B= <i>G. lucidum</i> 1 mL: nieves 1 mL; C= <i>G. lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL; D= <i>G. lucidum</i> 0.5 mL: nutrisol 1.5 mL; E= <i>G. lucidum</i> 1 mL: nutrisol 1 mL; F= <i>G. lucidum</i> 1.5 mL: nieves 0.5 mL; G= <i>G. lucidum</i> 2 mL: nieves 0 mL; H= <i>G. lucidum</i> 0 mL: nieves 2 mL; I= <i>G. lucidum</i> 0 mL: nutrisol 2 mL..... | 82 |
| Figura 66. | pH de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos liofilizados de <i>Ganoderma lucidum</i> (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). J= <i>G. lucidum</i> 2 g: amaranto nieves 2 g; K= <i>G. lucidum</i> 2 g: amaranto nutrisol 2 g; L= <i>G. lucidum</i> 4 g: amaranto nutrisol 0 g; M= <i>G. lucidum</i> 0 g: amaranto nieves 4 g; N= <i>G. lucidum</i> 0 g: amaranto nutrisol 4 g..... | 83 |
| Figura 67. | Conductividad de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos liofilizados de <i>Ganoderma lucidum</i> (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). J= <i>G. lucidum</i> 2 g: amaranto nieves 2 g; K= <i>G. lucidum</i> 2 g: amaranto nutrisol 2 g; L= <i>G. lucidum</i> 4 g: amaranto nutrisol 0 g; M= <i>G. lucidum</i> 0 g: amaranto nieves 4 g; N= <i>G. lucidum</i> 0 g: amaranto nutrisol 4 g..... | 83 |
| Figura 68. | Polifenoles totales de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos liofilizados de <i>Ganoderma lucidum</i> (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). J= <i>G. lucidum</i> 2 g: amaranto nieves 2 g; K= <i>G. lucidum</i> 2 g: amaranto nutrisol 2 g; L= <i>G. lucidum</i> 4 g: amaranto nutrisol 0 g; M= <i>G. lucidum</i> 0 g: amaranto nieves 4 g; N= <i>G. lucidum</i> 0 g: amaranto nutrisol 4 g..... | 84 |
| Figura 69. | Contenido de proteína de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos liofilizados de <i>Ganoderma lucidum</i> (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). J= <i>G. lucidum</i> 2 g: amaranto nieves 2 g; K= <i>G. lucidum</i> 2 g: amaranto nutrisol 2 g; L= <i>G. lucidum</i> 4 g: amaranto nutrisol 0 g; M= <i>G. lucidum</i> 0 g: amaranto nieves 4 g; N= <i>G. lucidum</i> 0 g: amaranto nutrisol 4 g..... | 85 |
| Figura 70. | Rendimiento de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos liofilizados de <i>Ganoderma lucidum</i> (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). J= <i>G. lucidum</i> 2 g: amaranto nieves 2 g; K= <i>G. lucidum</i> 2 g: amaranto nutrisol 2 g; L= <i>G. lucidum</i> 4 g: amaranto nutrisol 0 g; M= <i>G. lucidum</i> 0 g: amaranto nieves 4 g; N= <i>G. lucidum</i> 0 g: amaranto nutrisol 4 g..... | 85 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 71. | Rendimiento de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos liofilizados de <i>Ganoderma lucidum</i> (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). J= <i>G. lucidum</i> 2 g: amaranto nieves 2 g; K= <i>G. lucidum</i> 2 g: amaranto nutrisol 2 g; L= <i>G. lucidum</i> 4 g: amaranto nutrisol 0 g; M= <i>G. lucidum</i> 0 g: amaranto nieves 4 g; N= <i>G. lucidum</i> 0 g: amaranto nutrisol 4 g..... | 86 |
| Figura 72. | Concentración de bacterias en 50 µL de inóculo de la CPB-1 (<i>Salmonella thypi</i>)..... | 90 |
| Figura 73. | Efecto del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g: nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano (CPB.1) <i>Salmonella thypi</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria..... | 91 |
| Figura 74. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g: nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-1 <i>Salmonella thypi</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-1. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Salmonella thypi</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento, P.E (C.E.) = Control de esterilidad..... | 91 |
| Figura 75. | Efecto del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g: nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano (CPB.1) <i>Salmonella thypi</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria..... | 92 |
| Figura 76. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g: nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-1 <i>Salmonella thypi</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-1. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Salmonella thypi</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 92 |
| Figura 77. | Efecto del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre el crecimiento bacteriano (CPB.1) <i>Salmonella thypi</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria..... | 93 |
| Figura 78. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-1 <i>Salmonella thypi</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-1. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Salmonella thypi</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 93 |
| Figura 79. | Efecto del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano (CPB.1) <i>Salmonella thypi</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria..... | 94 |
| Figura 80. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-1 <i>Salmonella thypi</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-1. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Salmonella thypi</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 94 |
| Figura 81. | Efecto del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre el crecimiento bacteriano (CPB.1) <i>Salmonella thypi</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria..... | 95 |

| | | |
|-------------------|--|-----|
| Figura 82. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-1 <i>Salmonella thypi</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-1. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Salmonella thypi</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 95 |
| Figura 83. | Concentración de bacterias en 50 µL de inóculo de la CPB-4 (<i>Streptococcus agalactiae</i>)..... | 96 |
| Figura 84. | Efecto del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g: nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria.... | 96 |
| Figura 85. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g: nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 97 |
| Figura 86. | Efecto del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g: nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 97 |
| Figura 87. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g: nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 98 |
| Figura 88. | Efecto del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 98 |
| Figura 89. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 99 |
| Figura 90. | Efecto del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S.= Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 99 |
| Figura 91. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 100 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Figura 92. | Efecto del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 100 |
| Figura 93. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-4, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 101 |
| Figura 94. | Concentración de bacterias en 50 µL de inóculo de la CPB-6 (<i>Streptococcus agalactiae</i>)..... | 101 |
| Figura 95. | Efecto del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g; nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-6, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 102 |
| Figura 96. | Efecto del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g; nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-6, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-6. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 102 |
| Figura 97. | Efecto del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g; nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-6, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria... | 103 |
| Figura 98. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g; nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-6, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-6. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 103 |
| Figura 99. | Efecto del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-6, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 104 |
| Figura 100. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-6, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-6. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 104 |
| Figura 101. | Efecto del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-6, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 105 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Figura 102. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-6, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-6. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 105 |
| Figura 103. | Efecto del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-6, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 106 |
| Figura 104. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-6, <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-6. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 106 |
| Figura 105. | Concentración de bacterias en 50 µL de inóculo de la CPB-7 (<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)..... | 107 |
| Figura 106. | Efecto del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g: nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-7, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 107 |
| Figura 107. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g: nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-7, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-7. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 108 |
| Figura 108. | Efecto del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g: nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-7, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 108 |
| Figura 109. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g: nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-7, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-7. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 109 |
| Figura 110. | Efecto del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-7, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria... | 109 |
| Figura 111. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-7, a <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-7. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 110 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Figura 112. | Efecto del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-7, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria... | 110 |
| Figura 113. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-7, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-7. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 111 |
| Figura 114. | Efecto del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-7, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria... | 111 |
| Figura 115. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-7, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-7. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> . B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 112 |
| Figura 116. | Concentración de bacterias en 50 µL de inóculo de la CPB-8 (<i>Escherichia coli</i>)..... | 112 |
| Figura 117. | Efecto del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g: nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-8, <i>Escherichia coli</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 113 |
| Figura 118. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g: nieves 2 g) (<i>Ganoderma lucidum</i> 2 g) (nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-8, <i>Escherichia coli</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-8. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Escherichia coli</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 113 |
| Figura 119. | Efecto del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g: nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-8, <i>Escherichia coli</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 114 |
| Figura 120. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g: nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-8, <i>Escherichia coli</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-8. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Escherichia coli</i> . B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 114 |
| Figura 121. | Efecto del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-8 <i>Escherichia coli</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 115 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Figura 122. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-8, <i>Escherichia coli</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-8. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Escherichia coli</i> . B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 115 |
| Figura 123. | Efecto del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-8, <i>Escherichia coli</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 116 |
| Figura 124. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-8, <i>Escherichia coli</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-8. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Escherichia coli</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 116 |
| Figura 125. | Efecto del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-8, <i>Escherichia coli</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 117 |
| Figura 126. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-8, <i>Escherichia coli</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-8. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Escherichia coli</i> . B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 117 |
| Figura 127. | Concentración de bacterias en 50 µL de inóculo de la CPB-9 (<i>Bacillus subtilis</i>)..... | 118 |
| Figura 128. | Efecto del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g; nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-9, <i>Bacillus subtilis</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 118 |
| Figura 129. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g; nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-9 a <i>Bacillus subtilis</i> las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-9. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> . B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 119 |
| Figura 130. | Efecto del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g; nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-9, <i>Bacillus subtilis</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 119 |
| Figura 131. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g; nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-9, <i>Bacillus subtilis</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-9. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> . B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 120 |
| Figura 132. | Efecto del extracto del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-9 <i>Bacillus subtilis</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 120 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Figura 133. | Efecto del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-9, a <i>Bacillus subtilis</i> las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-9. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> . B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 121 |
| Figura 134. | Efecto del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-9, <i>Bacillus subtilis</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 121 |
| Figura 135. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-9, <i>Bacillus subtilis</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-9. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 122 |
| Figura 136. | Efecto del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-9, <i>Bacillus subtilis</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 122 |
| Figura 137. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-9, a <i>Bacillus subtilis</i> las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-9. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 123 |
| Figura 138. | Concentración de bacterias en 50 µL de inóculo de la CPB-10 (<i>Staphilococcus aureus</i>)..... | 123 |
| Figura 139. | Efecto del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g; nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-10, <i>Staphilococcus aureus</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria... | 124 |
| Figura 140. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g; nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-10 <i>Staphilococcus aureus</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-10. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Staphilococcus aureus</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 124 |
| Figura 141. | Efecto del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g; nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-10, <i>Staphilococcus aureus</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria.... | 125 |
| Figura 142. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g; nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-10, <i>Staphilococcus aureus</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-10. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Staphilococcus aureus</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 125 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Figura 143. | Efecto del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-10 <i>Staphilococcus aureus</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 126 |
| Figura 144. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-10, <i>Staphilococcus aureus</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-10. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Staphilococcus aureus</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 126 |
| Figura 145. | Efecto del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-10, <i>Staphilococcus aureus</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 127 |
| Figura 146. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-10, <i>Staphilococcus aureus</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-10. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Staphilococcus aureus</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 127 |
| Figura 147. | Efecto del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-10, <i>Staphilococcus aureus</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 128 |
| Figura 148. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-10, <i>Staphilococcus aureus</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-10. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Staphilococcus aureus</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 128 |
| Figura 149. | Concentración de bacterias en 50 µL de inóculo de la CPB-11 (<i>Listeria monocytogenes</i>)..... | 129 |
| Figura 150. | Efecto del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g; nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-11, <i>Listeria monocytogenes</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria... | 129 |
| Figura 151. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g; nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-11 <i>Listeria monocytogenes</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-11. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Listeria monocytogenes</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 130 |
| Figura 152. | Efecto del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g; nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-11, <i>Listeria monocytogenes</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria... | 130 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Figura 153. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g: nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-11, <i>Listeria monocytogenes</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-11. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Listeria monocytogenes</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 131 |
| Figura 154. | Efecto del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-11 <i>Listeria monocytogenes</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 131 |
| Figura 155. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-11, <i>Listeria monocytogenes</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-11. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Listeria monocytogenes</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 132 |
| Figura 156. | Efecto del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-11 <i>Listeria monocytogenes</i> , a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 132 |
| Figura 157. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-11, <i>Listeria monocytogenes</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-11. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Listeria monocytogenes</i> . B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 133 |
| Figura 158. | Efecto del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-11, <i>Listeria monocytogenes</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 133 |
| Figura 159. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-11, <i>Listeria monocytogenes</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-11. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Listeria monocytogenes</i> . B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 134 |
| Figura 160. | Concentración de bacterias en 50 µL de inóculo de la CPB-13 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)..... | 134 |
| Figura 161. | Efecto del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g: nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-13, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria... | 135 |
| Figura 162. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g: nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-13, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-13. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 135 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Figura 163. | Efecto del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g: nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-13, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria... | 136 |
| Figura 164. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g: nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-13, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-13. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 136 |
| Figura 165. | Efecto del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-13 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 137 |
| Figura 166. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-13, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-13. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 137 |
| Figura 167. | Efecto del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-13 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 138 |
| Figura 168. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-13, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-11. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 138 |
| Figura 169. | Efecto del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-13, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C= Control de crecimiento de la bacteria..... | 139 |
| Figura 170. | Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-13, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-13. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad..... | 139 |
| Figura 171. | Nivel del efecto bacteriostático de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g: nieves 2 g) sobre las bacterias estudiadas..... | 141 |
| Figura 172. | Nivel del efecto bacteriostático de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g: nutrisol 2 g) sobre las bacterias estudiadas..... | 142 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Figura 173. | Nivel del efecto bacteriostático de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre las bacterias estudiadas..... | 143 |
| Figura 174. | Nivel del efecto bacteriostático de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave M (Nieves 4 g) sobre las bacterias estudiadas..... | 143 |
| Figura 175. | Nivel del efecto bacteriostático de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave N (Nutrisol 4 g) sobre las bacterias estudiadas..... | 144 |
| Figura 176. | Niveles de los efectos bacteriostáticos de cada microdilución de los suplementos alimenticios elaborados con extractos liofilizados del hongo <i>Ganoderma lucidum</i> y semillas de amaranto nieves y nutrisol con las diferentes cepas. J= <i>G. lucidum</i> 2 g; amaranto nieves 2 g; K= <i>G. lucidum</i> 2 g; amaranto nutrisol 2 g; L= <i>G. lucidum</i> 4 g; amaranto nutrisol 0 g; M= <i>G. lucidum</i> 0 g; amaranto nieves 4 g; N= <i>G. lucidum</i> 0 g; amaranto nutrisol 4 g..... | 145 |
| Figura 177. | Nivel del efecto bactericida de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave J (<i>G. lucidum</i> 2 g; nieves 2 g) sobre las bacterias estudiadas..... | 147 |
| Figura 178. | Nivel del efecto bactericida de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave K (<i>G. lucidum</i> 2 g; nutrisol 2 g) sobre las bacterias estudiadas..... | 148 |
| Figura 179. | Nivel del efecto bactericida de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave L (<i>G. lucidum</i> 4 g) sobre las bacterias estudiadas..... | 148 |
| Figura 180. | Nivel del efecto bactericida de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave N (Nutrisol 4 g) sobre las bacterias estudiadas..... | 149 |
| Figura 181. | Niveles de los efectos bactericidas de cada microdilución de los suplementos alimenticios elaborados con extractos liofilizados del hongo <i>Ganoderma lucidum</i> y semillas de amaranto nieves y nutrisol con las diferentes cepas. J= <i>G. lucidum</i> 2 g; amaranto nieves 2 g; K= <i>G. lucidum</i> 2 g; amaranto nutrisol 2 g; L= <i>G. lucidum</i> 4 g; amaranto nutrisol 0 g; M= <i>G. lucidum</i> 0 g; amaranto nieves 4 g; N= <i>G. lucidum</i> 0 g; amaranto nutrisol 4 g..... | 150 |

LISTA DE CUADROS

| | Página |
|---|--------|
| Cuadro 1. Especificaciones físicas del grano de amaranto..... | 14 |
| Cuadro 2. Especificaciones físico-químicas del grano de amaranto reventado... | 15 |
| Cuadro 3. Análisis microbiológicos para el grano de amaranto reventado..... | 16 |
| Cuadro 4. Ejemplos de alimentos funcionales..... | 16 |
| Cuadro 5. Suplementos alimenticios elaborados con extractos hidroalcohólicos de <i>Ganoderma lucidum</i> (CP-145), mezclado con extracto hidroalcohólico de semillas de amaranto nieves y nutrisol, en relación volumen a volumen (v/v), dando un total de 2 mL de suplemento alimenticio..... | 41 |
| Cuadro 6. Suplementos alimenticios elaborados con extractos hidroalcohólicos liofilizados de <i>Ganoderma lucidum</i> (CP-145), mezclado con extracto hidroalcohólico liofilizado de semillas de amaranto nieves y nutrisol, en relación peso a peso (p/p), dando un total de 4 g de sólidos resuspendidos en 10 mL de solvente hidroalcohólico..... | 42 |
| Cuadro 7. Material biológico utilizado y depositado en la UREGENHC del Colegio de Postgraduados, <i>Campus</i> Puebla para la presente investigación..... | 45 |
| Cuadro 8. Distribución de la prueba de susceptibilidad bacteriana usando extracto de hongo como agente antimicrobiano. Toda la placa contenía 100 μ L de medio de cultivo estéril Mueller Hinton (MH)..... | 48 |
| Cuadro 9. Clasificación por tamaños de la semilla de amaranto conocida como nieves en base a su peso (muestra de 5 kg)..... | 53 |
| Cuadro 10. Clasificación por tamaños de la semilla de amaranto variedad nutrisol..... | 54 |
| Cuadro 11. Análisis estadístico de las variables en estudio con el programa (SAS) de los suplementos alimenticios en relación (volumen/volumen) (n=3)..... | 65 |
| Cuadro 12. Comparación de las concentraciones de los extractos (mg/g) en cada nivel de dilución de los suplementos alimenticios usando extractos hidroalcohólicos (v/v) y probados en los bioensayos de la prueba de susceptibilidad bacteriana en microplaca..... | 79 |
| Cuadro 13. Comparación de las concentraciones de los extractos (mg/g) en cada nivel de dilución de cada ingrediente de los suplementos alimenticios usando extractos hidroalcohólicos (v/v) y probados en los bioensayos de la prueba de susceptibilidad bacteriana en microplaca..... | 80 |
| Cuadro 14. Análisis estadístico de las variables en estudio con el programa (SAS) de los suplementos alimenticios por gramo de muestra liofilizada en relación peso/peso (n=3)..... | 86 |
| Cuadro 15. Cantidad de extracto (mg/mL) en cada microdilución de los suplementos alimenticios liofilizados (p/p)..... | 140 |
| Cuadro 16. Cantidad de extracto (mg/g de liofilizado) en cada microdilución de los suplementos alimenticios liofilizados (p/p)..... | 140 |

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Cuadro 17. | Cantidad de extracto (mg/mL) en cada microdilución de los suplementos alimenticios liofilizados (p/p)..... | 145 |
| Cuadro 18. | Cantidad de extracto (mg/g de liofilizado) en cada microdilución de los suplementos alimenticios liofilizados (p/p)..... | 146 |
| Cuadro 19. | Objetivos de la propuesta estrategia para la elaboración de suplementos alimenticios con extractos del hongo <i>Ganoderma lucidum</i> y semillas de amaranto..... | 156 |

I. INTRODUCCIÓN

En países de Europa y actualmente en México, se ha propiciado el crecimiento de pequeñas industrias dedicadas a la elaboración y comercio de suplementos alimenticios, debido a que aportan nutrientes como vitaminas, minerales, proteínas, ácidos grasos esenciales, metabolitos y otros compuestos con funciones establecidas, basándose en los resultados que arrojan las investigaciones científicas, beneficiando la salud y la economía de los mexicanos.

Las propiedades funcionales de los hongos comestibles y medicinales pueden concentrarse en extractos acuosos y alcohólicos, con actividades funcionales y benéficas para el ser humano. Las sustancias antioxidantes han adquirido gran importancia en las investigaciones científicas, por su capacidad para proteger las células humanas de los efectos negativos de radicales libres, lo cual estas moléculas pueden dañar las células y se han asociado a enfermedades cardiacas, el cáncer, la diabetes, otras enfermedades neurodegenerativas, e incluso el aceleramiento de procesos fisiológicos tales como el envejecimiento (Martínez-Carrera *et al.*, 2010).

El amaranto es un cultivo originario de México que vale la pena investigar y recuperar. Su capacidad para crecer fácilmente en distintos climas del territorio nacional y su alta calidad nutricional, hacen del amaranto un buen candidato y para el desarrollo de nuevos productos con propiedades terapéuticas. Es necesario encontrar la forma de aumentar la aceptación de la población por el amaranto. Esto podría requerir el desarrollo de productos más atractivos y prácticos para el consumo diario, la elaboración de suplementos alimenticios fáciles de administrar, e incluso una estrategia de difusión sobre las propiedades nutraceuticas del amaranto (Algara *et al.*, 2013).

En los estados de Puebla y Morelos existen recursos genéticos como lo son el amaranto y hongos comestibles y funcionales, de tal manera que la elaboración de suplementos alimenticios a base de semillas de amaranto puede ser una alternativa para la elaboración de un paquete tecnológico para el sector rural, así como el sector privado, con impacto social, económico, ecológico y de salud en la sociedad.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Biotecnología de alimentos

La ingeniería genética tiene una importante función al tratarse del perfeccionamiento y mejoramiento de alimentos funcionales, lo que no sólo implica investigaciones biológicas y tecnológicas, sino también normativas y de comunicación ética. La biotecnología es una ciencia multidisciplinaria que se basa en la obtención de bienes y servicios utilizando los procesos biológicos y el conocimiento sobre las propiedades de los seres vivos. La biotecnología aplicada a los alimentos no sólo tiene como finalidad aumentar la producción, mejorar o modificar la funcionalidad, sino también atender la demanda de los consumidores para productos más seguros, frescos, y sabrosos.

El uso de la biotecnología para el desarrollo de variedades promueve beneficios inmensos, los cuales se relacionan con la sustentabilidad implicando una mayor producción de alimentos, con mayor calidad y valor nutricional, lo que influye en el futuro desempeño económico de los países y en la condición nutricional de sus poblaciones (Santos *et al.*, 2012). La aplicación de la biotecnología en la producción de alimentos existe desde hace miles de años y es una de las técnicas más antiguas de las que se tiene conocimiento. La biotecnología ha evolucionado mucho, convirtiéndose en uno de los campos de la ciencia más importantes y con muchas áreas aún por explotar, debido a los beneficios que presenta para la sociedad y el medio ambiente.

Además de mejorar productos para bajar costos o mejorar procesos de producción, la biotecnología contribuye a dar respuesta a la incógnita de la alimentación mundial. Las expectativas de suplir de alimentos a la población mundial son cada vez más ambiciosas en términos de cantidad y calidad. Así, la biotecnología ofrece alternativas inocuas, ambientalmente sostenibles y de producción escalonada (Garro, 2012).

2.2 Biotecnología y desarrollo

Es un conjunto de técnicas o procesos que emplean organismos vivos o sustancias que provengan de ellos para producir o modificar un alimento, mejorar las plantas o animales de los que provienen los alimentos, o desarrollar microorganismos que intervengan en los procesos de elaboración de los mismos. La inmensa mayoría de los alimentos que comemos sufren diversas transformaciones biotecnológicas para obtener el producto que llegará al

mercado. Los animales y las plantas de los que provienen estos alimentos han sido modificados por el hombre en múltiples aspectos para adecuarlos a las necesidades de producción, para mejorar sus propiedades nutritivas, o para cambiar sus cualidades sensoriales (olor, sabor, forma, color, textura, etc.). Una vez en la industria, muchas de estas materias primas animales o vegetales sufren transformaciones mediante microorganismos como bacterias, hongos o levaduras, los cuales también han sido seleccionados y mejorados previamente buscando unas características apropiadas. Igualmente, es práctica común en la industria alimentaria el empleo de enzimas y otros aditivos en algunas fases de la producción de los alimentos, los cuales, en su mayor parte, han sido producidos industrialmente a partir de microorganismos (Casal *et al.*, 2003).

2.3 Biotecnología y desarrollo de los hongos comestibles, medicinales y funcionales

Los hongos *Agaricus blazei* y *Grifola frondosa* son setas comestibles y medicinales, y *Ganoderma lucidum* es una seta medicinal, presentan actividad antitumoral, inmunomoduladora, hipocolesterolemia, antiviral y antidiabética. Actualmente, estos hongos son utilizados como materias primas para la producción de alimentos funcionales, por lo cual es importante desarrollar e implementar procesos que garanticen altos rendimientos y estabilidad funcional de la biomasa. El cultivo biotecnológico bajo condiciones automatizadas permite optimizar la producción de biomasa y bioactivos; sin embargo, un punto crítico es el secado de la biomasa, ya que se requiere de sistemas de secado que eviten la pérdida de su funcionalidad, debido a que esta es la materia prima utilizada y la fuente de los bioactivos (Rojas *et al.*, 2012).

2.4 Importancia del cultivo de los hongos comestibles

La producción mundial de los hongos (*Pleurotus*, *Lentinula*, *Agaricus*, y *Flammulina* principalmente) hasta 1996 fluctuaba en 4 909 000 ton/año. En México, ésta actividad comercial de hongos comestibles es relevante desde el punto de vista social, económico y ecológico ya que para el 2004 se registró un total de 6.2 millones de toneladas del cual 38,708 toneladas fueron producidas en México, lo que constituye el 59% del total de los países latinoamericanos y, por lo que nuestro país es considerado en el 18° lugar a nivel mundial, generando un importante impacto económico ya que el monto generado supera los 150

millones de dolares y los volúmenes de exportación aportan divisas a nuestro país por más de 4 millones de dolares anuales, generando 20 mil empleos directos e indirectos. La importancia ecológica de esta actividad económica radica en la utilización y reciclaje de más de 386,000 toneladas anuales de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales (Martínez-Carrera *et al.*, 2004). Actualmente, los volúmenes de producción en México ascienden a más o menos 62,374 toneladas anuales de hongos comestibles frescos. Nuestro país es el mayor productor de Latinoamérica y cuenta con los desarrollos tecnológicos ya que genera alrededor del 80.8% de la producción total de esa región, seguido por Brasil (7.7%) y Colombia (5.2%), ubicándose en el lugar 13 a nivel mundial. Los hongos comestibles que se cultivan o procesan comercialmente en México son: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Ganoderma* y *Ustilago*.

La cadena está formada por un conglomerado de ocho grandes empresas productoras y comercializadoras de champiñones blancos, cafés y orgánicos (*Agaricus bisporus*), setas (*Pleurotus spp.*), shiitake (*Lentinula edodes*), cuitlacoche (*Ustilago maydis*) así como alrededor de 600 pequeños productores de setas, reishi (*Ganoderma lucidum*) y maitake (*Grifola frondosa*). Los principales productores se localizan en los estados de Coahuila, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Veracruz.

El valor funcional y medicinal de los hongos comestibles, tanto del micelio así como del cuerpo fructífero, debido al descubrimiento de sus mecanismos biológicos de acción en el organismo humano están promoviendo un desarrollo en la cadena agroalimentaria (producción- consumo). El valor funcional y medicinal de los hongos comestibles incluye propiedades anticancerígenas, antibióticas, antibióticas (antimicrobianas, antivirales, antibacterianas, antiparasitarias), antioxidantes, reductoras del nivel de colesterol y la hipertensión, antitrombóticas y antidiabéticas. A partir de estas propiedades, se estima que se generan operaciones comerciales de alto valor agregado superiores a los 6 billones de dólares en los mercados internacionales de la industria alimentaria y farmacéutica. En los países de China y Japón los hongos *Lentinula*, *Ganoderma*, *Grifola* y *Pleurotus* se han utilizado para desarrollar alimentos funcionales diversos, tales como platillos, concentrados, extractos, aderezos (micelio o cuerpos fructíferos pulverizados).

2.5 Cultivo del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*

Ganoderma es el género más grande de los Aphyllophorales con más de 300 especies. Se sabe que causan podredumbre de la raíz de los árboles de madera dura, y son importantes por ser conocidos como setas medicinales en el continente asiático (Bhosle *et al.*, 2010). *Ganoderma lucidum*, es un hongo medicinal popular, ha sido utilizado como remedio casero en la medicina tradicional china (MTC) en muchos países asiáticos durante los últimos dos milenios. Su consumo regular es en la forma de polvo del hongo tomándolo en té, se creía para preservar el la vitalidad humana y promover la longevidad (Sliva, 2006).

2.6 Plantas nativas comestibles y funcionales de México

Las cualidades especiales de las plantas medicinales como remedio para combatir todo tipo de enfermedades se remontan a tiempos prehistóricos. Su aprovechamiento sin duda comenzó con la continua experimentación de materiales vegetales diversos, que de acuerdo a sus características únicas ofrecían agradables aromas, sabores en los alimentos, alivio del dolor y cura de enfermedades. Hasta el siglo XIX, las plantas y algunos productos de origen animal y mineral fueron los únicos medicamentos empleados por el hombre en los países occidentales, y siguen siendo hoy en día la única fuente terapéutica utilizada en numerosas zonas del mundo. Se han identificado hasta 5,000 especies que tienen aplicaciones curativas, las cuales son comúnmente utilizadas por más de 60 grupos étnicos, muchos de los usos están restringidos por las autoridades de salud, sin embargo, en regiones marginadas forman parte de la tradición y cultura popular (Juárez-Rosete *et al.*, 2013).

Una de las plantas alimentarias de las cuales se saben sus bondades empíricas desde hace siglos y sus comprobaciones científicas al día de hoy, es la planta huautli, amaranto, bleo (*Amaranthus hypochondriacus* L.) que es una planta de 1 a 1.5 m de altura, anual, de tallo color rojizo. Las panículas se colectan a los cinco meses. Fue después del maíz el cultivo más querido y usado en tiempos precortesianos. Lo importante que hay que señalar es la gran proyección que pueden tener sus semillas como alimento solo o como acompañante. Las hojas tienen un alto valor nutritivo y sirven como verdura (Gispert-Cruells, 1997).

2.6.1 El amaranto

El amaranto es un cultivo muy antiguo. Su presencia en México data de 4000 AC en Tehuacán, Puebla (Teutónico y Knorr, 1985), y por lo tanto es uno de los alimentos más antiguos cultivados. Este grano fue nutriente importante para los aztecas, Mayas, Incas y otras civilizaciones. Se utiliza para preparar un pan especial usando en ceremonias religiosas y, por esta razón, el cultivo fue prohibido por los españoles cuando llegaron en Estados Unidos. El amaranto pertenece a la familia Amaranthaceae y al género *Amaranthus* comprende unas 60 especies distribuidas en todo el mundo. En el estado de Morelos se encuentran distribuidas seis especies. Se considera al amaranto como un alimento de excelente calidad proteica, ya que se asemeja a la proteína ideal y con una digestibilidad similar a la del pan blanco (Contreras *et al.*, 2011).

En nuestro país son más pocas las entidades que producen amaranto según el sistema agrícola y pecuario de la SAGARPA, en los últimos diez años las entidades que han contribuido a la producción nacional de este cultivo son: el Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro y Tlaxcala. Sin embargo, la producción se concentra en el Distrito Federal, Morelos, Tlaxcala, Estado de México, y Puebla. La SAGARPA considera que México está a la vanguardia a nivel mundial en este cultivo y transformación del amaranto, independientemente de que existe un importante mercado potencial en países desarrollados. Se destaca Puebla como el principal productor a nivel nacional, pues en 2006 produjo el 71% de la producción; es decir más de 2,300 toneladas de las 3 mil 300 obtenidas en todo el país.

Y en el mercado mundial el amaranto es muy atractivo, pues en Europa, Estados Unidos y Japón, existe una gran demanda y este producto se paga en alrededor de \$ 1,400.00 pesos M.N por tonelada. Las ventajas económicas del amaranto también son diversas, colocándolo muy por encima de los cultivos tradicionales como el maíz y el frijol. Según la Asociación Mexicana de Amaranto (AMA), el rendimiento económico del amaranto en zonas de temporal y de riego es mayor que las siembras de otras especies tradicionales. Esto debido a que es un cultivo de ciclo corto, con requerimiento muy bajo de agua, resistente a las sequías y con un valor nutricional y de mercado. Cabe destacarse que la productividad por hectárea es un aliciente adicional, ya que según se tiene conocimiento de que al aumentar la experiencia del productor primario con relación al manejo de este cultivo, la producción tiende a crecer,

llegando en ocasiones a obtener hasta 2.5 toneladas por hectárea bajo condiciones de temporal; en condiciones de suelo, humedad y temperatura, llega hasta los 5,000 kg/ha en riego.

Finalmente, se debe mencionar las desventajas económicas del cultivo del amaranto como los menores rendimientos promedio por hectárea, comparados contra cultivos tradicionales y sobre todo los altos costos de producción, relacionados a la utilización de mano de obra en exceso ya que requiere una gran cantidad de labores manuales como cortar la panoja, secarla, trillarla, y seleccionarla, entre otras (Sosa, 2013).

2.6.2 Valor nutricional y funcional del amaranto

Recientemente, la planta de amaranto ha despertado gran interés por parte de la comunidad científica debido a sus características y propiedades. La mayoría de la población asocia el consumo de amaranto a sus propiedades nutricionales y más específicamente al alto contenido de proteína la cual puede variar desde un 15% hasta un 38% en algunas especies. Es considerado erróneamente como un cereal y consumido por la población como tal, no pertenece al mismo grupo botánico que el maíz, arroz y trigo, sin embargo, debido a que sus semillas son parecidas y pueden ser empleadas para producir harinas y otros productos semejantes a los de estos granos se le atribuye esta connotación. La planta de amaranto en general tiene ventajas sobre otros cereales no sólo por el alto contenido de proteína presente en el grano, sino por la capacidad de aprovechamiento de la misma ya que la parte comestible constituye entre el 50 y 80%, principalmente. Las hojas pueden ser utilizadas como verdura junto con la inflorescencia para el consumo humano. El bajo contenido de gluten lo hace una excelente fuente de nutrientes para personas que padecen enfermedades celiacas (intolerancia al gluten). La cantidad de proteína de las hojas de amaranto es semejante a la de la espinaca (3.5%) pero contiene mayor cantidad de fibra que ayuda como preventivo de diverticulosis y cáncer de colon.

El amaranto parece estar más lejos de ser considerado un simple seudocereal y más cerca de ser considerado un alimento nutraceutico y funcional. Los reportes científicos sobre amaranto sugieren que la planta contiene agentes potencialmente beneficiosos para la salud, lo que parece darle un valor agregado a este alimento a nivel local, nacional e internacional. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de beneficios reportados todavía parece que estamos

lejos de descubrir todo sobre el amaranto, por lo que muchas investigaciones aún están en desarrollo.

Si bien la carne ocupa un lugar privilegiado en la sociedad por su contenido proteico, el costo aun es elevado y no está al alcance de la población pobre, lo que hace que la dieta del mexicano en condiciones de pobreza y extrema pobreza sea deficiente, sobre todo en proteínas y calorías. La calidad nutritiva y los rasgos biológicos del amaranto han hecho que países como China, India, Estados Unidos y el continente Africano se interesen en su consumo. Las semillas de amaranto son una fuente superior de proteínas, que pueden satisfacer gran parte de la ración recomendada de proteína para niños y proveer aproximadamente 70% de la energía de la dieta. Desde el punto de vista nutricional y alimentario, el amaranto es un alimento completo, ya que contiene ocho aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. En general los granos de amaranto proporcionan una adecuada cantidad de aminoácidos esenciales. La variedad que se consume en México tiene en promedio 16-18% de proteína, lo cual lo pone en ventaja con otras variedades de cereales como el trigo que contiene entre 12-14% o el maíz con un 9-10%. Cabe mencionar que la calidad de la proteína es sobresaliente por su alto contenido de lisina, un aminoácido esencial, siendo casi el doble que el trigo y tres veces más que el maíz, convirtiéndolo en un complemento nutricional óptimo. La composición de proteínas presentes en el amaranto incluye: albúmina rica en lisina, triptófano, treonina y valina; globulina la cual es rica en leucina y treonina y, las glutelinas ricas en leucina, triptófano, treonina e histidina. Actualmente, se ha reconocido al amaranto por sus propiedades proteínicas, sin embargo, no es el único nutriente de valor. Sus semillas contienen alto contenido de grasas mono y poliinsaturadas, tales como el ácido linoleico mejor conocidos como aceites Omega-3. Estos aceites esenciales han cobrado gran interés por los usuarios, debido a sus recientes descubrimientos sobre los beneficios a la salud y en contra de algunos problemas cardiovasculares.

Las semillas de amaranto contienen una buena proporción de estos aceites y representa entre un 6 y 10% de la semilla. La gran variedad de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados son de gran importancia para su consumo sin embargo, destaca la presencia del escualeno el cual representa alrededor del 5-8% del total de aceite. Esta cantidad varía dependiendo del tipo de amaranto. El escualeno, como ácido graso insaturado, es muy similar en su estructura al beta-caroteno siendo un metabolito intermedio en la síntesis del colesterol.

No es muy susceptible a la peroxidación y actúa como protector a la exposición de radiación UV, algunos estudios refieren su uso como terapia adjunta para una variedad de cáncer.

En lo que respecta a otros componentes nutricionales, el contenido de proteínas crudas, lípidos, fibra y cenizas de la semilla de amaranto por lo general es más alto que los de los cereales. La semilla contiene sodio, potasio, calcio, magnesio, zinc, cobre, manganeso, níquel y hierro. Además contiene tocotrienoles y otros componentes con propiedades antihipertensivas recientemente investigadas y de gran interés científico (Algara *et al.*, 2013).

2.6.3 Norma Mexicana NMX- FF-114-SCFI-2009, denominada “Grano de amaranto”

“Especificaciones de calidad y métodos de ensayo”. En ella se establece las especificaciones de calidad del grano de amaranto que se cosecha, procesa y comercializa en el territorio nacional para uso y consumo humano, excluyendo el grano de amaranto genéticamente modificado. Los granos de amaranto, en cualquiera de sus grados de calidad, deben estar exentos de sabores y olores extraños, y presentar color típico de la variedad. Estas especificaciones se verifican sensorialmente. Además deben cumplirse especificaciones fisicoquímicas y sanitarias. La declaratoria de vigencia de esta norma fue publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de agosto de 2009. Existe un proyecto de Norma PROY NMX-116-SCFI-2010, “Grano reventado de amaranto (*Amaranthus* spp.) Para uso y consumo humano”. En las etapas de trilla y encostado pueden existir riesgos de contaminación por metales, vidrios y cristales, además de riesgos químicos por la condición de almacenaje en espacios pequeños por productores en lugares cerca de los corrales de sus animales de traspatio, insecticidas, diesel, ya que todo se almacena en el mismo espacio. Un mecanismo de salvaguarda inherente al proceso de transformación de amaranto es que el proceso de reventado a temperaturas superiores a los 200° C volatiliza casi la totalidad de químicos.

Para cumplir con la norma, los granos de amaranto reventado, en cualquiera de sus grados de calidad deben estar limpios, es decir, exentos de cualquier materia extraña visible, de plagas y daños causados por ellas, que afecten al aspecto general del producto, de humedad anormal, de cualquier olor y/o sabor anormal o que indiquen rancidez y deben tener el color característico de la variedad., estas especificaciones se verifican sensorialmente. Asimismo, el grano reventado de amaranto debe cumplir con especificaciones físicas, fisicoquímicas, microbiológicas y toxicológicas (Ayala *et al.*, 2010).

2.7 Cultivo e importancia económica del amaranto

La superficie sembrada de amaranto en el año 2009 fue de 3,654.00 ha, obteniéndose una mayor producción con 4,433.33 toneladas, dando un valor de producción de \$ 35,557.16 M.N y la más baja se obtuvo en el 2005 con una superficie sembrada de 1,954.00 ha, y una producción de 2,857.7 toneladas con tan solo un valor de \$14,427 M.N. En el 2012 se sembraron 3,266.8 ha, obteniendo una producción de 4,159.76 toneladas y un valor de producción de \$ 26,495.71 pesos M.N (Fig. 1).

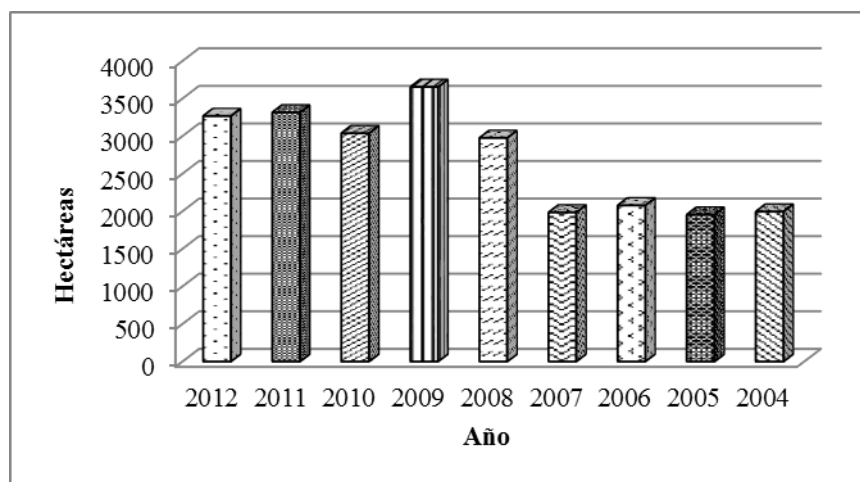


Figura 1. Superficie sembrada a nivel nacional, tomado de Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).

Puebla

Para el Estado de Puebla la mayor cantidad de hectáreas sembradas en los últimos 10 años fue de 2,816 ha en el 2008, mientras que el año 2003 se obtuvieron menor cantidad de ha sembradas siendo el más bajo en ese periodo con un promedio de 709 ha (Fig. 2).

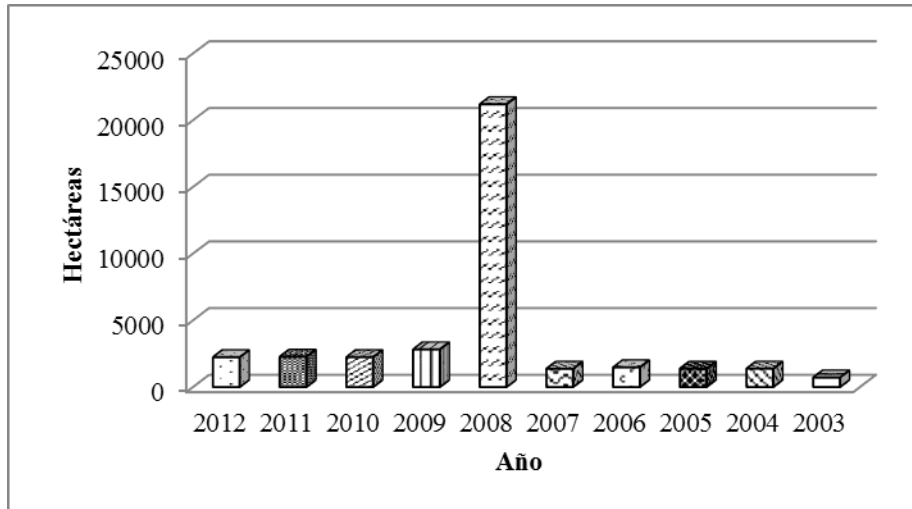


Figura 2. Superficie sembrada de amaranto en el Estado de Puebla. Tomado de Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).

El año 2009 fue en el que obtuvo mayor producción de amaranto teniendo como producción 3,355.68 toneladas y un valor de producción de \$ 21,336.87 pesos M.N, mientras que el año 2003 se obtuvieron menor cantidad de toneladas producidas siendo la más baja en ese periodo con un promedio de 1320 toneladas y un valor de producción de \$ 4150 pesos M.N (Fig. 3).

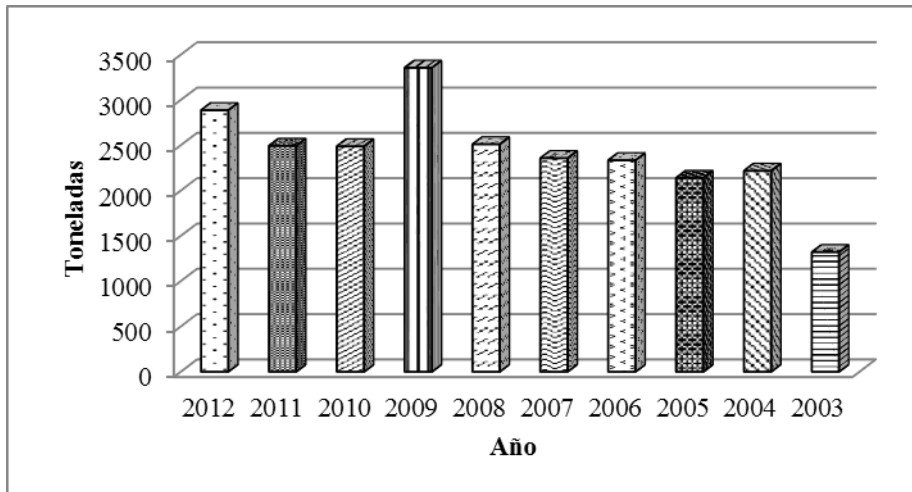


Figura 3. Producción de amaranto en el Estado de Puebla. Tomado de Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).

Morelos

La mayor superficie sembrada en el Estado de Morelos en los últimos 10 años fue de 329 ha en el 2009, mientras que el año 2003 se obtuvieron menor cantidad de ha sembradas siendo el más bajo en ese periodo con un promedio de 268.8 ha (Fig.4).

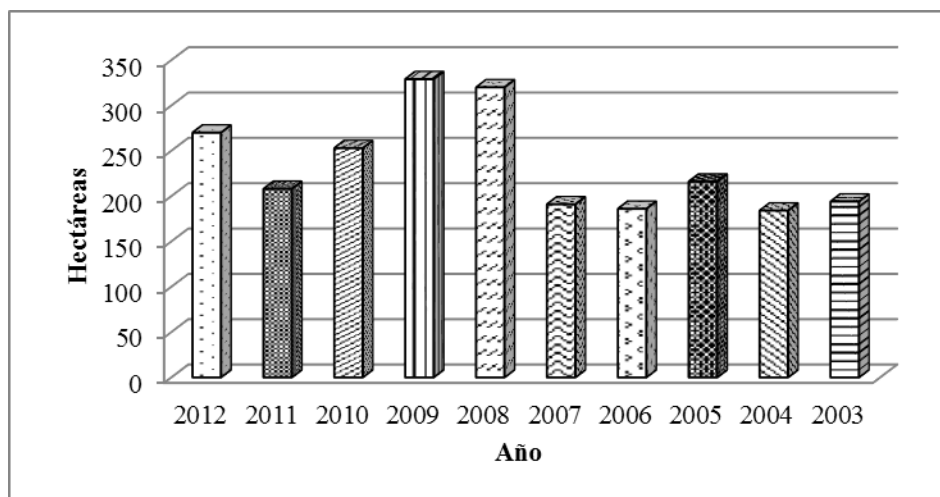


Figura 4. Superficie sembrada de amaranto en el Estado de Morelos. Tomado de Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).

En el año donde se obtuvieron más toneladas fue el año 2008, con 574.6 toneladas, obteniendo un valor de producción de \$8,492.20 pesos M.N, mientras que el año 2003 se obtuvieron menor cantidad de toneladas producidas siendo el más bajo en ese periodo con un promedio de 268.8 toneladas y un valor de producción de \$ 3444.72 pesos M.N (Fig. 5).

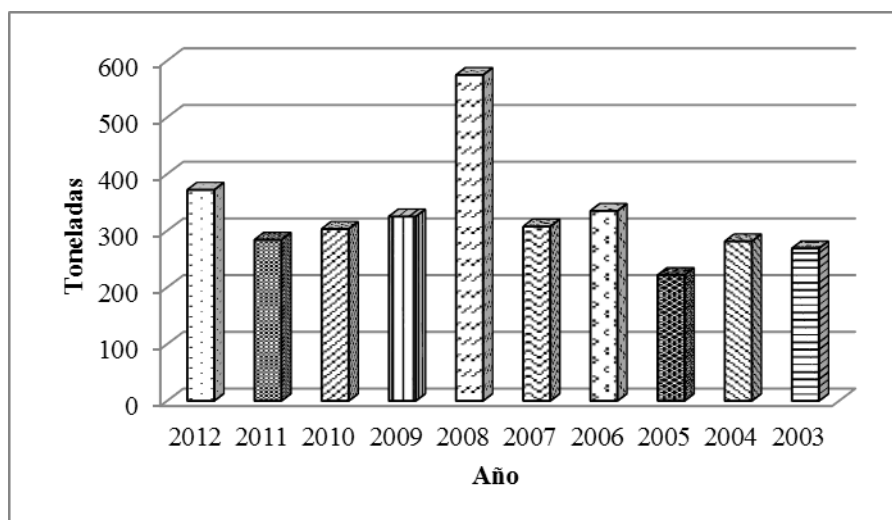


Figura 5. Producción de amaranto en el estado de Morelos. Tomado de Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).

Los pobladores de Huazulco señalan que la expansión del oficio a comunidades cercanas se debe a que los trabajadores aprenden en sus talleres el conocimiento tradicional de hacer dulce con un mínimo de capital de inversión y tener su propio taller. La forma organizativa de los talleres dulceros descansa en la estructura que provee la unidad doméstica, en específico la

mano de obra familiar y el espacio de la casa se destina para adecuar un lugar de trabajo. Estos talleres suelen alternar entre una y otra mercancía, unas veces palanqueta, otras alegría, o bien hacer varios artículos de manera simultánea, en cuyo caso se añade a la lista el dulce de tamarindo, el jamoncillo y la oblea.

Hasta la fecha los productores de dulces cuentan con un capital para invertir en sus talleres y cuentan con permisos de venta, tienen la oportunidad de ir a vender en los mercados a donde sus abuelos también iban, entre los cuales sobresalen: Ozumba, Atlatlahucan, Yecapixta y Totolopan, entre otros. Además de estos sitios y de la venta a través de intermediarios locales, los mismos productores de dulces han ampliado el área comercial, con lo cual abarcan a clientes en el Estado de Puebla, Distrito Federal, Acapulco, Guadalajara, Querétaro, el Estado de México y Monterrey (Moctezuma, 1994).

2.8 Productos elaborados de amaranto

Los dulces de amaranto que se elaboran en el pueblo de Huazulco son los siguientes, cereal de amaranto, cereal de amaranto con miel, chococereal amaranto, churro de amaranto, granola clásica, granola especial, alegría chica, alegría surtida, bombón de amaranto, mazapán de amaranto, mini oblea de amaranto, galleta de amaranto, harina de amaranto, principalmente.

2.9 Comercialización de productos a base de amaranto

La comercialización del grano se realiza por agentes de diversos tamaños, actualmente existen centros de acopio que han sido creados por productores primarios, que entregan el grano limpio a las agroindustrias. Existen diversas formas de comercializarlo, como semilla, amaranto reventado y harina integral que se venden a las agroindustrias según su interés, consolidación y escala (Manrique de Lara Soria, 2011). Existen cuatro grandes industrias que se dedican a la comercialización en gran escala del amaranto procesado: Qually, Xomor, Grupo San Miguel de Proyectos Agropecuarios, Expo Food (Espitia-Rangel, 2012). De acuerdo a Manrique de Lara Soia (2011), estos grupos se encuentran consolidados y han exportado productos e incluso han vendido a grandes corporativos como Gamesa (Manrique de Lara Soria, 2011). La Asociación Mexicana de Amaranto detalla que desde hace unos cuantos años la producción y la valoración del amaranto como alimento se está retomando a raíz de la demanda de grandes empresas, como Nestlé y Bimbo, que han incursionado en la

producción de la llamada barrita energética. Otro de los grandes consumidores ha sido el gobierno federal, a través del Sistema Nacional para el Desarrollo Integral de la Familia (DIF) y Diconsa, instituciones que adquieren productos hechos con amaranto para niños y adultos, lo que también ha alentado la producción. En pequeña escala, la comercialización del amaranto es uno de los aspectos más vulnerables de la cadena, puesto que más del 80% de la producción es comercializada por intermediarios, quienes deciden el precio a inicios de la temporada de cosecha y lo van incrementando o disminuyendo, dependiendo de la oferta y la demanda, es decir, los productores que venden volúmenes pequeños son los más vulnerables, ya que están expuestos a la fijación de precios de los intermediarios. En los estados de Morelos, Tlaxcala y Distrito Federal, la comercialización de los productos a pequeña escala se realiza en un local, en algunas ocasiones, este forma parte de las casas, en ellos se comercializan productos de elaboración propia. Los compradores arriban a los pequeños comercios y adquieren productos al menudeo y mayoreo para posteriormente venderlos al consumidor final en otros lugares. Existen tres categorías para el grano de amaranto reventado y cada categoría cuenta con especificaciones físicas, como el: porcentaje de amaranto retenido en la criba 16, grano negro, grano quemado, contenido de material ferroso y partículas metálicas como se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Especificaciones físicas del grano de amaranto.

| Especificaciones | Categoría I | Categoría II | Categoría III |
|------------------------------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| Reventado (% retenido en criba 16) | 100 a 96 | 95.9 a 90 | Menor a 90 |
| Grano negro (%) | ≤ 0.5 | | |
| Grano quemado (%) | Ausente | No aplica | |
| Contenido de material ferroso (%) | 0.05 | 0.051 a 0.20 | |
| Partículas metálicas | Ausente | | |

Y de acuerdo con su grado de calidad, el grano de amaranto reventado se dividen en dos categorías lo cual deben de cumplir con las especificaciones fisicoquímicas tales como humedad, proteína bruta, extracto etéreo, cenizas, fibra cruda, densidad, índice de peróxidos y metales pesados, cada tipo de especificación cuenta con los valores que se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Especificaciones físico-químicas del grano de amaranto reventado.

| Especificaciones | Grados de calidad | |
|--|--|--------------|
| | Categoría I | Categoría II |
| Humedad (g/100 g) | 0.1 a 2.8 | 2.9 a 3.5 |
| Proteína bruta (g/100 g) | ≥ 14.0 | ≤ 13.9 |
| Extracto etéreo (g/100 g) | ≥ 8 | ≤ 7.9 |
| Cenizas (g/100 g) | 2 a 2.9 | |
| Fibra cruda(g/100 g) | 2 a 5.4 | |
| Densidad (kg/HL) | ≤ 14.3 | ≥ 14.4 |
| Índice de peróxidos (meq peróxidos/kg) | ≤ 7.0 | 7.1 a 9.0 |
| Metales pesados (mg/kg) | Plomo: 0.5, cadmio: 0.1, mercurio: 0.01 y arsénico | |

Además del aspecto físico y de las especificaciones fisicoquímicas que determinan la calidad del grano de amaranto, otra parte muy importante consiste en la inocuidad del producto, en la cual también se halla involucrada la calidad, la cual trata de las especificaciones microbiológicas tales como: mohos y levaduras, mesófilos aeróbicos, coliformes totales, *Salmonella* ssp. y *Staphylococcus aureus*, sus límites máximos se mencionan en el cuadro 3.

Cuadro 3. Análisis microbiológicos del grano de amaranto reventado.

| Especificaciones | Límites máximos |
|--------------------------------|-----------------|
| Mohos y levaduras | 100 |
| Mesófilos aerobios (UFC/g) | 5000 |
| Coliformes totales (UFC/g) | 30 |
| <i>Salmonella</i> ssp. en 25 g | Ausente |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 100 |

2.10 Origen del concepto de alimento funcional

El término alimento funcional fue propuesto por primera vez en Japón en la década de los 80's con la publicación de la reglamentación para los "Alimentos para uso específico de salud" ("Foods for specified health use" o FOSHU) y que se refiere a aquellos alimentos procesados los cuales contienen ingredientes que desempeñan una función específica en las funciones fisiológicas del organismo humano, más allá de su contenido nutricional. Los alimentos de este tipo son reconocidos porque llevan un sello de aprobación del Ministerio de Salud y Bienestar del gobierno japonés. Algunas de las principales funciones son las relacionadas con un óptimo crecimiento y desarrollo, la función del sistema cardiovascular, los antioxidantes, el metabolismo de xenobioticos, el sistema gastrointestinal, entre otros (Alvídrez-Morales *et al.*, 2002). La lista de alimentos funcionales presentes hoy en los supermercados e hipermercados

es extraordinaria, pues hay tanto alimentos no modificados (pescado azul, legumbres.) como procesados industrialmente.

En el cuadro 4 se indican los principales tipos de alimentos funcionales modificados, según una clasificación simple que atiende a su propio momento histórico de aparición. El desarrollo inicial de alimentos funcionales consistió en los llamados alimentos «fortificados», por su mayor contenido en vitamina C, vitamina E, fibra, ácido fólico, cinc, hierro y calcio (p. ej., pan con fibra o zumo de frutas enriquecido con vitamina C). Posteriormente, la atención se centró en los llamados alimentos «enriquecidos» con nutrientes no presentes normalmente de forma natural, cuya finalidad era prevenir ciertas enfermedades, como las cardiovasculares o el cáncer. Es el caso de las margarinas con prebióticos o esteroides. El empleo de alimentos «alterados» constituye un paso más adelante; en ellos se sustituye el componente supuestamente perjudicial por otro más beneficioso, como el producto cárnico al que se le retira la grasa y se sustituye por fibra alimentaria, o la leche desnatada con ácidos grasos omega-3. Por último, se tiende a mejorar también las materias primas, de modo que uno de los nutrientes aumenta de manera natural al permitir una manipulación genética o una manipulación del alimento. Es el caso de los huevos enriquecidos con omega-3 por modificación de la alimentación de los pollos. Los alimentos funcionales se han desarrollado en casi todas las categorías alimentarias, pero los segmentos en que más presencia tiene son los productos lácteos, las bebidas de refresco, los zumos, los productos de pastelería y los de la alimentación infantil.

Cuadro 4. Ejemplos de alimentos funcionales.

| Tipo de alimento funcional | Definición | Ejemplo |
|----------------------------|---|--|
| Producto fortificado | Alimento en el que se aumenta la concentración o cantidad de un nutriente presente de forma natural. | Zumo de frutas fortificado con vitamina C. |
| Producto enriquecido | Alimento al que se le añaden nuevos nutrientes o componentes no presentes de forma natural en él. | Margarina con esteroides, probiótico o prebióticos. |
| Producto alterado | Alimento cuyo supuesto componente perjudicial se ha eliminado reducido y sustituido por otro componente beneficioso. | Productos cárnicos en los que la grasa se sustituye por fibra dietética. |
| Materias primas mejoradas | Alimento en el que uno de los componentes aumenta a través de condiciones de cultivo, crianza del animal, nueva composición de los piensos o abonos o, manipulación genética. | Huevos con mayor contenido en omega-3 por alteración de los piensos enriquecidos en pescado. |

(Vitoria y Dalmau, 2009).

2.11 Suplementos alimenticios

Son productos a base de hierbas, extractos vegetales, alimentos tradicionales, deshidratados o concentrados de frutas, adicionados o no, de vitaminas o minerales, que se puedan presentar en forma farmacéutica y cuya finalidad de uso sea incrementar la ingesta dietética total, complementarla o suplir algún componente, de acuerdo al artículo 215, fracción V, de la Ley General de Salud (Cofepris @ 2010). Algunos suplementos alimenticios están compuestos por polifenoles que pueden ser divididos en varios subgrupos atendiendo a su estructura básica. Los flavonoides, con estructura básica C6-C3-C6, incluyen a las antocianinas, los flavonoles y flavonas, las flavanonas, chalconas y dihidrochalconas, las isoflavonas y los flavan-3-oles. Otro subgrupo importante es el de los fenil propanoides que incluye a los derivados de ácidos hidroxicinámicos (cafeico, ferúlico, sinápico, p-cumárico). También tienen importancia los estilbenoides (resveratrol) y los derivados del benzoico (ácido gálico y elágico, etc.). Muchos compuestos fenólicos son en parte responsables de las propiedades organolépticas de los alimentos de origen vegetal y por tanto tienen importancia en la calidad de los mismos.

Desde el punto de vista de su actividad biológica muchos polifenoles tienen propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere actividad antioxidante, que podría estar relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer. Existen también sustancias con actividad estrogénica (fitoestrógenos), como las isoflavonas, los lignanos y el estilbeno resveratrol, mientras que otros, como los taninos, son capaces de fijar metales y proteínas, lo que afecta a la biodisponibilidad de éstos y puede estar en el origen de algunos efectos inespecíficos (por ejemplo, antimicrobianos), o prevención de enfermedades neurodegenerativas (Tomás-Barberán, 2003).

Los compuestos antioxidantes poseen una estructura química apropiada para reaccionar fácilmente con un radical libre, de modo que desde el punto de vista químico, un antioxidante es una sustancia que evita o retrasa la oxidación de otra. Esta acción se realiza mediante la reducción de un agente oxidante para lo cual los antioxidantes deben tener una estructura química que permita la donación de iones hidrógenos o de electrones como resultado de dicha interacción.

Las defensas del cuerpo humano pueden no ser suficientes para aliviar el estrés oxidativo. Por lo tanto, ciertas cantidades de antioxidantes exógenos naturales son recomendadas para mantener un nivel adecuado de antioxidantes con el fin de equilibrar los radicales libres. La

presencia natural de antioxidantes en los alimentos cumplen la función de prevenir o retardar el daño oxidativo que afecta a los lípidos y, en menor grado a las proteínas. Como consecuencia de ello, protegen a los alimentos contra la pérdida del valor nutricional asociada al consumo oxidativo de dichos nutrientes. Harman (1956), propuso la teoría de los radicales libres en el envejecimiento, sugiriendo que los radicales libres producidos durante la respiración aerobia causan daño oxidativo que se acumula, y resulta en una pérdida gradual de los mecanismos homeostáticos, en una interferencia de patrones de expresión génica y pérdida de la capacidad funcional de la célula, lo que conduce al envejecimiento y a la muerte. De acuerdo con dicha teoría, existe interrelación entre la generación de oxidantes, la protección antioxidante y la reparación del daño oxidativo (los 2 últimos pueden ser inducidos en respuesta al daño).

Se considera que la mitocondria es la fuente generadora de especies reactivas del oxígeno (ERO) más importante. El incremento en la formación de O_2^- y H_2O_2 se justifica con el hallazgo de que en el envejecimiento se modifican las condiciones del flujo de electrones en la cadena de transporte de estos. Existen múltiples evidencias que corroboran la importancia de la disfunción mitocondrial en la patogénesis de la destrucción celular que causa envejecimiento, y es el estrés oxidativo el principal inductor de esas alteraciones. La hipótesis del estrés oxidativo en el envejecimiento refiere a que los genes que gobiernan la secuencia y duración de varias fases ontogenéticas están ligados al gasto de una suma definida de energía. El nivel de estrés oxidativo depende de la velocidad de generación de oxidantes y de los niveles de defensa antioxidante, los cuales están genéticamente controlados, pero están influenciados también por factores epigenéticos (Céspedes, 2000).

2.12 Propiedades antimicrobianas

Molécula natural (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintética o semisintética, capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias, virus u hongos. Hoy en día no se utilizan moléculas de origen natural, por lo cual no se establece más la diferenciación con quimioterápicos, término usado para referirse a las moléculas de origen sintético y sus derivados. Utilizaremos el término antibiótico para referirnos al subgrupo de antimicrobianos con actividad antibacteriana.

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo (Seija y Vignoli, 2008).

2.13 Bacterias nocivas para el hombre

Pseudomonas. En asistencia primaria suelen encontrarse produciendo infección urinaria, otitis o cuadros respiratorios en EPOC o fibrosis quística. Presentan resistencia intrínseca a ampicilina, cefazolina, cefuroxima y ácido nalidíxico, pero las fluoroquinolonas, a pesar de ser menos eficaces en *Pseudomonas* que en enterobacterias por su menor capacidad de penetrar la membrana externa y menor actividad sobre la grasa, pueden ser una alternativa para el tratamiento de estas infecciones. La resistencia a ciprofloxacino es frecuente en enfermos con fibrosis quística (Pérez, 1998).

Salmonella typhi. Existen varios fármacos disponibles para el tratamiento de la fiebre tifoidea. El cloranfenicol continúa siendo utilizado ampliamente, y como alternativas están la ampicilina y el TMP/SMZ. Sin embargo, se ha observado un incremento en la resistencia durante los últimos cinco años, con porcentajes cercanos a 40% para las tres drogas mencionadas; en estos casos es necesario utilizar fluoroquinolonas para el tratamiento de la enfermedad.

En los años setenta se identificó en México y Centroamérica un brote debido a *S. typhi* multiresistente. La resistencia a cloranfenicol en México, durante 1972, fue mayor a 75%, y más de 92% de las cepas resultaron resistentes, además, a tetraciclina, estreptomina y sulfonamidas. Posteriormente hubo un franco descenso en la resistencia para ampicilina, cloranfenicol y TMP/SMZ (5-10, 5 y 10%, respectivamente), el cual se ha mantenido. (Solórzano-Santos y Miranda-Novales, 1998).

Salmonella, en el ámbito mundial, está asociada con mucha frecuencia a las enfermedades diarreicas, las cuales continúan siendo una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad sobre todo en lactantes, niños y ancianos. Se ha estimado que en Asia, África y Latinoamérica, dependiendo de factores socioeconómicos y nutricionales, la probabilidad de que un niño muera por enfermedad diarreica antes de los 7 años pueda llegar al 50. Las

infecciones agudas del tracto gastrointestinal están consideradas como una de las enfermedades más frecuentes en Colombia (Parra *et al.*, 2002).

Escherichia coli, es una bacteria Gram negativa que pertenece a la familia Enterobacteriaceae de la tribu Escherichia. Entre algunos de sus múltiples atributos se sabe que es el principal anaerobio facultativo de la flora normal microbiana del colon humano, en donde participa de manera importante en el control fisiológico. Típicamente *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal de los recién nacidos dentro de sus primeras horas y permanece ahí durante toda la vida en simbiosis con su huésped humano. Dentro de la misma especie, se ha demostrado que existen serotipos especiales que pueden causar una variedad de enfermedades en el humano incluyendo septicemia, neumonía, meningitis, infecciones en vías urinarias y diarrea (Vidal-Graniel, 2003).

Stenotrophomonas maltophilia. Recientemente se ha relacionado su patogenicidad con la expresión de determinados factores (hemolisina, elastasa y disminución de la estimulación de neutrófilos), de forma similar a como ocurre en otros bacilos no fermentadores. Tampoco se conoce a fondo su modo de adquisición, si bien se asume que la hospitalización prolongada y la antibioterapia de amplio espectro actuarían seleccionando al microorganismo en las vías respiratorias o en el tracto gastrointestinal, pasando más tarde a colonizar otras localizaciones o producir diversas infecciones en pacientes especialmente predispuestos; de ahí su consideración como patógeno oportunista de ámbito nosocomial. En este sentido *S. maltophilia* se ha aislado en las heces del 9,5% de pacientes oncológicos con diarrea y hasta en un tercio de pacientes con neoplasia hematológica. También se ha comprobado, mediante técnicas epidemiológicas de tipificación molecular, que es posible una verdadera transmisión horizontal intrahospitalaria. (Corzo-Delgado y Gómez-Mateos 2006).

Listeria monocytogenes, es un patógeno que cuando se encuentra en los alimentos, puede causar serias enfermedades, principalmente en grupos de alto riesgo como inmunocomprometidos, mujeres embarazadas y neonatos. *L. monocytogenes* es una importante causa de abortos, septicemia o infección del SNC. Antiguamente, los brotes se vinculaban con una gran variedad de alimentos, especialmente carnes procesadas (salchichas, paté, productos precocidos); en la actualidad, la mayoría se vincula al consumo de leche cruda o quesos elaborados con leche sin pasteurizar. La importancia de la listeriosis para la salud pública no

siempre es reconocida, sobre todo porque es una enfermedad relativamente rara, en comparación con otras más comunes como la salmonelosis (Rossi *et al.*, 2008).

El género *Staphylococcus* contiene más de 30 especies diferentes, y muchas de éstas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas; no tienen otros hábitats importantes, excepto cuando están involucradas en infecciones. La elevada virulencia de *S. aureus* fue notificada por primera vez en un estudio publicado en 1941, en donde se identificó 82% de mortalidad asociada a pacientes con bacteriemias ocasionadas por este microorganismo en un hospital de la ciudad de Boston. Las etapas de las infecciones causadas por *S. aureus* pueden resumirse de la siguiente manera: frecuentemente neonatos, niños y adultos pueden ser colonizados por *S. aureus* y portar el microorganismo generalmente en fosas nasales y, en ocasiones, en la piel y la ropa. Desde estos sitios, *S. aureus* puede transmitirse a otras regiones en la piel o a las membranas mucosas; si estas barreras son interrumpidas por un trauma o una cirugía, *S. aureus*, que es un patógeno oportunista, puede acceder al tejido provocando una lesión local. Debido a su amplia versatilidad, esta bacteria es capaz de causar enfermedades de amplio espectro: infecciones menores de la piel e infecciones invasoras serias como: bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y síndrome de choque tóxico (Velázquez-Meza, 2005).

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo no fermentador de la glucosa, capaz de permanecer por tiempos prolongados en líquidos y superficies como antisépticos, alimentación parenteral, equipo de inhaloterapia, fluidos de diálisis y grifos de agua, entre otros. En contraste, es excepcional encontrarla como parte de la microflora normal de los individuos sanos, en quienes se ha aislado en 0 a 6.6% en axilas, periné, tracto respiratorio y faringe, y en 2.6 a 24% en heces. *P. aeruginosa* es uno de los patógenos nosocomiales más frecuentes. En las unidades de cuidados intensivos es frecuente en casos de bacteriemias y de neumonías, particularmente en los pacientes intubados, en quienes, además, suele ser multirresistente e incrementa la mortalidad asociada. Los brotes por *Pseudomonas* representan 5% de las infecciones nosocomiales. La especie que más comúnmente se ha aislado es la *P. aeruginosa* y se ha asociado con la contaminación de fuentes comunes como agua, antisépticos y equipo médico, como broncoscopios (Vilar-Compte *et al.*, 2003).

2.14 Mecanismos de la inmunización bacteriana

En estos últimos días se ha llegado ya a un punto en el que es crucial concienciar a la población sobre la problemática del inadecuado uso de los antibióticos que deriva; en la inmunización de las bacterias a los mismos, inutilizando así unos recursos médicos a los que se llega tras años de investigación. La resistencia de las bacterias ante los antibióticos es el resultado de la consabida teoría de la evolución Darwiniana según la cual la especie de bacteria en cuestión acaba por adquirir unos genes que le confieren tal propiedad. Los mecanismos por los cuales se establecen en la especie los genes inmunizadores son tres:

1. Mutación: Mutaciones espontáneas del ADN bacteriano.
2. Transformación: es una forma de sexo microbiano denominada transformación, en la que la bacteria puede obtener ADN.
3. Plásmido: Contienen genes de resistencia a un determinado antibiótico, de manera que el plásmido únicamente supondrá una ventaja en presencia de ese antibiótico. Existen plásmidos integrativos, es decir, que tienen la capacidad de insertarse en el cromosoma bacteriano.

2.15 Mecanismos de resistencia de las bacterias

Las bacterias, por su tremenda capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. Existe una resistencia natural o intrínseca en las bacterias si carecen de diana para un antibiótico (como la falta de pared en el mico plasma en relación con losi). La resistencia adquirida es realmente importante desde un punto de vista clínico debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. La primera puede ir seguida de la selección de las mutantes resistentes (rifampicina, macrólidos), pero la resistencia transmisible es la más importante, estando mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra.

Las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos desarrollando mecanismos de resistencia que impiden al antibiótico ejercer su mecanismo de acción. Los mecanismos de resistencia de las bacterias son fundamentalmente tres:

- 1) Inactivación del antibiótico por enzimas: La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico; las más importantes son las betalactamasas y muchas bacterias son capaces de producirlas. En los Gram positivos suelen ser plasmídicas, inducibles y

extracelulares y en las Gram negativas de origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas. También hay enzimas modificantes de aminoglucósidos y aunque no es éste su principal mecanismo de resistencia, también el cloranfenicol, las tetraciclinas y los macrólidos pueden ser inactivados por enzimas.

- 2) Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana: Las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared que impiden la entrada de ciertos antibióticos (betalactámicos) o alteran los sistemas de transporte (aminoglucósidos en los anaerobios). En otras ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente.
- 3) Alteración por parte de la bacteria de su punto diana, impidiendo o dificultando la acción del antibiótico. Aquí podemos contemplar las alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia de quinolonas), del ARNr 23S (macrólidos) de las enzimas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a betalactámicos).

Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies bacterianas, todo lo cual complica sobremanera el estudio de las resistencias de las bacterias a los distintos antimicrobianos (Pérez, 1998).

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Propiedades del hongo *Ganoderma lucidum*

Ganoderma lucidum ha sido estudiado extensamente encontrándole propiedades como hipoglucemiante antitumoral, carcinostático, anti-mutagénico, anti-inflamatorio, anti-alérgica, anti-androgénicos y propiedades anti-virales (Ji *et al.*, 2007). También se ha utilizado en la medicina tradicional china (MTC) desde hace más de 2000 años para prevenir y/o tratar enfermedades tales como la hepatitis, la bronquitis crónica, la gastritis, tumor el crecimiento y trastornos inmunológicos (Xiao-Ling *et al.*, 2007). Dentro de metabolitos de los hongos que presentan actividades antioxidantes y antimicrobianas se encuentran los diterpenos, compuestos fenólicos, polisacáridos, sesquiterpenos, p-terfenilos, glucanos acetilenos, terpenoides, alcaloides, compuestos nitrogenados, entre otros (Brizuela *et al.*, 1998).

3.2 Alimentos y bebidas con hongos

En un estudio realizado por Brennan *et al.* (2012), utilizaron los sustratos de desechos del cultivo de champiñón, recogiendo las partes del tallo, los cuales fueron limpiados de cualquier materia y liofilizadas durante 2 días. Los tallos liofilizados fueron sellados herméticamente y se almacenaron a temperatura ambiente. Los tallos secos se molieron para producir un polvo. El objetivo de la investigación fue evaluar el uso potencial del material de desecho como ingrediente funcional para productos como bocadillos. Sus ingredientes fueron harina blanca de trigo, harina de avena, y sémola fina de maíz. El resultado puso de manifiesto que los productos fueron ricos en fibra, lo que aumentó la calidad nutricional de los bocadillos.

Este estudio tenía como objetivo determinar la aplicabilidad de la adición de polvo liofilizado de seta al pan como único ingrediente nutricional mediante la evaluación de propiedades físicas y químicas del pan. La harina de trigo integral blanca fue sustituido con *Agaricus bisporus* en polvo (Variedad *Portabella*).

Este estudio demostró la posibilidad de utilizar polvo como suplemento nutricional para el pan que podría suministrar valiosos micronutrientes como selenio y vitamina D, junto con la ergotioneina. Se realizaron análisis proximales y minerales para demostrar que el contenido nutricional de polvos de *Agaricus bisporus* pueden mejorar el contribuir a un pan de trigo, además de tener un alto contenido de ciertos minerales, cantidades predecibles de vitamina D, y por lo tanto puede proporcionar el pan con una fuente de la vitamina D. Los polvos del

hongo también pueden contribuir con fibra dietética, incluyendo beta- glucanos y quitina (Corey *et al.*, 2009).

En otro se estudió, se hicieron trabajos para enriquecer la calidad nutricional de las galletas mediante la incorporación de polvo de hongo (*Pleurotus sajor caju*) en niveles de 5 y 10%. Lo cual se determinaron diversas características físicas, organolépticas y nutricionales de control. La adición del polvo de hongo hasta el nivel de 10% no mostró ningún efecto significativo en las características sensoriales de galletas en comparación con el control. También se observó una mejora significativa en la tiamina, la riboflavina, el total de lisina, metionina, fibra dietética, Ca y Fe. Las galletas enriquecidas con proteína envasadas en bolsas de polipropileno pueden ser almacenadas hasta por 45 días sin alterar sus propiedades sensoriales (Proadhan *et al.*, 2015).

También se tienen reportes una cerveza, los resultados obtenidos indican que la cerveza normal puede ser con éxito enriquecida con extractos de *Ganoderma* como fuente de suplementos naturales (Leskosek-Cukalovic, 2009). Por otro lado, se elaboró un licor de hierbas que contiene 55 ingredientes, lo cual son extractos de diferentes tipos de hierbas seleccionadas, 8 frutas y el hongo medicinal *Ganoderma lucidum*. Esta bebida pertenece a una clase de licores amargos de hierbas que se pueden utilizar como aperitivo (tónico) o una bebida digestiva. La mayoría de los efectos beneficiosos para la salud, tales como la disminución de la tensión, cansancio y agotamiento, los efectos positivos sobre la regulación del tracto gastrointestinal y el metabolismo, la secreción glandular, inmunoestimulación, así como papel preventivo en el desarrollo del cáncer y enfermedades del corazón, podría atribuirse a su actividad antioxidante (Vukosavljević *et al.*, 2009).

3.3 Propiedades del amaranto

El contenido de proteína de los granos fluctúa entre el 12 y 19% y, destaca por la alta concentración de algunos aminoácidos esenciales, como lisina, metionina y triptófano, presentando un perfil de aminoácidos bien balanceado (Calderón *et al.*, 1991). Actúa contra hipertensión arterial y es hipoalérgico, mejorando la concentración de Ca y P en los huesos (Contreras *et al.*, 2011).

3.3.1 Actividad antimicrobiana del amaranto

Se prepararon extractos de metanol de las hojas secas y semillas de la especie *Amaranthus viridis* y se utilizaron para análisis fitoquímicos y antibacterianos, los rendimientos del extracto de las hojas y las semillas varían siendo mejor el de las semillas (Ahmed *et al.*, 2013). En esta investigación se analizó el análisis fotoquímico de esta planta y se determinaron algunos compuestos como taninos, saponinas, alcaloides y glucósidos presentes en las hojas. Los extractos también contenían niveles apreciables compuestos fenólicos, el contenido total de flavonoides y la actividad de captación de radicales libres DPPH. Los resultados demostraron la presencia de actividad antimicrobiana en las semillas de *Amarathaceae*, utilizando metanol al 100% metanol y al 80% depositando 20 µg de extracto en el microdisco, con la bacteria *Staphiloccoccus aureus* con concentración de metanol al 100% encontró una inhibición de 16 mm y metanol 80% de 18 mm y para la bacteria *E. coli* con metanol al 100% 11 mm y metanol al 80% de 10 mm (Ahmed *et al.*, 2013).

3.3.2 Actividad antioxidante del amaranto

En diversos estudios se evaluó el efecto de una dieta basada con semillas de amaranto *Amaranthus hypochondriacus* (Ah) semillas sobre el estrés oxidativo y el estado antioxidante en el hígado de ratas subcrónicamente expuestos a etanol. Los datos sugieren que Ah es una buena fuente de fenoles totales y ejerce un efecto protector en el suero y en el hígado de ratas intoxicadas con etanol (López *et al.*, 2011). La actividad antioxidante in vitro de 2 especies de grano de amaranto *A. caudatus* y *A. paniculatus*, en un modelo sistema de ácido β-caroteno/linoleico fue reportado por Klimczak *et al.* (2002). Casaletto y Amaya, (2012), estimaron el contenido de compuestos fenólicos por el método de Folin Ciocalteau dando un 39.17 mg/100 g de *A. caudatus* y 56.22 mg/100 g de *A. paniculatus*.

3.4 Propiedades de los alimentos elaborados con las semillas de amaranto

El amaranto es un cereal libre de gluten con un alto valor nutricional. La inulina y la oligofruktosa son ingredientes prebióticos que presentan efectos como la mejora de la absorción de calcio. En Brasil se elaboraron barras de amaranto enriquecido con inulina y la oligofruktosa con sabor a plátano, nueces, pasas, coco, durazno, fresa y nuez. Las barras de

amaranto presentan ventajas nutricionales en comparación con barras de cereales comerciales teniendo reducción calórica y mayores niveles de fibra dietética (Días y Gomes, 2010).

Otro estudio que se realizó tenía como objetivo evaluar el efecto de la incorporación de toda harina de amaranto en las propiedades físicas y el valor nutricional de pan de queso. La harina de amaranto se incorporó a las 10, 15, y 20% en proporciones diferentes formulaciones. El 10% de contenido de amaranto agregado al pan de queso exhibe ligeras diferencias en las propiedades físicas en comparación con los controles. Estos resultados demostraron la posibilidad de la incorporación de 10% de toda la harina de amaranto en la formulación de pan de queso que resulta en un producto con un mayor contenido de fibra dietética y de hierro y, el mismo nivel de aceptación como la de la formulación convencional. El objetivo de este enfoque fue aumentar la disponibilidad de productos de panadería sin gluten con valor nutricional añadido, que contribuye a aumentar la variedad de la dieta de los pacientes celíacos (Dos Reis *et al.*, 2012).

Se utilizó harina integral y fracciones de la molienda de semillas crudas de amaranto en mezclas de 90:10, 80:20 y 50:50 con harina industrializada de maíz (MINSA), para la elaboración de tortillas y arepas, constituyentes nutricionales básicos de la dieta habitual en varios países latinoamericanos. Se encontró que las mezclas de harina integral de amaranto y harina de maíz comercial, en la proporción de 80:20 y 50:50, eran adecuadas para la preparación de arepas.

La harina de *A. cruentus* fue seleccionado por su disponibilidad y propiedades bromatológicas, ya que brinda productos de calidad nutricional excelente, por el contenido de aminoácidos e índice de eficiencia proteínica. En todos los casos se logró mejorar el contenido de minerales y ácidos grasos de las tortillas (Sánchez-Marroquín y Maya, 1985). Se elaboraron tres mezclas de harina precocida de maíz blanco con harina procesada de amaranto a los niveles de sustitución del 10, 20 y 30%. Las tres mezclas demostraron aumentos graduales de contenido de fibra, grasa y cenizas en relación a la harina precocida de maíz blanco.

Durante tres meses de almacenamiento, el contenido de proteína y grasa no se vio alterado. Se llevaron a cabo pruebas de aceptabilidad de las arepas, encontrándose que las mezclas con los niveles de 10% y 20% de sustitución son aceptables desde el punto de vista sensorial. La calidad proteínica fue analizada en términos de eficiencia proteínica y resultó ser superior a la de la harina de maíz blanco comercial (1.93) y la digestibilidad "aparente" fue de 92%. En

cuanto al contenido de lisina en las arepas provenientes de las mezclas con sustitución del 10% contuvo 1.6 g lisina/100 g de proteína y 20% equivalente a 2.0 g lisina/100g de proteína también resultaron ser superiores al de las arepas elaboradas con harina de maíz blanco comercial de 0.7 g de lisina/100 g de proteína (De Delahaye y Portillo, 1990).

Se elaboró una bebida instantánea a base de harina de semillas de amaranto (*A. cruentus*), harina de arroz y harina de maíz, suero de leche y leche en polvo con un mínimo de 16% de proteínas y 350 Kcal. Se establecieron formulaciones que presentaron un contenido de harina de semillas de amaranto entre 20 y 40%. Las formulaciones se procesaron en un secador de rocío hasta la obtención de un pulverizado con características de bebida instantánea. La formulación con mayor aceptación fue la que estuvo constituida por 30% de harina de semillas de amaranto, 30% de leche completa en polvo, 30% de suero de leche en polvo, 5% de harina de arroz y 5% de harina de maíz. Se concluyó que las semillas de amaranto son una alternativa nutricional para la elaboración de bebidas instantáneas altamente proteicas. Se obtuvo una bebida instantánea a base de semillas de amaranto con alto valor proteico (superior al 16% de proteínas) y de gran aceptabilidad (Arcila y Mendoza, 2006).

3.5 Obtención de los extractos hidroalcohólicos

Para obtener un extracto, primero que todo es importante identificar el material biológico deseado y la parte que contiene los constituyentes útiles. El mecanismo de extracción involucra dos fenómenos físicos: difusión a través de la pared celular y el lavado de los contenidos celulares, una vez que las paredes se han roto. Existen diferentes métodos para extraer y son los siguientes.

Métodos tradicionales

Extracción por solventes: se basan principalmente en la selección de solventes, temperatura o agitación con el fin de incrementar la solubilidad de los materiales y la tasa de transferencia de masas. El más usado es el método por *Maceración*: consiste en remojar la materia prima, debidamente fragmentada, hasta que el solvente penetre en la primera estructura celular ablandando y disolviendo las partes solubles. El recipiente a utilizar debe ser hermético y resistir la acción de los solventes utilizados que pueden ser (agua, vino, vinagre, aceite, alcohol, éter, etc.). Se colocan el material y solvente, dejándoselos reposar tapados durante un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Posteriormente se filtra el solvente que

contiene los compuestos de interés, y se prensa el residuo sólido. En el caso de que la extracción no haya sido completa se repite la operación.

Soxhlet: un tipo de material de vidrio utilizado para la extracción de compuestos, generalmente de naturaleza lipídica, contenidos en un sólido, por medio de un solvente afín.

Destilación. Es la operación de separar, mediante calor, los diferentes componentes líquidos de una mezcla aprovechando las diferencias de volatilidades de los compuestos por separar.

Métodos no tradicionales

Los métodos de extracción más modernos se basan en la mejora de la eficiencia de los métodos tradicionales por acción física sobre el medio.

Extracción asistida por microondas. La irradiación de microondas causa movimiento de moléculas por migración de iones y rotación de dipolo que contribuyen a una rápida transferencia de energía al solvente y materia vegetal.

Extracción por fluidos supercríticos. Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión sobre punto crítico termodinámico. Tiene una habilidad única para difundirse a través de los sólidos como una gas y de disolver materiales como un líquido, generando solvente de baja viscosidad, altas tasas de difusión y sin tensión superficial.

Extracción turbo. Utiliza un agitador de alta velocidad, que induce cavitación hidrodinámica, aumentando rendimiento de extracción. Ya que se aumenta el contacto entre el material vegetal y el solvente y el proceso de difusión a través de las paredes celulares se incrementa.

Extracción eléctrica. Se aplican descargas eléctricas a la mezcla de extracción hasta un 25% al formarse burbujas de cavitación.

Extracción asistida por ultrasonido. Se utiliza sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como el resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente (Azuola y Vargas, 2007).

IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La salud y la alimentación son los principales problemas en nuestro país. Las zonas pobres y de pobreza extrema han quedado excluidas casi por completo de los beneficios del desarrollo económico y social (Ávila *et al.*, 1993). A los hongos del género *Ganoderma* se les han atribuido diferentes actividades medicinales, principalmente por la presencia de polisacáridos que presentan actividad funcional. La actividad funcional de *Ganoderma* spp. y su utilización como suplemento en alimentos que puedan ser incorporados a la dieta humana en diferentes edades, desde niños hasta adultos, puede tener un impacto potencial social y económico en México. En la actualidad, se han generado una gran cantidad de medicamentos y suplementos alimenticios que buscan mejorar la salud humana, jugando un papel muy importante los metabolitos producidos por los hongos comestibles, funcionales y medicinales. Actualmente existen distintos programas gubernamentales que incentivan el cultivo en el campo con especies vegetales de interés funcional, otorgando recursos de infraestructura y maquinaria para que el productor cultive alimentos para auto abasto y en el mejor de los casos para venta, logrando mejorar los patrones de alimentación. Existen cultivos de especies herbáceas como el amaranto que por sí solos presentan ventajas nutrimentales con respecto a otros alimentos procesados, cultivándose actualmente semillas mejoradas y criollas de amaranto, de las cuales se elaboran diferentes productos por métodos artesanales a los que se les adicionan otros ingredientes y saborizantes, lo que permite que dichos productos sean más atractivos y comercializados generando mayores ingresos a bajo costo y de buena calidad. Sin embargo, no se tienen antecedentes de productos que combinen las propiedades funcionales y medicinales de *G. lucidum* en aquellos de amaranto. En este trabajo se desarrolló un suplemento alimenticio a base de extractos de *G. lucidum* y semillas de amaranto evaluando sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

V. HIPÓTESIS

Las propiedades funcionales del hongo *Ganoderma lucidum* y del amaranto permitirán elaborar un suplemento alimenticio para consumo humano con propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

VI. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Elaborar un suplemento alimenticio a base de los extractos hidroalcohólicos de *Ganoderma lucidum* y *Amaranthus* spp., evaluando sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener extractos del hongo *Ganoderma lucidum* y amaranto.
2. Caracterizar los suplementos alimenticios elaborados con los extractos de *Ganoderma lucidum* y amaranto.
3. Proponer un modelo para la elaboración de un suplemento alimenticio utilizando como elementos estratégicos al hongo medicinal *Ganoderma lucidum* y amaranto.

VII. MATERIALES Y METODOS

7.1 Cultivo del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* (CP-145)

La cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., se cultivó previamente en la formulación COLPOS-17, la cual contiene principalmente aserrín de encino, aserrín de *Bursera*, bagazo de caña de azúcar, olote y salvado. La mezcla se hidrató hasta obtener una humedad del 70%. Los basidiocarpos se cosecharon a los 2-3 meses después de la inoculación. Los hongos frescos se deshidrataron a 40 °C durante 48 horas, después se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

7.2 Procedencia del material vegetal

7.2.1 Semilla criolla de amaranto conocida como “nieves”

Los 5 kg de semilla de amaranto criolla conocida como “nieves” (*Amaranthus* spp.) que se utilizó para esta investigación fueron proporcionadas por el Señor Efraín Javan Rivera del poblado de Huazulco, Temoac, Morelos, sembrada el 20 de agosto y cosechada el 20 de diciembre del año 2013 (Fig. 6).



Figura 6. Cultivo de la semilla criolla de amaranto conocida como “nieves” en Huazulco, Temoac, Morelos.

7.2.2 Semilla mejorada de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) variedad nutrisol

Los 5 kg de la semilla de amaranto variedad nutrisol (*A. hypochondriacus* L.) fueron proporcionadas por el señor José Hernández Cortez, del municipio de Calpan, Puebla sembrada el 15 de junio y cosechada el 06 de diciembre del año 2013 (Fig. 7).



Figura 7. Cultivo de amaranto de la variedad nutrisol perteneciente a la especie *Amaranthus hypochondriacus* en el municipio de Calpan, Puebla.

7.3 Caracterización de las semillas de amaranto

Una vez obtenidas los dos tipos de semillas de amaranto, se pesó 1 kg de cada variedad y se tamizó con una malla para eliminar polvo, hojas secas, piedras, etc. La apariencia de las semillas limpias se muestra en la figura 8. Se calculó la cantidad de materia eliminada y limpia.

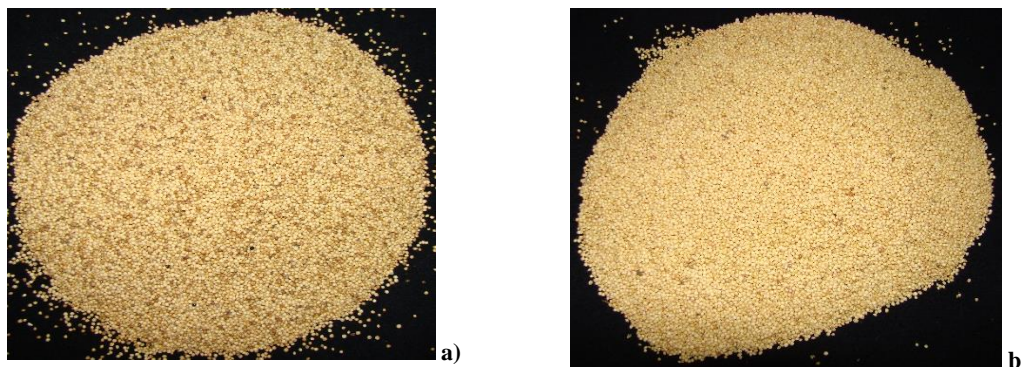


Figura 8. Semillas limpias de amaranto: a) variedad nutrisol especie *Amaranthus hypochondriacus* y b) criolla conocida como nieves (*Amaranthus* spp.).

Una vez limpias las semillas de amarantos, se tomaron 5 muestras de 5 g cada una y se pusieron en una estufa de secado a 38 °C, se mantuvieron por dos días a esa temperatura para determinar el peso seco. La humedad se calculó de la división del peso seco de la muestra entre el peso inicial de la muestra fresca, según la siguiente ecuación:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{\text{Peso seco}}{\text{Peso fresco}} \times 100$$

Con las semillas limpias, se procedió a hacer una separación por tamaños con diferentes tamices de pruebas físicas (Mont inox) con el tamiz número 18 (1000 micrones), número 20

(841 micrones) y >20 (<841 micrones) (Fig. 9). De cada tamaño se anotó el peso obtenido, también se les determinó la humedad (%). Las semillas clasificadas se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas de papel para su posterior análisis.

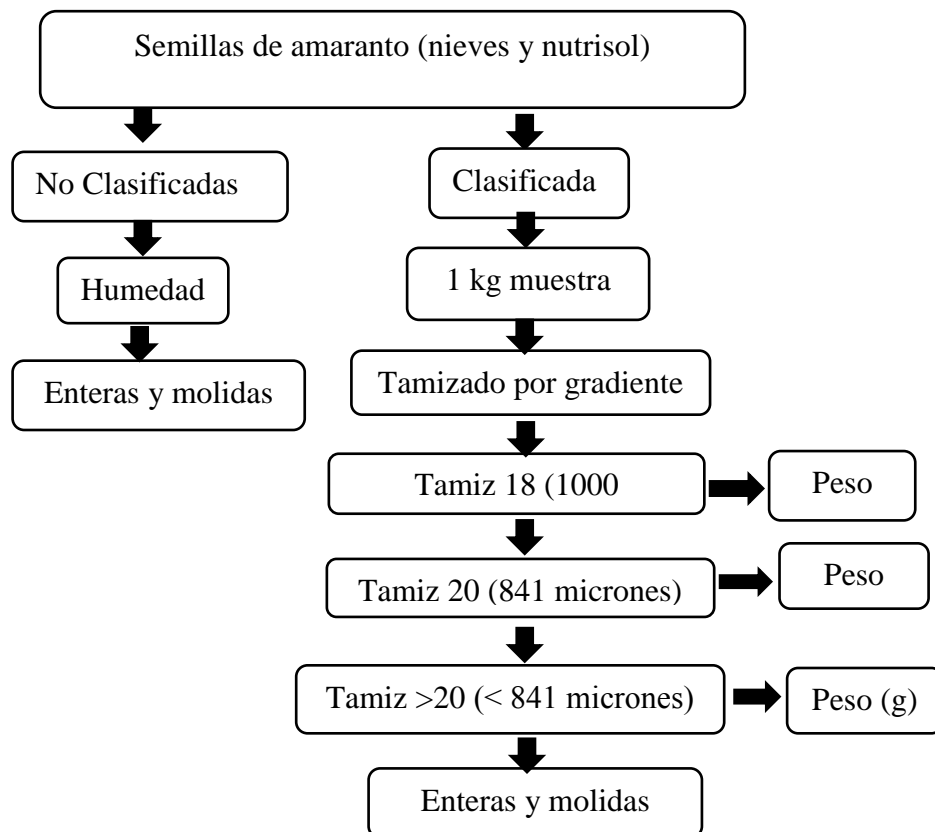


Figura 9. Diagrama que se siguió para la obtención de las semillas de amaranto no clasificadas y clasificadas por tamaño según el tamiz empleado.

Una vez clasificadas por tamaño, las semillas se molieron en una licuadora (Ozterizer) durante 1 minuto, para comparar las propiedades de las semillas no clasificadas enteras y no clasificadas molidas, las semillas clasificadas enteras y las semillas clasificadas molidas, quedando las siguientes descripciones.

- a) Semillas no clasificadas enteras, nutrisol y nieves.
- b) Semillas no clasificadas molidas, nutrisol y nieves.
- c) Muestras de semillas enteras (E) de amaranto nutrisol (NU) clasificadas en 3 gradientes (18, 20 y >20) con claves NUE18, NuE20, NUE >20 , y para el amaranto nieves (NI), NIE18, NIE20, NIE >20 para el amaranto criollo conocido como nieves.

- d) Muestras de semillas molidas (M) de amaranto nutrisol (NU) en sus 3 gradientes (18, 20 y >20), con claves NUM18, NUM20, NUM>20 clasificadas y, para el amaranto nieves (NI) quedaron NIM18, NIM20 y NIM>20.

7.4 Preparación de las muestras

Todas las muestras de amaranto y de *G. lucidum* se molieron en vasos de 200 mL de una licuadora (Osterizer modelo 890-00), hasta obtener un tamaño fino de partícula. De cada una de las muestras molidas y enteras de amaranto se pesó 10 g y se colocaron por separado en sobres de papel filtro de poro medio de 7.5 cm de ancho x 9 cm de largo, se sellaron bien para evitar pérdidas. De igual forma la muestra de *G. lucidum* se pesó, colocando 10 g en los sobres diseñados para ello.

7.5 Maceración de las muestras en solución hidroalcohólica

Se empleó el método de maceración, sumergiendo el contenido de la muestra en el sobre en 150 mL de una solución hidroalcohólica por 24 horas a temperatura ambiente en condición de obscuridad.

Después de ese tiempo, se recuperaron los macerados por decantación y las muestras empaquetadas en el papel filtro se presionaron en una prensa vertical (Oishii take), con capacidad de 150 mL con el fin de recuperar todo el solvente utilizado (Fig.10). Se midió el volumen final del macerado en una probeta y se trasvasaron a un matraz bola para medir el pH y temperatura empleando un potenciómetro (METTLER TOLEDO, modelo Seven Excellence), con electrodos Mettler Toledo In Labb Expert Pro pH 0-14 y temperatura 0-100 °C, la resistividad 30 K Ω y conductividad eléctrica de 500 μ s/cm (Fig. 11).

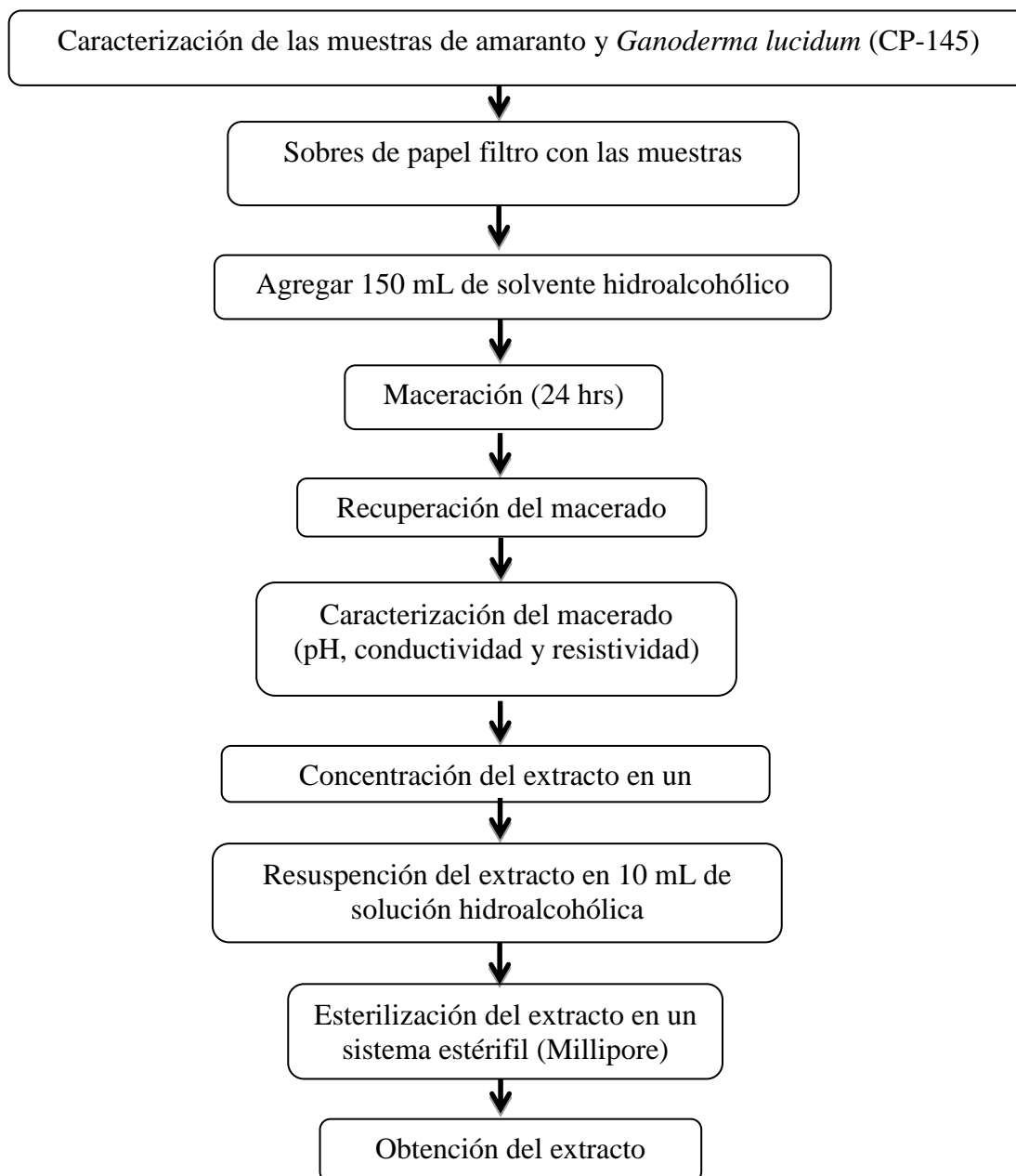


Figura 10. Diagrama de flujo para la obtención de los extractos del hongo *Ganoderma lucidum* y semillas de amaranto.



Figura 11. Potenciómetro para medir el pH, temperatura, conductividad y resistividad de los extractos obtenidos de todas las muestras en estudio.

7.6 Concentración de los macerados hidroalcohólicos en el rotavapor

Los extractos obtenidos por maceración fueron concentrados utilizando un rotavapor (HAHN SHIN, modelo HS-2000 NS), con condiciones de operación a 38 °C y 90 rpm hasta obtener un concentrado de aproximadamente 7 mL (Fig. 12).



Figura 12. Concentración de los extractos del hongo *Ganoderma lucidum* y semillas de amaranto en el rotavapor.

7.7 Obtención de los extractos

Una vez concentrados los macerados obtenidos de las semillas de amaranto y del hongo *G. lucidum*, se resuspendieron en 10 mL de la solución hidroalcohólica en un matraz volumétrico, estas muestras recibieron el nombre de extractos.

7.8 Esterilización de los extractos por filtración

Los extractos se esterilizaron en un sistema de esterilización estéril (Millipore) con capacidad de 250 mL con un filtro de 47 mm de diámetro y con poro de 0.45 μm . El extracto

estéril se guardó en un tubo falcon estéril de 15 mL y se almacenó a 4°C hasta su uso. A todos los extractos se les realizó el mismo procedimiento.

7.9 Caracterización de los extractos hidroalcohólicos de las muestras estudiadas

7.9.1 Determinación de polifenoles totales

La cuantificación de polifenoles totales se expresó como miliequivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mgEAG/g). Para ello, se prepararon las siguientes soluciones siguiendo la metodología descrita por Müller *et al.* (2010).

Solución saturada de carbonato de sodio. En una balanza analítica (OHAUS, modelo Explorer digital EX224) se pesaron 50 g de carbonato de sodio (SIGMA-ALDRICH) y se disolvieron en 200 mL de agua destilada, para inducir a la precipitación se agregó un grano de carbonato de sodio (SIGMA-ALDRICH) dejándolo reposar en el refrigerador durante una hora.

Solución stock de ácido gálico. De éste reactivo se pesaron 0.1005 g y se disolvieron en 1 mL de etanol. Posteriormente, se aforó a 100 mL con agua destilada.

Curva de calibración del ácido gálico. En matraces aforados de 10 mL y envueltos con papel aluminio para evitar el paso de la luz, se pusieron 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mL de la solución stock de ácido gálico y se aforaron con agua destilada a 10 mL. La solución 0 fue solo agua destilada y las demás soluciones tuvieron una concentración de 25, 50, 100, 150 y 200 µg/mL, respectivamente. Se tomó 1 mL del reactivo Folin Ciocalteau (SIGMA-ALDRICH) y se aforó en un matraz de 10 mL (Fig. 13).

La reacción se hizo en una microplaca de 96 pozos (Corning) y por triplicado, en las primeras tres columnas se colocó la curva de calibración empezando de la fila A hasta la H, el pozo G se utilizó para obtener el valor de la solución hidroalcohólica (blanco). En el resto de la microplaca se colocaron las muestras de los extractos en estudio. La reacción se realizó utilizando 20 µL de los extractos de las semillas de amaranto o del hongo *G. lucidum*, según haya sido la muestra en estudio. Los reactivos que se utilizaron se agregaron en el siguiente orden: 100 µL de Folin-Ciocalteau, 75 µL de solución saturada de carbonato de sodio; la microplaca se incubó a temperatura ambiente y en obscuridad por 2 horas. Al término del tiempo de incubación se depositaron los extractos en los pozos que se dejaron vacíos y, posteriormente se leyó la microplaca en un espectrofotómetro (BIOTEK Instruments, modelo Epoch) a una longitud de onda de 740 nm (Fig. 13). El promedio de la absorbancia de las

muestras (triplicado) se graficó en el programa Excel 2013 generando con los valores de la solución estándar una línea de tendencia, la ecuación de la recta y el valor de R^2 . Los valores de la ecuación ($y= mx+b$) se utilizaron para determinar la concentración de ácido gálico presente en los extractos.

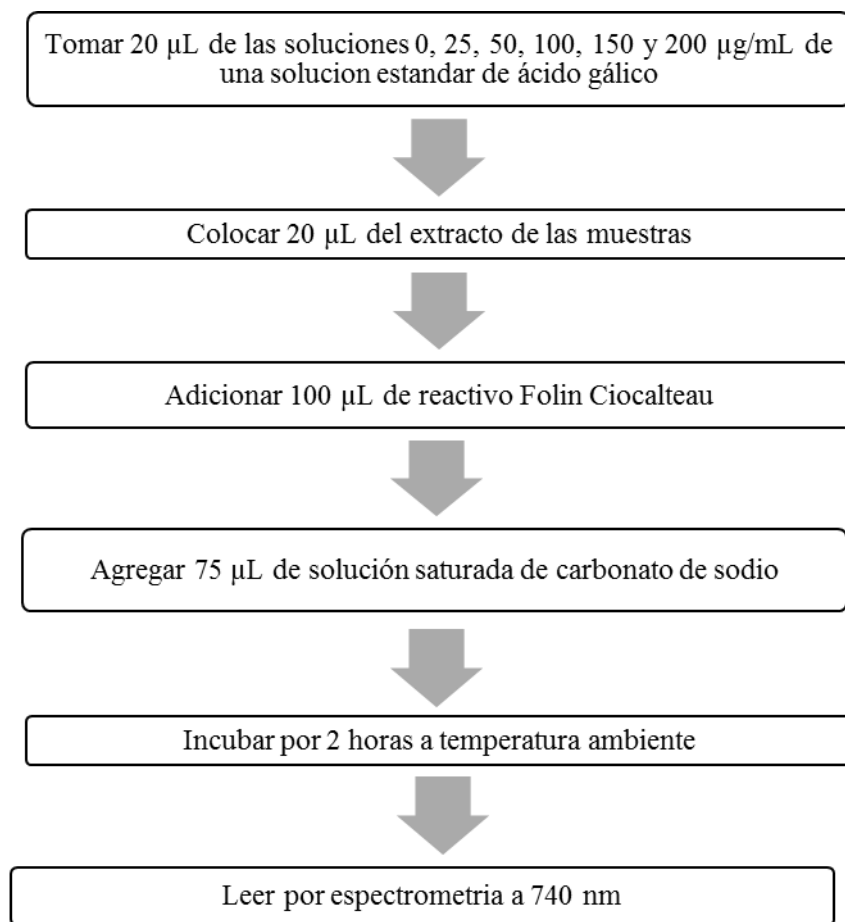


Figura 13. Metodología para la determinación antioxidantes basada en la cantidad de polifenoles totales presentes en los extractos de las muestras en estudio.

7.9.2 Determinación de proteínas

A los extractos de las muestras de las semillas de amaranto y del hongo se les determinó el contenido de proteínas por el método de (Bradford, 1976) (Fig. 14). Una solución de BSA (SIGMA) se preparó pesando un miligramo de Albúmina de Suero Bovino y se disolvió en un mililitro de agua destilada, de esa solución stock se hicieron soluciones de 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ L, y se aforaron a 1 mL con agua destilada, las cuales sirvieron para realizar la curva de calibración.

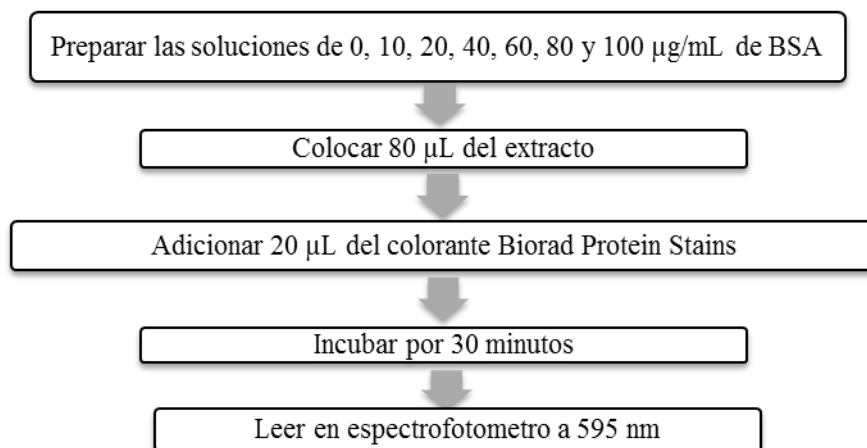


Figura 14. Metodología para determinar proteínas en microplaca de las muestras elaboradas en este trabajo.

La reacción se llevó a cabo en una microplaca de 96 pozos (Corning) por cuadruplicado. En cada pozo se colocaron 80 µL de muestra o BSA. Posteriormente, se agregaron 20 µL de colorante (Bio-Rad protein stain). La placa se incubó 30 minutos y se leyó en el espectrofotómetro (Biotek, Epoch) a 595 nm. Los datos de absorbancia se exportaron al programa Excel 2013 y la curva de calibración se determinó la cantidad de proteína de las muestras.

7.10 Cálculo del rendimiento de los extractos (mg/g)

A los extractos esterilizados se les determinó el rendimiento tomando 500 µL de muestra con una micropipeta (Finnpipete) y se depositaron en una caja de Petri, la cual fue previamente tarada, anotando el dato en la bitácora. Este procedimiento se hizo con 5 repeticiones. Las muestras se secaron en una incubadora (Lab-Line, modelo 150), a temperatura de 38 °C a 40 °C. Se tomaron los pesos de las cajas de Petri más la del extracto a las 24 y 48 horas. Se realizaron las operaciones para calcular el rendimiento de los extractos expresados en mg/mL de extracto (10 mL) o mg/g de muestra (10 g).

7.11 Selección de los extractos y elaboración de los suplementos alimenticios

De los mayores valores obtenidos con las muestras obtenidas de amaranto y las del hongo *G. lucidum*, se realizaron los suplementos en relación volumen a volumen. Los extractos

seleccionados en ésta investigación fueron los del amaranto criollo (nieves) tamaño de tamiz 18, muestra molida (NIM18) y, el extracto obtenido de la semilla de amaranto variedad nutrisol tamaño de tamiz 20 (NUM20), muestra molida, así como la del extracto del hongo *G. lucidum*. Los tres extractos se utilizaron para elaborar los suplementos alimenticios en v/v y en p/p. A los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos líquidos de semillas de amaranto con el hongo *G. lucidum* (v/v) se les asignaron diferentes claves, siendo para las muestras de amaranto nieves las claves A, B y C y, para nutrisol las claves D, E y F con las siguientes proporciones 0.5:1.5, 1:1 y 1.5:0.5 mL. Los suplementos alimenticios de las semillas de amaranto sin mezclar se les asignaron las claves G para el extracto del hongo, H para nieves e I para la semilla nutrisol, con un volumen final de 2 mL (Cuadro 5).

Cuadro 5. Suplementos alimenticios elaborados con extractos hidroalcohólicos de *Ganoderma lucidum* (CP-145), mezclado con extracto hidroalcohólico de semillas de amaranto nieves y nutrisol, en relación volumen a volumen (v/v), dando un total de 2 mL de suplemento alimenticio.

| Volumen (mL) | | Clave | Volumen (mL) | | Clave |
|-------------------|-----------------|-------|-------------------|-------------------|-------|
| <i>G. lucidum</i> | Amaranto nieves | | <i>G. lucidum</i> | Amaranto nutrisol | |
| 0.5 | 1.5 | A | 0.5 | 1.5 | D |
| 1 | 1 | B | 1 | 1 | E |
| 1.5 | 0.5 | C | 1.5 | 0.5 | F |
| 2 | 0 | G | 2 | 0 | G |
| 0 | 2 | H | 0 | 2 | I |

Para elaborar los suplementos alimenticios usando extractos liofilizados se realizaron varias extracciones de las muestras seleccionadas de amaranto y de *G. lucidum*, los extractos obtenidos se congelaron en un refrigerador (REVCO, modelo ULT1340) a temperatura -26 °C.



Figura 15. Liofilizadora con los extractos de amaranto congelados.

Las muestras congeladas se deshidrataron en una Liofilizadora (LABCONCO modelo Freezone 4.5) a peso constante por 48 horas (Fig. 15), hasta obtener las muestras en polvo para hacer los suplementos alimenticios en relación peso a peso (Fig. 16).



Figura 16. Suplementos alimenticios elaborados a base de extractos liofilizados del hongo *Ganoderma lucidum* y amaranto nieves (a) y de amaranto nutrisol (b).

A los suplementos alimenticios elaborados a base del extracto hidroalcohólico liofilizado de semillas de amaranto nieves y nutrisol mezclados con el hongo *G. lucidum* en relación de 2 g: 2 g, se le asignó la clave J para nieves y, la clave K para nutrisol. Los suplementos alimenticios de las semillas de amaranto sin mezclar con el hongo se les asignó la clave L para el hongo, M para el amaranto nieves y N para el amaranto nutrisol, conteniendo un total de 4 g (Cuadro 6).

Cuadro 6. Suplementos alimenticios elaborados con extractos hidroalcohólicos liofilizados de *Ganoderma lucidum* (CP-145), mezclado con extracto hidroalcohólico liofilizado de semillas de amaranto nieves y nutrisol, en relación peso a peso (p/p), dando un total de 4 g de sólidos resuspendidos en 10 mL de solvente hidroalcohólico.

| Peso (g) | | Clave | Peso (g) | | Clave |
|-------------------|-----------------|-------|-------------------|-------------------|-------|
| <i>G. lucidum</i> | Amaranto nieves | | <i>G. lucidum</i> | Amaranto nutrisol | |
| 2 | 2 | J | 2 | 2 | K |
| 4 | 0 | L | 4 | 0 | L |
| 0 | 4 | M | 0 | 4 | N |

Las proporciones de los diferentes suplementos alimenticios basados en 4 g de extracto liofilizado se resuspendieron en 10 mL de solvente hidroalcohólico, se filtraron con un sistema de esterilización por microfiltración esteril (Millipore), con filtros 0.45 μm de 47 mm, para realizar los análisis de proteína, antioxidantes y análisis estadísticos como lo muestra la figura 17. El pH, conductividad y resistividad de las mezclas de las variedades de amaranto se

midieron con un potenciómetro (METTLER TOLEDO, modelo Seven Excellence), como lo descrito previamente.

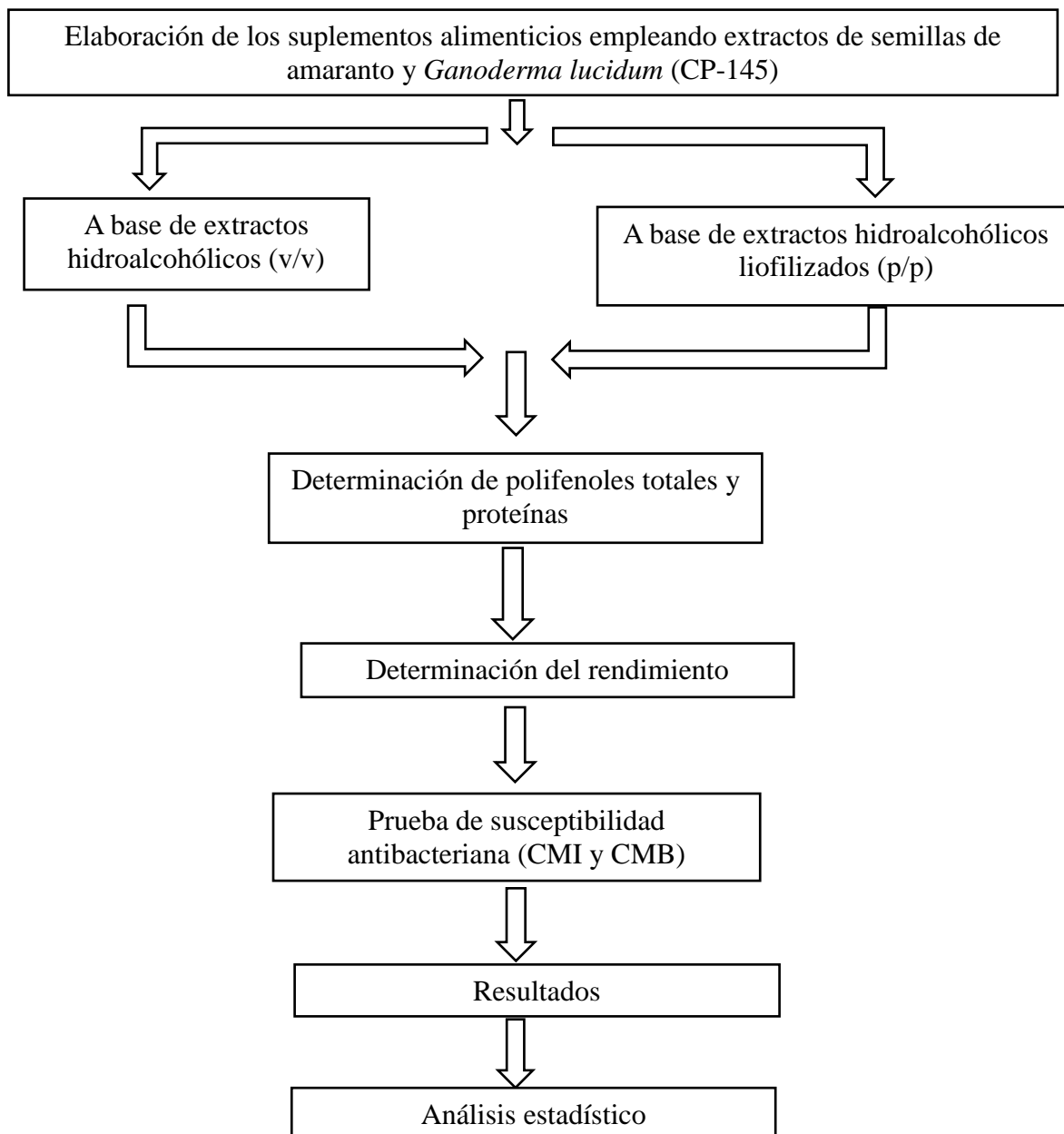


Figura 17. Elaboración de los suplementos alimenticios de *Ganoderma lucidum* (CP-145) y amaranto nieves y nutrisol en base a los extractos hidroalcohólicos (volumen/volumen) y extractos hidroalcohólicos liofilizados (peso/peso). CMI= Concentración mínima inhibitoria. CMB= Concentración mínima bactericida.

7.12 Análisis estadístico (SAS)

En todos los experimentos los cultivos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron mediante un diseño experimental completamente al azar y se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), se les aplicó la prueba de Tukey (P 0.05), todos los análisis se realizaron con el programa SAS 9.0.

7.13 Prueba de susceptibilidad bacteriana de los suplementos alimenticios

Se preparó medio agar Mueller Hinton BD Bioxon, disolviendo 38 g en 1 litro de agua destilada a temperatura de ebullición durante 3 a 5 minutos en un horno de microondas (SHARP, Carousel). Una vez disuelto el medio, se esterilizó en una olla de presión (ALL AMERICAN) durante 20 minutos a 121 °C, posteriormente se vació el medio en cajas de Petri de 60 x 15 mm y se dejaron solidificar. Se preparó medio de cultivo líquido Mueller Hinton disolviendo 21 g en agua destilada, se hirvió de 3 a 5 minutos en un horno de microondas (SHARP, Carousel). Se vertieron 20 mL del medio en matraces Erlenmeyer con tapa de rosca de 125 mL y se esterilizaron bajo las mismas condiciones que el medio de agar.

7.13.1 Recursos genéticos bacterianos usados en los bioensayos

En el cuadro 7, se presentan las diferentes especies de cepas bacterianas que se utilizaron para realizar las pruebas de susceptibilidad bacteriana así como su procedencia.

Cuadro 7. Material biológico utilizado y depositado en la UREGENHC* del Colegio de Postgraduados, Campus Puebla en la presente investigación.

| Cepas | Clave | Procedencia | Tinción |
|--|--------|--------------|---------|
| II. Bacterias | | | |
| <i>Salmonella typhi</i> (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar | CPB-1 | BUAP | Gram – |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> Lehmann and Neumann | CPB-4 | BUAP | Gram + |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula | CPB-6 | BUAP | Gram – |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (Hugh) Palleroni and Bradbury | CPB-7 | BUAP | Gram – |
| <i>Escherichia coli</i> (Migula) Castellani and Chalmers | CPB-8 | ATCC** 25922 | Gram – |
| <i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn | CPB-9 | ATCC 6633 | Gram + |
| <i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach | CPB-10 | ATCC 25923 | Gram + |
| <i>Listeria monocytogenes</i> (Murray et al.) Pirie | CPB-11 | ATCC 19115 | Gram + |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula | CPB-13 | ATCC 27853 | Gram – |

*UREGENHC= Unidad de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales. **ATCC= American Type Culture Collection.

7.13.1.1 Obtención del inóculo bacteriano

De un cultivo fresco desarrollado previamente por 24 horas a 35.5 °C de cada una de las bacterias en estudio, se tomó una asada y se sembraron matraces Erlenmeyer de 125 mL con 20 mL de medio de cultivo líquido estéril Mueller Hinton, los matraces se incubaron a 35.5 °C en una incubadora orbital (Thermo scientific, modelo MAXQ 4000) por 24 horas a 120 revoluciones por minuto, este matraz se rotuló con el número 1. De ese matraz “semilla” se tomaron 100 µL con una micropipeta (Finnpipete) y se colocaron en una microplaca que se leyó en un espectrofotómetro (Epoch, BIOTEX Instruments) a una longitud de onda de 600 nm, con éstas lecturas se generó el valor promedio que fue procesado en un programa desarrollado en Excel, obteniendo el resultado en una tabla y en una gráfica, mostrando la concentración de bacterias/mL cultivadas en el matraz “semilla”. Conocida la concentración del el matraz 1 se determinó el volumen a agregar al matraz 2 para tener una concentración de 1×10^8 bact./mL. Para confirmar dicha concentración, se determinó el volumen a transferir del matraz 2 al matraz 3, del cual se tomaron 4 µL de esa dilución y se sembraron en cajas de Petri de medio de cultivo Agar Mueller Hinton para confirmar una población de 50 Unidades

Formadoras de Colonias (Fig. 18). Con dicho rango se confirma que el matraz 2 puede usarse como inóculo para los bioensayos.

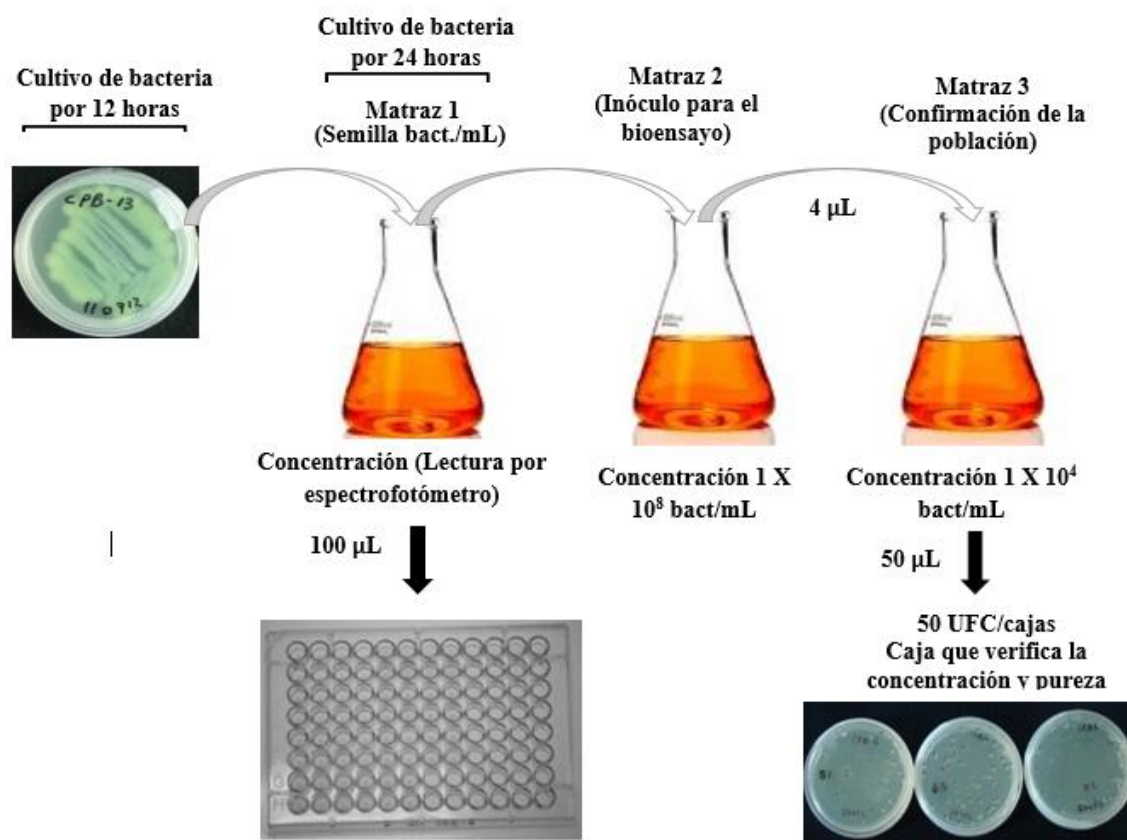


Figura 18. Ajuste de la cantidad de las bacterias a una concentración de 1×10^8 bact./mL para el diseño experimental y, de 1×10^4 bact./mL para verificar el inóculo con 50 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en cajas de Petri con medio de cultivo Agar Mueller Hinton.

7.13.2 Arreglo de las muestras en la microplaca

Todos los ensayos se realizaron en microplacas transparentes de 96 pozos con fondo redondo (Corning) siguiendo el protocolo del Clinical and Laboratory Standards Institute (2006). A todos los pozos de la microplaca se le agregaron 100 µL de agar líquido estéril Mueller Hinton. Con el fin de poder probar el efecto del suplemento alimenticio como agente antibacteriano (tratamiento), se establecieron controles positivos y negativos para la bacteria, el solvente y el extracto del hongo (tratamiento). El control positivo de la bacteria también llamado control de crecimiento bacteriano, muestra la viabilidad de la bacteria en estudio. El control positivo del solvente muestra el efecto del solvente sobre el crecimiento de la bacteria (Fig. 19). El blanco positivo del tratamiento, es el tratamiento sin la bacteria, cuyo valor de D.O. se resta a la lectura del tratamiento por el tono propio del extracto. El control de

esterilidad comprueba que no hubo contaminación durante la prueba. El control negativo del solvente determinó el valor de la D.O. que tiene el solvente el cual se restó al control positivo del solvente para cada dilución en estudio. El tratamiento (suplemento alimenticio) demostró la actividad antibacteriana sobre la bacteria (Fig. 19).

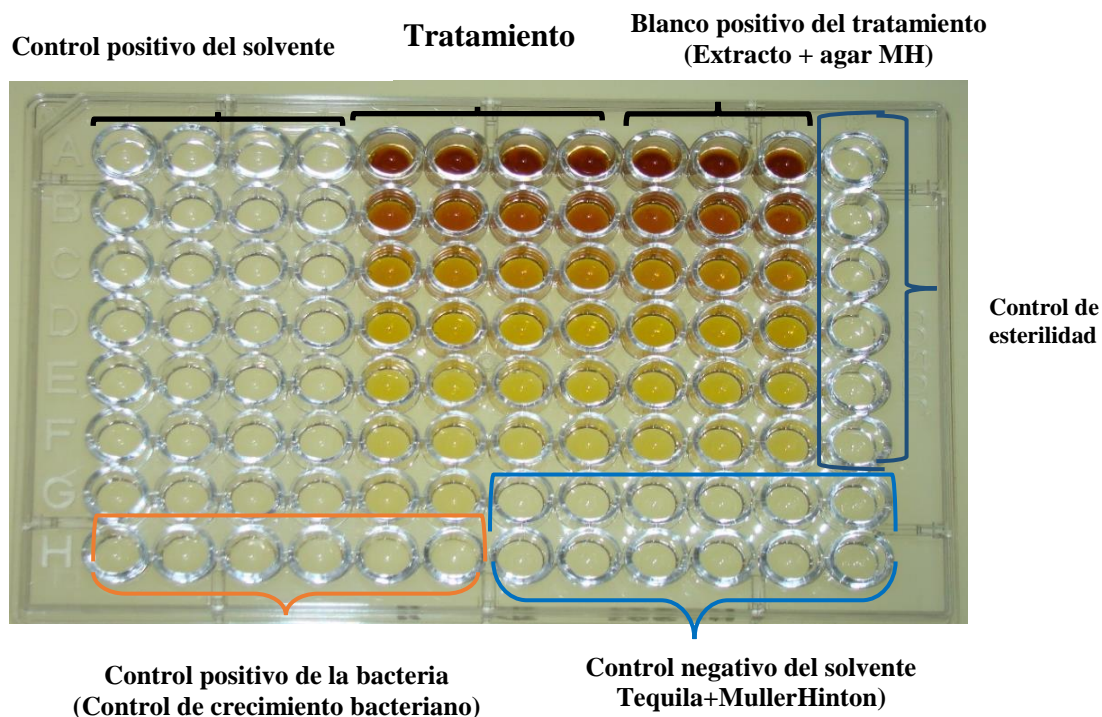


Figura 19. Distribución de las microdiluciones en la microplaca para la prueba de susceptibilidad bacteriana

7.13.3 Método de microdilución en microplaca para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los suplementos alimenticios

La figura 20 muestra la adaptación de la microplaca en este estudio y estuvo basada en la propuesta hecha por Wiegand *et al.* (2008). En ella se notan los colores que presentan las diluciones de los controles del solvente, del medio de cultivo y del suplemento alimenticio (tratamiento). Después de realizada la distribución se procedió a inocular la microplaca con 2 μL de inóculo bacteriano (B), según se indica en la figura 20. El volumen final de cada pozo fue de 200 μL .

| Filas | Columnas (1-12) | | | | | | | | | | | |
|-------|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|--|--|--|--|
| A | B | B | B | B | B | B | B | B | | | | |
| B | B | B | B | B | B | B | B | B | | | | |
| C | B | B | B | B | B | B | B | B | | | | |
| D | B | B | B | B | B | B | B | B | | | | |
| E | B | B | B | B | B | B | B | B | | | | |
| F | B | B | B | B | B | B | B | B | | | | |
| G | B | B | B | B | B | B | | | | | | |
| H | B | B | B | B | B | B | | | | | | |

Figura 20. Especificaciones de la inoculación de la bacteria en estudio para realizar la prueba de susceptibilidad bacteriana en esta investigación.

El cuadro 8, describe la microplaca basada en el rótulo de la placa para relacionar las lecturas con los resultados y poder procesarlas en la base de datos, según lo propuesto por Escudero (2015).

Cuadro 8. Distribución de la prueba de susceptibilidad bacteriana usando extracto de hongo como agente antimicrobiano. Toda la placa contenía 100 μ L de medio de cultivo estéril Mueller Hinton (MH).

| Descripción | Microdiluciones (soluciones) | Ubicación (pozos) |
|---------------------------------|---|-------------------|
| Control positivo del solvente | 100 μ L de solvente + 2 μ L de inóculo bacteriano | A1-G4 |
| Tratamiento | 100 μ L de extracto + 2 μ L de inóculo bacteriano | A5-F8 y G5-G6 |
| Blanco positivo del tratamiento | 100 μ L de extracto | A9-F11 |
| Control de esterilidad | 200 μ L de MH | A12-F12 |
| Control positivo de la bacteria | 200 μ L de MH + 2 μ L de solución bacteriana | H1-H6 |
| Control negativo del solvente | 100 μ L de solvente | G7-G12 y H7-H12 |

La concentración del suplemento alimenticio (tratamiento) en cada microdilución está representada en la figura 21. Dependiendo de la microdilución se tomaron 100 μ L de ese pozo y se transfirieron a la siguiente columna y así sucesivamente, hasta el último pozo de cada tratamiento. Los últimos 100 μ L de cada pozo se eliminaron.

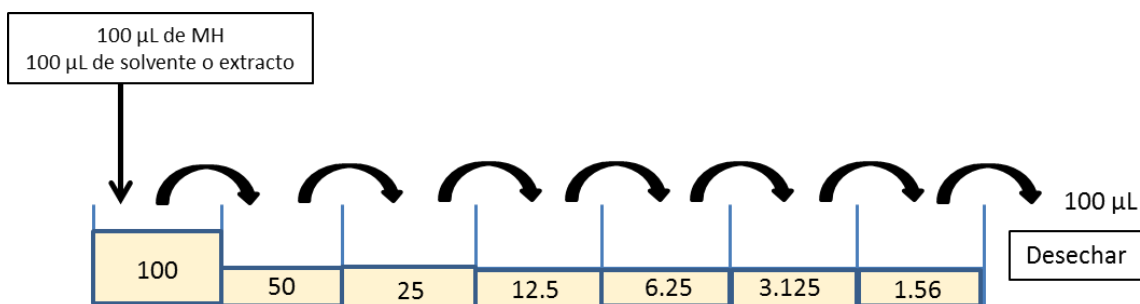


Figura 21. Vista longitudinal de la forma en que se realizó la microdilución de los suplementos alimenticios en la microplaca. El valor que está indicado dentro de cada pozo representa la dilución (%) del suplemento alimenticio (tratamiento) o del solvente, el 100 fue el valor de la concentración inicial, el 50 fue el valor de la concentración diluida a la mitad, y así sucesivamente. El volumen total de la microdilución de cada pozo fue de 200 µL.

Una vez terminada las microdiluciones, la microplaca se colocó en una caja semi hermética para evitar la evaporación de las soluciones durante la incubación de la microplaca, simulando una cámara húmeda usando agua destilada estéril (Fig. 22a) y se incubó en una incubadora (Biometra, modelo OV5) a 35.5 °C (Fig. 22b). Después de 24 horas se leyó la microplaca en el espectrofotómetro (Epoch, BIOTEK Instruments) a una longitud de onda de 600 nm. Los valores de densidad óptica de cada dilución se tomaron en cuenta para calcular el efecto del agente antimicrobiano (suplemento alimenticio) sobre las bacterias en estudio.

A



B



Figura 22. Forma en que se colocó la microplaca para evitar la pérdida de humedad (a) e incubadora donde se colocó la microplaca durante 24 horas (b).

Para comprobar el efecto bactericida o el efecto bacteriostático del tratamiento (suplemento alimenticio), se tomaron muestras de los pozos que contenían las microdiluciones del tratamiento (indicadas como D1 al D7) y ubicadas en los pozos 5A, 6A y 7A al 5G, 6G y 7F, el control de esterilidad (CE) tomada de los pozos 12A al 12F, el control de crecimiento (CC) de la bacteria en estudio, tomado de los pozos 1H al 6H y, del extracto estéril tomado de los pozos 9A al 11A (Fig. 23).

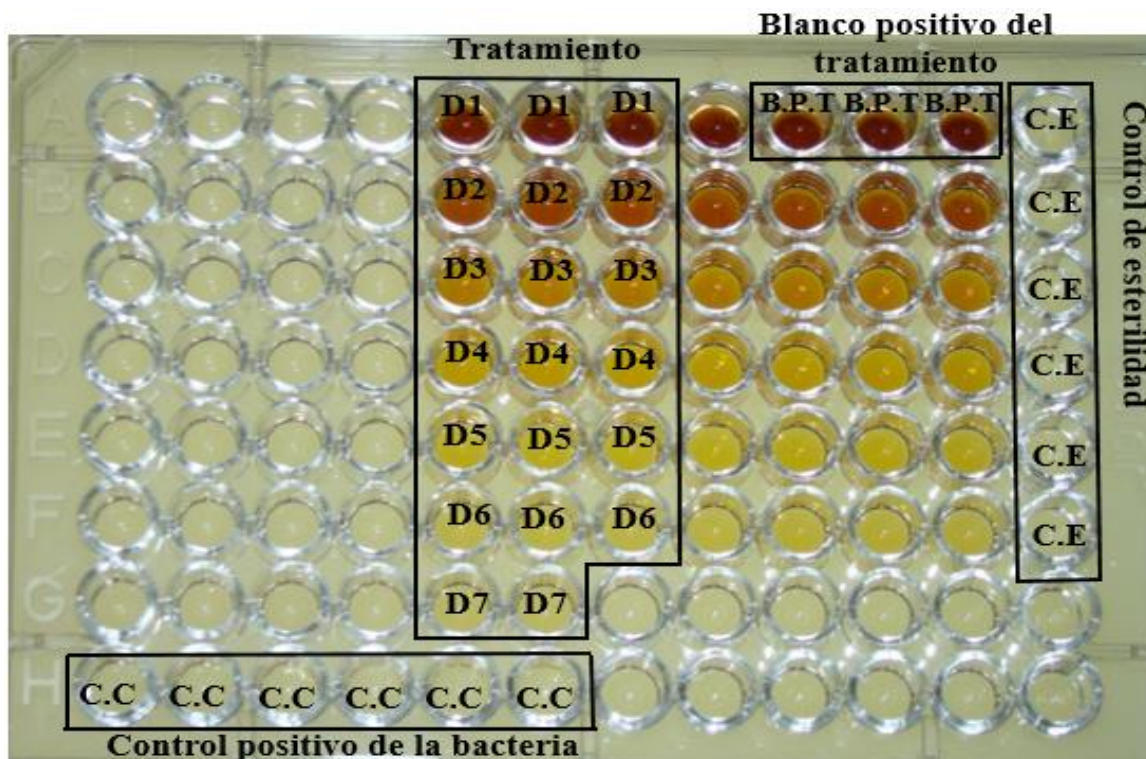


Figura 23. Representación de los pozos de la microplaca donde se tomaron las muestras para evaluar los efectos bactericida y bacteriostático de los suplementos alimenticios (tratamientos).

7.13.4 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los suplementos alimenticios

Para comprobar la actividad bactericida de los diferentes suplementos alimenticios probados en cada una de las bacterias, se diseñó una caja de Petri con medio de cultivo agar Mueller Hinton (Fig. 24). Después de leer en el espectrofotómetro la placa de la prueba de susceptibilidad bacteriana (24 horas de incubación), se sembraron 1.3 μL de cada una de las microdiluciones de la placa, la caja de Petri se incubó por 24 horas. Se comprobó la concentración mínima inhibitoria cuando el extracto mata la bacteria después de 24 horas de incubación de la caja de Petri. Se estableció como actividad bactericida la concentración del suplemento alimenticio que mata el crecimiento bacteriano a las 48 horas de realizada la prueba de susceptibilidad antibacteriana.

Basada en el mismo principio que la CMI, se definió como actividad bacteriostática a la concentración del suplemento alimenticio que inhibió el crecimiento de las bacterias a las 24

horas de incubación de la caja de Petri, pero permite el crecimiento de las bacterias a las 48 horas de realizada la prueba de susceptibilidad bacteriana.

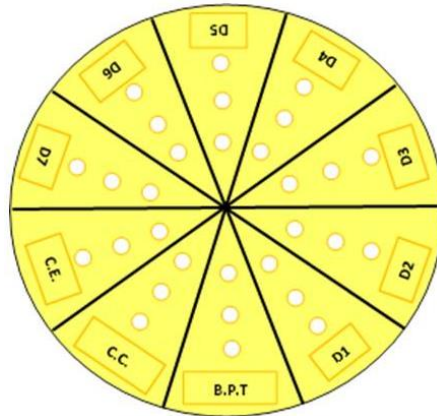


Figura 24. Modo de inoculación de la caja de Petri con agar Mueller Hinton para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los suplementos alimenticios de *Ganoderma lucidum* y amaranto, sembrado con la cepa bacteriana en estudio. C.E.= Control de esterilidad. C.C.= Control de crecimiento bacteriano (Blanco positivo de la bacteria). B.P.T= Blanco positivo del tratamiento.

7.14 Selección del mejor suplemento alimenticio

En base a los efectos bacteriostáticos y bactericidas de los suplementos alimenticios elaborados en relación V/V y P/P se compararon los resultados para seleccionar el suplemento alimenticio con mejores propiedades.

VIII. RESULTADOS

8.1 Basidiocarpos de la CP-145 de *Ganoderma lucidum*

La cepa (CP-145) de *G. lucidum* (Fig. 25), se cultivó en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales, con la formulación COLPOS-17. Los basidiocarpos presentaron un color anaranjado, himenio color blanquecino, píleo de 7.1 x 5.4 cm. Con respecto a la producción de dicha cepa, el periodo transcurrido desde la inoculación hasta la primera cosecha fue de 87 días, con una producción de 677.287 g, y una eficiencia biológica del 5.74% (Quiriz-Cerezo, 2012).



Figura 25. Basidiocarpos de *Ganoderma lucidum* (CP-145), cultivados en la formulación COLPOS-17.

8.2 Características del material biológico vegetal

8.2.1 Semilla de amaranto criollo conocida como “nieves”

De un total de este tipo de semilla de 5906 g se obtuvieron 5599 g de la semilla limpia lo que equivalió a un 95%, y 307 g de residuos que fue correspondiente a un 5% (Fig. 26).

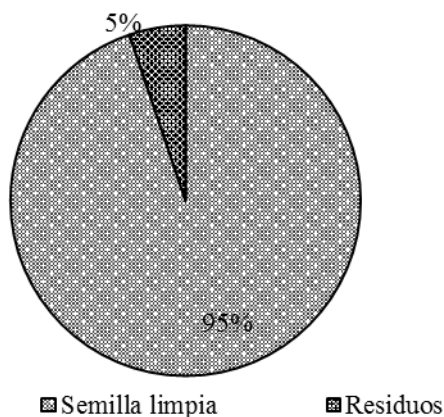


Figura 26. Proporciones (%) de la semilla de amaranto criollo conocido como nieves durante la limpieza.

De 5 kg de semilla nieves, se obtuvo 3.370 kg de tamaño de 1000 micrones representando un 67% del total, seguido, por la semilla de tamaño de 841 micrones con 1.022 Kg 20%, y >20 micrones 0.577 Kg equivalentes al 12% del peso, y 31 g de residuos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Clasificación por tamaños de la semilla de amaranto conocida como nieves en base a su peso (muestra de 5 kg).

| Tamiz | Tamaño (micrones) | Peso (g) | % |
|----------|-------------------|----------|-----|
| 18 | 1000 | 3370 | 67 |
| 20 | 841 | 1022 | 20 |
| >20 | <841 | 577 | 12 |
| Residuos | | 31 | 1 |
| Total | | 5000 | 100 |

De la separación por tamaños de la semilla conocida como nieves, la que mayor tamaño presento fue la de 1000 micrones con 67%, seguida por la del tamiz número 20 con 20% y la semilla que tuvo >20 con 12% (Fig. 27).

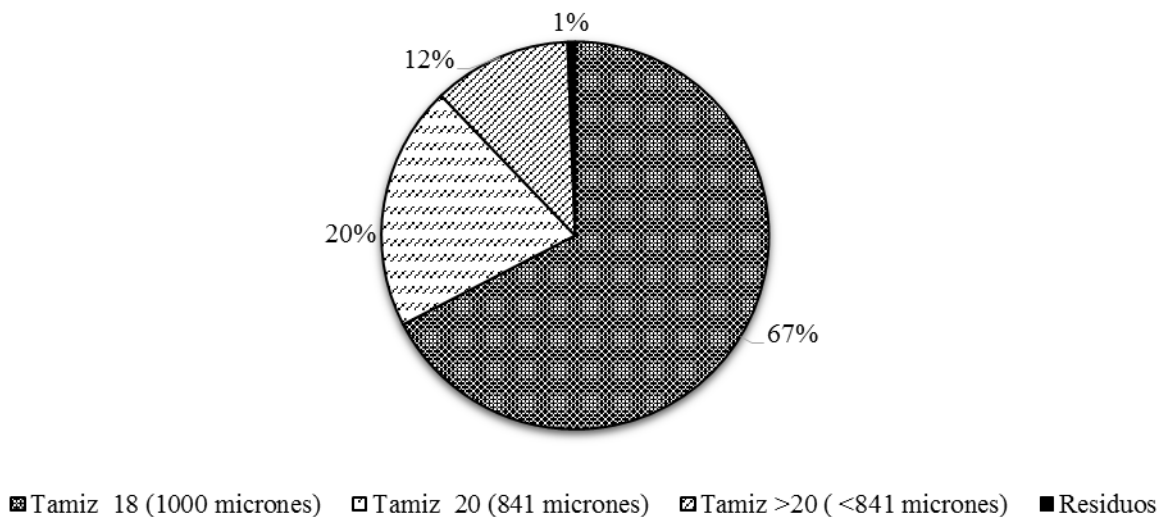


Figura 27. Clasificación por tamaños (%) de la semilla de amaranto criolla conocida como nieves usando diferentes tamices y 5 Kg de muestra.

8.2.2 Semilla de amaranto mejorada variedad “nutrisol”

De un total de 7624 g de semilla variedad nutrisol contiene 7514 g de la semilla limpia representó el 99% y solo 110 g de residuos correspondieron al 1% (Fig. 28).

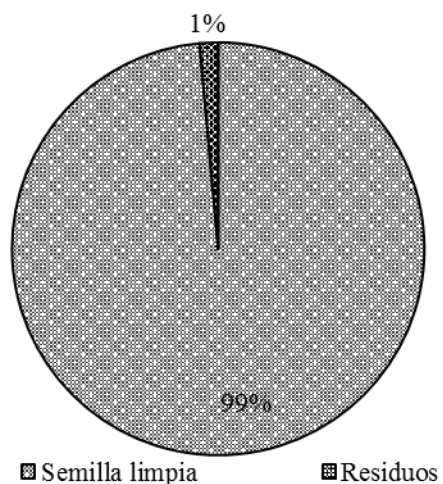


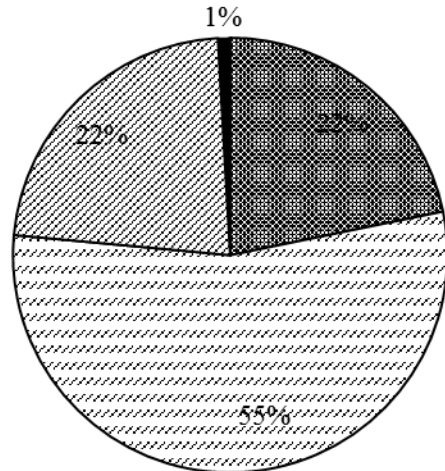
Figura 28. Proporciones (%) de la semilla de amaranto variedad nutrisol durante la limpieza.

De 5 kg de semilla de la variedad nutrisol la que mayor cantidad respecto a su tamaño fue la de 841 micrones con un peso de 2.735 kg representando un 55% del total, seguido por la de 1000 micrones con 1.089 Kg y la de <841 micrones con 1.131 Kg, las dos con el mismo 22% (Cuadro 10).

Cuadro 10. Clasificación por tamaños de la semilla de amaranto variedad nutrisol.

| Tamiz | Tamaño (Micrones) | Peso (g) | % |
|----------|-------------------|----------|-----|
| 18 | 1000 | 1089 | 22 |
| 20 | 841 | 2735 | 55 |
| > 20 | < 841 | 1131 | 22 |
| Residuos | | 45 | 1 |
| Total | | 5000 | 100 |

La separación de la semilla por tamaños en la variedad nutrisol el que mayor porcentaje obtuvo fue la número 20 con 55% de un total de 5 Kg, seguida por la de los tamaños 18 y >20 con el mismo porcentaje de 22%. Una vez que se separaron las semillas de las dos tipos de amaranto se procedió a preparar las muestras y obtener extractos utilizando como solvente una solución hidroalcohólica (Fig. 29). Se les determinó la humedad a las dos semillas de amaranto, para la semilla conocida como nieves se obtuvo un 9.2% de humedad y para la variedad nutrisol de 13.5%.



■ Tamiz 18 (1000 micrones) ▨ Tamiz 20 (841 micrones) ▩ Tamiz >20 (<841 micrones) ■ Residuos

Figura 29. Clasificación por tamaños (%) de la semilla de amaranto variedad nutrisol usando diferentes tamices y 5 Kg de muestra.

8.3 pH de los macerados hidroalcohólicos de las semillas de amaranto sin clasificar por tamaños (enteras y molidas)

Los valores de pH, más altos fueron el de la variedad nutrisol entera de 7.11 y nutrisol molida 6.63, mientras que con la semilla conocida como nieves entera y molida fueron de 6.08 y 6.15. De los extractos obtenidos se tomaron pequeñas muestras para hacer análisis de polifenoles totales y proteínas (Fig. 30).

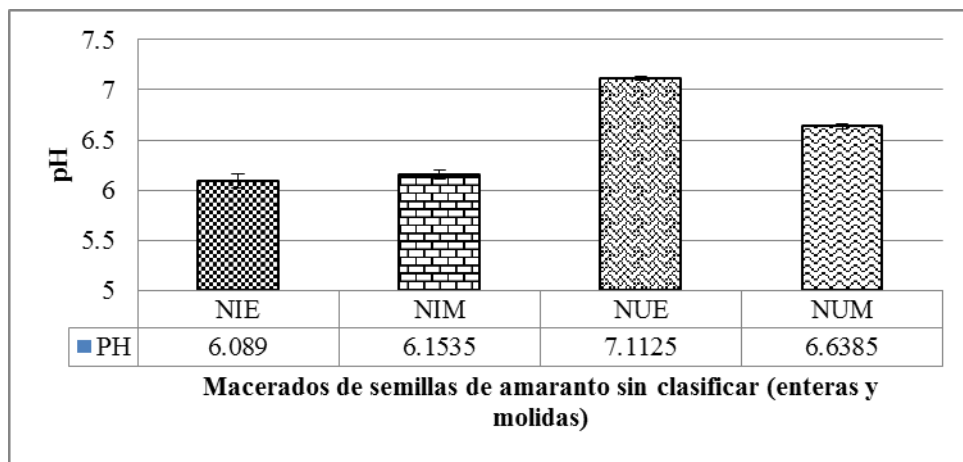


Figura 30. pH de los macerados hidroalcohólicos de las semillas de amaranto sin clasificar por tamaños (enteras y molidas). NIE = Nieves entera; NIM= Nieves molida; NUE= Nutrisol entera; NUM= Nutrisol molida.

8.4 pH de los macerados hidroalcohólicos de las semillas de amaranto clasificadas por tamaños (enteras y molidas)

De los extractos que se analizaron los que presentaron altos valores de pH fueron los de la variedad nutrisol entera tamaño 18 (NUE18) con 6.79, nutrisol entera tamaño 20 (NUE20) con 7.04, y nutrisol entera tamaño mayor de 20, (NUE>20) con 7.07. Los extractos que tuvieron menores valores fueron las semillas nieves entera tamaño 18 (NIE18) con 6.04 y la nieves entera tamaño 20 (NIE20) 6.09 (Fig. 31).

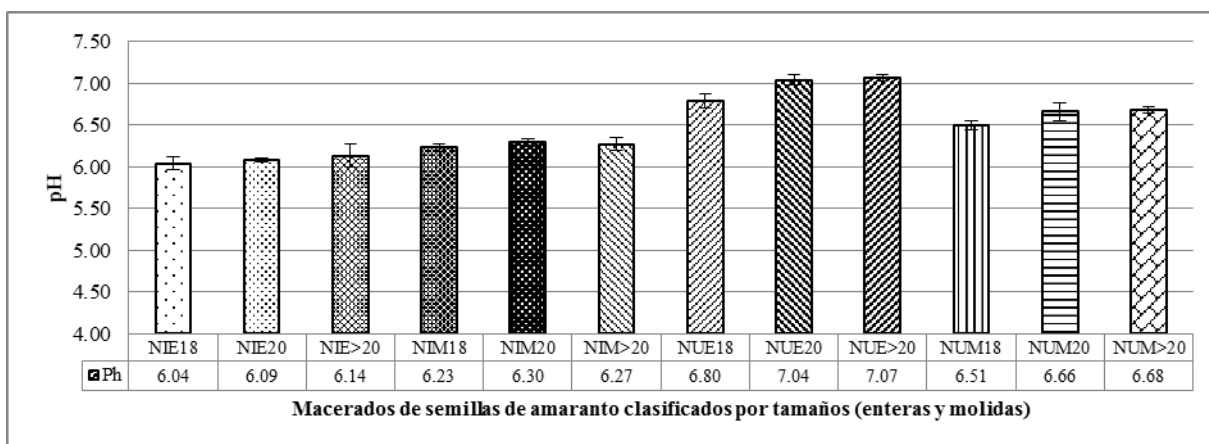


Figura 31. pH de los macerados hidroalcohólicos de las semillas de amaranto clasificados por tamaños (enteras y molidas). NIE18= Nieves entera tamaño 18; NIE20= Nieves entera tamaño 20; NIE>20= Nieves entera tamaño >20; NUE18= Nutrisol entera tamaño 18; NUE20= Nutrisol entera tamaño 20; NUE>20= Nutrisol entera tamaño >20; NIM18= Nieves molida tamaño 18; NIM20= Nieves molida tamaño 20; NIM>20= Nieves molida tamaño >20; NUM18= Nutrisol molida tamaño 18; NUM20= Nutrisol molida tamaño 20; NUM>20= Nutrisol molida tamaño >20.

8.5 Caracterización de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de amaranto sin clasificar por tamaños (enteras y molidas)

8.5.1 Polifenoles totales de los extractos

La semilla conocida como nieves sin clasificar la semilla por su tamaño, nieves molida (NIM) obtuvo mayor cantidad de polifenoles totales de 0.19 mgEAG/g y la nieves entera (NIE), obtuvo una cantidad de 0.17 mgEAG/g, mientras que la variedad nutrisol molida sin clasificar por su tamaño, obtuvo mayor cantidad de polifenoles totales de 0.28 mgEAG/g y la nutrisol entera, obtuvo una cantidad de 0.26 mgEAG/g (Fig. 32).

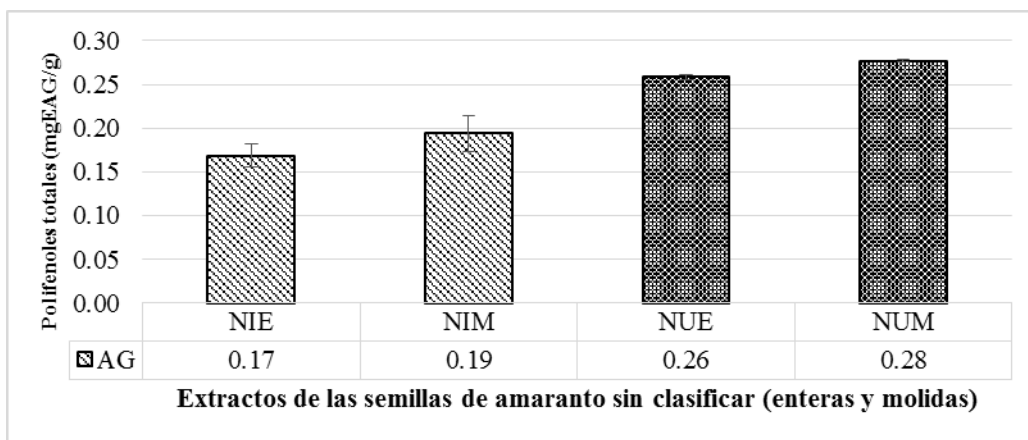


Figura 32. Polifenoles totales de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de amaranto sin clasificar por tamaños (enteras y molidas). NIE = Nieves entera; NIM= Nieves molida; NUE= Nutrisol entera; NUM= Nutrisol molida.

8.5.2 Proteínas de los extractos

De las muestras de los extractos sin clasificar por tamaño que obtuvieron mayores resultados fueron de la variedad nutrisol molida (NUM) con 74.39 $\mu\text{g/g}$ seguida por la nieves molida (NIM) 62.88 $\mu\text{g/g}$ y las enteras presentaron valores de 20.97 $\mu\text{g/g}$ nieves enteras (NIE) y nutrisol entera (NUE) 44.86 $\mu\text{g/g}$ (Fig. 33).

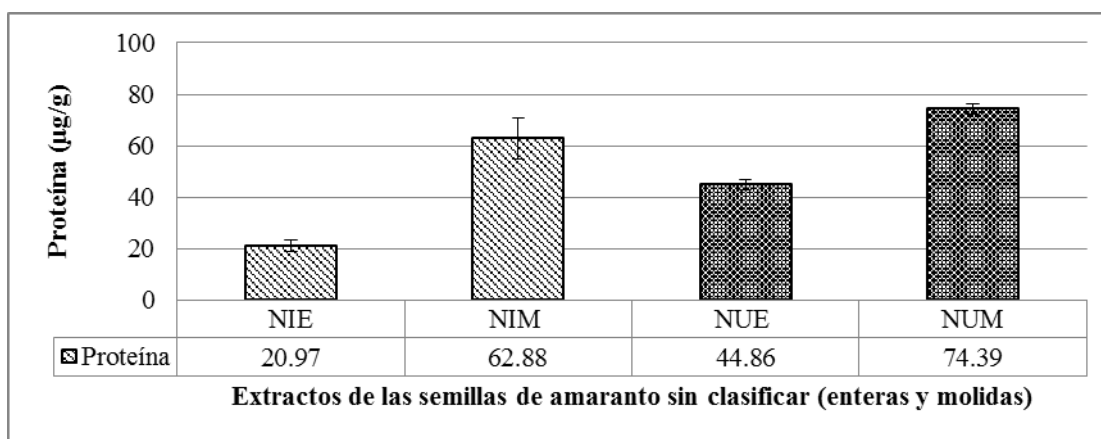


Figura 33. Concentraciones de proteína $\mu\text{g/g}$ de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de amaranto sin clasificar por tamaños (enteras y molidas). NIE = Nieves entera; NIM= Nieves molida; NUE= Nutrisol entera; NUM= Nutrisol molida.

8.5.3 Rendimiento de los extractos

En ambas semillas de amaranto sin clasificar por tamaño, las que obtuvieron mayor rendimiento de extracto fueron las molidas siendo la más alta de la nutrisol molida (NUM) con

rendimiento de 46.16 mg/g seguida por la nieves molida (NIM) 42.96 mg/g, ya que las semillas enteras presentaron rendimientos de (NIE) 18.56 y (NUE) 31.04 mg/g (Fig. 34).

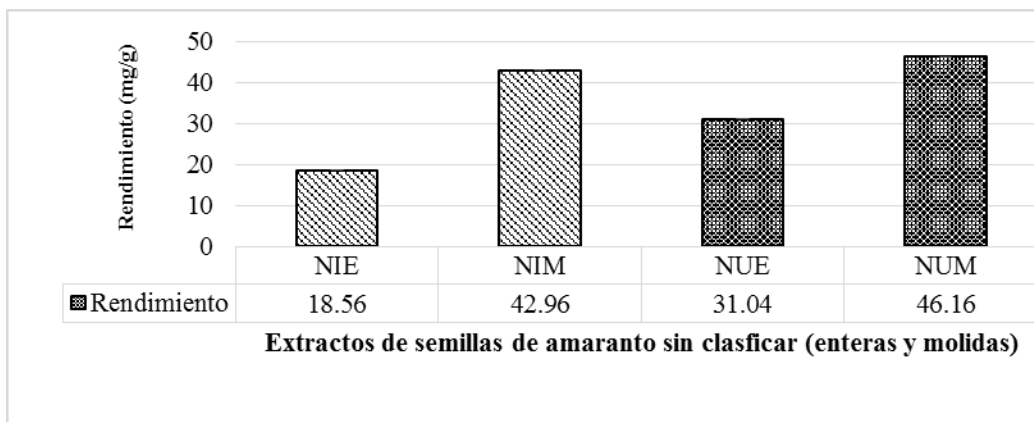


Figura 34. Rendimientos de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de amaranto sin clasificar por tamaños (enteras y molidas). NIE = Nieves entera; NIM= Nieves molida; NUE= Nutrisol entera; NUM= Nutrisol molida.

8.6 Caracterización de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de amaranto clasificadas por tamaños (enteras y molidas)

8.6.1 Polifenoles totales de los extractos

Curvas estándar de ácido gálico

La concentración de fenoles totales fue expresada en mg de equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g). Para la determinación del contenido de los polifenoles en los extractos de los basidiocarpos, se procedió a realizar la curva de calibración estándar con ácido gálico (Fig. 35).

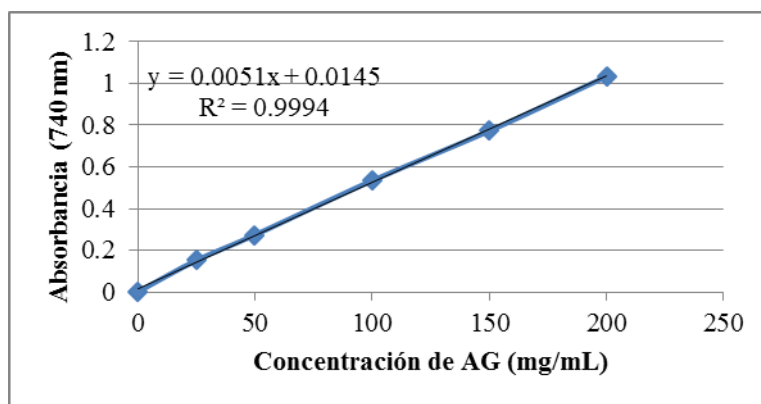


Figura 35. Curva de ácido gálico (AG) para determinar la concentración de polifenoles totales.

El contenido de polifenoles totales de los extractos hidroalcohólicos de la semilla nieves molida, la que mayor cantidad obtuvo fue la nieves molida 18 (NIM18) con resultado de 0.25 mgEAG/g, y la nieves molida tamaño 20 (NIM20) con 0.20 mgEAG/g. Y para la variedad nutrisol fueron las del tamaño >20 enteras y molidas (NUE>20) y (NUM>20) con 0.37 mgEAG/g y 0.35 mgEAG/g, las muestras que les siguieron fueron por las del tamaño 20 enteras y molidas (NUE20 y NUM20) 0.32 mgEAG/g y 0.31 mgEAG/g. Los extractos hidroalcohólicos que tuvieron menores resultados fueron las semillas, nieves entera tamaño 18 (NIE18) con 0.12 mgEAG/g y la nieves entera tamaño 20 (NIE20) 0.10 mgEAG/g (Fig. 36).

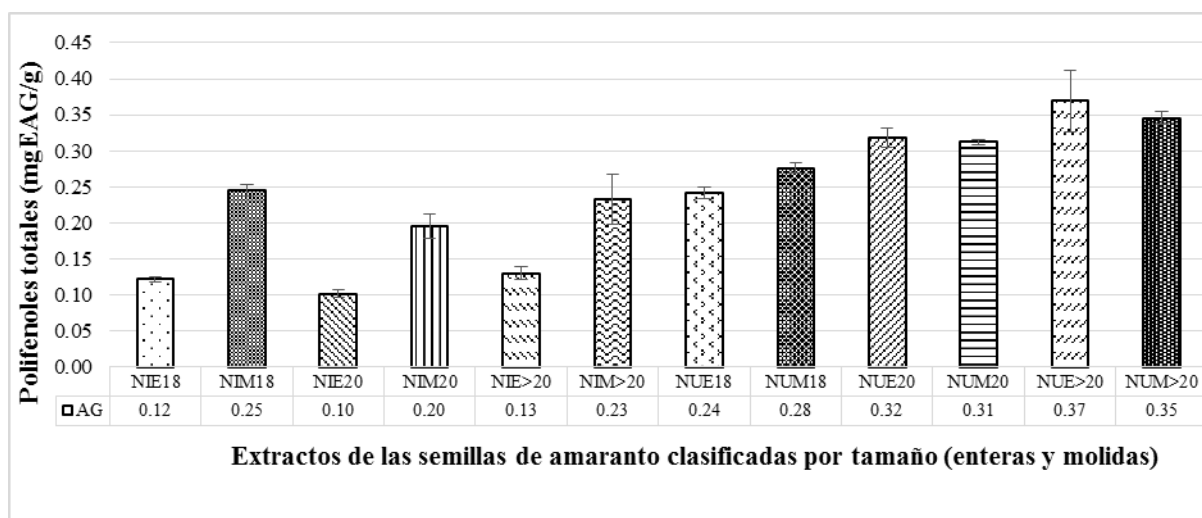


Figura 36. Polifenoles totales de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de amaranto clasificadas por tamaños (enteras y molidas). NIE18= Nieves entera tamaño 18; NIE20= Nieves entera tamaño 20; NIE>20= Nieves entera tamaño >20; NUE18= Nutrisol entera tamaño 18; NUE20= Nutrisol entera tamaño 20; NUE>20= Nutrisol entera tamaño >20; NIM18= Nieves molida tamaño 18; NIM20= Nieves molida tamaño 20; NIM>20= Nieves molida tamaño >20; NUM18= Nutrisol molida tamaño 18; NUM20= Nutrisol molida tamaño 20; NUM>20= Nutrisol molida tamaño >20.

8.6.2 Proteínas de los extractos

Curvas estándar de BSA

Para la determinación del contenido de proteína en los extractos hidroalcohólicos de los basidiocarpos, se procedió a realizar la curva de calibración mediante BSA (Albumina de Suero Bovino, Sigma) de 0 a 100 µg/mL (Fig. 37).

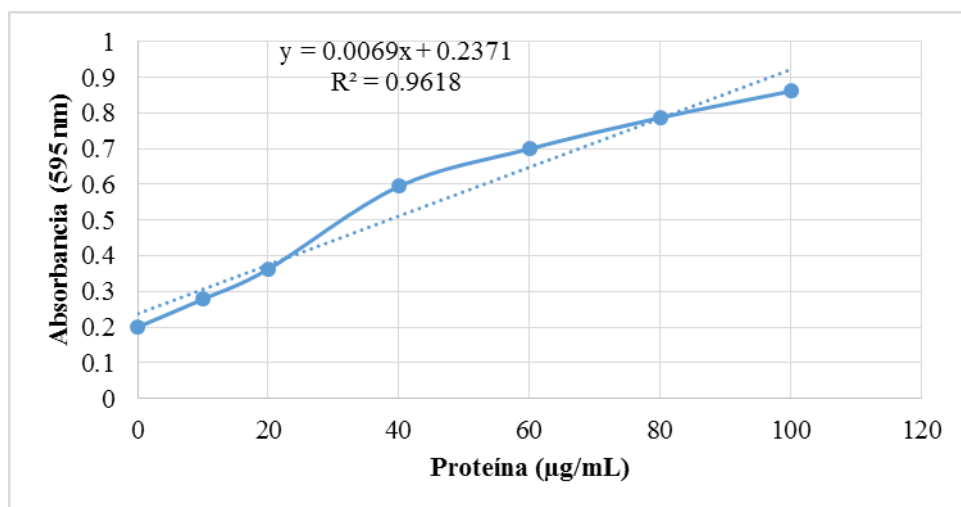


Figura 37. Curva de calibración para proteínas usando el método de Bradford.

En el contenido de proteína, los extractos hidroalcohólicos que tuvieron mejores resultados en la nieves, fueron la nieves molida 18 (NIM18) y la nieves molida 20 (NIM20), con 34.18 y 30.05 µg/g. Mientras que para la variedad nutrisol fueron la nutrisol molida tamaño 20 (NUM 20) con 38.33 µg/g, nutrisol entera tamaño >20 (NUE>20) con 39.80 µg/g. Los extractos hidroalcohólicos que tuvieron menores resultados fueron las semillas, nieves entera tamaño 18 (NIE18) con 5.64 µg/g y la nieves entera tamaño 20 (NIE20) 5.67 µg/g (Fig. 38).

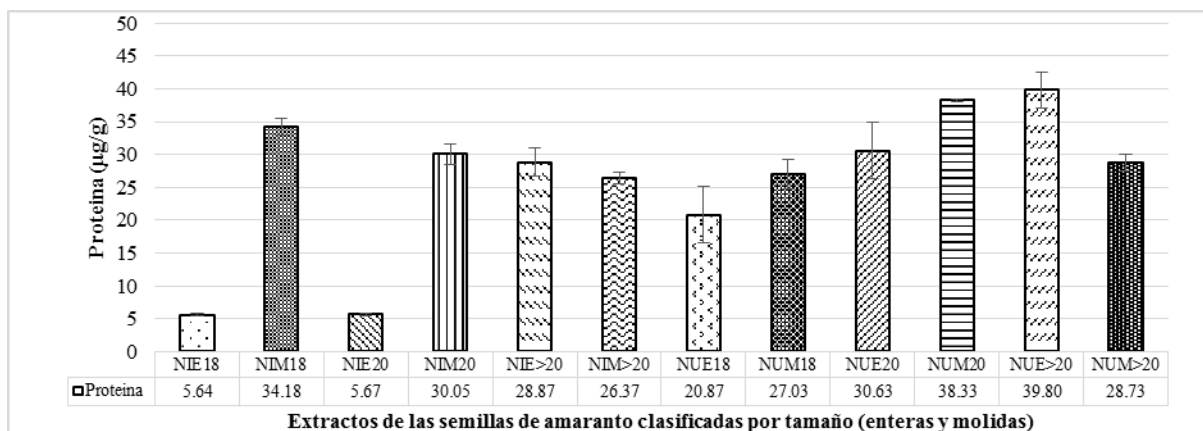


Figura 38. Contenido de proteína de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de amaranto clasificadas por tamaño (enteras y molidas). NIE18= Nieves entera tamaño 18; NIE20= Nieves entera tamaño 20; NIE>20= Nieves entera tamaño >20; NUE18= Nutrisol entera tamaño 18; NUE20= Nutrisol entera tamaño 20; NUE>20= Nutrisol entera tamaño >20; NIM18= Nieves molida tamaño 18; NIM20= Nieves molida tamaño 20; NIM>20= Nieves molida tamaño >20; NUM18= Nutrisol molida tamaño 18; NUM20= Nutrisol molida tamaño 20; NUM>20= Nutrisol molida tamaño >20.

8.6.3 Rendimiento de los extractos

Los mejores rendimientos de los extractos de las semillas de amaranto fueron la: nieves molida tamaño 18 (NIM18) con 55.33 mg/g, nutrisol molida tamaño 20 (NUM20) con 55.33 mg/g y nutrisol molida tamaño >20 (NUM>20) con 56.13 mg/g. Los extractos que tuvieron menores resultados fueron las semillas, nieves entera tamaño 18 (NIE18) con 15.73 mg/g, y la nieves entera tamaño 20 (NIE 20) 16.93 mg/g (Fig. 39).

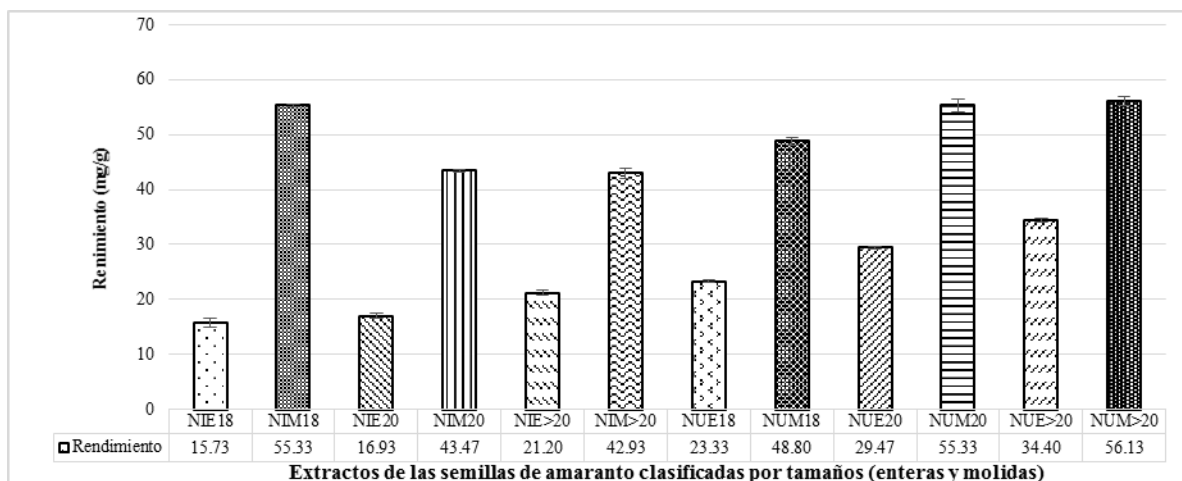


Figura 39. Rendimiento de los extractos hidroalcohólicos de las semillas de amaranto clasificadas por tamaños (enteras y molidas). NIE18= Nieves entera tamaño 18; NIE20= Nieves entera tamaño 20; NIE>20= Nieves entera tamaño >20; NUE18= Nutrisol entera tamaño 18; NUE20= Nutrisol entera tamaño 20; NUE>20= Nutrisol entera tamaño >20; NIM18= Nieves molida tamaño 18; NIM20= Nieves molida tamaño 20; NIM>20= Nieves molida tamaño >20; NUM18= Nutrisol molida tamaño 18; NUM20= Nutrisol molida tamaño 20; NUM>20= Nutrisol molida tamaño >20.

8.7 Selección de los extractos hidroalcohólicos de las semillas molidas de amaranto nieves y nutrisol clasificadas por tamaño para elaborar los suplementos alimenticios (v/v)

Para la elaboración de las mezclas con las muestras seleccionadas de amaranto y las del hongo se elaboró a un volumen total de 2 mL con diferente proporción de cada una.

8.8 Caracterización de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos de *G. lucidum* y amaranto nieves y nutrisol (v/v)

8.8.1 pH de los suplementos alimenticios (v/v)

Los valores de pH de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos, las semillas seleccionadas de amaranto y el hongo en relación volumen a volumen quedaron para la semilla conocida como nieves las claves: (A) 5.15, (B) 4.96, (C)

4.88 y la variedad nutrisol con claves fueron: (D) 5.28, (E) 5.03, (F) 4.89 y para cada ingrediente de (G) 4.81, (H) 5.94 y (I) 6.16 , esta última obtuvo el valor más alto (Fig. 40).

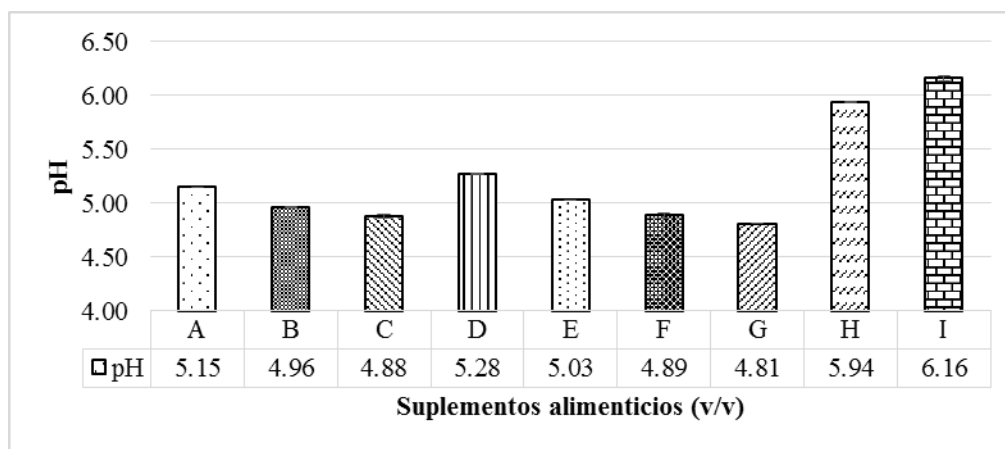


Figura 40. pH de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos de *Ganoderma lucidum* (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). A= *G. lucidum* 0.5 mL: nieves 1.5 mL; B= *G. lucidum* 1 mL: nieves 1 mL; C= *G. lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL; D= *G. lucidum* 0.5 mL: nutrisol 1.5 mL; E= *G. lucidum* 1 mL: nutrisol 1 mL; F= *G. lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL; G= *G. lucidum* 2 mL: nieves 0 mL; H= *G. lucidum* 0 mL: nieves 2 mL; I= *G. lucidum* 0 mL: nutrisol 2 mL.

8.8.2 Conductividad y resistividad de los suplementos alimenticios (v/v)

En la conductividad de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos de las semillas seleccionadas de amaranto en relación volumen a volumen quedaron para la semilla conocida como nieves con clave A de 6621.4, la B de 9369.7, la C de 11013 y con la variedad nutrisol fue para la clave D de 9544.1, la E de 9977.3, la F de 11590.1 y, para cada ingrediente de 12983.5 (clave G), siendo la mayor que todas, la H de 6091.7 y la I de 8608.3 (Fig. 41).

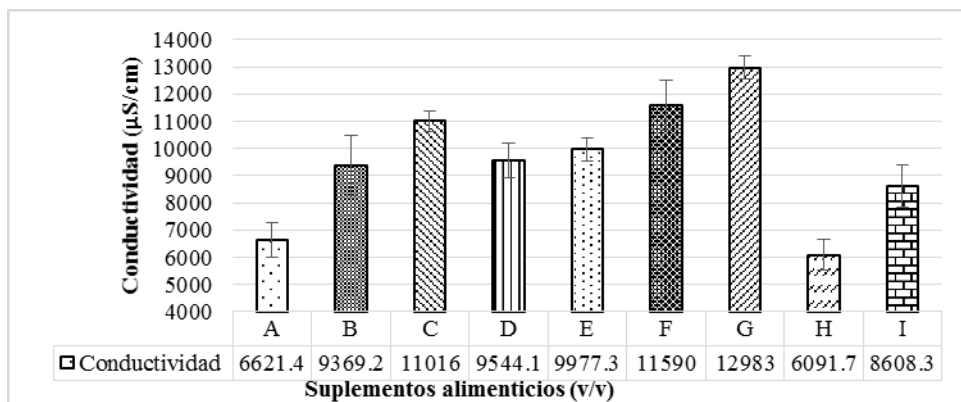


Figura 41. Conductividad de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos de *Ganoderma lucidum* (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). A= *G. lucidum* 0.5 mL: nieves 1.5 mL; B= *G. lucidum* 1 mL: nieves 1 mL; C= *G. lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL; D= *G. lucidum* 0.5 mL: nutrisol 1.5 mL; E= *G. lucidum* 1 mL: nutrisol 1 mL; F= *G. lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL; G= *G. lucidum* 2 mL: nieves 0 mL; H= *G. lucidum* 0 mL: nieves 2 mL; I= *G. lucidum* 0 mL: nutrisol 2 mL.

8.8.3 Polifenoles totales de los suplementos alimenticios (v/v)

El contenido de polifenoles totales de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos de las semillas seleccionadas de amaranto y el hongo en relación volumen a volumen quedaron para la semilla conocida como nieves, clave A de 0.84, la B de 1.40, la C de 1.85 mgEAG/g siendo la mayor entre las mezclas y, con la variedad nutrisol fue para la clave D de 0.85, la E de 1.24, la F de 1.73, y, para cada ingrediente con clave G de 2.75 siendo la mayor con respecto a la H de 0.22, y la clave I de 0.29 mgEAG/g (Fig. 42).

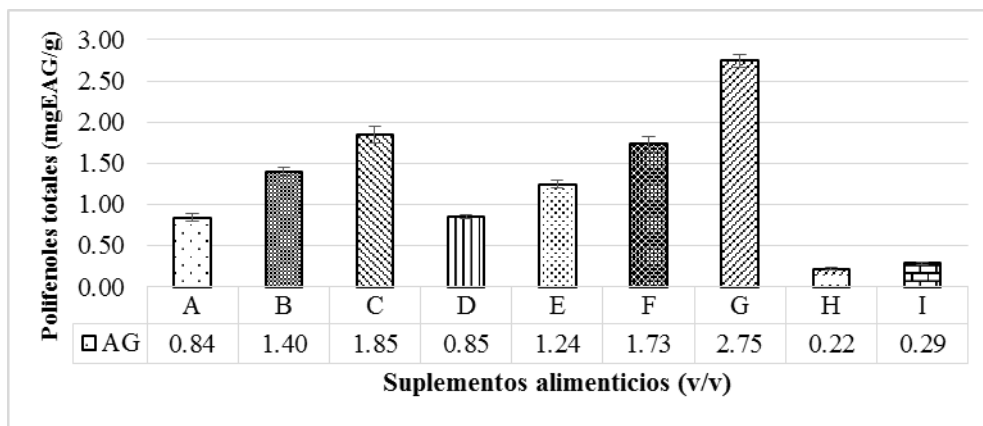


Figura 42. Polifenoles totales de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos de *Ganoderma lucidum* (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). A= *G. lucidum* 0.5 mL: nieves 1.5 mL; B= *G. lucidum* 1 mL: nieves 1 mL; C= *G. lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL; D= *G. lucidum* 0.5 mL: nutrisol 1.5 mL; E= *G. lucidum* 1 mL: nutrisol 1 mL; F= *G. lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL; G= *G. lucidum* 2 mL: nieves 0 mL; H= *G. lucidum* 0 mL: nieves 2 mL; I= *G. lucidum* 0 mL: nutrisol 2 mL.

8.8.4 Proteína de los suplementos alimenticios (v/v)

El contenido proteína de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos de las semillas seleccionadas de amaranto y el hongo en relación volumen a volumen quedaron para la semilla conocida como nieves, con clave A de 83.61, la B de 117.0 y la clave C de 131.93 $\mu\text{g/g}$, y con la variedad nutrisol la clave D con 126.77, la clave E de 159.22, y el suplemento alimenticio F de 236.38 $\mu\text{g/g}$, este valor fue el más alto entre las mezclas y, para cada ingrediente con clave G de 237.60 $\mu\text{g/g}$ que fue la de mayor concentración, el H con 44.11 y el I con 94.98 $\mu\text{g/g}$ (Fig. 43).

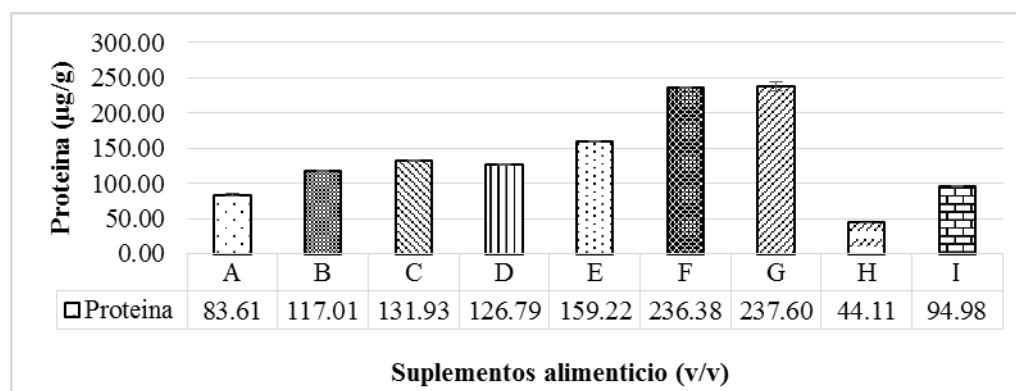


Figura 43. Contenido de proteína de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos de *Ganoderma lucidum* (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). A= *G. lucidum* 0.5 mL: nieves 1.5 mL; B= *G. lucidum* 1 mL: nieves 1 mL; C= *G. lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL; D= *G. lucidum* 0.5 mL: nutrisol 1.5 mL; E= *G. lucidum* 1 mL: nutrisol 1 mL; F= *G. lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL; G= *G. lucidum* 2 mL: nieves 0 mL; H= *G. lucidum* 0 mL: nieves 2 mL; I= *G. lucidum* 0 mL: nutrisol 2 mL.

8.8.5 Rendimiento de los suplementos alimenticios (v/v)

Con respecto al rendimiento de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos de las semillas seleccionadas de amaranto y el hongo en relación volumen a volumen, los elaborados a base de semilla conocida como nieves con clave A fue de 59.72 mg/g, el B de 84.76 mg/g, el C de 102.32 mg/g y, con la variedad nutrisol, el suplemento alimenticio con clave D fue 64.52 mg/g, el E con 82.6 mg/g, el F de 101.56 mg/g, y, para el G de 123.50 mg/g, siendo éste suplemento el que obtuvo mayor rendimiento, en comparación con el H de 46.92 mg/g y el I 45.25 mg/g (Fig. 44).

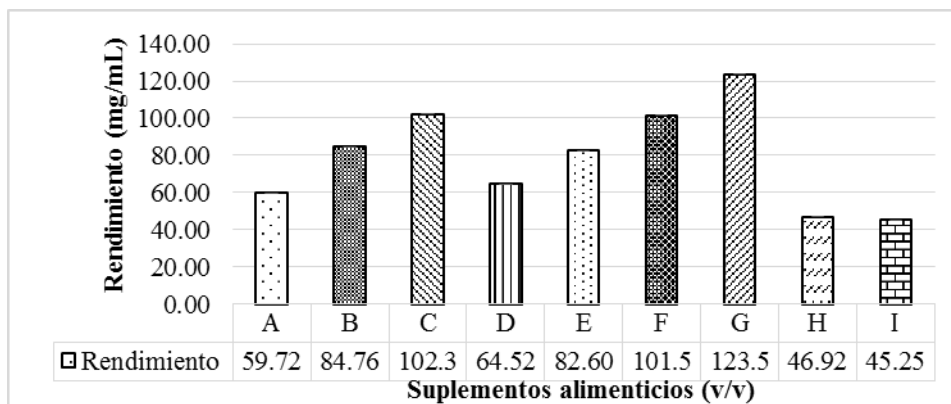


Figura 44. Rendimiento de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos de *Ganoderma lucidum* (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). A= *G. lucidum* 0.5 mL: nieves 1.5 mL; B= *G. lucidum* 1 mL: nieves 1 mL; C= *G. lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL; D= *G. lucidum* 0.5 mL: nutrisol 1.5 mL; E= *G. lucidum* 1 mL: nutrisol 1 mL; F= *G. lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL; G= *G. lucidum* 2 mL: nieves 0 mL; H= *G. lucidum* 0 mL: nieves 2 mL; I= *G. lucidum* 0 mL: nutrisol 2 mL.

8.9 Análisis estadístico (SAS)

Se determinó si existen diferencias significativas entre los suplementos alimenticios y correlaciones entre los resultados de polifenoles totales, proteína y rendimiento por el Coeficiente de Correlación de Pearson (Cuadro 11).

Cuadro 11. Análisis estadístico de las variables en estudio con el programa (SAS) de los suplementos alimenticios en relación (volumen/volumen) (n=3).

| Suplementos alimenticios | Variables | | |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------|--------------------|
| | Polifenoles totales (mgEAG/g) | Proteína (µg/g) | Rendimiento (mg/g) |
| A | 0.84±0.05d | 83.610 ± 7.004 dc | 67.400 ±0.844d |
| B | 1.40±0.05c | 117.005±6.216 bc | 85.550 ±0.69c |
| C | 1.85±0.10b | 131.928±6.454 bc | 103.350 ±0.84b |
| D | 0.85±0.03d | 126.78 ±6.485 bc | 64.850 ±0.805d |
| E | 1.24±0.04c | 159.218 ± 7.383 b | 83.200±1.134c |
| F | 1.73±0.09b | 242.005 ±6.536 a | 102.400 ±1.489b |
| G | 2.75±0.08a | 237.60 ±31.43 a | 124.350 ±1.927a |
| H | 0.22± 0.02e | 44.108 ±1.084 d | 47.25 ±0.4031 e |
| I | 0.29±0.01e | 94.983±4.424 dc | 45.250 ±0.590e |

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una P≤0.05.

Polifenoles totales

Los resultados obtenidos en el programa SAS, se obtuvo una F-valor de 179.84 y $Pr < 0.0001$ muy altamente significativa, lo cual nos muestra que hay diferencias significativas entre los suplementos alimenticios en su contenido de polifenoles (antioxidantes) con una $R^2 = 0.981$.

Para probar que $H_0: t_1=t_2=t_3=t_4=t_5=t_6=t_7=t_8=t_9$ en oposición a H_a : al menos un suplemento alimenticio es diferente de los demás, con un $\alpha = 0.05$, obtenemos que se rechaza H_0 y se concluye que al menos un suplemento alimenticio es diferente. La prueba de Tukey indicó que las medias de los tratamientos de acuerdo al análisis que nos proporcionó el programa, el suplemento alimenticio H, compuesto con 2 mL de nieves de extracto hidroalcohólico con una media de 0.22 ± 0.02 mgEAG/g y el suplemento alimenticio I compuesto de nutrisol con 2 mL de su extracto hidroalcohólico con una media de 0.29 ± 0.01 mgEAG/g no presentaron diferencias significativas.

A los suplementos alimenticios con 0.5 mL de extracto del hongo *G. lucidum*, como el suplemento alimenticio A, compuesto con 0.5 mL *G. lucidum* y 1.5 mL nieves de extracto hidroalcohólico y el suplemento alimenticio D, compuesto con 0.5 mL *G. lucidum* y 1.5 mL nutrisol de extracto hidroalcohólico no presentaron diferencias significativas, ya que obtuvieron medias de 0.84 ± 0.05 y 0.85 ± 0.03 mgEAG/g, respectivamente.

De igual forma cuando se le agregó 1 mL del extracto del hongo *G. lucidum* a cada extracto de diferente semilla, el suplemento alimenticio B, compuesto con 1 mL *G. lucidum* y 1 mL con extracto hidroalcohólico y el suplemento alimenticio E, compuesto con 1 mL *G. lucidum* y 1 mL nutrisol de extracto hidroalcohólico, no presentaron diferencias significativas con medias de 1.40 ± 0.05 y 1.24 ± 0.04 mgEAG/g, respectivamente.

Con 1.5 mL del extracto del hongo *G. lucidum* agregado a los dos extractos con diferente tipo de semilla de amaranto, el suplemento alimenticio C, compuesto con 1.5 mL *G. lucidum* y 0.5 mL nieves de extracto hidroalcohólico y el suplemento alimenticio F, compuesto con 1.5 mL *G. lucidum* y 0.5 mL nutrisol de extracto hidroalcohólico tampoco presentaron diferencia significativa con medias de 1.85 ± 0.10 y 1.73 ± 0.09 mgEAG/g, respectivamente.

En el caso del suplemento alimenticio G, compuesto con 2 mL *G. lucidum* de extracto hidroalcohólico presentaron diferencias significativas con todas los suplementos alimenticios A, B, C, D, E y F, con una media de 2.75 ± 0.08 mgEAG/g.

Proteína

Los resultados obtenidos en el programa SAS, con una F-valor de 31.18 y Pr <0.0001 (muy altamente significativa), lo cual nos mostró que hubo diferencias significativas entre los suplementos alimenticios en su contenido de polifenoles totales, con una $R^2 = 0.9023$. Para probar que $H_0: t_1=t_2=t_3=t_4=t_5=t_6=t_7=t_8=t_9$ en oposición a H_a : al menos un suplemento alimenticio es diferente de los demás, con un $\alpha = 0.05$, obtenemos que se rechaza H_0 y se concluye que al menos un suplemento alimenticio es diferente.

La prueba de Tukey de acuerdo al análisis que nos proporcionó el programa, el suplemento alimenticio H, compuesto con 2 mL de nieves de extracto hidroalcohólico con una media de $44.108 \pm 1.084 \mu\text{g/g}$ y suplemento alimenticio I, compuesto de nutrisol con 2 mL de su extracto hidroalcohólico con una media de $94.983 \pm 4.424 \mu\text{g/g}$, no presentaron diferencias significativas al igual que el suplemento alimenticio A, compuesto con 0.5 mL *G. lucidum* y 1.5 mL nieves, con una media de $83.610 \pm 7.004 \mu\text{g/g}$. Cuando a los suplementos alimenticios de diferente semilla se les agregó 0.5 mL de extracto del hongo *G. lucidum*, el suplemento alimenticio A, compuesto con 0.5 mL *G. lucidum* y 1.5 mL nieves de extracto hidroalcohólico y el suplemento alimenticio D, compuesto con 0.5 mL *G. lucidum* y 1.5 mL de extracto hidroalcohólico nutrisol, no hubo diferencias significativas con medias de 83.610 ± 7.004 y $126.78 \pm 6.485 \mu\text{g/g}$, respectivamente.

De igual forma cuando se le agregó 1 mL del extracto del hongo *G. lucidum* a cada suplemento alimenticio de diferente semilla, el suplemento alimenticio B, compuesto con 1 mL *G. lucidum* y 1 mL con extracto hidroalcohólico, obtuvo una media de $117.005 \pm 6.216 \mu\text{g/g}$ y suplemento alimenticio E, compuesto con 1 mL *G. lucidum* y 1 mL nutrisol de extracto hidroalcohólico, no presentaron diferencias significativas con una media de $159.218 \pm 7.383 \mu\text{g/g}$. Con 1.5 mL del extracto del hongo *G. lucidum* agregado al suplemento alimenticio C, compuesto con 1.5 mL de *G. lucidum* y 0.5 mL nieves de extracto hidroalcohólico y el suplemento alimenticio F, compuesto con 1.5 mL de *G. lucidum* y 0.5 mL de extracto hidroalcohólico nutrisol, presentaron diferencia significativa con medias de $131.928 \pm 6.454 \mu\text{g/g}$ y $242.005 \pm 6.536 \mu\text{g/g}$, siendo la mejor la segunda de todas suplementos que se elaboraron. En el suplemento alimenticio G, compuesto con 2 mL de *G. lucidum* de extracto hidroalcohólico presentaron diferencias significativas con todas las diferentes mezclas, con

una media de $237.60 \pm 31.43 \mu\text{g/g}$, excepto con el suplemento alimenticio F, compuesto con 1.5 mL *G. lucidum* y 0.5 mL nutrisol de extracto hidroalcohólico $242.005 \pm 6.536 \mu\text{g/g}$.

Otro grupo donde se compararon y no presentaron diferencias significativas, fue el suplemento alimenticio B, compuesto con 1 mL *G. lucidum* y 1 mL con extracto hidroalcohólico, con $117.005 \pm 6.216 \mu\text{g/g}$, el suplemento alimenticio C, compuesto con 1.5 mL *G. lucidum* y 0.5 mL nieves de extracto hidroalcohólico con $131.928 \pm 6.454 \mu\text{g/g}$ y suplemento alimenticio A, compuesto con 0.5 mL *G. lucidum* y 1.5 mL nieves de extracto hidroalcohólico con una media de $126.78 \pm 6.485 \mu\text{g/g}$.

Rendimiento

Cuando se analizaron los resultados en el programa SAS, la F-valor de 623.11 y $\text{Pr} < 0.0001$ fue muy altamente significativa, lo cual nos muestra que hubo diferencias significativas entre los suplementos alimenticios en su rendimiento con una $R^2 = 0.994$. Para probar que $H_0: t_1 = t_2 = t_3 = t_4 = t_5 = t_6 = t_7 = t_8 = t_9$ en oposición a H_a : al menos un tratamiento es diferente de los demás, con un $\alpha = 0.05$, obtenemos que se rechaza H_0 y se concluye que al menos un suplemento alimenticio es diferente. De acuerdo al análisis de la prueba de Tukey que nos proporcionó el programa, el suplemento alimenticio a base de semillas nieves H = *G. lucidum*, 0 mL: nieves 2 mL con una media de $47.25 \pm 0.4031 \text{ mg/g}$ y la nutrisol I = *G. lucidum*, 0 mL: nutrisol 2 mL con una media de $45.250 \pm 0.590 \text{ mg/g}$ no presentaron diferencias significativas.

Cuando a cada suplemento con diferente semilla se le agregó 0.5 mL de extracto del hongo *G. lucidum*, el suplemento alimenticio A, compuesto con 0.5 mL *G. lucidum* y 1.5 mL nieves de extracto hidroalcohólico y suplemento alimenticio D, compuesto con 0.5 mL *G. lucidum* y 1.5 mL nutrisol de extracto hidroalcohólico, no presentaron diferencias significativas con medias de 67.400 ± 0.844 y $64.850 \pm 0.805 \text{ mg/g}$, respectivamente.

Al agregar 1 mL del extracto del hongo *G. lucidum*, el suplemento alimenticio B, compuesto con 1 mL de *G. lucidum* y 1 mL con extracto hidroalcohólico, con $85.550 \pm 0.69 \text{ mg/g}$ y, el suplemento alimenticio E, compuesto con 1 mL *G. lucidum* y 1 mL nutrisol de extracto hidroalcohólico no presentaron diferencias significativas con media de $83.200 \pm 1.134 \text{ mg/g}$.

El suplemento alimenticio C, compuesto con 1.5 mL de *G. lucidum* y 0.5 mL nieves de extracto hidroalcohólico obtuvo $103.350 \pm 0.84 \text{ mg/g}$ y el suplemento alimenticio F, compuesto con 1.5 mL *G. lucidum* y 0.5 mL nutrisol de extracto hidroalcohólico tampoco presentaron diferencia significativa con $102.400 \pm 1.489 \text{ mg/g}$. El suplemento alimenticio G, compuesto con

2 mL *G. lucidum* de extracto hidroalcohólico presentó diferencias significativas con todos los suplementos alimenticios diferentes con una media de 124.350 ± 1.927 mg/g. Se presentan diferencias significativas entre los grupos de los suplementos alimenticios de los extractos de las dos semillas de amaranto y *G. lucidum*, en base a las diferentes proporciones establecidas.

Correlación de las variables

Coeficiente de Correlación de Pearson de las mezclas establecidas del hongo *G. lucidum* y los dos diferentes tipos de semillas de amaranto. La concentración entre polifenoles totales y el contenido de proteína están relacionados en un 0.9560 con <0.0001 un nivel muy alto significancia, pero la concentración del primero con el rendimiento de los suplementos alimenticios indica una correlación más fuerte en un 0.9845 con <0.0001 , un nivel muy alto significancia. La relación entre el contenido de proteína y el rendimiento fue menor que con la de polifenoles totales, siendo de 0.9702 con <0.0001 , un nivel muy alto significancia. La cantidad de semilla de los dos tipos de amarantos y el hongo *G. lucidum* que se obtuvo en los suplementos alimenticios con relación volumen/volumen impactan directamente en el rendimiento, polifenoles totales y proteína.

8.10 Prueba de susceptibilidad bacteriana de los suplementos alimenticios (v/v) usando una cepa bacteriana

8.10.1 Bioensayo con la cepa CPB-4 de *Streptococcus agalactiae*

8.10.1.1 Confirmación del inóculo

Para determinar la concentración de bacterias del inóculo o semilla de la CPB-4 de *Streptococcus agalactiae* se tomaron 50 μ L y se vertieron por triplicado en cajas Petri con agar Mueller Hinton, mismas que se incubaron por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C (Fig. 45). Se confirmó la concentración de bacterias del inóculo de la CPB-4 de *S. agalactiae* del matraz 3, en las tres cajas Petri incubadas por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C. Cada caja presentó en promedio 85.33 ± 11.02 UFC, valor que entro en el rango de 50 a 100 UFC lo que aseguró una población de 1 a 2×10^8 bact/mL de *S. agalactiae*.

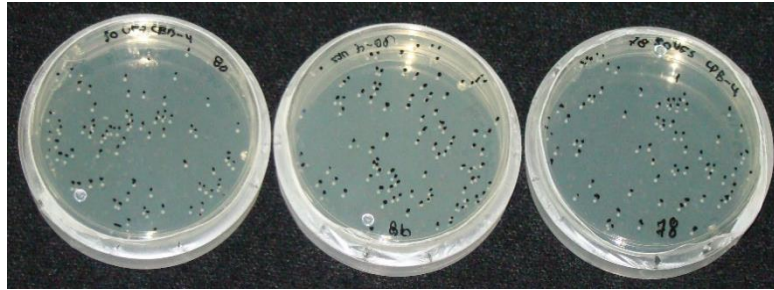


Figura 45. Concentración de bacterias en 50 μ L de inóculo de la CPB-4 (*Streptococcus agalactiae*).

8.10.1.2 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 0.5 mL de extracto de *G. lucidum* y 1.5 mL de extracto de amaranto nieves (Clave A)

El suplemento alimenticio A, compuesto con 0.5 mL *G. lucidum* y 1.5 mL nieves de extracto hidroalcohólico con un rendimiento de 59.72 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-4 en la dilución D2, a una concentración de extracto de 14.93 mg/mL, confirmando que los organismos de esa población fueron susceptibles al extracto y cesaron su crecimiento (Fig. 46).

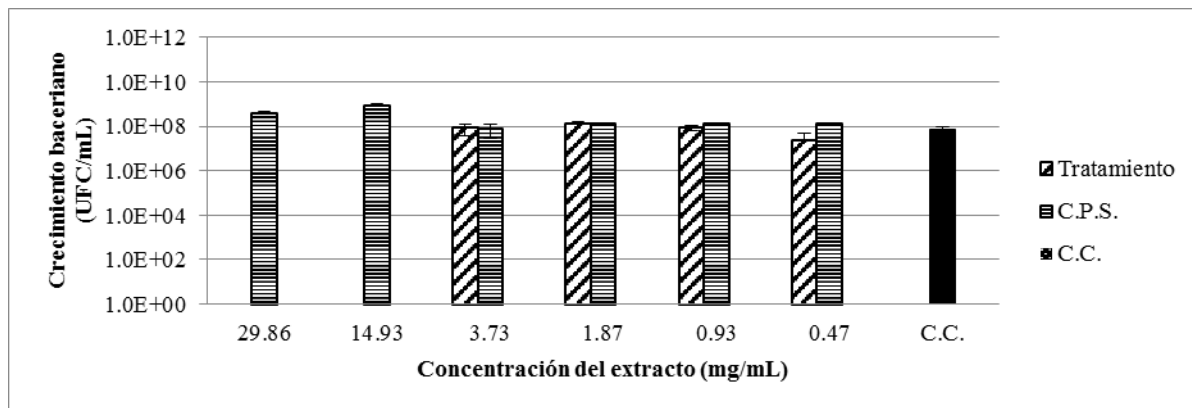


Figura 46. Efecto del suplemento alimenticio con clave A (*Ganoderma lucidum* 0.5 mL: nieves 1.5 mL), sobre el crecimiento bacteriano de la CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio A, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-4 en la dilución D1 a una concentración del extracto de 29.86 mg/mL, lo cual las colonias de bacterias fueron susceptibles y ocasionó la muerte total de la población (Fig. 47).

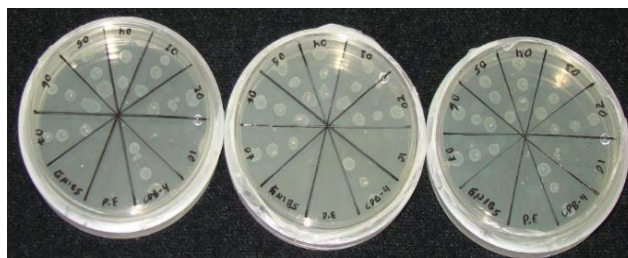


Figura 47. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave A (*Ganoderma lucidum* 0.5 mL: nieves 1.5 mL), sobre la bacteria en estudio CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.10.1.3 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 1.0 mL de extracto de *G. lucidum* y 1.0 mL de extracto de amaranto nieves (Clave B)

El suplemento alimenticio B, compuesto con 1.0 mL *G. lucidum* y 1.0 mL con extracto hidroalcohólico con rendimiento de 84.76 mg/mL tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-4 en la dilución D2, a una concentración de extracto de 21.19 mg/mL, inhibiendo el crecimiento y multiplicación de las bacterias (Fig. 48).

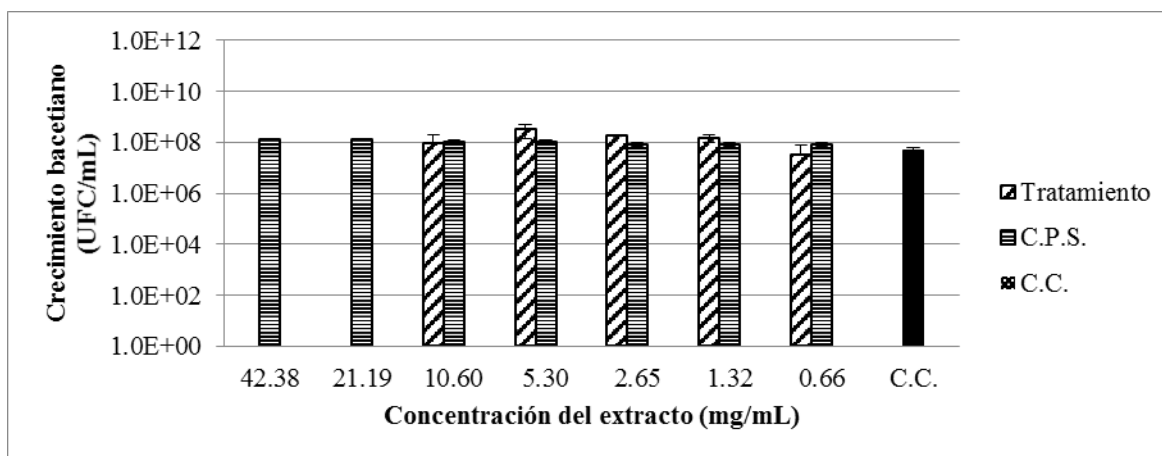


Figura 48. Efecto suplemento alimenticio con clave B (*Ganoderma lucidum* 1.0 mL: nieves 1.0 mL) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio B, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-4 en la dilución D1, a una concentración del extracto de 42.38 mg/mL, conduciendo la muerte celular de la población bacteriana (Fig. 49).

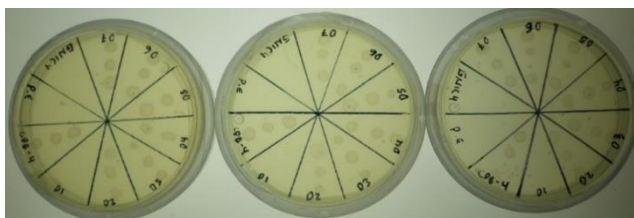


Figura 49. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave B (*Ganoderma lucidum* 1 mL: nieves 1 mL) sobre la bacteria en estudio CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.10.1.4 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 1.5 mL de extracto de *G. lucidum* y 0.5 mL de extracto de amaranto nieves (Clave C)

El suplemento alimenticio C, compuesto con 1.5 mL *G. lucidum* y 0.5 mL nieves de extracto hidroalcohólico con rendimiento de 102.32 mg/mL tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-4 en la dilución D3, a una concentración de extracto de 12.79 mg/mL, a un tiempo mínimo de inhibición bacteriana de 24 horas (Fig. 50).

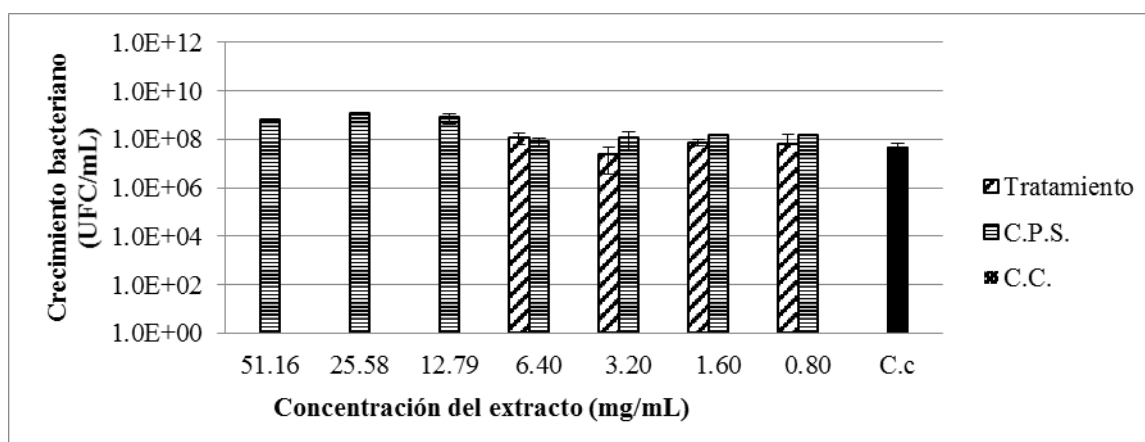


Figura 50. Efecto del suplemento alimenticio con clave C (*Ganoderma lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL), sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio C, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-4 en la dilución D2, a una concentración del extracto de 25.58 mg/mL, inhibiendo completamente el crecimiento de las bacterias (Fig. 51).



Figura 51. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave C (*Ganoderma lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL), sobre la bacteria en estudio CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.10.1.5 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 0.5 mL de extracto de *G. lucidum* y 1.5 mL de extracto de amaranto nutrisol (Clave D)

El suplemento alimenticio D, compuesto con 0.5 mL *G. lucidum* y 1.5 mL nutrisol de extracto hidroalcohólico con rendimiento de 64.52 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio de crecimiento contra CPB-4 en la dilución D2, a una concentración de extracto de 16.13 mg/mL, ya que en las demás diluciones las bacterias fueron resistentes al extracto (Fig. 52).

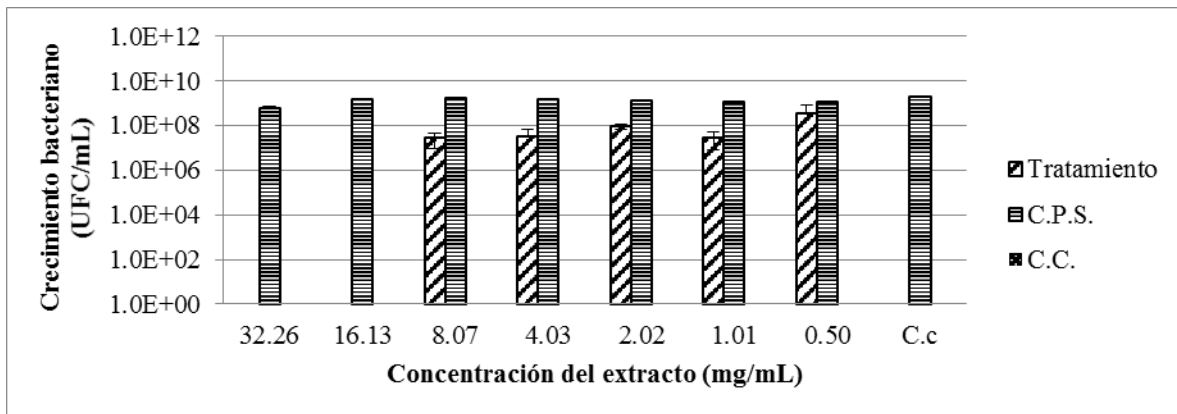


Figura 52. Efecto del suplemento alimenticio con clave D (*Ganoderma lucidum* 0.5 mL: nieves 1.5 mL) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio D, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-4 en la dilución D1, con una concentración del extracto de 32.26 mg/mL, teniendo un efecto irreversible con las células susceptibles ya que provocó la muerte total de las bacterias (Fig. 53).

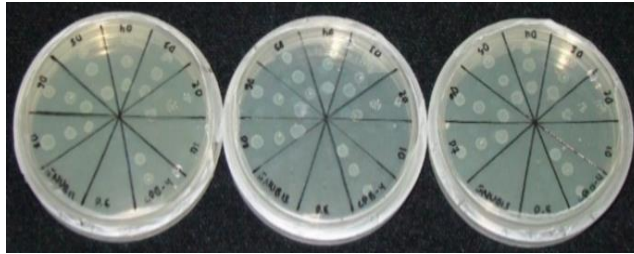


Figura 53. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave D (*Ganoderma lucidum* 0.5 mL: nieves 1.5 mL) sobre la bacteria en estudio CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.10.1.6 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 1.0 mL de extracto de *G. lucidum* y 1.0 mL de extracto de amaranto nutrisol (Clave E)

El suplemento alimenticio E, compuesto con 1.0 mL *G. lucidum* y 1.0 mL nutrisol de extracto hidroalcohólico con rendimiento 82.6 mg/mL tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-4 en la dilución D2, con una concentración de extracto de 20.65 mg/mL, ya que los organismos de una población fueron susceptibles y cesaron su crecimiento (Fig. 54).

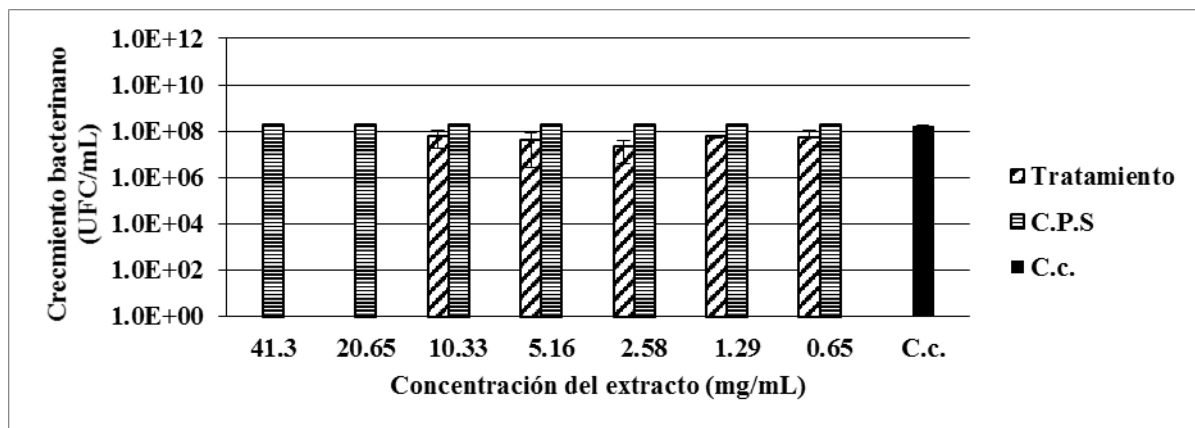


Figura 54. Efecto del suplemento alimenticio con clave E (*Ganoderma lucidum* 1.0 mL: nieves 1.0 mL) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio E, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-4 en la dilución D1, con una concentración del extracto de 41.3 mg/mL, lo cual las colonias de bacterias fueron susceptibles y ocasionó la muerte total de la población (Fig. 55).



Figura 55. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave E (*Ganoderma lucidum* 1 mL: nieves 1 mL) sobre la bacteria en estudio CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.10.1.7 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 1.5 mL de extracto de *G. lucidum* y 0.5 mL de extracto de amaranto nutrisol (Clave F)

El suplemento alimenticio F, compuesto con 1.5 mL *G. lucidum* y 0.5 mL nutrisol de extracto hidroalcohólico con una concentración de rendimiento 101.56 mg/mL tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-4 en la dilución D4, a una concentración de extracto de 6.35 mg/mL, inhibiendo el crecimiento y multiplicación de las bacterias (Fig. 56).

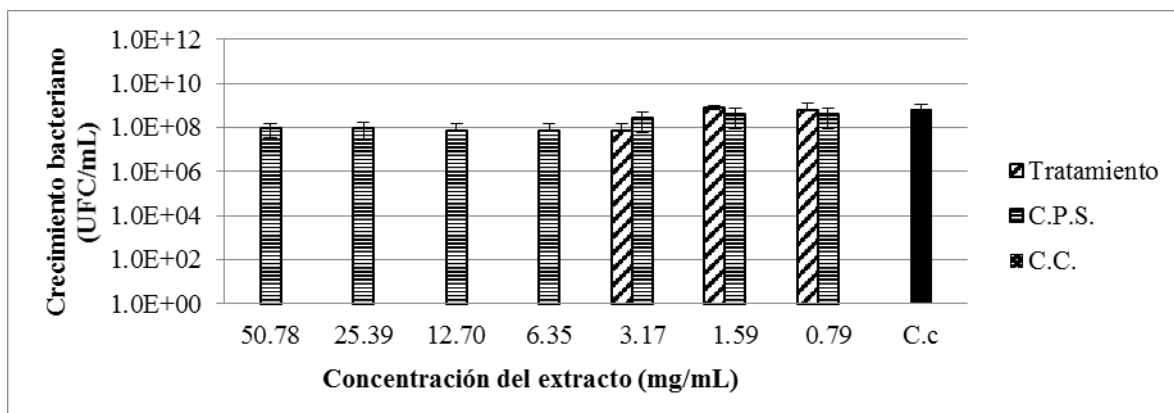


Figura 56. Efecto del suplemento alimenticio con clave F (*Ganoderma lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL), sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio F, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-4 en la dilución D3 a una concentración del extracto de 12.70 mg/mL, conduciendo a la muerte celular de la población bacteriana (Fig. 57).



Figura 57. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave F (*Ganoderma lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL), sobre la bacteria en estudio CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.10.1.8 Efecto del suplemento elaborado con 2.0 mL de extracto de *G. lucidum* (Clave G)

El suplemento alimenticio G, compuesto con 2 mL *G. lucidum* de extracto hidroalcohólico con una concentración de rendimiento 123.53 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-4 en la dilución D3, con una concentración de extracto de 15.44 mg/mL a un tiempo mínimo de inhibición bacteriana de 24 horas (Fig. 58).

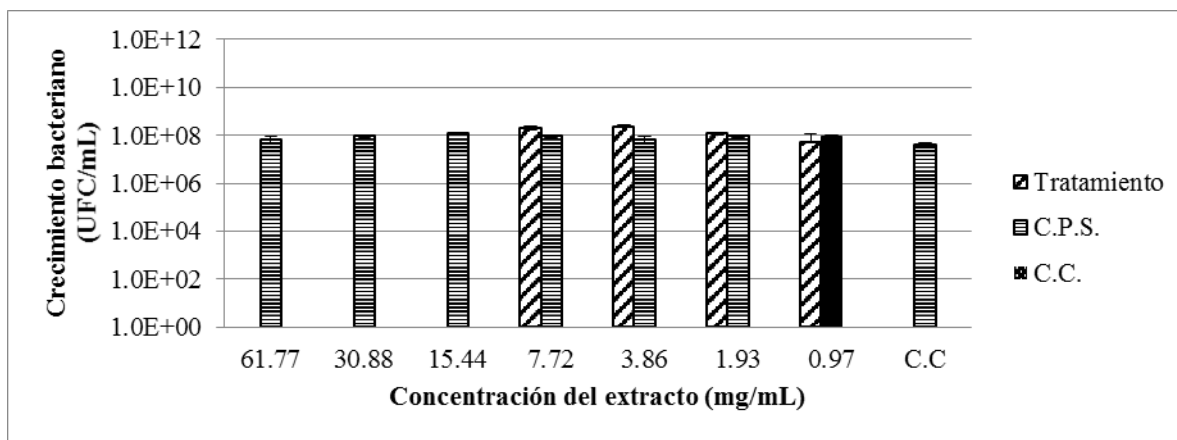


Figura 58. Efecto del suplemento con clave G (*Ganoderma lucidum* 2 mL) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio G, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-4 en la dilución D2, con una concentración del extracto de 30.88 mg/mL, inhibiendo completamente el crecimiento de los microorganismos (Fig. 59).

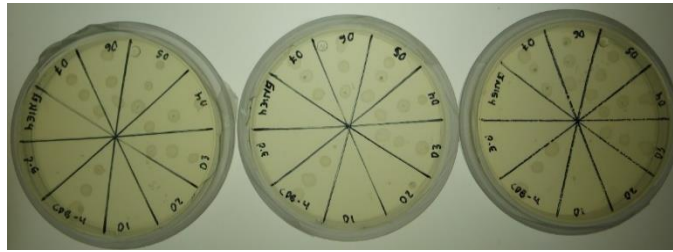


Figura 59. Efecto bactericida del suplemento con clave G (*Ganoderma lucidum* 2 mL), sobre la bacteria en estudio CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.10.1.9 Efecto del suplemento elaborado con 2.0 mL de extracto de amaranto nieves (Clave H)

El suplemento alimenticio H, compuesto con 2 mL de nieves de extracto hidroalcohólico con rendimiento de 46.92 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-4 en la dilución D1, con una concentración de extracto de 23.46 mg/mL, ya que en las demás diluciones las bacterias fueron resistentes a los agentes antibacterianos (Fig. 60).

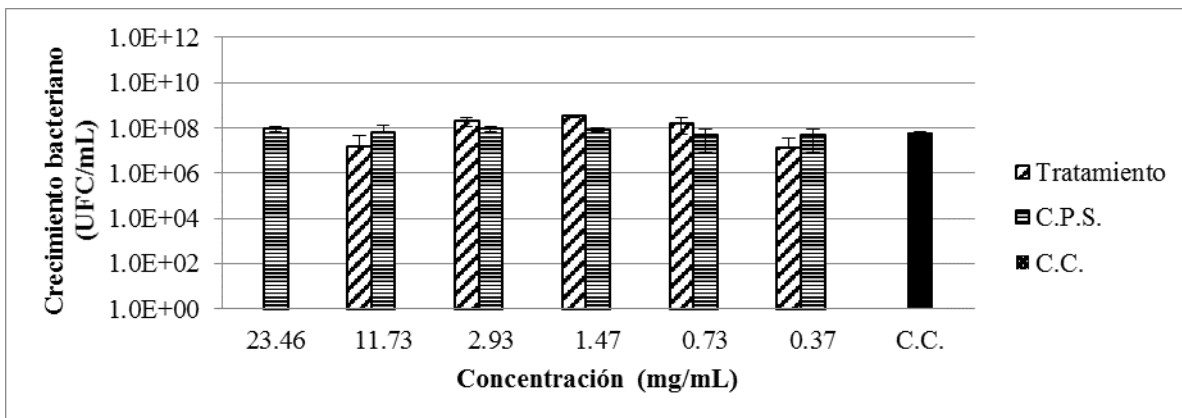


Figura 60. Efecto del suplemento con clave H (Nieves 2 mL), sobre el crecimiento bacteriano de la CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio H, compuesto con 2 mL de nieves de extracto hidroalcohólico con rendimiento de 46.92 mg/mL con una concentración del extracto de 23.46 mg/mL no es susceptible, ya que no ocasionó la muerte total de las bacterias (Fig. 61).

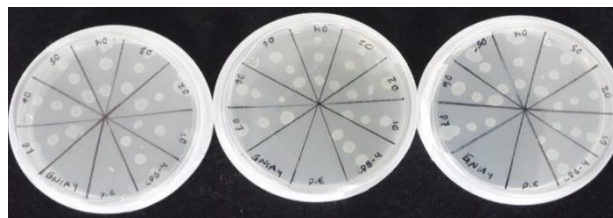


Figura 61. Efecto bactericida del suplemento con clave H (Nieves 2 mL), sobre la bacteria CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.10.1.10 Efecto del suplemento elaborado con 2.0 mL de extracto de amaranto nutrisol (Clave I)

La bacteria no es susceptible al suplemento alimenticio I, de nutrisol con 2 mL de su extracto hidroalcohólico con rendimiento 45.25 mg/mL a una concentración de 22.63 mg/mL, ya que los microorganismos de una población no fueron susceptibles y no cesaron su división (Fig. 62).

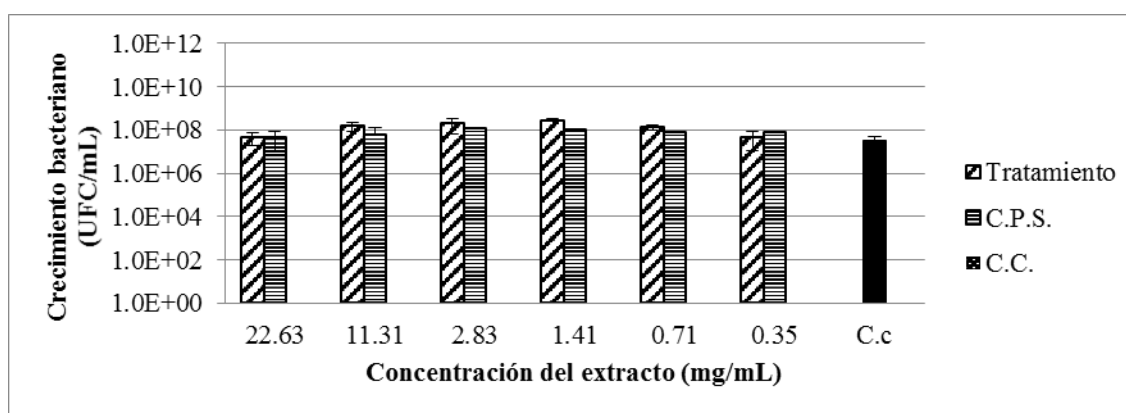


Figura 62. Efecto del suplemento con clave I (Nutrisol 2 mL), sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio de nutrisol con 2 mL de rendimiento de extracto hidroalcohólico (45.25 mg/mL), y a una concentración de 22.63 mg/mL no condujo a la muerte celular de la población bacteriana (Fig. 63).



Figura 63. Efecto bactericida del suplemento con clave I (Nutrisol 2 mL), sobre la bacteria en estudio CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

En el cuadro 12, se muestran las diluciones de las diferentes mezclas con los suplementos alimenticios de extractos de semillas de amaranto y *G. lucidum* que se realizaron y fueron probadas contra la CPB-4 de *Streptococcus agalactiae*, para determinar el efecto bacteriostático y bactericida.

Cuadro 12. Comparación de las concentraciones de los extractos (mg/g) en cada nivel de dilución de los suplementos alimenticios usando extractos hidroalcohólicos (v/v) y probados en los bioensayos de la prueba de susceptibilidad bacteriana en microplaca.

| Nivel dilución | Concentración mg/g de los suplementos alimenticios | | | | | |
|----------------------------|--|-------|--------|-------|-------|--------|
| | A | B | C | D | E | F |
| Concentración inicial (CI) | 59.72 | 84.76 | 102.32 | 64.52 | 82.6 | 101.56 |
| D1 | 29.86 | 42.38 | 51.16 | 32.26 | 41.3 | 50.78 |
| D2 | 14.93 | 21.19 | 25.58 | 16.13 | 20.65 | 25.39 |
| D3 | 7.46 | 10.59 | 12.79 | 8.06 | 10.32 | 12.69 |
| D4 | 3.73 | 5.29 | 6.39 | 4.03 | 5.16 | 6.34 |
| D5 | 1.86 | 2.64 | 3.19 | 2.01 | 2.58 | 3.17 |
| D6 | 0.93 | 1.32 | 1.59 | 1.00 | 1.29 | 1.58 |
| D7 | 0.46 | 0.66 | 0.79 | 0.50 | 0.64 | 0.79 |

D1-D7 = Dilución del extracto, A= (*Ganoderma lucidum* 0.5 mL: nieves 1.5 mL), B= (*Ganoderma lucidum* 1.0 mL: nieves 1 mL), C= (*Ganoderma lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL), D= (*Ganoderma lucidum* 0.5 mL: nieves 1.5 mL), E= (*Ganoderma lucidum* 1 mL: nieves 1 mL), F= (*Ganoderma lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL).

En el cuadro 13, se muestran las diluciones de los suplementos alimenticios de los extractos de semillas de amaranto y *G. lucidum*, que se realizaron y fueron probadas contra la CPB-4 de *Streptococcus agalactiae* para determinar el efecto bacteriostático y bactericida.

Cuadro 13. Comparación de las concentraciones de los extractos (mg/g) en cada nivel de dilución de cada ingrediente de los suplementos alimenticios usando extractos hidroalcohólicos (v/v) y probados en los bioensayos de la prueba de susceptibilidad bacteriana en microplaca.

| Nivel dilución | Concentración mg/g de los suplementos alimenticios | | |
|----------------------------|--|-------|-------|
| | G | H | I |
| Concentración inicial (CI) | 123.53 | 46.92 | 45.25 |
| D1 | 61.76 | 23.46 | 22.62 |
| D2 | 30.88 | 11.73 | 11.31 |
| D3 | 15.4 | 5.86 | 5.65 |
| D4 | 7.72 | 2.93 | 2.82 |
| D5 | 3.86 | 1.46 | 1.41 |
| D6 | 1.93 | 0.73 | 0.70 |
| D7 | 0.96 | 0.36 | 0.35 |

G= (*Ganoderma lucidum* 2.0 mL), H= (Nieves 2.0 mL) y I= (Nutrisol 2.0 mL).

Las bacterias de la cepa CPB-4 *Streptococcus agalactiae*, que fueron susceptibles y solamente inhibieron su crecimiento, fue en la dilución D4 del suplemento F, compuesto con 1.5 mL de *G. lucidum* y 0.5 mL de extracto hidroalcohólico nutrisol a una concentración 6.34 mg/mL, ya que creció nuevamente en la D5. La que presentó efecto inhibitorio en la dilución D3 fue el suplemento C, compuesto con 1.5 mL de *G. lucidum* y 0.5 mL de extracto hidroalcohólico nieves, y el suplemento G en su dilución D4, compuesto con 2 mL de extracto de *G. lucidum* con 12.79 mg/mL y 15.4 mg/mL, respectivamente. La siguiente dilución fue la D2 en el suplemento alimenticio A, compuesto con 0.5 mL de *G. lucidum* y 0.5 mL de extracto hidroalcohólico nieves, con 14.93 mg/mL, el suplemento alimenticio con clave B, compuesto con 1.0 mL de extracto de *G. lucidum* y 1.0 mL con extracto hidroalcohólico a una concentración de 21,19 mg/mL, el suplemento alimenticio D, compuesto con 1.5 mL de *G. lucidum* y 1.5 mL de extracto hidroalcohólico nutrisol, con 16.13 mg/mL, y el E, compuesto con 1.0 mL de *G. lucidum* y 1.0 mL de extracto hidroalcohólico nutrisol, con 20.65 mg/mL tuvieron su crecimiento en la dilución D3, y el suplemento H, compuesto con 2 mL de extracto hidroalcohólico nieves, tuvieron efecto en la dilución D1 a una concentración de 23.46 mg/mL, y creciendo en la dilución D2. El suplemento I no tuvo ningún efecto (compuesto con 2 mL de extracto de amaranto nutrisol) en ningún nivel de dilución (Fig. 64).

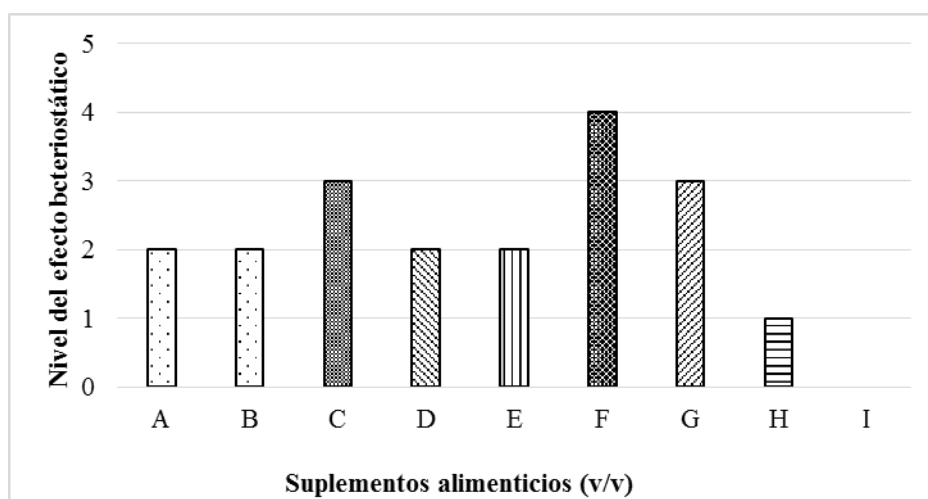


Figura 64. Nivel del efecto bacteriostático de cada microdilución de los suplementos alimenticios elaborados con extractos hidroalcohólicos del hongo *Ganoderma lucidum* y semillas de amaranto nieves y nutrisol sobre la bacteria *S. agalactiae*. A= *G. lucidum* 0.5 mL: nieves 1.5 mL; B= *G. lucidum* 1 mL: nieves 1 mL; C= *G. lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL; D= *G. lucidum* 0.5 mL: nutrisol 1.5 mL; E= *G. lucidum* 1 mL: nutrisol 1 mL; F= *G. lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL; G= *G. lucidum* 2 mL: nieves 0 mL; H= *G. lucidum* 0 mL: nieves 2 mL; I= *G. lucidum* 0 mL: nutrisol 2 mL.

De los suplementos alimenticios v/v cuyos efectos fueron irreversibles con la bacteria y provocaron la muerte de la cepa CPB-4 de *Streptococcus agalactiae*, los mayores efectos se presentaron en el siguiente orden, en el suplemento F compuesto con 1.5 mL de *G. lucidum* y 0.5 mL de extracto hidroalcohólico nutrisol, con 12.69 mg/m, fue en la dilución D3 ya que volvió a crecer en la D4, y en el suplemento G, compuesto con 2.0 mL *G. lucidum* de extracto hidroalcohólico, con 15.4 mg/mL fue en la dilución D2, en el suplemento C, compuesto con 1.5 mL de *G. lucidum* y 0.5 mL de extracto hidroalcohólico nieves, con una concentración de 12.79 mg/mL y creció en la dilución D3, y las que presentaron efecto en la dilución D1 fueron el suplemento alimenticio A, compuesto con 0.5 mL de *G. lucidum* y 1.5 mL de extracto hidroalcohólico nieves, con 29.86 mg/mL, el suplemento D, compuesto con 0.5 mL de *G. lucidum* y 1.5 mL de extracto hidroalcohólico nutrisol, con 32.26 mg/mL, el suplemento B, compuesto con 1 mL de *G. lucidum* y 1 mL de extracto hidroalcohólico nieves, y el suplemento E, compuesto con 1.0 mL de *G. lucidum* y 1.0 mL de extracto hidroalcohólico nutrisol, con una concentración 41.3 mg/mL, en todos ellos la bacteria creció en la dilución D2, y finalmente las que no tuvieron ningún efecto fueron los suplementos H, compuesto con 2.0 mL de extracto hidroalcohólico nieves, y el suplemento I, compuesto de nutrisol con 2.0 mL, aun cuando las colonias de bacterias fueron susceptibles no ocasionó la muerte total de la población en las concentraciones de cada dilución (Fig. 65).

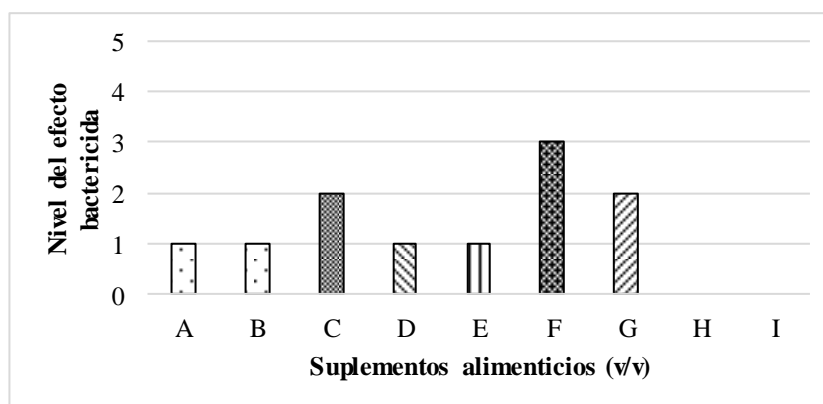


Figura 65. Nivel del efecto bactericida de cada microdilución de los suplementos alimenticios elaborados con extractos hidroalcohólicos del hongo *Ganoderma lucidum* y semillas de amaranto nieves y nutrisol sobre la bacteria *S. agalactiae*. A= *G. lucidum* 0.5 mL: nieves 1.5 mL; B= *G. lucidum* 1 mL: nieves 1 mL; C= *G. lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL; D= *G. lucidum* 0.5 mL: nutrisol 1.5 mL; E= *G. lucidum* 1 mL: nutrisol 1 mL; F= *G. lucidum* 1.5 mL: nieves 0.5 mL; G= *G. lucidum* 2 mL: nieves 0 mL; H= *G. lucidum* 0 mL: nieves 2 mL; I= *G. lucidum* 0 mL: nutrisol 2 mL.

8.11 Selección de los extractos liofilizados de las semillas molidas de amaranto nieves y nutrisol clasificadas por tamaño para elaborar los suplementos alimenticios (p/p)

De acuerdo a los resultados de los suplementos alimenticios en sus efectos contra la cepa CPB-4, *Streptococcus agalactiae* que mostraron en relación (V/V), se eligió la mejor proporción para elaborar los suplementos alimenticios con extractos liofilizados.

8.12 Caracterización de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos liofilizados de *G. lucidum* y de las semillas molidas de amaranto nieves y nutrisol (p/p)

8.12.1 pH de los suplementos alimenticios (p/p)

El pH de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos liofilizados de las semillas seleccionadas de amaranto y el hongo en relación a peso a peso fueron para la clave J de 5.24, para el suplemento alimenticio K de 5.49 y, para cada ingrediente de 5.17 (clave L), el M de 5.93 y el N de 6.17, siendo éste siendo el más alto (Fig. 66).

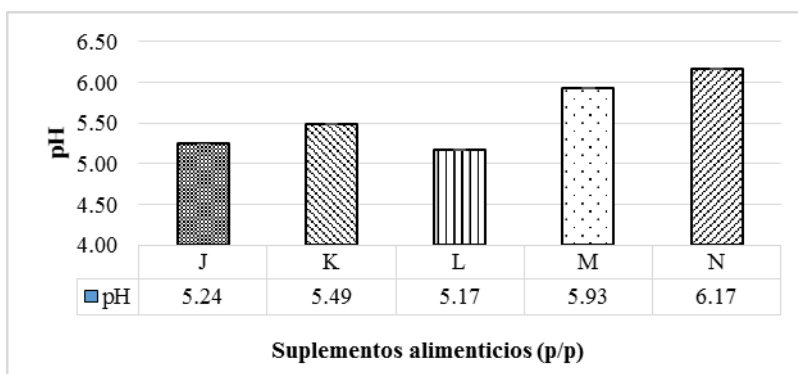


Figura 66. pH de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos liofilizados de *Ganoderma lucidum* (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). J= *G. lucidum* 2 g; amaranto nieves 2 g; K= *G. lucidum* 2 g; amaranto nutrisol 2 g; L= *G. lucidum* 4 g; amaranto nutrisol 0 g; M= *G. lucidum* 0 g; amaranto nieves 4 g; N= *G. lucidum* 0 g; amaranto nutrisol 4 g.

8.12.2 Conductividad y resistividad de los suplementos alimenticios (p/p)

La conductividad de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos liofilizados de las semillas seleccionadas de amaranto y el hongo en relación a peso a peso quedaron para la semilla conocida como nieves con la clave J de 38254.77 y los suplementos alimenticios usando la variedad nutrisol fue de 34078.44 para la clave K y, para

cada ingrediente utilizado con clave L de 25610.9, la clave M de 21888.7 y el N de 39994.43, presentando mayor conductividad el suplemento alimenticio con clave J (Fig. 67).

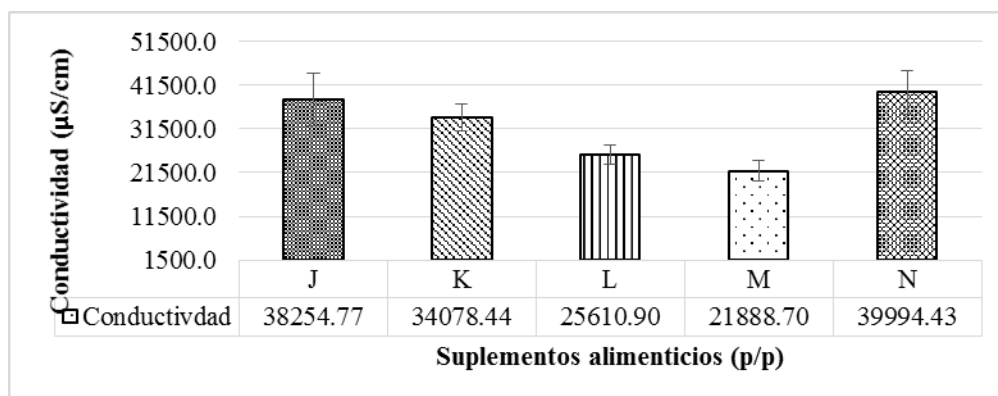


Figura 67. Conductividad de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos liofilizados de *Ganoderma lucidum* (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). J= *G. lucidum* 2 g: amaranto nieves 2 g; K= *G. lucidum* 2 g: amaranto nutrisol 2 g; L= *G. lucidum* 4 g: amaranto nutrisol 0 g; M= *G. lucidum* 0 g: amaranto nieves 4 g; N= *G. lucidum* 0 g: amaranto nutrisol 4 g.

8.12.3 Polifenoles totales de los suplementos alimenticios (p/p)

Los polifenoles totales de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos liofilizados de las semillas seleccionadas de amaranto y el hongo expresados como mgEAG/g de muestra liofilizada para la relación a peso a peso, quedaron para los suplementos alimenticios a base de semilla de amaranto conocida como nieves con clave J de 2.69 mgEAG/g de muestra liofilizada y, los suplementos a base de amaranto variedad nutrisol con clave K de 11 mgEAG/g de muestra liofilizada y, para cada ingrediente indicado con la letra L de 17.89 mgEAG/g de muestra liofilizada, siendo la mejor el de la clave M con 2.69 mgEAG/g de muestra liofilizada y el N con 4.05 mgEAG/g de muestra liofilizada (Fig. 68).

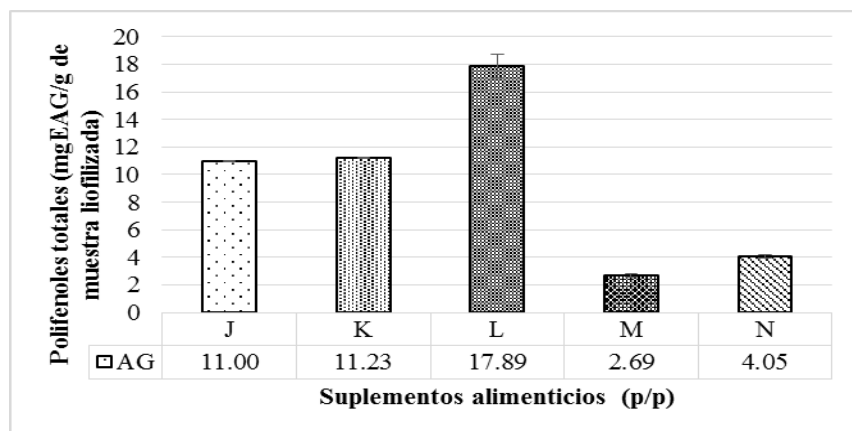


Figura 68. Polifenoles totales de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos liofilizados de *Ganoderma lucidum* (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). J= *G. lucidum* 2 g: amaranto nieves 2 g; K= *G. lucidum* 2 g: amaranto nutrisol 2 g; L= *G. lucidum* 4 g: amaranto nutrisol 0 g; M= *G. lucidum* 0 g: amaranto nieves 4 g; N= *G. lucidum* 0 g: amaranto nutrisol 4 g.

8.12.4 Proteína de los suplementos alimenticios (p/p)

En cantidad de proteína de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos liofilizados de las semillas seleccionadas de amaranto y el hongo expresados en μg de proteína por gramo de muestra liofilizada, quedaron con la semilla conocida como nieves y clave J de $2143.72 \mu\text{g/g}$ de muestra liofilizada, siendo la mayor de todas, ya que para los suplementos alimenticios con la variedad de amaranto nutrisol con clave K fue de $2059.18 \mu\text{g/g}$ de muestra liofilizada, y para cada ingrediente de los suplementos fue en el L de 1804.54 , el M de 1189.61 y el N de $1268.12 \mu\text{g/g}$ de muestra liofilizada (Fig. 69).

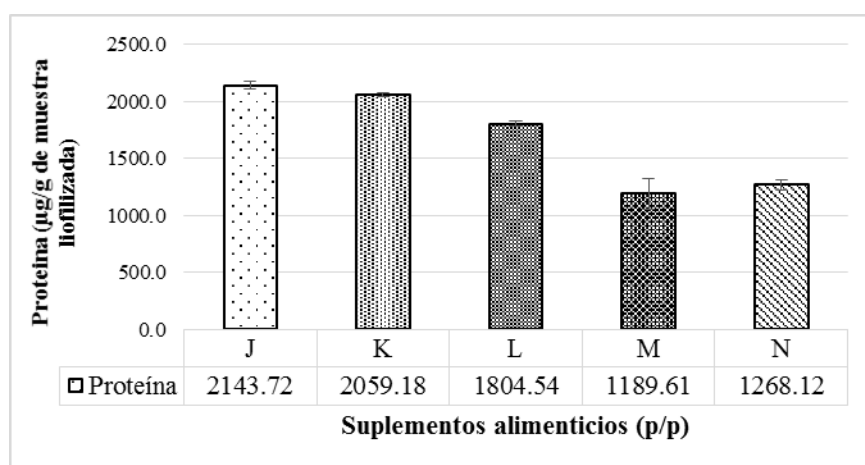


Figura 69. Contenido de proteína de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos liofilizados de *Ganoderma lucidum* (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). J= *G. lucidum* 2 g: amaranto nieves 2 g; K= *G. lucidum* 2 g: amaranto nutrisol 2 g; L= *G. lucidum* 4 g: amaranto nutrisol 0 g; M= *G. lucidum* 0 g: amaranto nieves 4 g; N= *G. lucidum* 0 g: amaranto nutrisol 4 g.

8.12.5 Rendimiento de los suplementos alimenticios (p/p)

En el rendimiento de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos liofilizados de las semillas seleccionadas de amaranto y el hongo expresados como mg/mL de extracto relación a peso a peso fueron para los suplementos alimenticios usando semilla de amaranto conocida como nieves y con clave J de 322.83 mg/mL de extracto, siendo el suplemento alimenticio que mayor contenido de proteína presentó, el K con 285.5 mg/mL de extracto y, por ingrediente el de clave L con 269.67, el M de 304.83 y el N de 283.67 mg/mL de extracto (Fig. 70).

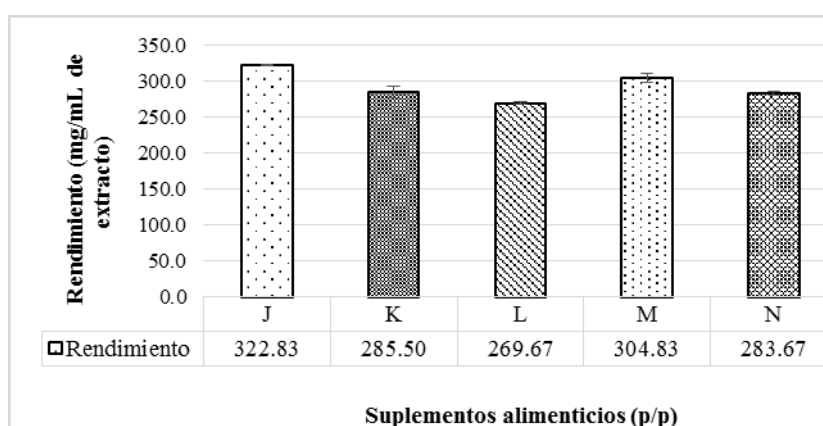


Figura 70. Rendimiento de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos liofilizados de *Ganoderma lucidum* (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). J= *G. lucidum* 2 g: amaranto nieves 2 g; K= *G. lucidum* 2 g: amaranto nutrisol 2 g; L= *G. lucidum* 4 g: amaranto nutrisol 0 g; M= *G. lucidum* 0 g: amaranto nieves 4 g; N= *G. lucidum* 0 g: amaranto nutrisol 4 g.

El rendimiento de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos hidroalcohólicos liofilizados de las semillas seleccionadas de amaranto y el hongo medicinal *G. lucidum* expresados en mg/g de muestra liofilizada, relación a peso a peso, utilizando extractos de la semilla conocida como nieves y con clave J fue de 807.08 mg/g de muestra liofilizada, siendo mayor que el rendimiento cuando se utilizó la variedad nutrisol con clave K de 713.75 mg/g de muestra liofilizada y, para cada ingrediente el de la clave L fue de 674.17, el M de 762.08 y el N de 709.17 mg/g de muestra liofilizada (Fig. 71).

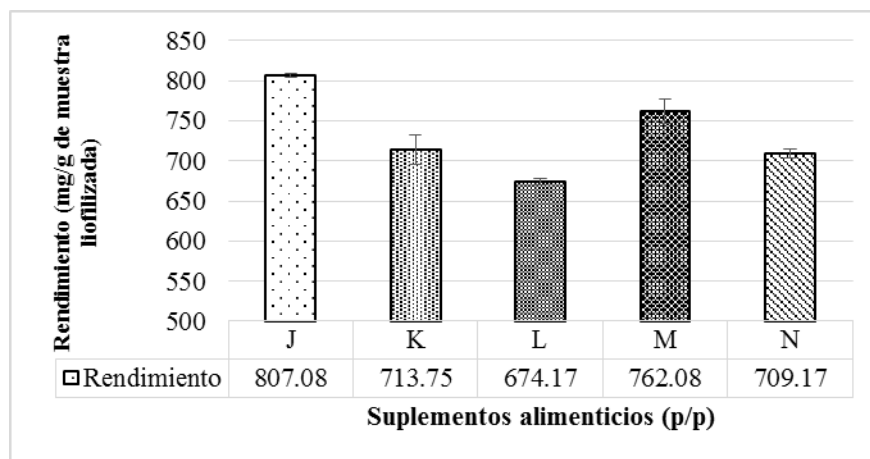


Figura 71. Rendimiento de los suplementos alimenticios elaborados a base de extractos liofilizados de *Ganoderma lucidum* (CP-145) y las semillas seleccionadas de amaranto (nutrisol y nieves). J= *G. lucidum* 2 g: amaranto nieves 2 g; K= *G. lucidum* 2 g: amaranto nutrisol 2 g; L= *G. lucidum* 4 g: amaranto nutrisol 0 g; M= *G. lucidum* 0 g: amaranto nieves 4 g; N= *G. lucidum* 0 g: amaranto nutrisol 4 g.

8.13 Análisis estadístico (SAS)

Se determinó si existen diferencias significativas entre los suplementos alimenticios y correlaciones entre los resultados de polifenoles totales, proteína y rendimiento por el Coeficiente de Correlación de Pearson en relación en relación peso a peso (gramo de muestra liofilizada utilizada) (Cuadro 14).

Cuadro 14. Análisis estadístico de las variables en estudio con el programa (SAS) de los suplementos alimenticios por gramo de muestra liofilizada en relación peso/peso (n=3).

| Suplemento alimenticio | Variables | | |
|------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|
| | Polifenoles totales (mgEAG/g) | Proteína µg/g | Rendimiento mg/g |
| J | 11.23±0.13B | 2059.18±12.07A | 807.08±1.50A |
| K | 10.99±0.07 B | 2143.72±21.77A | 713.75±10.48C |
| L | 17.88 ±0.14 A | 1804.54,±13.72 B | 674.16±2.31D |
| M | 2.70±0.07 D | 1189.61±78.5C | 762.08± 9.13B |
| N | 4.05 ±0.01C | 1268.12±27.67 C | 709.16±3.25C |

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

Polifenoles totales

Para probar que $H_0: t_1=t_2=t_3=t_4=t_5=t_6=t_7=t_8=t_9$ en oposición a H_a : al menos un tratamiento es diferente de los demás, con un $\alpha = 0.05$, se rechaza H_0 y se concluye que al menos un

suplemento alimenticio fue diferente. Los resultados obtenidos en el programa SAS, con F-valor de 4001.83 y Pr <0.0001 fue muy altamente significativa, con una $R^2 = 0.999$, lo cual nos muestra que hubo diferencias significativas entre los suplementos alimenticios en su contenido de polifenoles totales.

En la prueba de Tukey, los suplementos alimenticios de amaranto mezclados con *G. lucidum*, como el suplemento alimenticio J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de nieves de extracto hidroalcohólico liofilizado tuvo una media de 10.99 ± 0.07 mgEAG/g, y suplemento alimenticio K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol presentó una media de 11.23 ± 0.13 mgEAG/g, los dos no mostraron diferencias significativas, sin en cambio los suplementos alimenticios que fueron de amaranto, como el suplemento alimenticio M, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves tuvo una media de 2.70 ± 0.07 mgEAG/g y el suplemento alimenticio N, compuesto con 4 g de nutrisol con extracto hidroalcohólico liofilizado con una media de 4.05 ± 0.01 mgEAG/g, si mostraron diferencias significativas siendo la mejor la variedad nutrisol, pero el suplemento alimenticio que fue significativamente diferente a todos fue el suplemento alimenticio L, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado de *G. lucidum*, con una media de 17.88 ± 0.14 mgEAG/g fue superior a los demás.

Los suplementos alimenticios de las semillas de amaranto cuando no se mezclan con el hongo presentaron menores contenidos de polifenoles totales, como el suplemento M, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves y el N, compuesto con 4 g con extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol, pero cuando se les agregó el extracto del hongo aumentan en gran cantidad presentando diferencias significativas entre el J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de nieves de extracto hidroalcohólico liofilizado y K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de nutrisol de extracto hidroalcohólico liofilizado.

Proteína

La F-valor de 126.60 y Pr <0.0001 muy altamente significativa, con una $R^2 = 0.98$, fue lo que se obtuvo en el programa SAS, lo cual nos muestra que hubo diferencias significativas entre los suplementos alimenticios en el contenido de proteínas. Los resultados de la prueba de Tukey en los suplementos alimenticios de amaranto que se mezclaron con el hongo medicinal *G. lucidum*, el suplemento alimenticio J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves tuvo una media de 2143.72 ± 21.77 µg/g de contenido de

proteína y el suplemento alimenticio K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol presentó 2059.18 ± 12.07 µg/g de contenido de proteína, entre esos suplementos alimenticios no se presentaron diferencias significativas, siendo la mayor el suplemento alimenticio J.

Los suplementos alimenticios a base de amaranto, como por ejemplo el M, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves tuvo 1189.61 ± 78.5 µg/g y el suplemento alimenticio N, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol presentó una media de 1268.122 µg/g, ambos no presentaron diferencias significativas.

El suplemento alimenticio L, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado de *G. lucidum*, tuvo una media 1804.54 ± 13.72 µg/g, este presentó diferencias significativas en todos los demás suplementos alimenticios ya que fue menor que los suplementos alimenticios realizados con amaranto, y mayor que los de amaranto solos.

Rendimiento

Los resultados obtenidos en el programa SAS, con una F-valor de 63.40 y Pr <0.0001 resultaron muy altamente significativas y con una $R^2 = 0.962$, lo cual nos demostró que hubo diferencias significativas entre los suplementos alimenticios en los rendimientos del extracto. La prueba de Tukey mostró que el suplemento alimenticio J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves tuvo un rendimiento de 807.08 ± 1.50 mg/g y el suplemento K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol presentó 713.75 ± 10.48 mg/g de rendimiento, ambos tuvieron diferencias significativas. El suplemento alimenticio M, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves con un rendimiento de 762.08 ± 9.13 mg/g y el suplemento alimenticio N, compuesto con 4 g con extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol obtuvo un rendimiento de 709.16 ± 3.25 mg/g, ambos presentaron diferencias significativas, siendo la mejor la semilla criolla nieves.

Entre los suplementos alimenticios de las semillas de amaranto no suplementadas con el hongo presentaron menores contenidos de polifenoles totales, como el suplemento M, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves y el N, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol, pero cuando se les agregó el extracto del hongo aumentaron en gran cantidad presentando diferencias significativas. Tal es el caso del suplemento con clave J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico

liofilizado nieves y el K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol. El valor más bajo lo presentó el suplemento alimenticio L, compuesto con 4 g de *G. lucidum*, con una media de 674.16 ± 2.31 mg/g presentando diferencias significativas con todos los suplementos alimenticios.

Correlación de las variables

Este coeficiente entre los suplementos alimenticios del hongo *G. lucidum* y los dos diferentes tipos de semillas de amaranto demostró que el contenido de polifenoles totales y proteína está muy poco relacionados en un 0.72579 con 0.0022 sin significancia y, el contenido polifenoles totales con el rendimiento por gramo de extracto liofilizado indicó que tampoco existe una correlación en un -0.37356 ya que no es significativa con 0.1702. No existe una relación entre la cantidad de proteína y el rendimiento siendo de 0.15910 con un 0.5712, sin significancia. Los rendimientos de los suplementos alimenticios por gramo de liofilizado en proporción peso/peso de los dos tipos de amaranto y el hongo *G. lucidum* no impactan directamente en las cantidades de polifenoles totales y proteína.

8.14 Prueba de susceptibilidad bacteriana de los suplementos alimenticios elaborados con extractos liofilizados (p/p)

8.14.1 Bioensayo con la cepa CPB-1 de *Salmonella thypi*

8.14.1.1 Confirmación del inóculo

Para determinar la concentración de bacterias del inóculo o semilla de la CPB-1 de *Salmonella thypi* se tomaron 50 μ L y se vertieron por triplicado en cajas Petri con agar Mueller Hinton, mismas que se incubaron por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C (Fig. 72).

Se confirmó la concentración de bacterias del inóculo de la CPB-1 de *S. thypi* del matraz 3, en las tres cajas Petri incubadas por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C. Cada caja presentó en promedio 90.33 ± 9.87 UFC, valor que entro en el rango de 50 a 100 UFC lo que aseguró una población de 1 a 2×10^8 bact/mL de *Salmonella thypi*.



Figura 72. Concentración de bacterias en 50 μ L de inóculo de la CPB-1 (*Salmonella thypi*).

8.14.1.2 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)

El suplemento alimenticio J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves con un rendimiento de 322.83 mg/mL y un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-1 en la dilución D1, con una concentración del extracto de 161.415 mg/mL, ya que los bacterias de esa población fueron susceptibles y cesaron su crecimiento (Fig. 73).

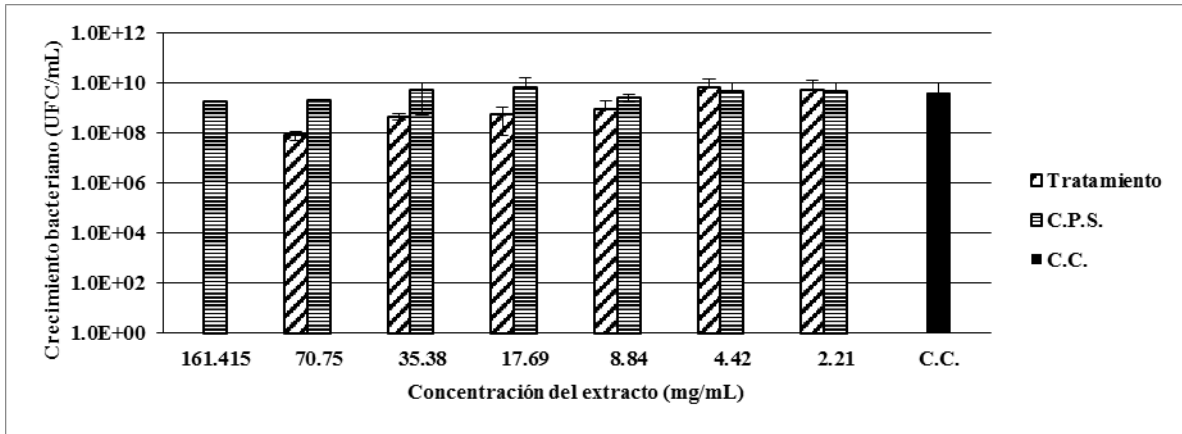


Figura 73. Efecto del suplemento alimenticio con clave J= (*G. lucidum* 2 g; nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano (CPB-1) *Salmonella thypi* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio J, a una concentración de 161.415 mg/mL, y no condujo a la muerte celular de la población bacteriana (Fig. 74).



Figura 74. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave J= (*G. lucidum* 2 g; nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-1 *Salmonella thypi* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-1. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Salmonella thypi*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento, P.E (C.E.) = Control de esterilidad.

8.14.1.3 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)

El suplemento alimenticio K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-1 en la dilución D1, a una concentración de extracto de 142.75 mg/mL, inhibiendo el crecimiento y multiplicación de las bacterias (Fig. 75).

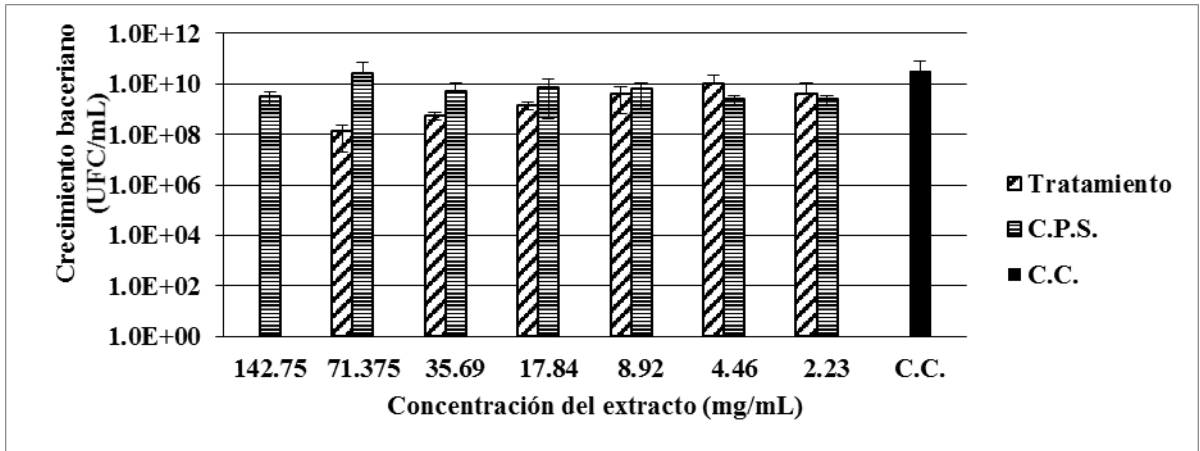


Figura 75. Efecto del suplemento alimenticio con clave K= (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano (CPB-1) *Salmonella thypi* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio K, a una concentración de 142.75 mg/mL, aun así cuando las colonias de bacterias fueron susceptibles no ocasionó la muerte total de la población (Fig. 76).

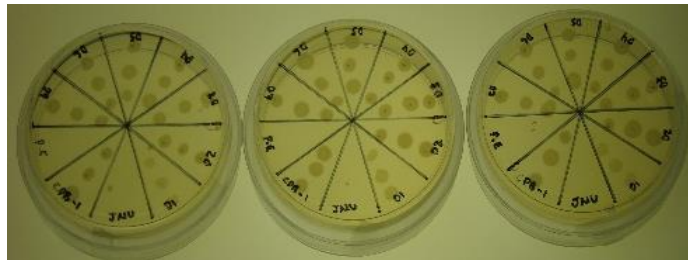


Figura 76. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K= (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-1 *Salmonella thypi* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-1. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Salmonella thypi*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.1.4 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de *G. lucidum* (Clave L)

El suplemento alimenticio L, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado de *G. lucidum*, con rendimiento de 269.66 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-1 en la dilución D2, a una concentración de extracto de 67.4 mg/mL, y un tiempo mínimo de inhibición bacteriana de 24 horas (Fig. 77).

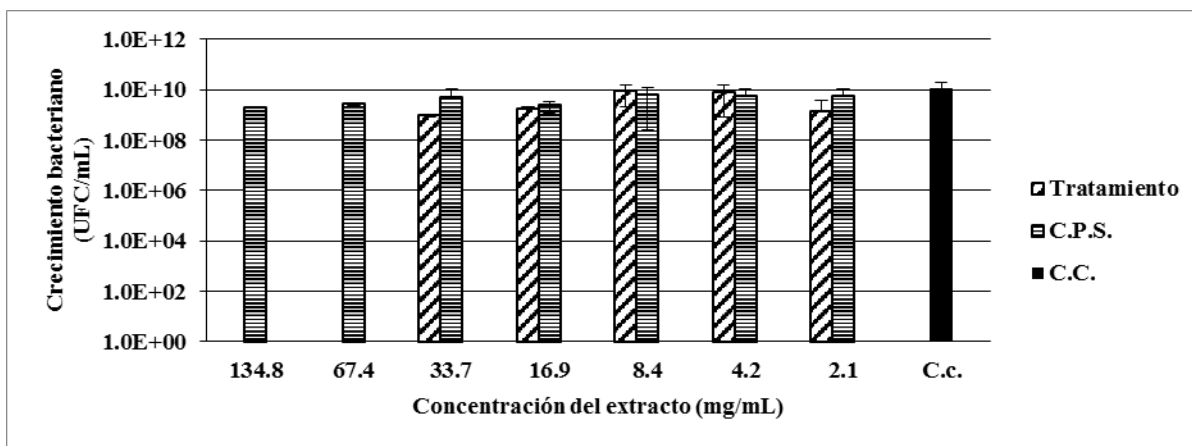


Figura 77. Efecto del suplemento alimenticio con clave L= (*G. lucidum* 4 g) sobre el crecimiento bacteriano (CPB-1) *Salmonella thypi* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio L, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-1 en la dilución D1, con una concentración de extracto de 134.8 mg/mL, las colonias de bacterias fueron susceptibles y ocasionó la muerte total de la población (Fig. 78).



Figura 78. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave L= (*G. lucidum* 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-1 *Salmonella thypi* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-1. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Salmonella thypi*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.1.5 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio M, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves y rendimiento de extracto de 304.83 mg/mL y una concentración de 152.41 mg/mL, ya que en ninguna de sus diluciones presentó efecto, y los organismos de esa población no fueron susceptibles y continuaron creciendo (Fig. 79).

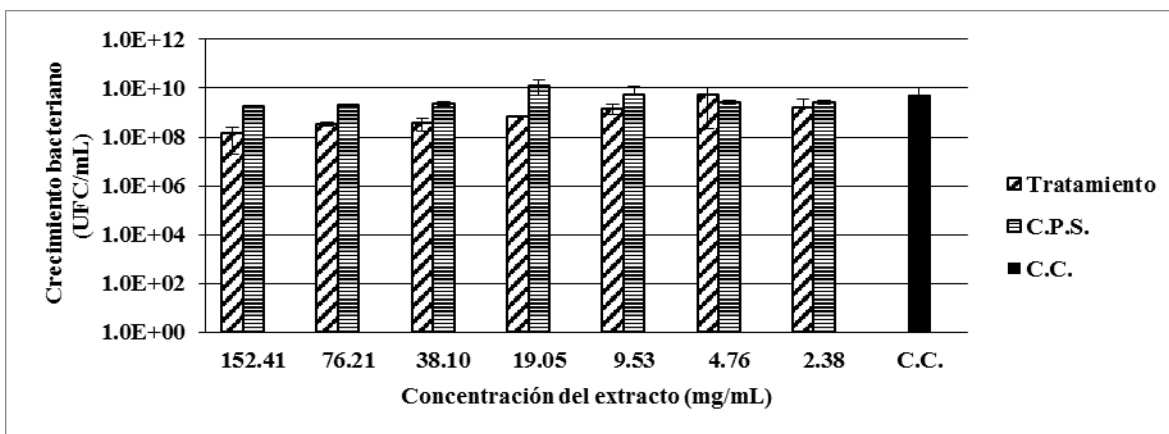


Figura 79. Efecto del suplemento alimenticio con clave M= (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano (CPB-1) *Salmonella thypi* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio M, a una concentración de 152.41 mg/mL, ya que en ninguna de sus diluciones presentó efecto bactericida (Fig. 80).

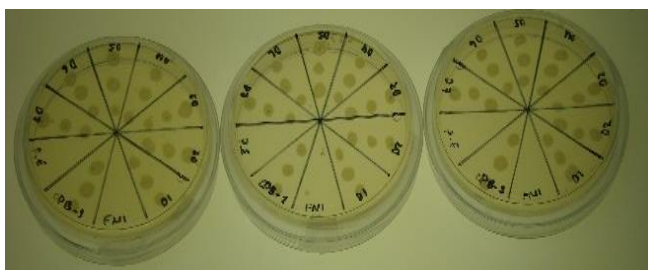


Figura 80. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M= (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-1 *Salmonella thypi* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-1. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Salmonella thypi*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.1.6 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio N, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol y rendimiento de extracto de 283.6 mg/mL, a una concentración de 141.5 mg/mL no inhibió el crecimiento y multiplicación de las bacterias (Fig. 81).

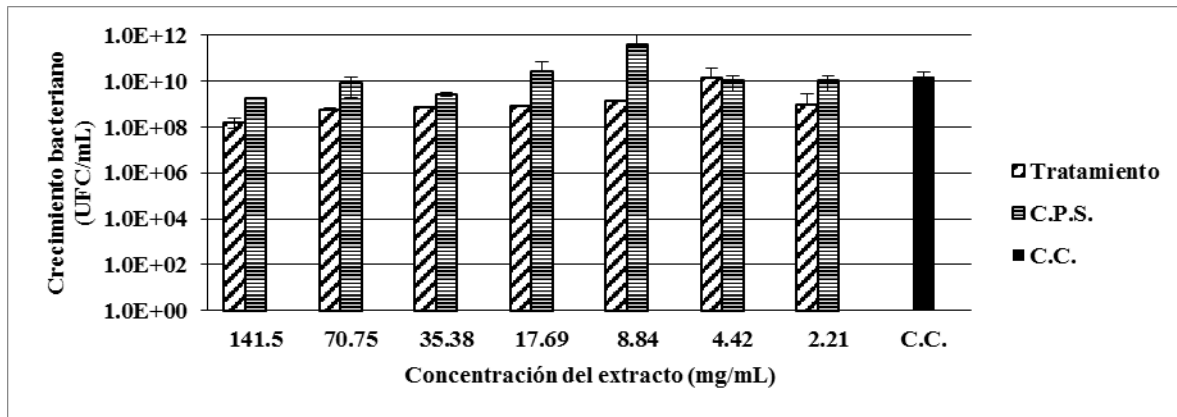


Figura 81. Efecto del suplemento alimenticio con clave N= (Nutrisol 4 g) sobre el crecimiento bacteriano (CPB-1) *Salmonella thypi* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio N, a una concentración de extracto de 141.5 mg/mL, no inhibió completamente el crecimiento de los organismos (Fig. 82).

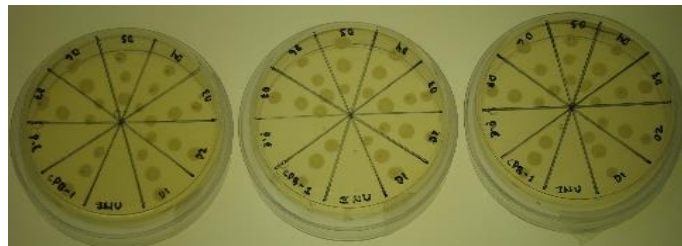


Figura 82. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N= (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-1 *Salmonella thypi* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-1. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Salmonella thypi*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.2 Bioensayo con la cepa CPB-4 de *Streptococcus agalactiae*

8.14.2.1 Confirmación del inóculo

Para determinar la concentración de bacterias del inóculo o semilla de la CPB-4 de *Streptococcus agalactiae* se tomaron 50 μ L y se vertieron por triplicado en cajas Petri con agar Mueller Hinton, mismas que se incubaron por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C (Fig. 83). Se confirmó la concentración de bacterias del inóculo de la CPB-4 de *S. agalactiae* del matraz 3, en las tres cajas Petri incubadas por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C. Cada caja presentó en promedio 85.33 ± 11.02 UFC, valor que entro en el rango de 50 a 100 UFC lo que aseguró una población de 1 a 2×10^8 bact/mL de *S. agalactiae*.

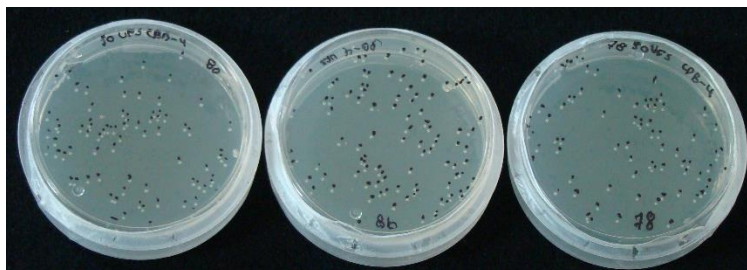


Figura 83. Concentración de bacterias en 50 μ L de inóculo de la CPB-4 (*Streptococcus agalactiae*).

8.14.2.2 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)

El suplemento alimenticio J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves con rendimiento 322.83 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB- 4 en la dilución D4, con una concentración de extracto de 20.18 mg/mL, ya que en las demás diluciones las bacterias fueron resistentes a los agentes antibacterianos (Fig. 84).

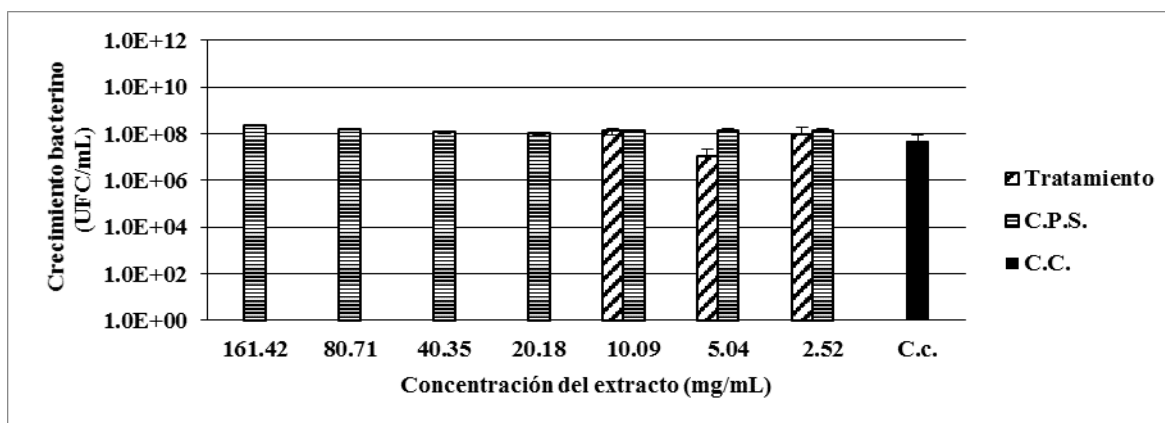


Figura 84. Efecto del suplemento alimenticio con clave J= (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio J, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-4 en la dilución D4, con una concentración del extracto de 20.18 mg/mL, conduciendo a la muerte de la población bacteriana (Fig. 85).

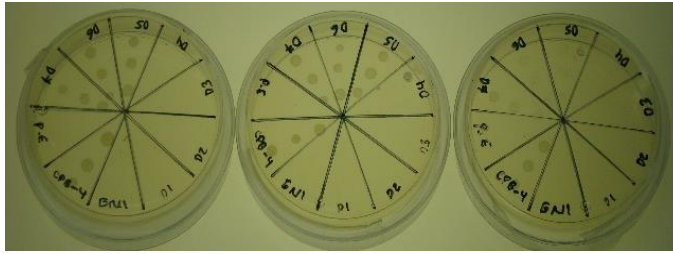


Figura 85. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave J= (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.2.3 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)

El suplemento alimenticio K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol con rendimiento 285.5 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-4 en la dilución D4 con una concentración de extracto de 17.8 mg/mL, ya que los organismos de la población fueron susceptibles y cesaron su crecimiento (Fig. 86).

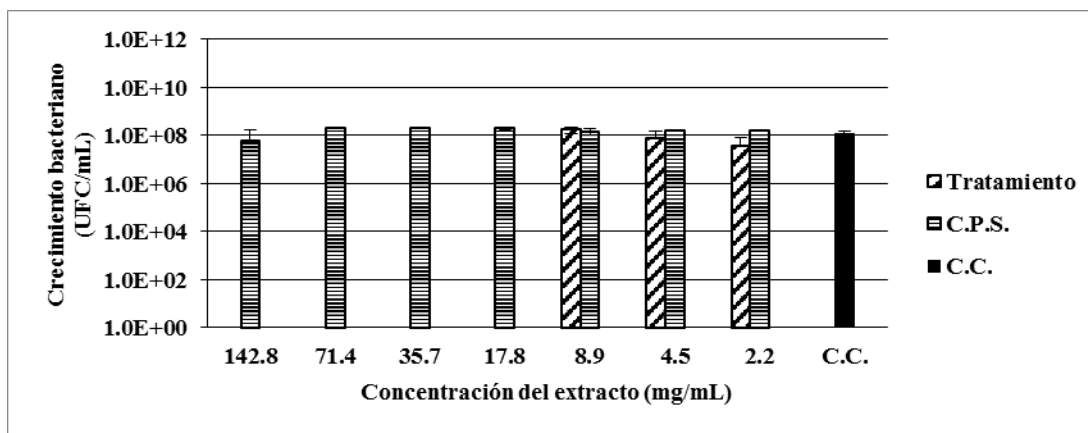


Figura 86. Efecto del suplemento alimenticio con clave K= (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio K, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-4 en la dilución D4 con una concentración del extracto de 17.8 mg/mL, inhibiendo completamente el crecimiento de las bacterias (Fig. 87).

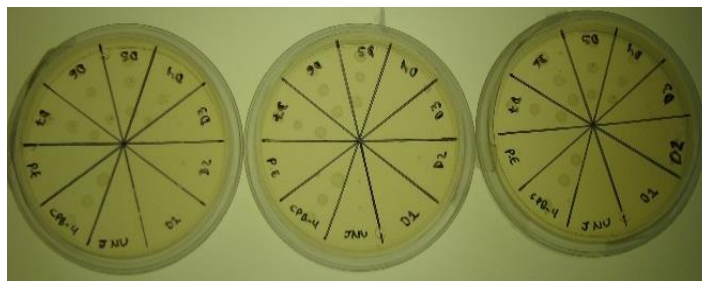


Figura 87. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K= (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.2.4 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de *G. lucidum* (Clave L)

El suplemento alimenticio L, compuesto con 4 g, de extracto hidroalcohólico liofilizado de *G. lucidum*, con rendimiento de 269.66 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-4 en la dilución D5, con una concentración del extracto de 8.43 mg/mL, a un tiempo mínimo de inhibición de bacteriana de 24 horas (Fig. 88).

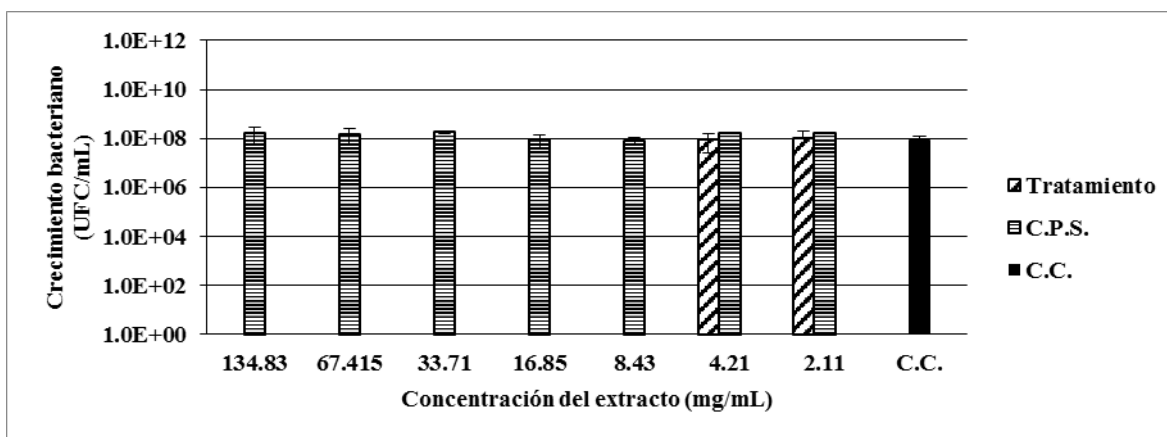


Figura 88. Efecto del suplemento alimenticio con clave L= (*G. lucidum* 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio L, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-4 en la dilución D3 con una concentración del extracto de 33.71 mg/mL, lo cual las colonias de bacterias fueron susceptibles y ocasionó la muerte total de la población (Fig. 89).



Figura 89. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave L= (*G. lucidum* 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.2.5 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)

El suplemento alimenticio M, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves con rendimiento de su extracto de 304.83 mg/mL, tuvo efecto mínimo inhibitorio contra CPB-4 en la dilución D3 a una concentración de 38.10 mg/mL, ya que en las demás diluciones las bacterias fueron resistentes a los agentes antibacterianos (Fig. 90).

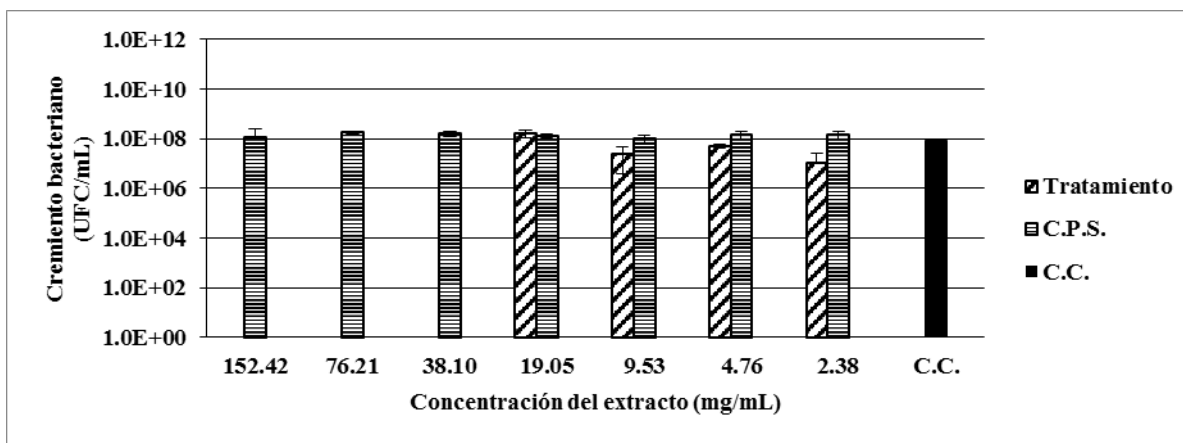


Figura 90. Efecto del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio M, a una concentración de 152.42 mg/mL, ya que en ninguna de sus diluciones presentó efecto en las células susceptibles y no provocó la muerte total de las bacterias (Fig. 91).



Figura 91. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.2.6 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)

El suplemento alimenticio N, compuesto con 4 g con extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol con rendimiento de su extracto 283 mg/mL, tuvo efecto mínimo inhibitorio contra CPB-4 en la dilución D3 a una concentración de 35.38 mg/mL, ya que la población bacteriana fue susceptible y cesaron su crecimiento (Fig. 92).

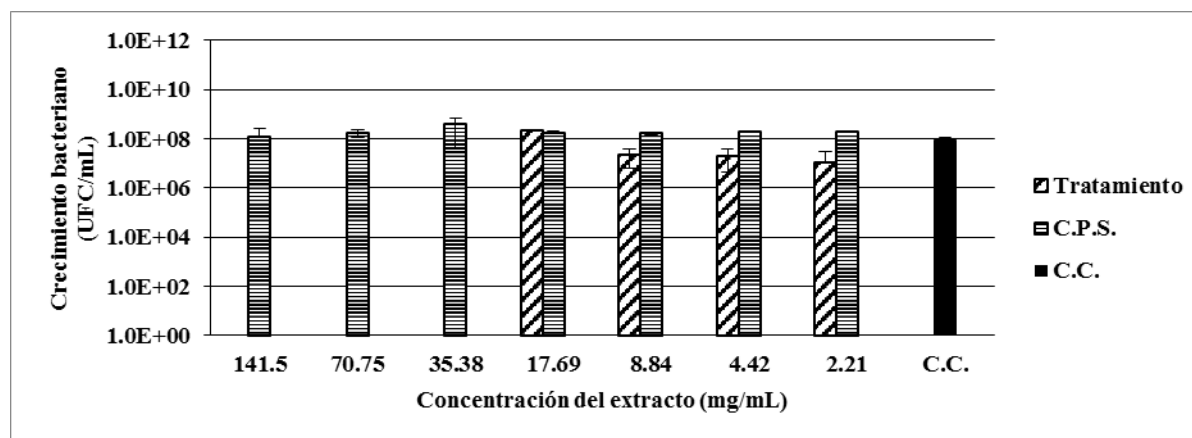


Figura 92. Efecto del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

La bacteria fue poco susceptible al suplemento alimenticio N, tuvo efecto mínimo bactericida contra CPB-4 en la dilución D2 a una concentración de 70.75 mg/mL, conduciendo a la muerte celular de la población bacteriana (Fig. 93).

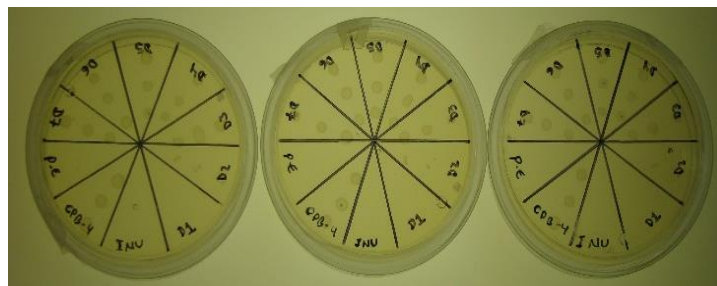


Figura 93. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-4, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-4. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.3 Bioensayo con la cepa CPB-6 de *Streptococcus agalactiae*

8.14.3.1 Confirmación del inóculo

Para determinar la concentración de bacterias del inóculo o semilla de la CPB-6 de *Streptococcus agalactiae* se tomaron 50 μ L y se vertieron por triplicado en cajas Petri con agar Mueller Hinton, mismas que se incubaron por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C (Fig. 94). Se confirmó la concentración de bacterias del inóculo de la CPB-6 de *S. agalactiae* del matraz 3, en las tres cajas Petri incubadas por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C. Cada caja presentó en promedio 55.33 ± 6.66 UFC, valor que entro en el rango de 50 a 100 UFC lo que aseguró una población de 1 a 2×10^8 bact/mL de *S. agalactiae*.

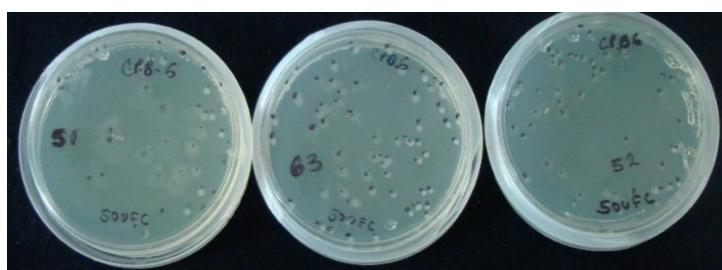


Figura 94. Concentración de bacterias en 50 μ L de inóculo de la CPB-6 (*Streptococcus agalactiae*).

8.14.3.2 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)

El suplemento alimenticio J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves con rendimiento 322.83 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-6 en la dilución D3 con una concentración del extracto de 40.35 mg/mL, inhibiendo el crecimiento y multiplicación de las bacterias (Fig. 95).

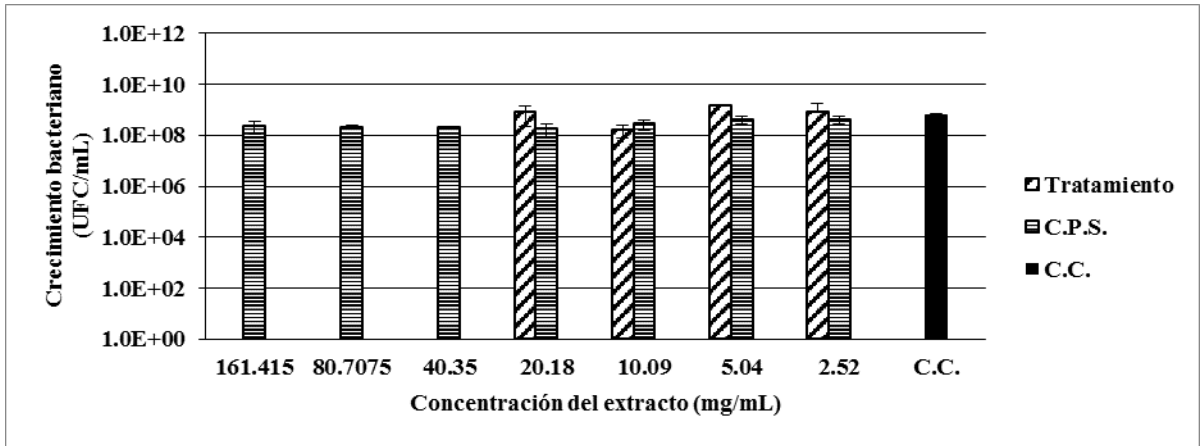


Figura 95. Efecto del suplemento alimenticio con clave J (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-6, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio J, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-6 en la dilución D3 con una concentración del extracto de 40.35 mg/mL, inhibiendo completamente el crecimiento de los organismos (Fig. 96).

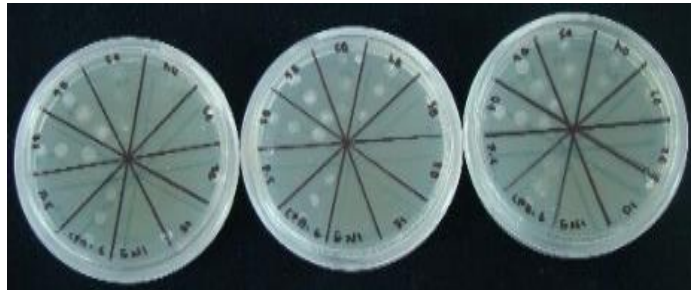


Figura 96. Efecto del suplemento alimenticio con clave J (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-6, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-6. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.3.3 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)

El suplemento alimenticio K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol con rendimiento 285.5 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-6 en la dilución D3 a una concentración del extracto de 35.69 mg/mL, a un tiempo mínimo de inhibición bacteriana de 24 horas (Fig. 97).

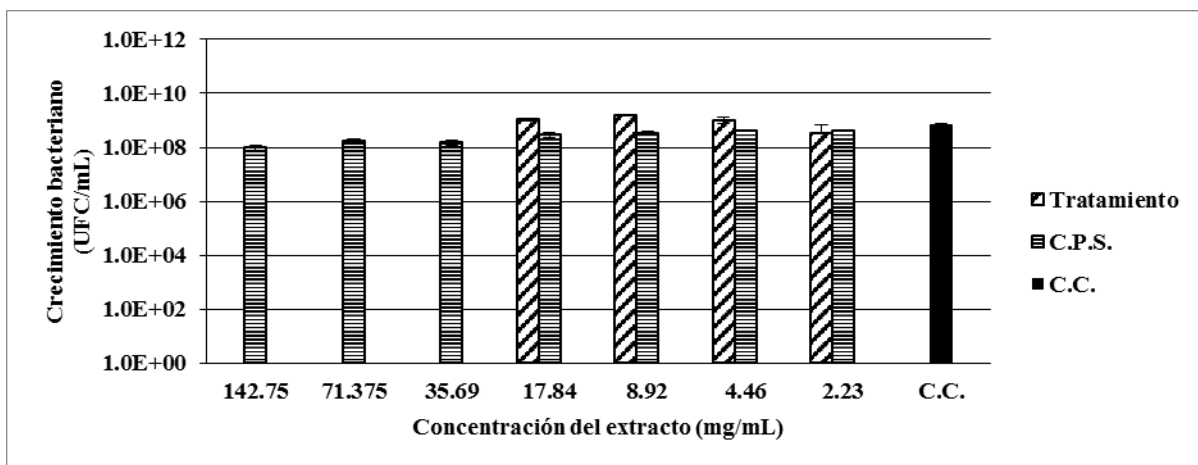


Figura 97. Efecto del suplemento alimenticio con clave K (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-6, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio K, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-6 en la dilución D3 con una concentración del extracto de 35.69 mg/mL, teniendo un efecto que fue irreversible con las células susceptibles ya que provocó la muerte total de las bacterias (Fig. 98).



Figura 98. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-6, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-6. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.3.4 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de *G. lucidum* (Clave L)

Este suplemento alimenticio, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado de *G. lucidum*, con rendimiento 269.66 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-6 en la dilución D3 a una concentración de extracto de 33.71 mg/mL, ya que en las demás diluciones las bacterias fueron resistentes a los agentes antibacterianos (Fig. 99).

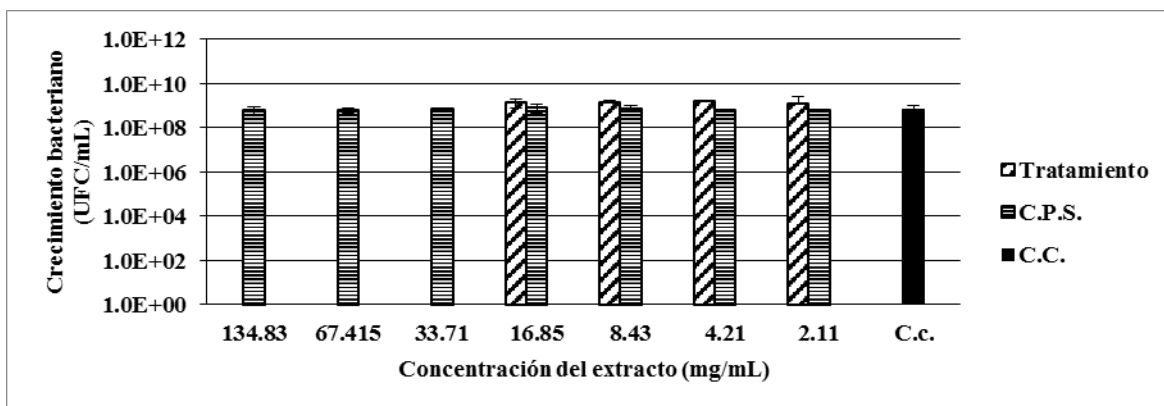


Figura 99. Efecto del suplemento alimenticio con clave L (*G. lucidum* 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-6, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio L, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-6 en la dilución D3 con una concentración del extracto de 33.71 mg/mL, lo cual las colonias de bacterias fueron susceptibles y ocasionó la muerte total de la población (Fig. 100).

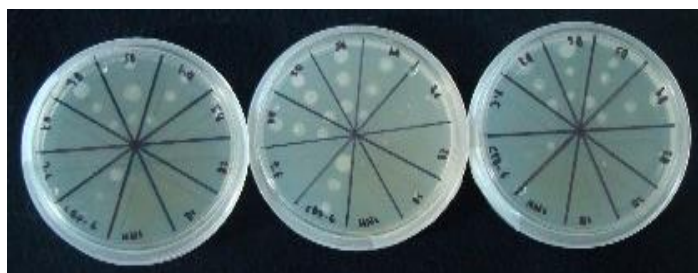


Figura 100. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave L (*G. lucidum* 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-6, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-6. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.3.5 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio M, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves con rendimiento de su extracto 304.83 mg/mL a una concentración de 152.42 mg/mL, no presentó inhibición bacteriana en el tiempo mínimo de 24 horas (Fig. 101).

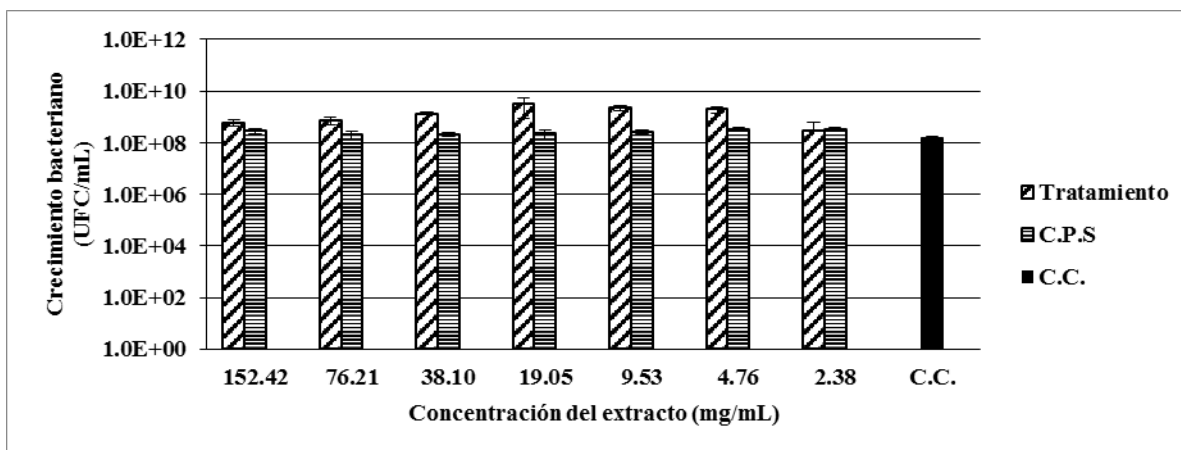


Figura 101. Efecto del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-6, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio M, a una concentración de 152.42 mg/mL, no condujo a la muerte celular de la población bacteriana (Fig. 102).



Figura 102. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-6, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-6. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.3.6 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)

El suplemento alimenticio clave (N) compuesto con 4 g con extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol con rendimiento de su extracto 283 mg/mL, tuvo efecto mínimo inhibitorio contra CPB-6 en la dilución D1 a una concentración de 141.5 mg/mL, ya que los organismos de una población fueron susceptibles y cesaron su crecimiento (Fig. 103).

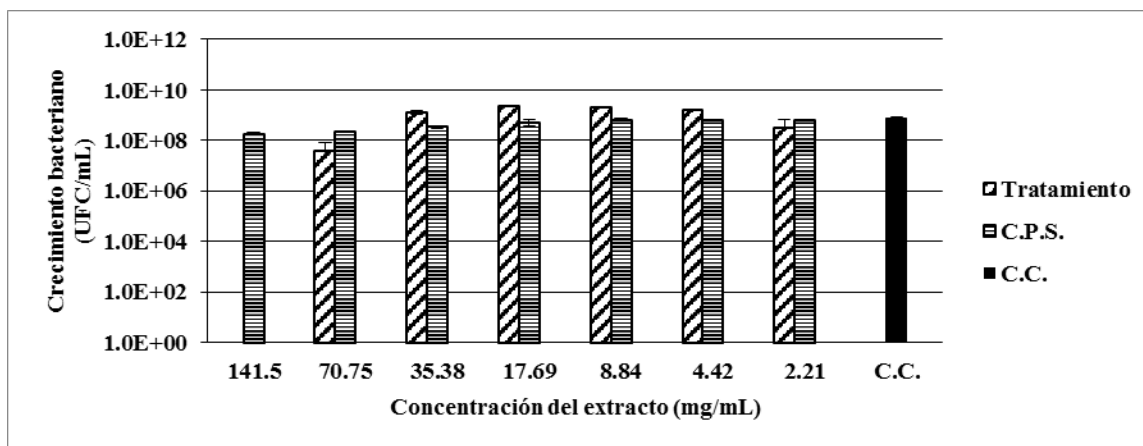


Figura 103. Efecto del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-6, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio N, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-6 en la dilución D1 con una concentración de extracto de 141.5 mg/mL, conduciendo a la muerte celular de la población bacteriana (Fig. 104).



Figura 104. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-6, *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-6. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Streptococcus agalactiae*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.4 Bioensayo con la cepa CPB-7 de *Stenotrophomonas maltophilia*

8.14.4.1 Confirmación del inóculo

Para determinar la concentración de bacterias del inóculo o semilla de la CPB-7 de *Stenotrophomonas maltophilia* se tomaron 50 μ L y se vertieron por triplicado en cajas Petri con agar Mueller Hinton, mismas que se incubaron por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C (Fig. 105). Se confirmó la concentración de bacterias del inóculo de la CPB-7 de *S. maltophilia* del matraz 3, en las tres cajas Petri incubadas por 24 horas a una temperatura de

28±2 °C. Cada caja presentó en promedio 84.33±36.23 UFC, valor que entro en el rango de 50 a 100 UFC lo que aseguró una población de 1 a 2x10⁸ bact/mL de *S. maltophilia*.

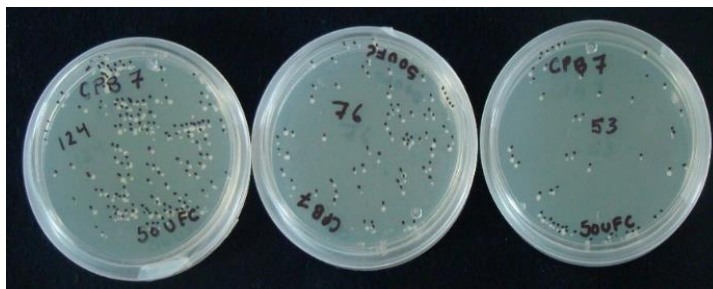


Figura 105. Concentración de bacterias en 50 µL de inóculo de la CPB-7 (*Stenotrophomonas maltophilia*).

8.14.4.2 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)

El suplemento alimenticio con clave J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves con rendimiento 322.83 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-7 en la dilución D3 con una concentración del extracto de 40.35 mg/mL, inhibiendo el crecimiento y multiplicación de las bacterias (Fig. 106).

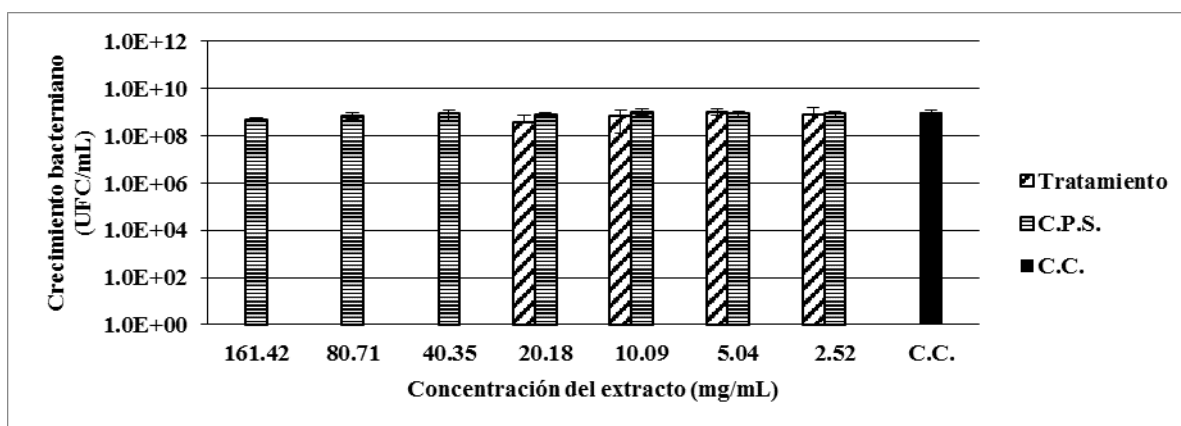


Figura 106. Efecto del suplemento alimenticio con clave J (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-7, *Stenotrophomonas maltophilia* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

Este suplemento alimenticio, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-7 en la dilución D2 con una concentración de extracto de 80.71 mg/mL, inhibiendo completamente el crecimiento de los organismos (Fig. 107).



Figura 107. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave J= (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-7, *Stenotrophomonas maltophilia* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-7. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.4.3 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)

El suplemento alimenticio K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol con rendimiento 285.5 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-7 en la dilución D3 con una concentración de extracto de 35.7 mg/mL, a un tiempo mínimo de inhibición bacteriana de 24 horas (Fig. 108).

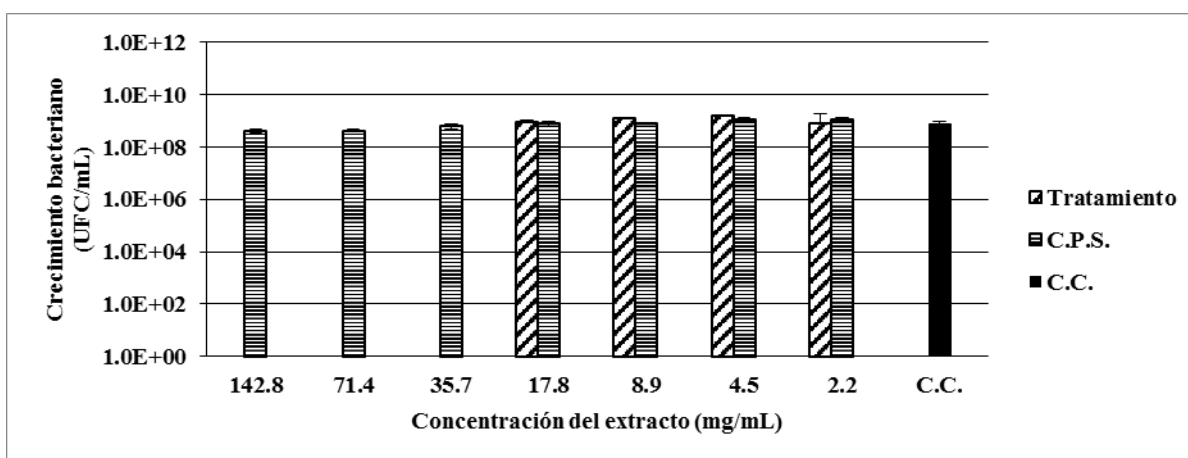


Figura 108. Efecto del suplemento alimenticio con clave K (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-7, *Stenotrophomonas maltophilia* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio K, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-7 en la dilución D2 con una concentración de extracto de 71.4 mg/mL, teniendo un efecto irreversible con las células susceptibles ya que provocó la muerte total de las bacterias (Fig. 109).



Figura 109. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-7, *Stenotrophomonas maltophilia* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-7. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.4.4 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de *G. lucidum* (Clave L)

El suplemento alimenticio L, compuesto con 4 g, de extracto hidroalcohólico liofilizado de *G. lucidum* con rendimiento 269.66 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-7 en la dilución D4 con una concentración del extracto de 16.9 mg/mL, ya que en las demás diluciones las bacterias fueron resistentes a los agentes antibacterianos (Fig. 110).

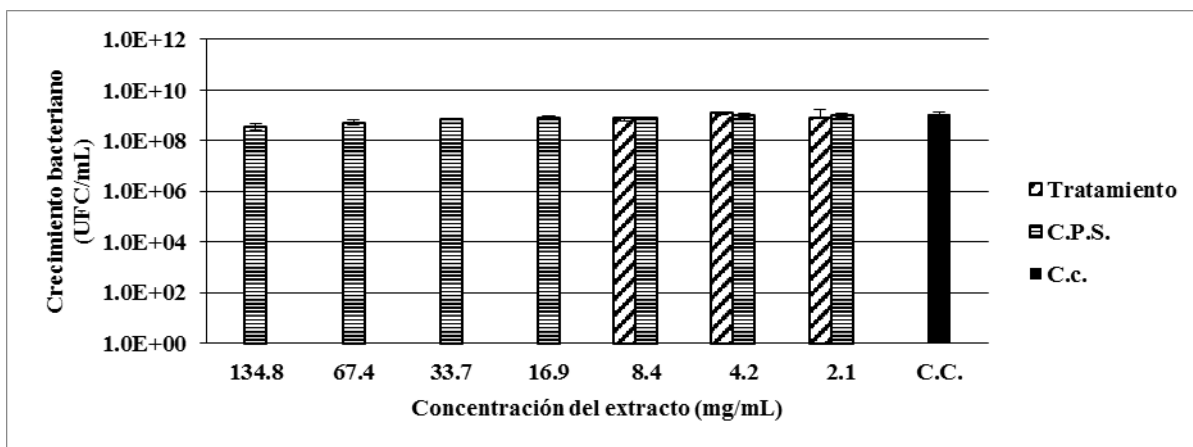


Figura 110. Efecto del suplemento alimenticio con clave L (*G. lucidum* 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-7, *Stenotrophomonas maltophilia* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio con clave L, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-7 en la dilución D4 a una concentración del extracto de 16.9 mg/mL, lo cual las colonias de bacterias fueron susceptibles y ocasionó la muerte total de la población (Fig. 111).



Figura 111. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave L (*G. lucidum* 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-7, a *Stenotrophomonas maltophilia* las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-7. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.4.5 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)

El suplemento alimenticio M, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves con rendimiento de su extracto 304.83 mg/mL, tuvo efecto mínimo inhibitorio contra CPB-7 en la dilución D1 a una concentración de 152.42 mg/mL, ya que los organismos de una población fueron susceptibles y cesaron su crecimiento (Fig. 112).

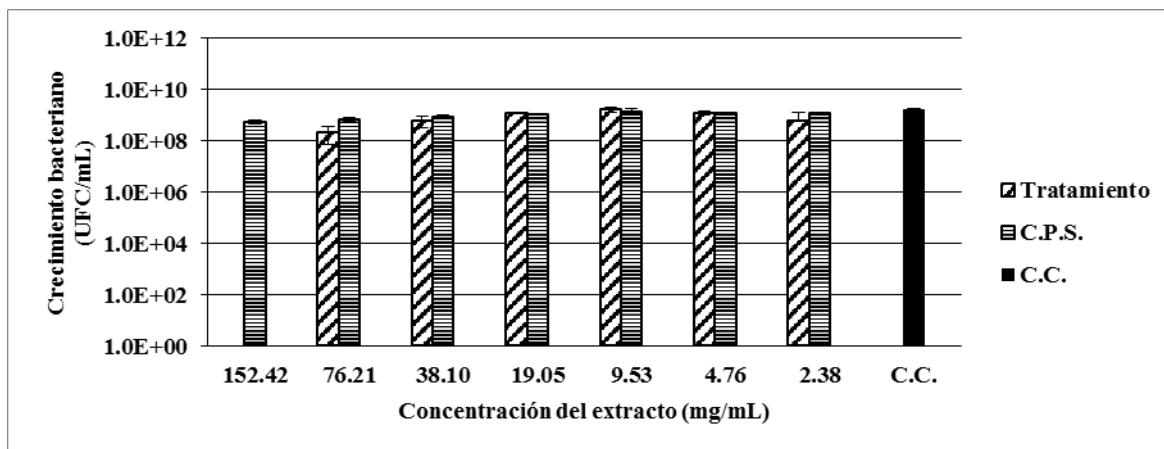


Figura 112. Efecto del suplemento alimenticio con clave M= (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-7, *Stenotrophomonas maltophilia* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

Las bacterias no fue susceptible al suplemento alimenticio M, a una concentración de 152.42 mg/mL, aun así cuando las colonias de bacterias fueron susceptibles no ocasionó la muerte total de la población (Fig. 113).

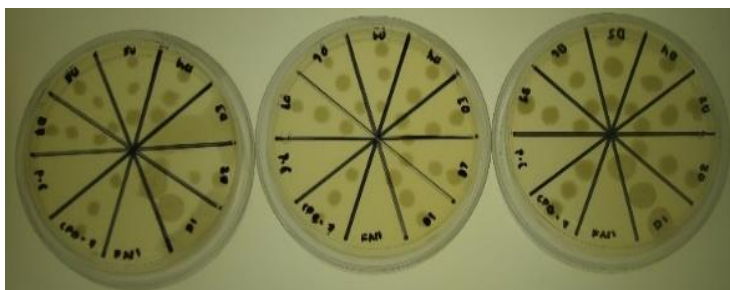


Figura 113. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-7, *Stenotrophomonas maltophilia* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-7. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.4.6 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)

El suplemento alimenticio N, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol con rendimiento de su extracto 283 mg/mL tuvo efecto mínimo inhibitorio contra CPB-7 en la dilución D1 a una concentración de 141.5 mg/mL, inhibiendo el crecimiento y multiplicación de las bacterias (Fig. 114).

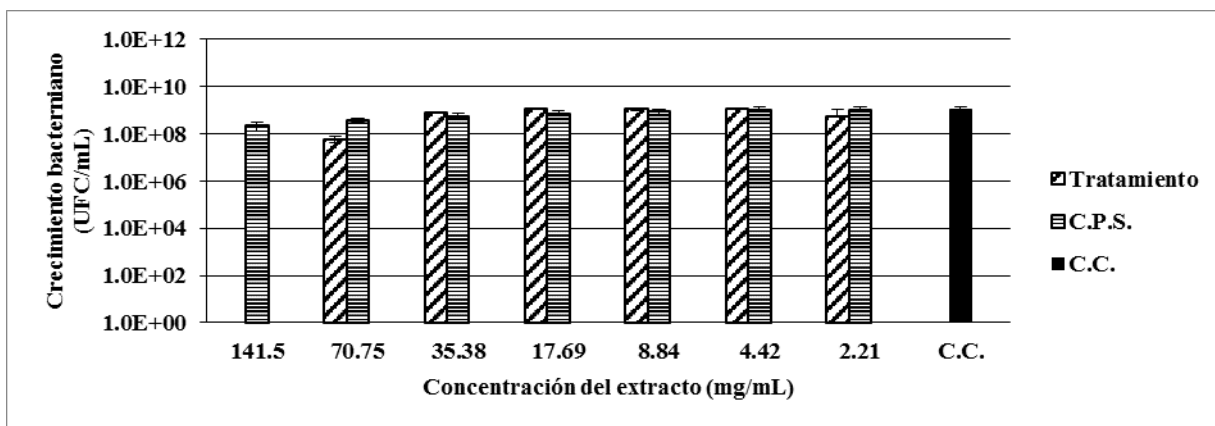


Figura 114. Efecto del suplemento alimenticio con clave N= (Nutrisol 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-7, *Stenotrophomonas maltophilia* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio N, a una concentración de 141.5 mg/mL, condujo a la muerte celular de la población bacteriana (Fig. 115).

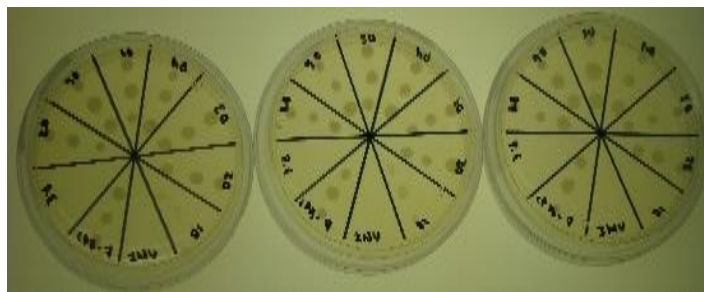


Figura 115. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-7, *Stenotrophomonas maltophilia* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-7. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia*. B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.5 Bioensayo con la cepa CPB-8 de *Escherichia coli*

8.14.5.1 Confirmación del inóculo

Para determinar la concentración de bacterias del inóculo o semilla de la CPB-8 de *Escherichia coli* se tomaron 50 μ L y se vertieron por triplicado en cajas Petri con agar Mueller Hinton, mismas que se incubaron por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C (Fig. 116). Se confirmó la concentración de bacterias del inóculo de la CPB-8 de *E. coli* del matraz 3, en las tres cajas Petri incubadas por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C. Cada caja presentó en promedio 84.33 ± 3.06 UFC, valor que entro en el rango de 50 a 100 UFC lo que aseguró una población de 1 a 2×10^8 bact/mL de *E. coli*.



Figura 116. Concentración de bacterias en 50 μ L de inóculo de la CPB-8 (*Escherichia coli*).

8.14.5.2 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)

El suplemento alimenticio J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves con rendimiento 322.83 mg/mL, tuvo un efecto mínimo

inhibitorio contra CPB-8 en la dilución D1 con una concentración del extracto de 161.42 mg/mL, a un tiempo mínimo de inhibición bacteriana de 24 horas (Fig. 117).

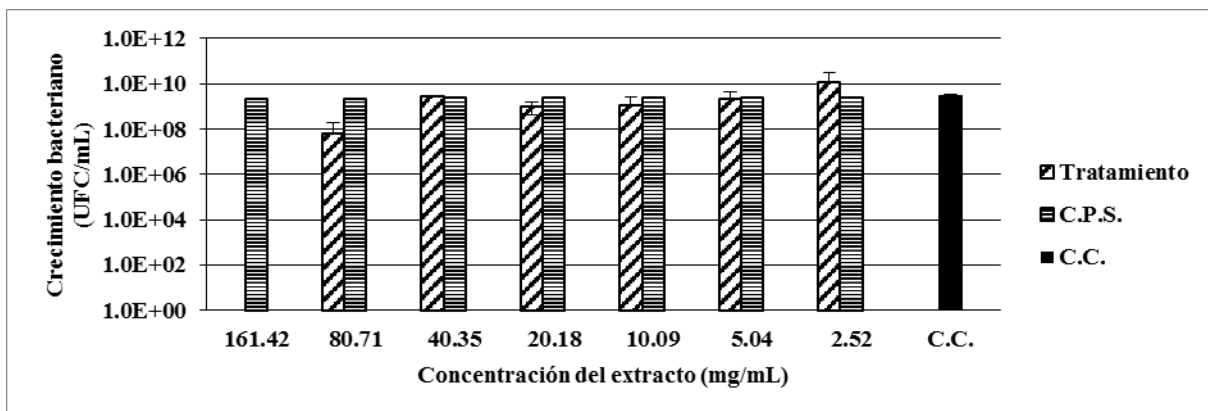


Figura 117. Efecto del suplemento alimenticio con clave J= (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-8, *Escherichia coli* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio J, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-8 en la dilución D1 con una concentración del extracto de 161.42 mg/mL, inhibiendo completamente el crecimiento de los organismos (Fig. 118).



Figura 118. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave J (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g) (*Ganoderma lucidum* 2 g) (nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-8, *Escherichia coli* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-8. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.5.3 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)

El suplemento alimenticio K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol con rendimiento de 285.5 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-8 en la dilución D1 con una concentración de extracto de 142.75 mg/mL, ya que en las demás diluciones las bacterias fueron resistentes a los agentes antibacterianos (Fig. 119).

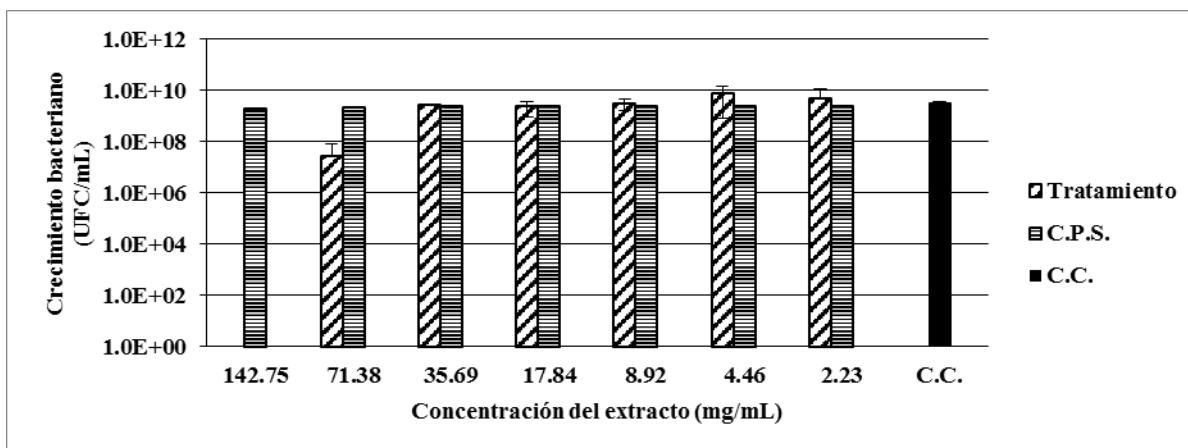


Figura 119. Efecto del suplemento alimenticio con clave K= (*G. lucidum* 2 g; nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-8, *Escherichia coli* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio K, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-8 en la dilución D1 con una concentración del extracto de 142.75 mg/mL, teniendo un efecto que fue irreversible con las células susceptibles ya que provocó la muerte total de las bacterias (Fig. 120).



Figura 120. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K (*G. lucidum* 2 g; nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-8, *Escherichia coli* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-8. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*. B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.5.4 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de *G. lucidum* (Clave L)

El suplemento alimenticio L, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado de *G. lucidum*, con rendimiento 269.66 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-8 en la dilución D2 con una concentración del extracto de 67.415 mg/mL, ya que los organismos de una población fueron susceptibles y cesaron su crecimiento (Fig. 121).

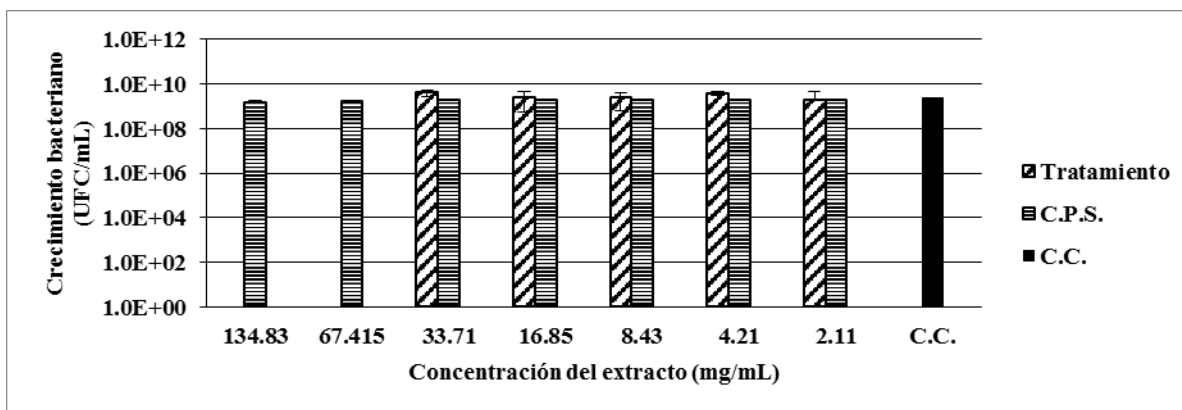


Figura 121. Efecto del suplemento alimenticio con clave L (*G. lucidum* 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-8 *Escherichia coli* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio L, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-8 en la dilución D1 con una concentración de extracto de 134.83 mg/mL, lo cual las colonias de bacterias fueron susceptibles y ocasionó la muerte total de la población (Fig. 122).

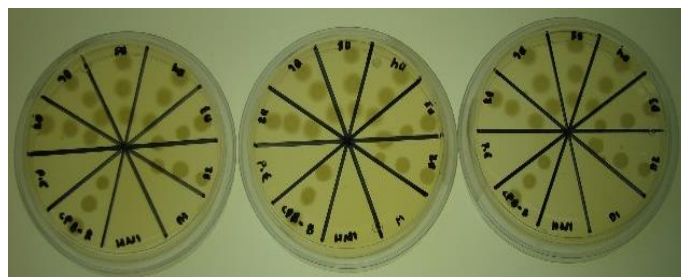


Figura 122. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave L (*G. lucidum* 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-8, *Escherichia coli* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-8. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*. B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.5.5 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio M, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves con rendimiento de su extracto 304.83 mg/mL a una concentración de 152.42 mg/mL, ya que en todas las diluciones las bacterias fueron resistentes a los agentes antibacterianos (Fig. 123).

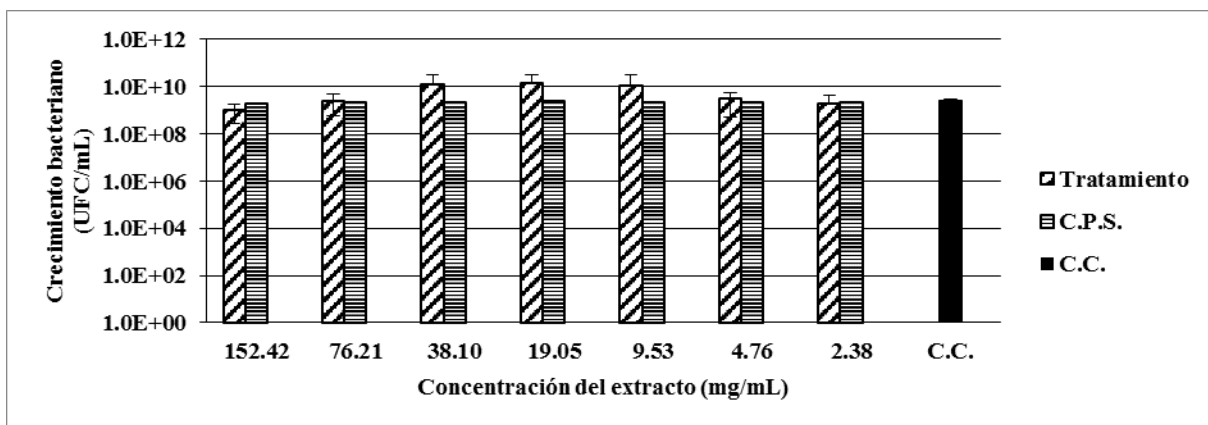


Figura 123. Efecto del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-8, *Escherichia coli* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio M, a una concentración de 152.42 mg/mL, no tuvo un efecto irreversible con las bacterias ya que no provocó la muerte total de la bacteria en el bioensayo (Fig. 124).



Figura 124. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-8, *Escherichia coli* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-8. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.5.6 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio N, compuesto con 4 g con extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol con rendimiento de su extracto 283 mg/mL a una concentración de 141.50 mg/mL, ya que la población bacteriana no fue susceptible y no cesaron su crecimiento (Fig. 125).

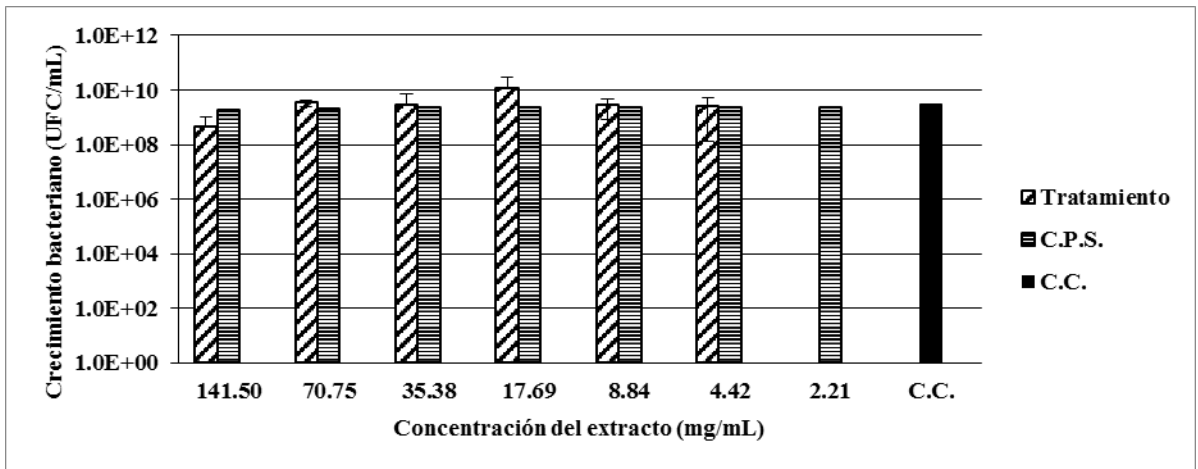


Figura 125. Efecto del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-8, *Escherichia coli* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio N, a una concentración de 141.50 mg/mL, no se presentó muerte celular de la población bacteriana o efecto bactericida (Fig. 126).



Figura 126. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-8, *Escherichia coli* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-8. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*. B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.6 Bioensayo con la cepa CPB-9 de *Bacillus subtilis*

8.14.6.1 Confirmación del inóculo

Para determinar la concentración de bacterias del inóculo o semilla de la CPB-9 de *Bacillus subtilis* se tomaron 50 μ L y se vertieron por triplicado en cajas Petri con agar Mueller Hinton, mismas que se incubaron por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C (Fig. 127). Se confirmó la concentración de bacterias del inóculo de la CPB-9 de *B. subtilis* del matraz 3, contando las UFC de las tres cajas Petri incubadas por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C. Cada caja

presentó en promedio 78.33 ± 6.11 UFC, valor que entro en el rango de 50 a 100 UFC lo que aseguró una población de 1 a 2×10^8 bact/mL de *B. subtilis*.

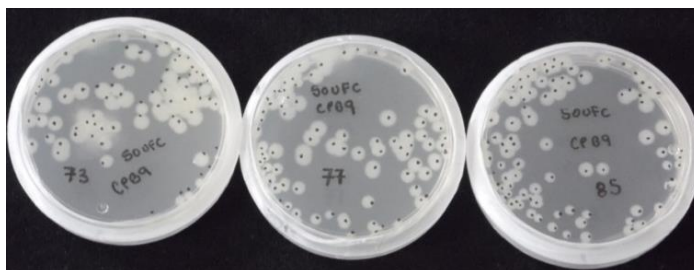


Figura 127. Concentración de bacterias en 50 μ L de inóculo de la CPB-9 (*Bacillus subtilis*).

8.14.6.2 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)

El suplemento alimenticio J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves con rendimiento 322.83 mg/mL tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-9 en la dilución D3 con una concentración del extracto de 40.4 mg/mL, inhibiendo el crecimiento y multiplicación de las bacterias (Fig. 128).

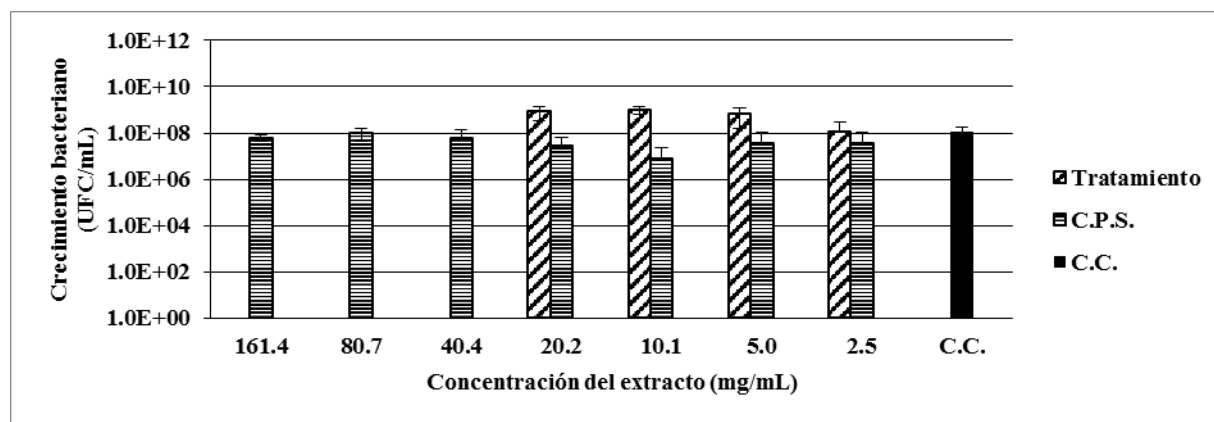


Figura 128. Efecto del suplemento alimenticio con clave J (*G. lucidum* 2 g; nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-9, *Bacillus subtilis* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio J, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-9 en la dilución D3 con una concentración del extracto de 40.4 mg/mL, inhibiendo completamente el crecimiento de los microorganismos (Fig. 129).

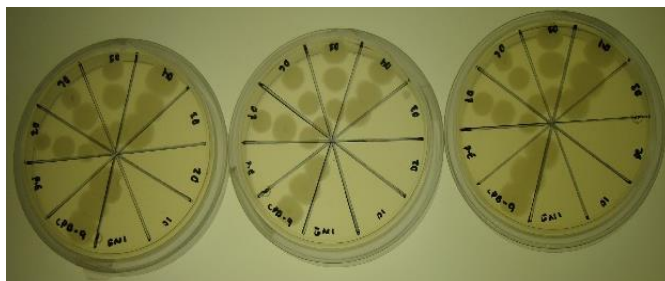


Figura 129. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave J (*G. lucidum* 2 g; nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-9 a *Bacillus subtilis* las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-9. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis*. B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.6.3 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)

El suplemento alimenticio K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol con rendimiento 285.5 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-9 en la dilución D3 a una concentración del extracto de 35.69 mg/mL, a un tiempo mínimo de inhibición bacteriana de 24 horas (Fig. 130).

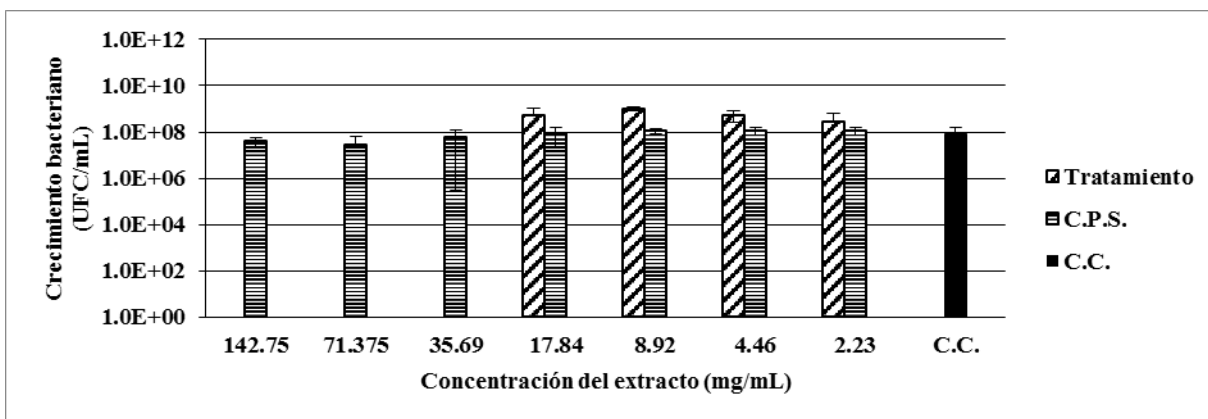


Figura 130. Efecto del suplemento alimenticio con clave K (*G. lucidum* 2 g; nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-9, *Bacillus subtilis* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio K, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-9 en la dilución D3 con una concentración del extracto de 35.69 mg/mL, teniendo un efecto que fue irreversible con las células susceptibles ya que provocó la muerte total de las bacterias (Fig. 131).



Figura 131. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-9, *Bacillus subtilis* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-9. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis*. B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.6.4 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de *G. lucidum* (Clave L)

La clave L de este suplemento alimenticio, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado de *G. lucidum*, con rendimiento 269.66 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-9 en la dilución D4 a una concentración del extracto de 16.85 mg/mL, a menos concentración del extracto las bacterias fueron resistentes a los agentes antibacterianos (Fig. 132).

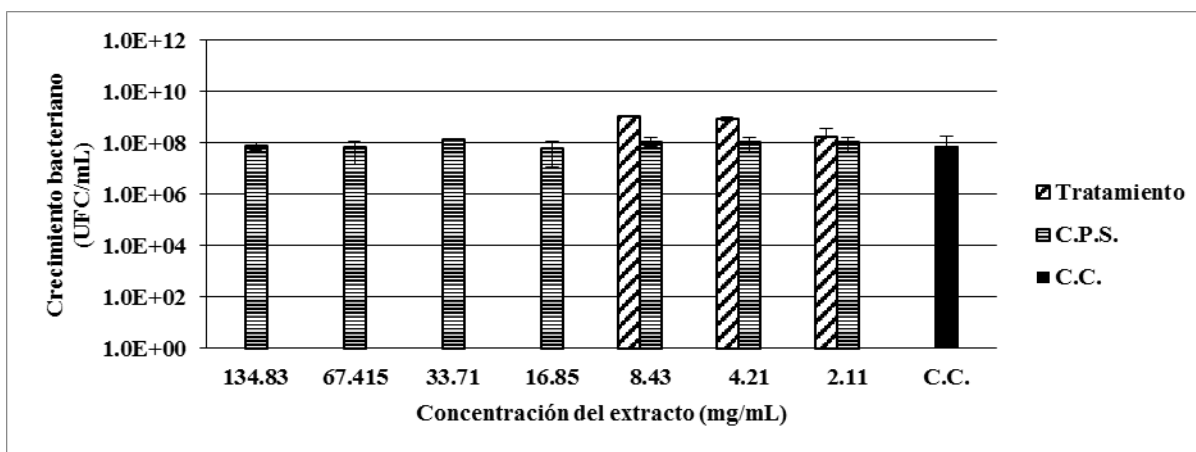


Figura 132. Efecto del extracto del suplemento alimenticio con clave L (*G. lucidum* 4 g) sobre el crecimiento bacteriano, CPB-9 *Bacillus subtilis* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio L, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-9 en la dilución D4 con una concentración del extracto de 16.85 mg/mL, lo cual las colonias de bacterias fueron susceptibles y ocasionó la muerte total de la población demostrando su efecto bactericida (Fig. 133).

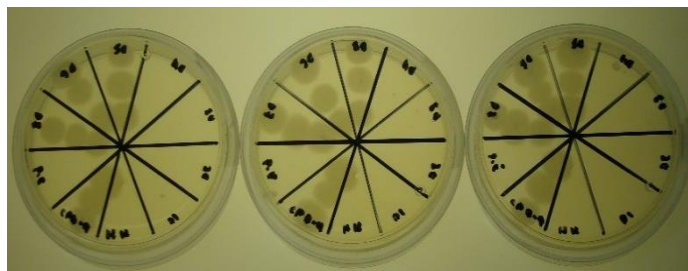


Figura 133. Efecto del suplemento alimenticio con clave L (*G. lucidum* 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-9, a *Bacillus subtilis* las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-9. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis*. B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.6.5 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio M, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves con rendimiento de su extracto 304.83 mg/mL a una concentración de 152.4 mg/mL, no inhibió el crecimiento y ni la multiplicación de las bacterias (Fig. 134).

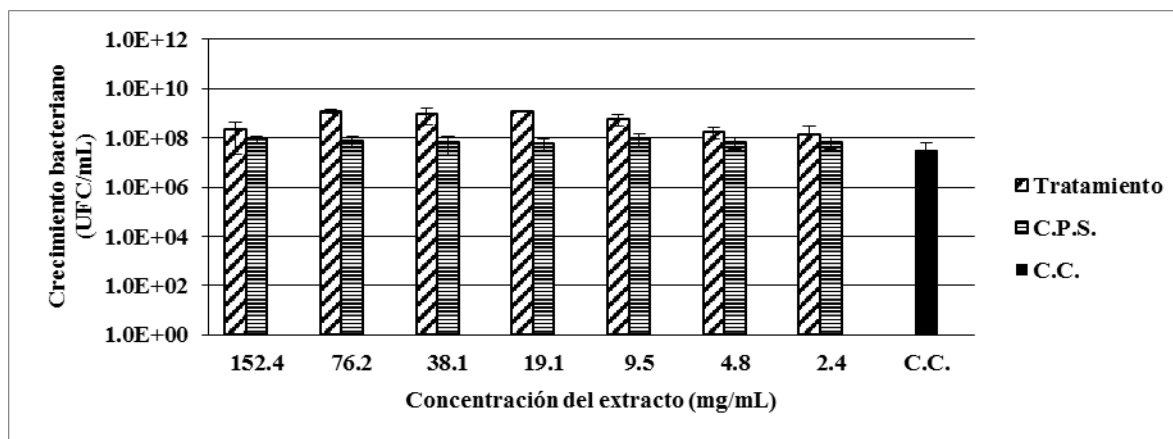


Figura 134. Efecto del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-9, *Bacillus subtilis* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio M, a una concentración de 152.4 mg/mL, ni se observó el efecto bactericida o muerte celular de la población bacteriana (Fig. 135).

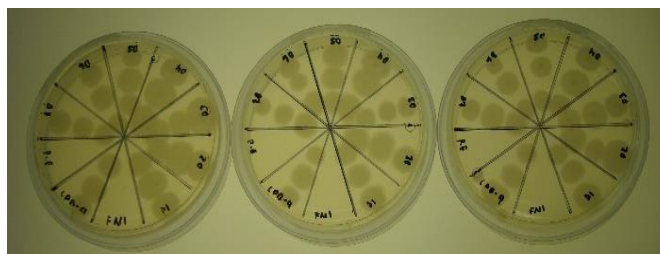


Figura 135. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-9, *Bacillus subtilis* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-9. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.6.6 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)

El suplemento alimenticio N, compuesto con 4 g con extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol con rendimiento de su extracto 283 mg/mL tuvo efecto mínimo inhibitorio contra CPB-9 en la dilución D3 a una concentración de 35.69 mg/mL, ya que las bacterias de la población fueron susceptibles y cesaron su crecimiento (Fig. 136).

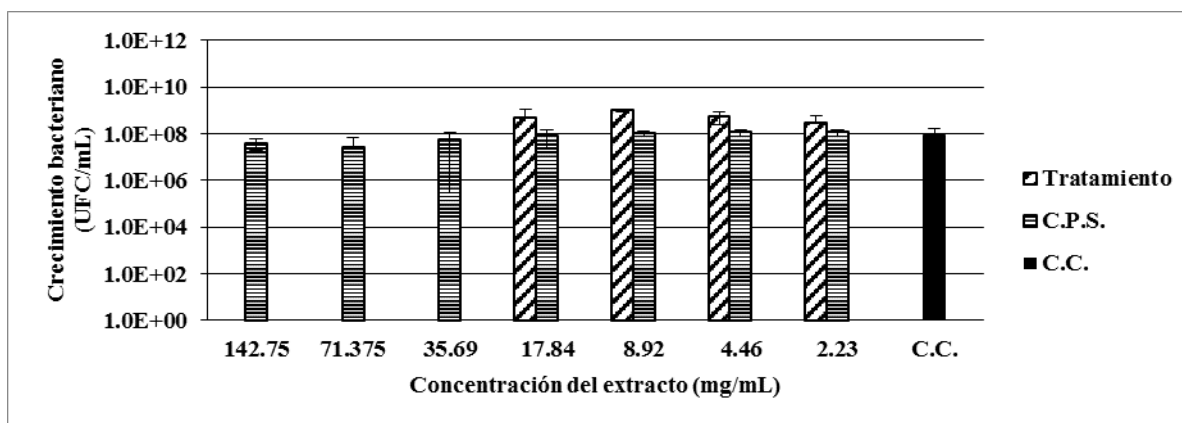


Figura 136. Efecto del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) del suplemento alimenticio sobre el crecimiento bacteriano CPB-9, *Bacillus subtilis* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio N, tuvo efecto mínimo bactericida contra CPB-9 en la dilución D1 a una concentración de 142.75 mg/mL, conduciendo a la muerte celular de la población bacteriana (Fig. 137).



Figura 137. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-9, a *Bacillus subtilis* las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-9. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.7 Bioensayo con la cepa CPB-10 de *Staphylococcus aureus*

8.14.7.1 Confirmación del inóculo

Para determinar la concentración de bacterias del inóculo o semilla de la CPB-10 de *Staphylococcus aureus* se tomaron 50 μ L y se vertieron por triplicado en cajas Petri con agar Mueller Hinton, mismas que se incubaron por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C (Fig. 138). Se confirmó la concentración de bacterias del inóculo de la CPB-10 de *S. aureus* del matraz 3, en las tres cajas Petri incubadas por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C. Cada caja presentó en promedio 89.67 ± 7.37 UFC, valor que entro en el rango de 50 a 100 UFC lo que aseguró una población de 1 a 2×10^8 bact/mL de *S. aureus*.



Figura 138. Concentración de bacterias en 50 μ L de inóculo de la CPB-10 (*Staphylococcus aureus*).

8.14.7.2 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)

El suplemento alimenticio J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves con rendimiento 322.83 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-10 en la dilución D3, a una concentración de extracto de 40.35 mg/mL, inhibiendo el crecimiento y multiplicación de las bacterias (Fig. 139).

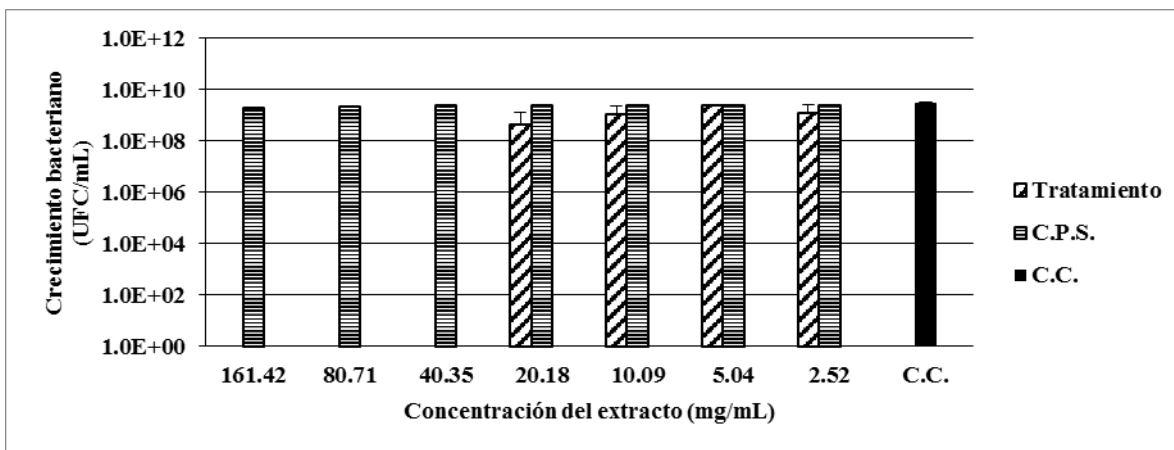


Figura 139. Efecto del suplemento alimenticio con clave J (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-10, *Staphylococcus aureus* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio J, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-10 en la dilución D2 con una concentración del extracto de 80.71 mg/mL, inhibiendo completamente el crecimiento de los microorganismos (Fig. 140).

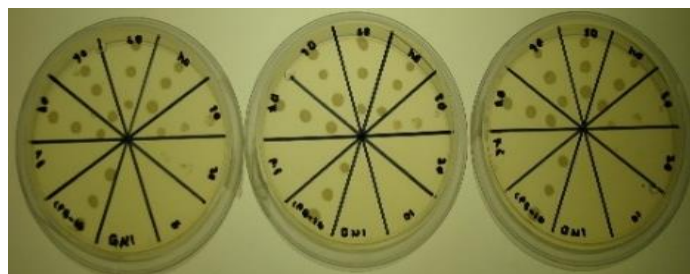


Figura 140. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave J (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-10 *Staphylococcus aureus* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-10. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.7.3 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)

El suplemento alimenticio K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol con rendimiento 285.5 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-10 en la dilución D3 a una concentración de extracto de 35.69 mg/mL, en el tiempo mínimo de inhibición bacteriana de 24 horas con lo que se valora el efecto bacteriostático (Fig. 141).

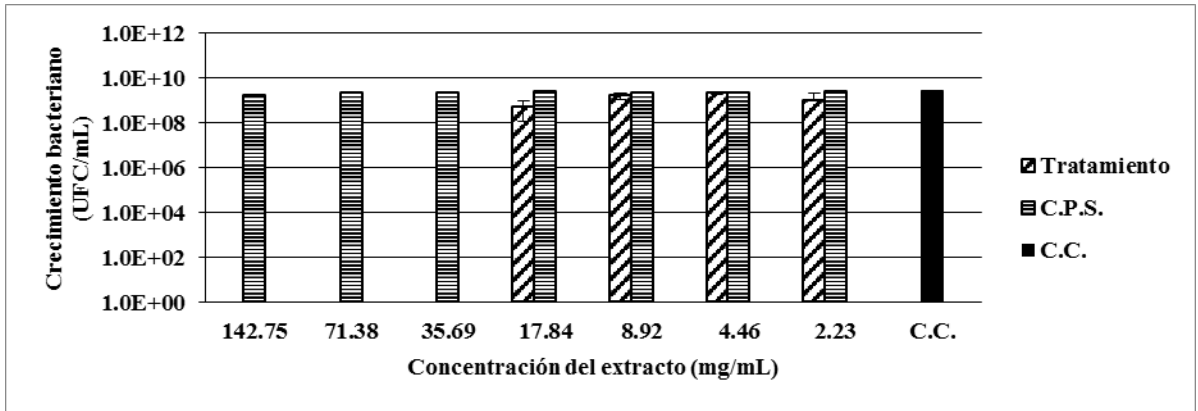


Figura 141. Efecto del suplemento alimenticio con clave K (*G. lucidum* 2 g; nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-10, *Staphylococcus aureus* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio K, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-10 en la dilución D2 con una concentración de extracto de 71.38 mg/mL, el efecto bactericida fue irreversible con las células susceptibles ya que provocó la muerte total de las bacterias a esa concentración (Fig. 142).



Figura 142. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K (*G. lucidum* 2 g; nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-10, *Staphylococcus aureus* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-10. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.7.4 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de *G. lucidum* (Clave L)

Los 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado de *G. lucidum* usados para elaborar el suplemento alimenticio L tuvo un rendimiento 269.66 mg/mL y un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-10 en la dilución D4 con una concentración del extracto de 16.85 mg/mL, en las demás diluciones la concentración del extracto fue mínimo y las bacterias fueron resistentes a los agentes antibacterianos (Fig. 143).

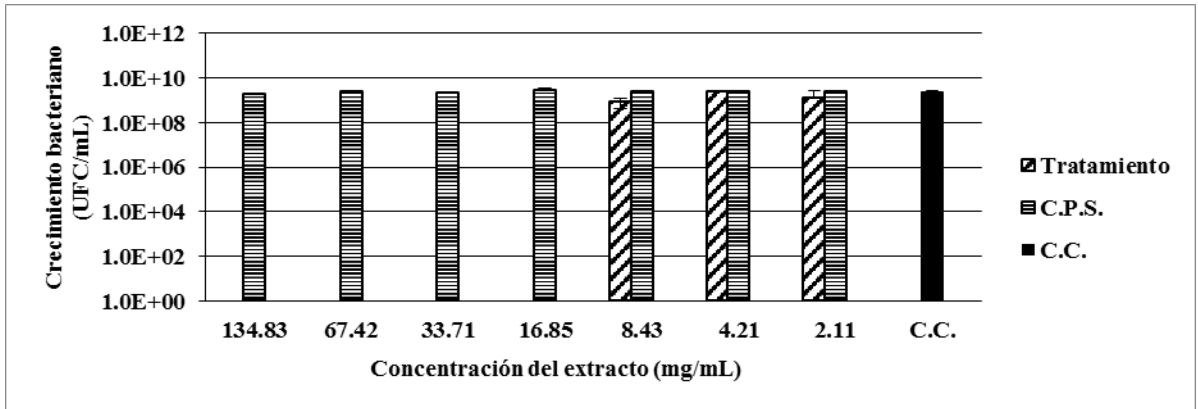


Figura 143. Efecto del suplemento alimenticio con clave L (*G. lucidum* 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-10 *Staphylococcus aureus* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio L, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-10 en la dilución D3, a una concentración de extracto de 33.71 mg/mL, lo cual las colonias de bacterias fueron susceptibles y ocasionó la muerte total de la población, confirmando a esa concentración el efecto bactericida del extracto (Fig. 144).

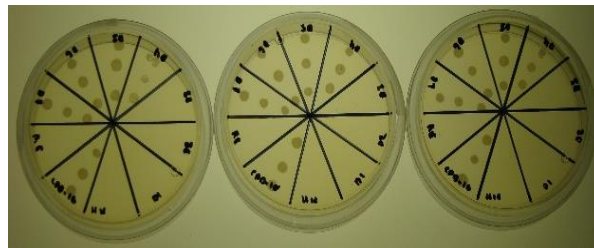


Figura 144. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave L (*G. lucidum* 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-10, *Staphylococcus aureus* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-10. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.7.5 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)

El suplemento alimenticio M, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves con rendimiento de 304.83 mg/mL, tuvo efecto mínimo inhibitorio contra CPB-10 en la dilución D1, a una concentración de 152.42 mg/mL, a esa concentración los microorganismos de la población fueron susceptibles y cesaron su crecimiento (Fig. 145).

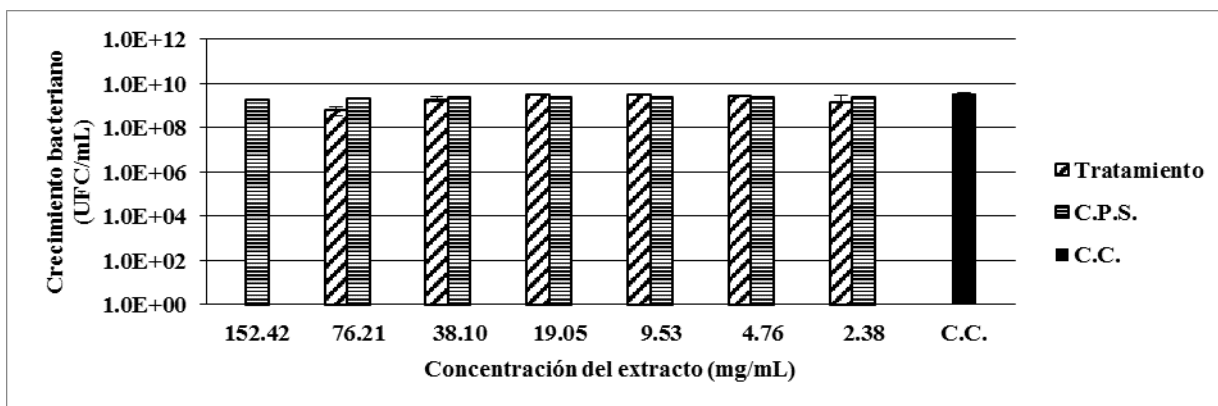


Figura 145. Efecto del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-10, *Staphylococcus aureus* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio M, a una concentración de 152.42 mg/mL, aun así cuando las colonias de bacterias fueron susceptibles no se observó el efecto bactericida en ninguna concentración (Fig. 146).



Figura 146. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-10, *Staphylococcus aureus* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-10. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.7.6 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)

El suplemento alimenticio N, compuesto con 4 g con extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol y rendimiento del extracto de 283 mg/mL, tuvo efecto mínimo inhibitorio contra CPB-10 en la dilución D1, a una concentración de 141.50 mg/mL, en esa dilución se confirmó el efecto bactericida (Fig. 147).

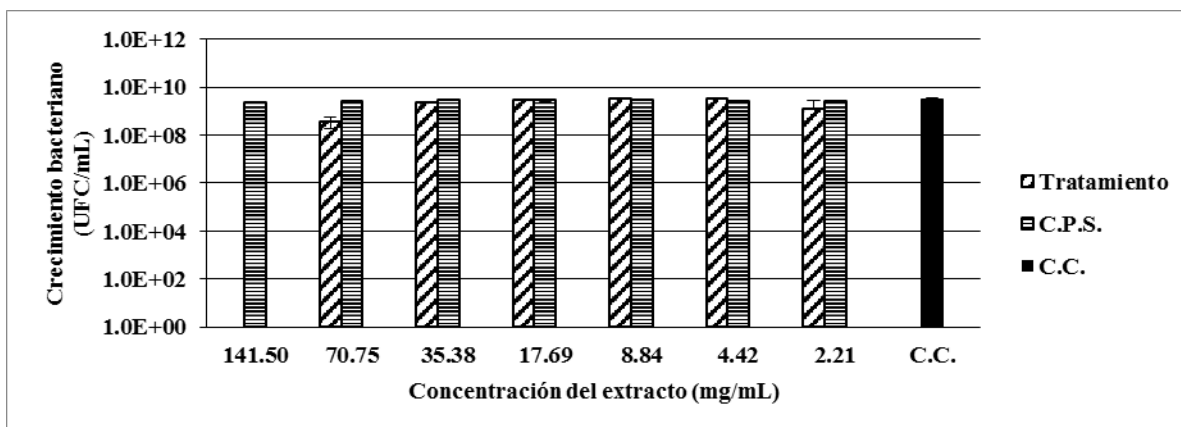


Figura 147. Efecto del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-10, *Staphylococcus aureus* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio N, en ninguna concentración ni en la de 141.50 mg/mL en donde se observó el efecto bactericida (Fig. 148).



Figura 148. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-10, *Staphylococcus aureus* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-10. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.8 Bioensayo con la cepa CPB-11 de *Listeria monocytogenes*

8.14.8.1 Confirmación del inóculo

Para determinar la concentración de bacterias del inóculo o semilla de la CPB-11 de *Listeria monocytogenes* se tomaron 50 μ L y se vertieron por triplicado en cajas Petri con agar Mueller Hinton, mismas que se incubaron por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C (Fig. 149). Se confirmó la concentración de bacterias del inóculo de la CPB-11 de *L. monocytogenes* del matraz 3, en las tres cajas Petri incubadas por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C. Cada caja presentó en promedio 56.67 ± 7.02 UFC, valor que entro en el rango de 50 a 100 UFC lo que aseguró una población de 1 a 2×10^8 bact/mL de *L. monocytogenes*.

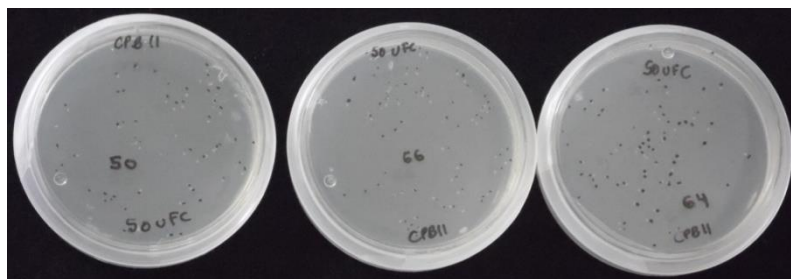


Figura 149. Concentración de bacterias en 50 µL de inóculo de la CPB-11 (*Listeria monocytogenes*).

8.14.8.2 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)

El suplemento alimenticio J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves con rendimiento 322.83 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-11 en la dilución D4, con una concentración de extracto de 20.2 mg/mL, inhibiendo el crecimiento y multiplicación de las bacterias confirmando a esa dilución el efecto bactericida (Fig. 150).

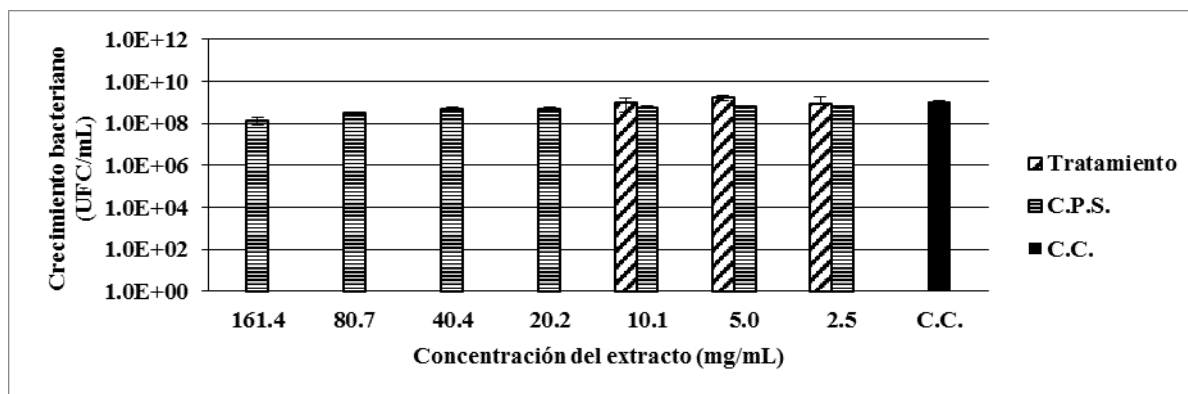


Figura 150. Efecto del suplemento alimenticio con clave J (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-11, *Listeria monocytogenes* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio J, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-11 en la dilución D3 con una concentración de extracto de 40.4 mg/mL, conduciendo a la muerte celular de la población bacteriana no presentando crecimiento en las cajas de Petri (Fig. 151).

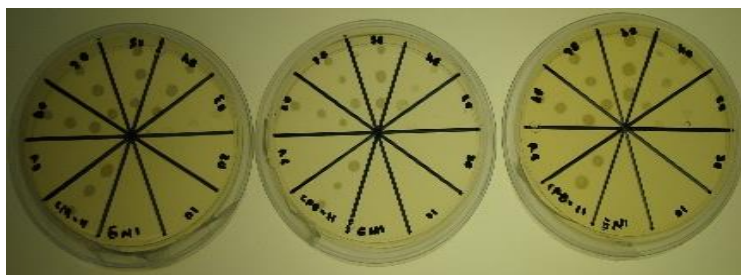


Figura 151. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave J (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-11 *Listeria monocytogenes* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-11. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Listeria monocytogenes*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.8.3 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)

El suplemento alimenticio K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol con rendimiento 285.5 mg/mL, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-11 en la dilución D3, con una concentración del extracto de 35.69 mg/mL, en el tiempo mínimo de inhibición bacteriana de 24 horas de incubación con el extracto (Fig. 152).

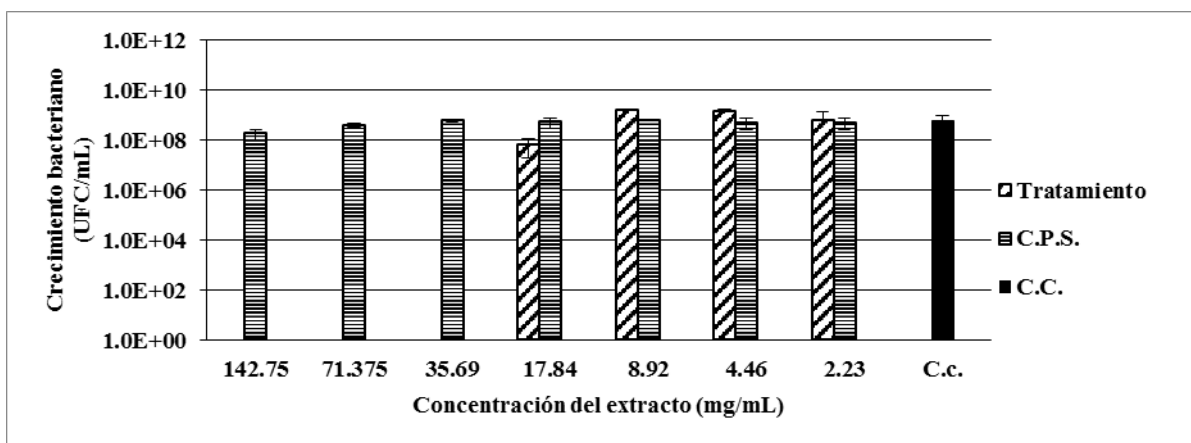


Figura 152. Efecto del suplemento alimenticio con clave K (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-11, *Listeria monocytogenes* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio K, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-11 en la dilución D3 a una concentración de extracto de 35.69 mg/mL, inhibiendo completamente el crecimiento de los microorganismos tal como se muestra en la figura 153.



Figura 153. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-11, *Listeria monocytogenes* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-11. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Listeria monocytogenes*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.8.4 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de *G. lucidum* (Clave L)

El suplemento alimenticio L, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado de *G. lucidum* con rendimiento 269.66 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-11 en la dilución D4, a una concentración del extracto de 16.85 mg/mL, en las demás diluciones las bacterias fueron resistentes a los agentes antibacterianos o por la baja concentración de los extractos (Fig. 154).

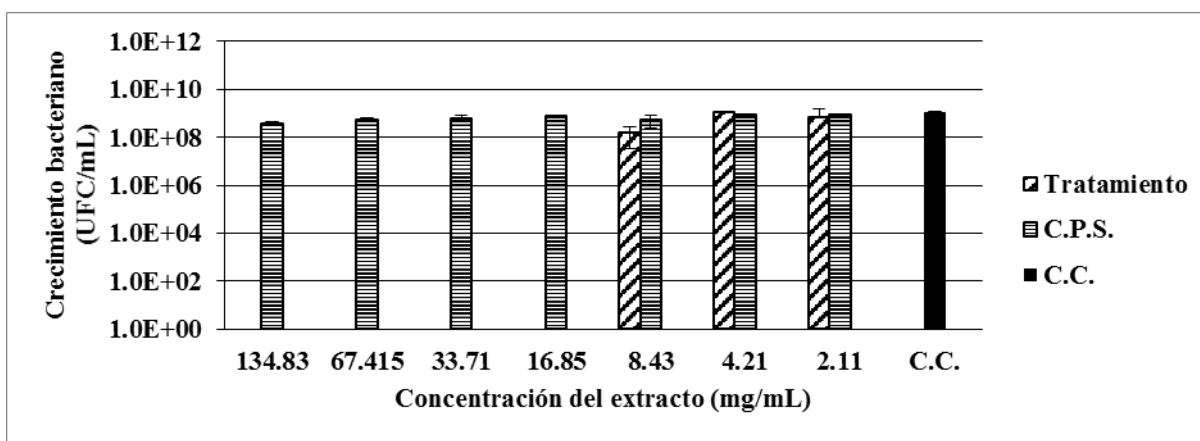


Figura 154. Efecto del suplemento alimenticio con clave L (*G. lucidum* 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-11 *Listeria monocytogenes* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio L, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-11 en la dilución D4 con una concentración de extracto de 16.85 mg/mL, teniendo un efecto que fue irreversible con las células susceptibles ya que provocó la muerte total de las bacterias en las primeras tres diluciones (Fig. 155).



Figura 155. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave L (*G. lucidum* 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-11, *Listeria monocytogenes* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-11. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Listeria monocytogenes*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.8.5 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio M, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves a un rendimiento de extracto 304.83 mg/mL y una concentración de 152.42 mg/mL (D1), no presentó inhibición bacteriana en el tiempo mínimo de 24 horas de incubación (Fig. 156).

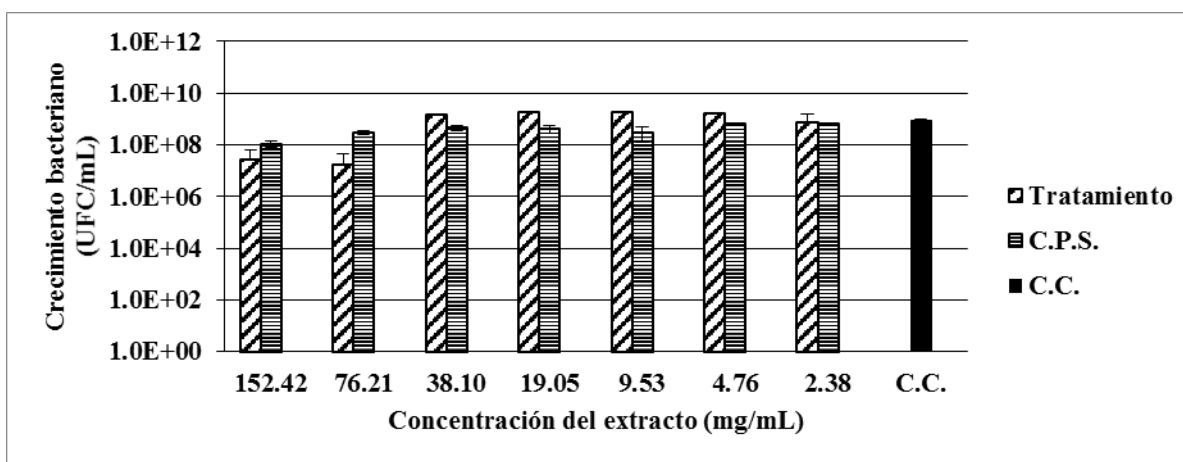


Figura 156. Efecto del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-11, *Listeria monocytogenes*, a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio M, a una concentración de 152.42 mg/mL, y tampoco tuvo un efecto en las bacterias ya que no provocó la muerte en ninguna concentración (Fig. 157).

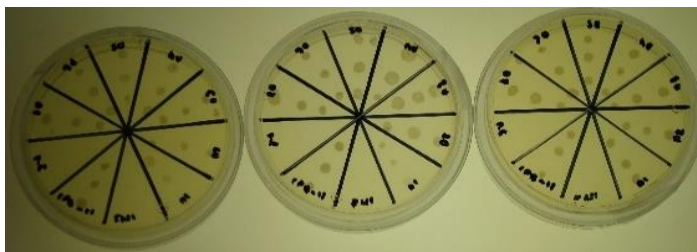


Figura 157. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-11, *Listeria monocytogenes* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-11. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Listeria monocytogenes*. B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.8.6 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)

El suplemento alimenticio N, compuesto con 4 g con extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol con rendimiento y un rendimiento de extracto de 283 mg/mL, tuvo efecto mínimo bactericida contra CPB-11 en la dilución D1 a una concentración de 141.50 mg/mL, fue la única concentración en donde las bacterias cesaron su crecimiento después de 24 horas de incubación con las diferentes concentraciones del extracto (Fig. 158).

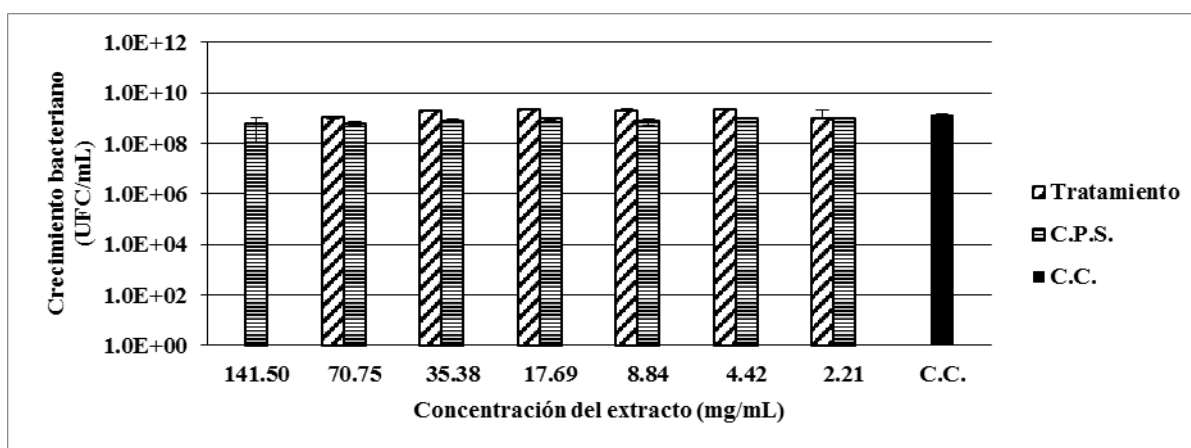


Figura 158. Efecto del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-11, *Listeria monocytogenes* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio N, tuvo efecto mínimo bactericida contra CPB-11 en la dilución D1 a una concentración de 141.50 mg/mL, las bacterias fueron susceptibles sólo a esa concentración y ocasionó la muerte total de la población, comprobándose el efecto bactericida en las cajas de Petri de la figura 159.



Figura 159. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-11, *Listeria monocytogenes* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-11. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Listeria monocytogenes*. B.P.T. = Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.9 Bioensayo con la cepa CPB-13 de *Pseudomonas aeruginosa*

8.14.9.1 Confirmación del inóculo

Para determinar la concentración de bacterias del inóculo o semilla de la CPB-13 de *Pseudomonas aeruginosa* se tomaron 50 μ L y se vertieron por triplicado en cajas Petri con agar Mueller Hinton, mismas que se incubaron por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C (Fig. 160). Se confirmó la concentración de bacterias del inóculo de la CPB-13 de *P. aeruginosa* del matraz 3, en las tres cajas Petri incubadas por 24 horas a una temperatura de 28 ± 2 °C. Cada caja presentó en promedio 54.33 ± 9.02 UFC, valor que entro en el rango de 50 a 100 UFC lo que aseguró una población de 1 a 2×10^8 bact/mL de *P. aeruginosa*.

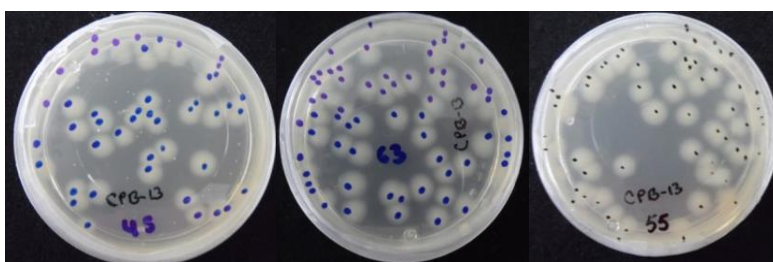


Figura 160. Concentración de bacterias en 50 μ L de inóculo de la CPB-13 (*Pseudomonas aeruginosa*).

8.14.9.2 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nieves (Clave J)

El suplemento alimenticio J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves y rendimiento de 322.41 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-13 en la dilución D2 a una concentración mínima bacteriostática de 80.60 mg/mL, inhibiendo el crecimiento y multiplicación de las bacterias (Fig. 161).

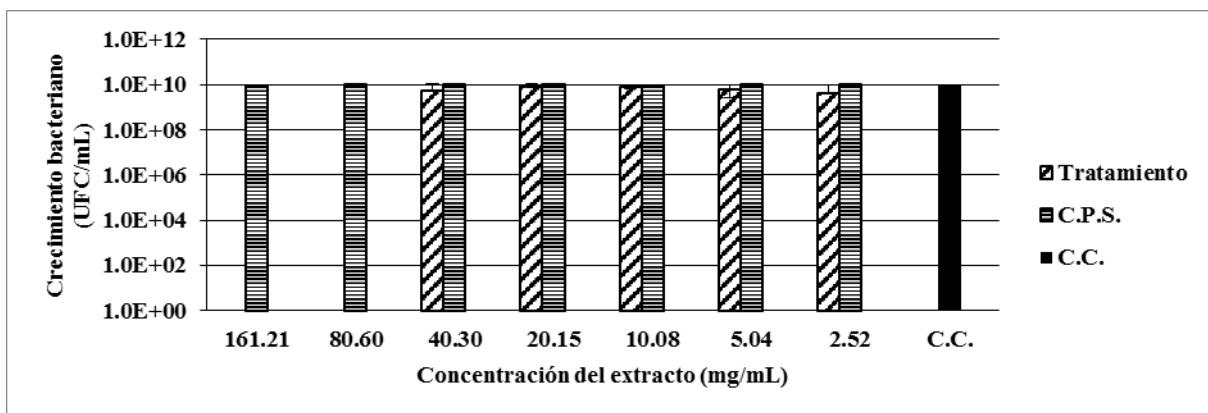


Figura 161. Efecto del suplemento alimenticio con clave J (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-13, *Pseudomonas aeruginosa* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio J, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-13 en la dilución D2 a una concentración bactericida del extracto de 80.60 mg/mL, conduciendo a la muerte celular de la población bacteriana (Fig. 162).

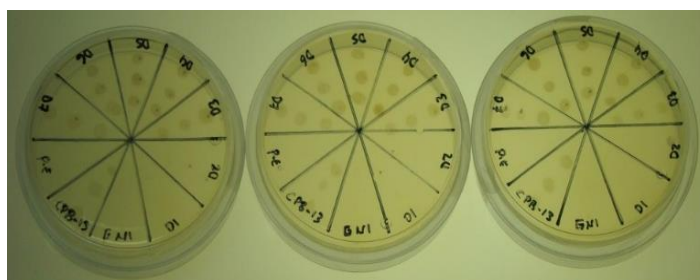


Figura 162. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave J= (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-13, *Pseudomonas aeruginosa* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-13. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.9.3 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 2 g de extracto de *G. lucidum* y 2 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave K)

El suplemento alimenticio K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol con rendimiento 285.5 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-13 en la dilución D2, siendo la concentración bacteriostática del extracto de 71.38 mg/mL, a un tiempo mínimo de inhibición bacteriana de 24 horas (Fig. 163).

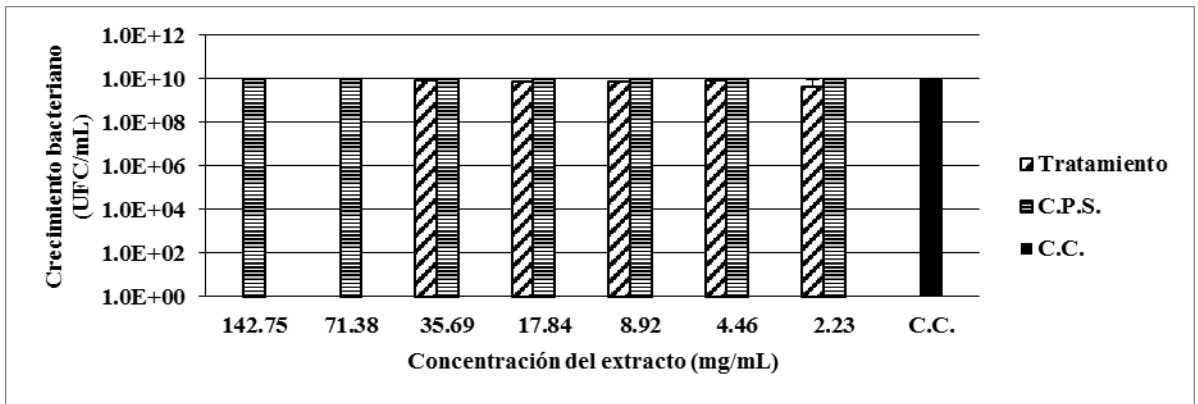


Figura 163. Efecto del suplemento alimenticio con clave K (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-13, *Pseudomonas aeruginosa* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio K, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-13 en la dilución D2 con una concentración mínima bactericida de 71.38 mg/mL de extracto, inhibiendo completamente el crecimiento de los microorganismos en las primeras dos concentraciones (Fig. 164).



Figura 164. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave K= (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g) sobre la bacteria en estudio CPB-13, *Pseudomonas aeruginosa* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-13. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.9.4 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de *G. lucidum* (Clave L)

El suplemento alimenticio L, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado de *G. lucidum*, con rendimiento 269.66 mg/mL, tuvo un efecto mínimo inhibitorio contra CPB-13 en la dilución D3 y una concentración mínima bacteriostática de 33.71 mg/mL de extracto, ya que en las demás diluciones las bacterias fueron resistentes a los agentes antibacterianos debido a la dilución de los mismos (Fig. 165).

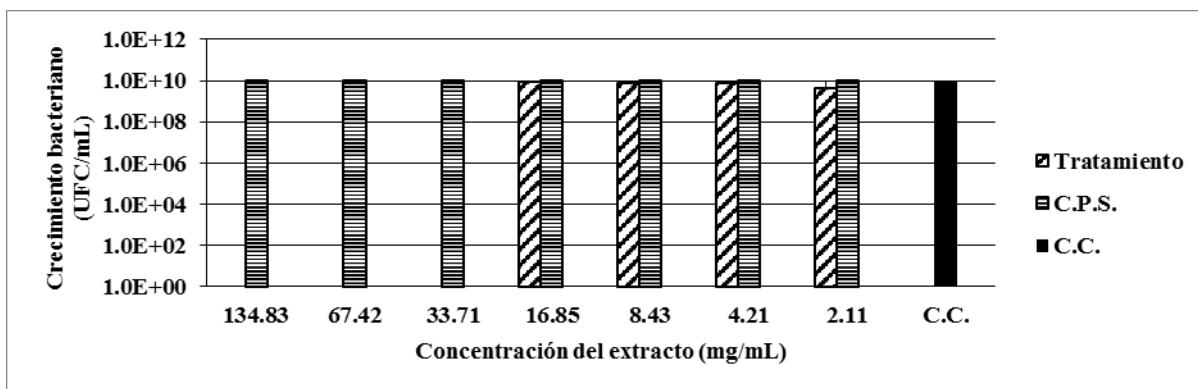


Figura 165. Efecto del suplemento alimenticio con clave L (*G. lucidum* 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-13 *Pseudomonas aeruginosa* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio L, tuvo un efecto mínimo bactericida contra CPB-13 en la dilución D3 y una concentración mínima bactericida de 33.71 mg/mL de extracto, teniendo un efecto irreversible en las bacterias susceptibles ya que provocó la muerte total de las mismas (Fig. 166).



Figura 166. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave L (*G. lucidum* 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-13, *Pseudomonas aeruginosa* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-13. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.9.5 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nieves (Clave M)

El suplemento alimenticio M, compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves y 304.83 mg/mL de rendimiento de extracto, tuvo efecto mínimo inhibitorio contra CPB-13 en la dilución D1 a la concentración de 152.42 mg/mL (Fig. 167).

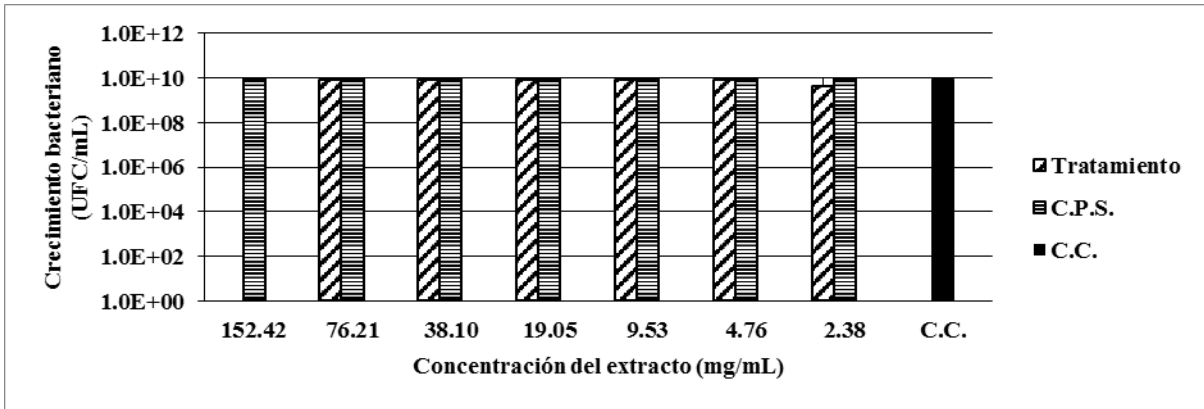


Figura 167. Efecto del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-13 *Pseudomonas aeruginosa* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

La bacteria no fue susceptible al suplemento alimenticio M, a una concentración de 152.42 mg/mL, ya que en todas las diluciones las bacterias fueron resistentes a los agentes antibacterianos confirmando ese efecto en las cajas de Petri (Fig. 168).

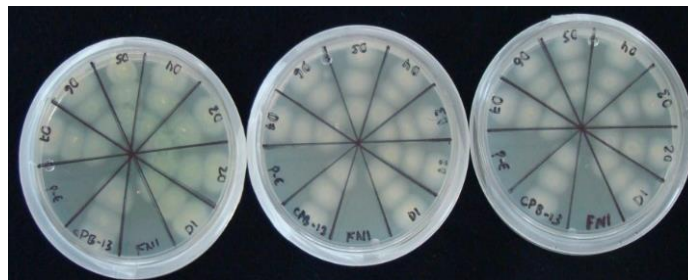


Figura 168. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave M (Nieves 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-13, *Pseudomonas aeruginosa* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-11. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.14.9.6 Efecto del suplemento alimenticio elaborado con 4 g de extracto de amaranto nutrisol (Clave N)

El suplemento alimenticio N, compuesto con 4 g con extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol y una concentración de 283 mg/mL de rendimiento del extracto, tuvo efecto mínimo inhibitorio contra CPB-13 en la dilución D1 a una concentración de 141.50 mg/mL, inhibiendo el crecimiento y multiplicación de las bacterias (Fig. 169).

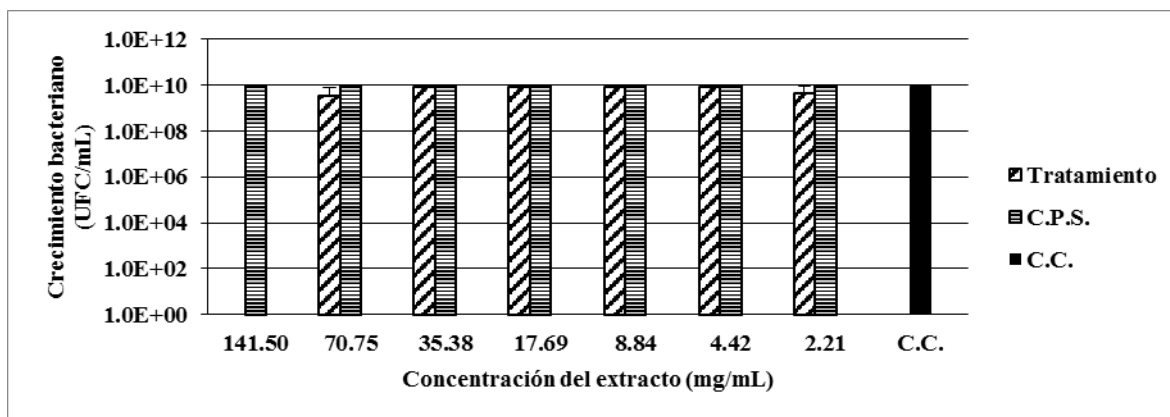


Figura 169. Efecto del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre el crecimiento bacteriano CPB-13, *Pseudomonas aeruginosa* a las 24 horas de incubación. UFC= Unidades formadoras de colonias. C.P.S. = Control positivo del solvente. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria.

El suplemento alimenticio N, tuvo efecto mínimo bactericida contra CPB-13 en la dilución D1 a una concentración de 141.50 mg/mL, sólo a esa concentración las UFC fueron susceptibles y ocasionando la muerte total de la población. En la figura 170 se confirma la inhibición bacteria en D1.



Figura 170. Efecto bactericida del suplemento alimenticio con clave N (Nutrisol 4 g) sobre la bacteria en estudio CPB-13, *Pseudomonas aeruginosa* a las 24 horas de incubación. D1 a la D7= Microdiluciones del tratamiento CPB-13. C.C.= Control de crecimiento de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento. P.E (C.E.)= Control de esterilidad.

8.15 Comparación del efecto bacteriostático de los suplementos alimenticios (p/p) contra cada cepa bacteriana

En el cuadro 15, se muestra las diluciones de las mezclas de los extractos de las semillas de amaranto con las de la *G. lucidum* que se realizaron y fueron probadas contra 9 cepas bacterianas para determinar el efecto bacteriostático.

Cuadro 15. Cantidad de extracto (mg/mL) en cada microdilución de los suplementos alimenticios liofilizados (p/p)

| Nivel dilución | Concentración (mg/g) de los suplementos alimenticios | | | | |
|-----------------------|--|-------|--------|---------|-------|
| | J | K | L | M | N |
| Concentración inicial | 322.83 | 285.5 | 269.66 | 304.83 | 283 |
| D1 | 161.42 | 142.8 | 134.83 | 152.415 | 141.5 |
| D2 | 80.71 | 71.4 | 67.42 | 76.21 | 70.75 |
| D3 | 40.35 | 35.7 | 33.71 | 38.10 | 35.38 |
| D4 | 20.18 | 17.8 | 16.85 | 19.05 | 17.69 |
| D5 | 10.09 | 8.9 | 8.43 | 9.53 | 8.84 |
| D6 | 5.04 | 4.5 | 4.21 | 4.76 | 4.42 |
| D7 | 2.52 | 2.2 | 2.11 | 2.38 | 2.21 |

D1-D7 = Dilución del extracto, J= (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g), K= (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g), L= (*G. lucidum* 4 g), M= (Nieves 4 g), N= (Nutrisol 4 g).

Y en el cuadro 16, se muestran las concentraciones en cada dilución de las mezclas en miligramos por g de muestra liofilizado.

Cuadro 16. Cantidad de extracto (mg/g de liofilizado) en cada microdilución de los suplementos alimenticios liofilizados (p/p).

| Nivel dilución | Concentración mg/g de los suplementos alimenticios | | | | |
|-----------------------|--|--------|--------|--------|--------|
| | J | K | L | M | N |
| Concentración inicial | 807.08 | 713.75 | 674.15 | 762.08 | 709.15 |
| D1 | 403.54 | 356.88 | 337.08 | 381.04 | 354.58 |
| D2 | 201.77 | 178.44 | 168.54 | 190.52 | 177.29 |
| D3 | 100.88 | 89.22 | 84.27 | 95.26 | 88.64 |
| D4 | 50.44 | 44.61 | 42.13 | 47.63 | 44.32 |
| D5 | 25.22 | 22.30 | 21.07 | 23.81 | 22.16 |
| D6 | 12.61 | 11.15 | 10.53 | 11.91 | 11.08 |
| D7 | 6.31 | 5.58 | 5.27 | 5.95 | 5.54 |

D1-D7 = Dilución del extracto, J= (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g), K= (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g), L= (*G. lucidum* 4 g), M= (Nieves 4 g), N= (Nutrisol 4 g).

El suplemento alimenticio J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de nieves de extracto hidroalcohólico liofilizado presento efectos a un tiempo mínimo de inhibición bacteriana de 24 horas hasta en la dilución D4 con una concentración de 20.18 mg/mL tuvo mayor efecto bacteriostático contra las cepas CPB-11 *Listeria monocytogenes* y CPB-4, *Streptococcus agalactiae* y presentaron crecimiento hasta la D5 y enseguida las que presentaron efecto hasta la D3 con una concentración de 40.35 mg/mL fue con las cepas CPB-6 *Pseudomonas aeruginosa*, CPB-7 *Stenotrophomonas maltophilia*, CPB-9 *Bacillus subtilis*, CPB-10

Staphylococcus aureus de manera que las bacterias volvieron a crecer en la D4 y la CPB-13 *Pseudomonas aeruginosa* hubo efecto hasta la D2 con una concentración de 80.71 mg/mL creciendo nuevamente en la D3 y las cepas que tuvieron menor efecto fueron con las CPB-1 *Salmonella typhi* y la CPB-8 *Escherichia coli* solamente en la D1 con una concentración de 161.42 mg/mL, creciendo las bacterias después en la D2 (Fig. 171).

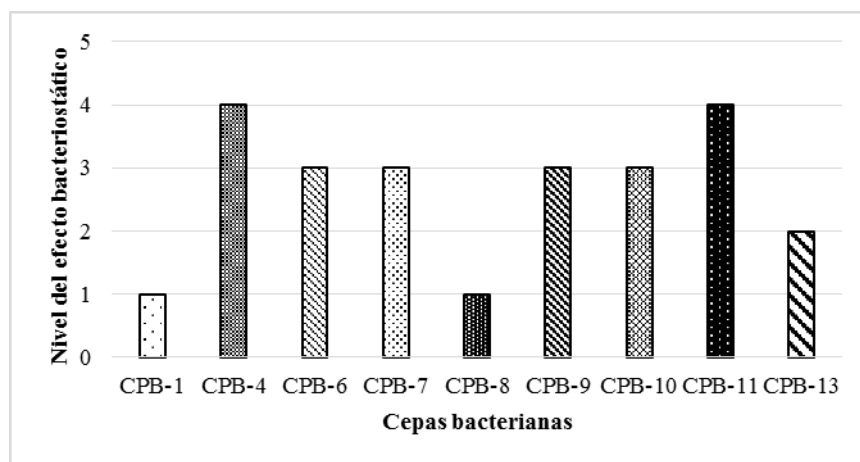


Figura 171. Nivel del efecto bacteriostático de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave J= (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g) sobre las bacterias estudiadas.

El suplemento alimenticio K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de nutrisol de extracto hidroalcohólico liofilizado tuvo efectos ya que los organismos de una población bacteriana fueron susceptibles y cesaron su división hasta la dilución D4 con una concentración de 17.8 mg/mL, teniendo mayor efecto bacteriostático contra la cepa CPB-4, *Streptococcus agalactiae* ya que las bacterias crecieron nuevamente en la D5, enseguida la que presentó efecto hasta la D3 con una concentración 35.7 mg/mL, fueron con las cepas CPB-6 *Pseudomonas aeruginosa*, CPB-7 *Stenotrophomonas maltophilia*, CPB-9 *Bacillus subtilis*, CPB-10 *Staphylococcus aureus* y CPB-11 *Listeria monocytogenes* creciendo las bacterias en la D4, el siguiente nivel fue hasta la D2 con una concentración de 71.4 mg/mL, ya que solo tuvo efecto contra la CPB-13 *Pseudomonas aeruginosa* creciendo otra vez en la D3 y con las cepas que tuvo menor efecto fue con las CPB-1 *Salmonella typhi* y la CPB-8 *Escherichia coli* en la D1 con una concentración de 142.8 mg/mL, creciendo las cepas de bacterias nuevamente en la D2 (Fig. 172).

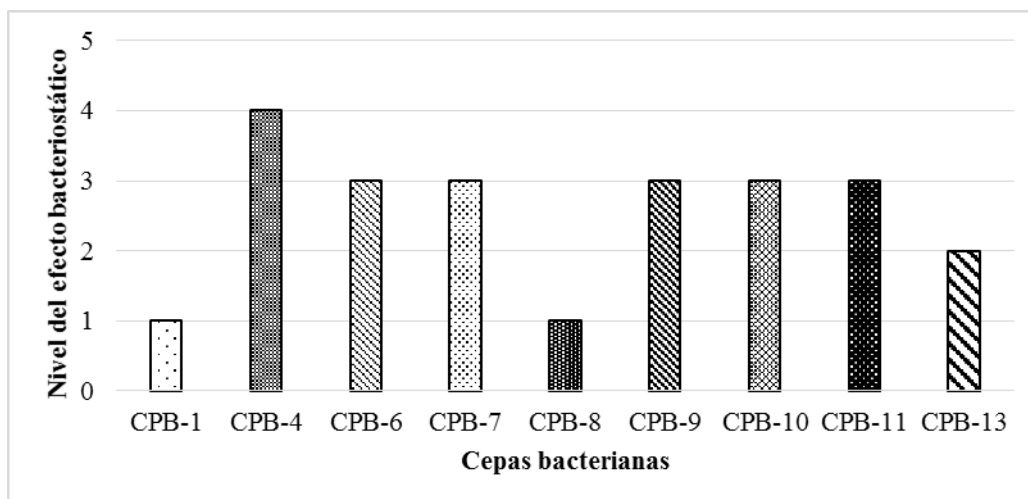


Figura 172. Nivel del efecto bacteriostático de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave K= (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g) sobre las bacterias estudiadas.

El suplemento alimenticio L, compuesto con 4 g de *G. lucidum*, de extracto hidroalcohólico liofilizado tuvo efectos inhibiendo el crecimiento y multiplicación de las bacterias hasta la dilución D5 con una concentración de 8.43 mg/mL, teniendo mayor efecto bacteriostático contra la cepa CPB-4, *Streptococcus agalactiae* obteniendo nuevamente crecimiento hasta la D6, enseguida en la que presentó efecto fue la dilución D4 con una concentración de 16.86 mg/mL, presentó efecto contra la CPB-7 *Stenotrophomonas maltophilia*, CPB-9 *Bacillus subtilis*, CPB-10 *Staphylococcus aureus* y CPB-11 *Listeria monocytogenes* ya que las bacterias crecieron otra vez hasta la D5, y las que hubo efecto hasta en la D3 con una concentración de 33.71 mg/mL, tuvo efecto contra la CPB-6 *Pseudomonas aeruginosa* y CPB-13 *Pseudomonas aeruginosa* llegando a crecer en la D4 y con las cepas que tuvo menor efecto fue con las CPB-1 *Salmonella typhi* y la CPB-8 *Escherichia coli* en la D2 con una concentración de 67.42 mg/mL y volviendo a crecer nuevamente en la D3 (Fig. 173).

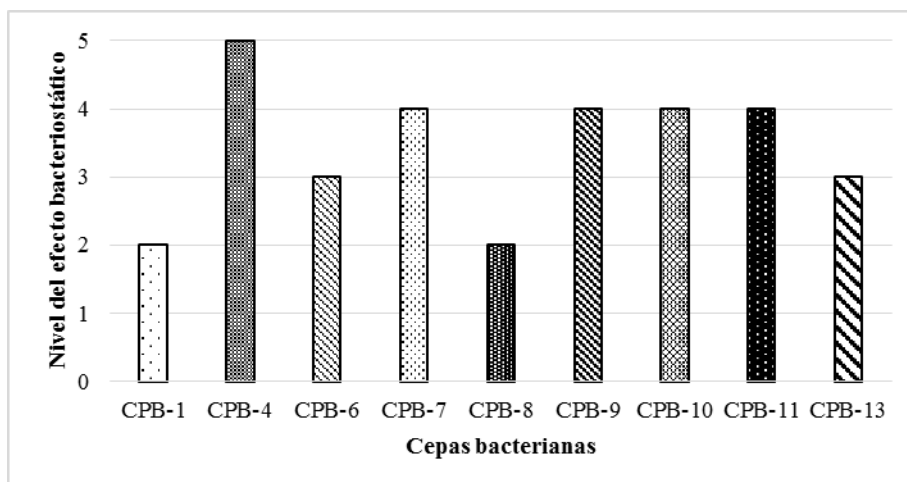


Figura 173. Nivel del efecto bacteriostático de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave L= (*G. lucidum* 4 g) sobre las bacterias estudiadas.

El suplemento alimenticio M, compuesto con 4 g de nieves de extracto hidroalcohólico liofilizado solo presentó nivel de efecto bacteriostático con la CPB-4 *Streptococcus agalactiae* hasta en la dilución D3 con una concentración de 38.10 mg/mL, y los microorganismos crecieron otra vez en la D4, enseguida tuvo efecto en su D1 con las cepas CPB-7 *Stenotrophomonas maltophilia*, CPB-10 *Staphylococcus aureus* y CPB-13 *Pseudomonas aeruginosa* obteniendo un crecimiento otra vez en la D2, ya que las demás cepas bacterianas no presentaron nivel de inhibición bacteriana a un tiempo mínimo de 24 horas en ninguna (Fig. 174).

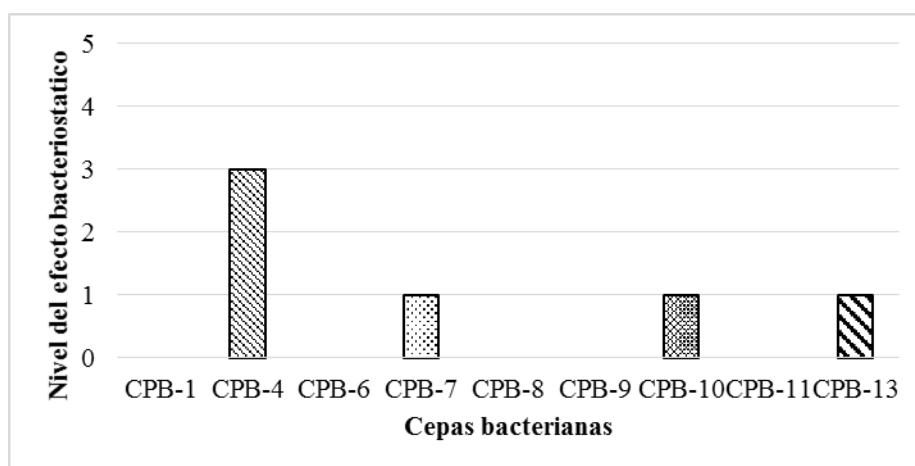


Figura 174. Nivel del efecto bacteriostático de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave M= (Nieves 4 g) sobre las bacterias estudiadas.

El suplemento alimenticio N, compuesto con 4 g de nutrisol con extracto hidroalcohólico liofilizado presentó nivel de efecto bacteriostático inhibiendo el crecimiento y multiplicación

de las bacterias en la dilución D3 con una concentración de 35.38 mg/mL, contra la cepa CPB-4, *Streptococcus agalactiae* y CPB-9 *Bacillus subtilis* obteniendo crecimiento nuevamente en la D4 y las cepas que tuvo menor nivel de efecto bacteriostático fueron con las CPB-6 *Pseudomonas aeruginosa*, CPB-7 *Stenotrophomonas maltophilia*, CPB-10 *Staphylococcus aureus*, CPB-11 *Listeria monocytogenes* y la CPB-13 *Pseudomonas aeruginosa* en la D1 con una concentración de 141.5 mg/mL, llegando a crecer otra vez en la D2 y en caso de la CPB-1 *Salmonella typhi* y CPB-8 *Escherichia coli* no presentó ningún efecto en ningún nivel de dilución (Fig. 175).

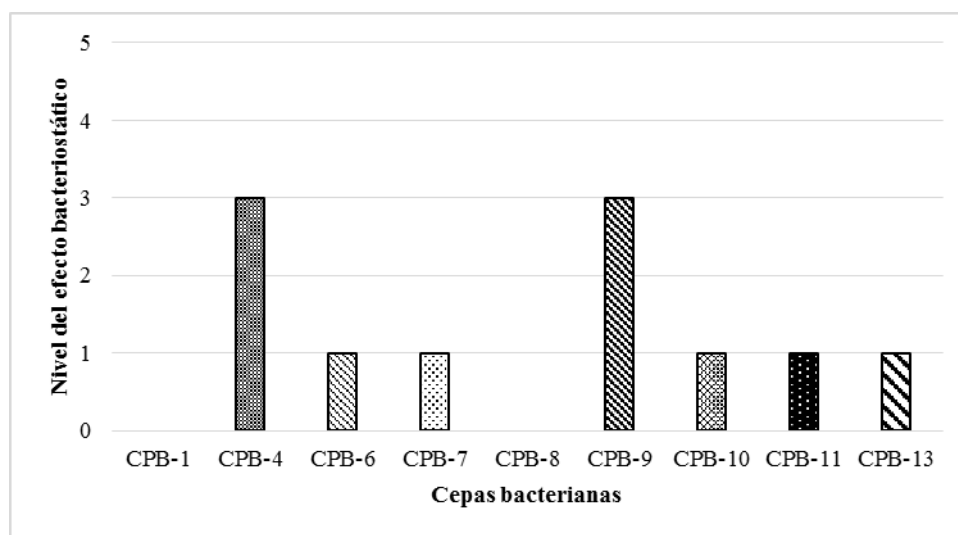


Figura 175. Nivel del efecto bacteriostático de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave N= (Nutrisol 4 g) sobre las bacterias estudiadas.

La CPB-4 *Streptococcus agalactiae* fue la bacteria más susceptible a un tiempo mínimo de inhibición bacteriana de 24 horas con los suplementos alimenticios presentando efecto bacteriostático. Mientras que las cepas que presentaron mayor resistencia y no presentaron inhibición bacteriana a un tiempo mínimo de 24 horas a los suplementos alimenticios fueron las cepas CPB-1 *Salmonella typhi* y CPB-8 *Escherichia coli*. El suplemento alimenticio K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de nutrisol de extracto hidroalcohólico liofilizado con el suplemento alimenticio J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de nieves de extracto hidroalcohólico liofilizado, se comportan con el mismo efecto bacteriostático, inhibiendo el crecimiento y multiplicación de las bacterias hasta en su nivel de dilución D3 con todas las cepas, excepto con la CPB-11 *Listeria monocytogenes* ya que el suplemento alimenticio J, tuvo efecto hasta D4, mientras que el suplemento K solo tuvo hasta en la D3 (Fig. 176).

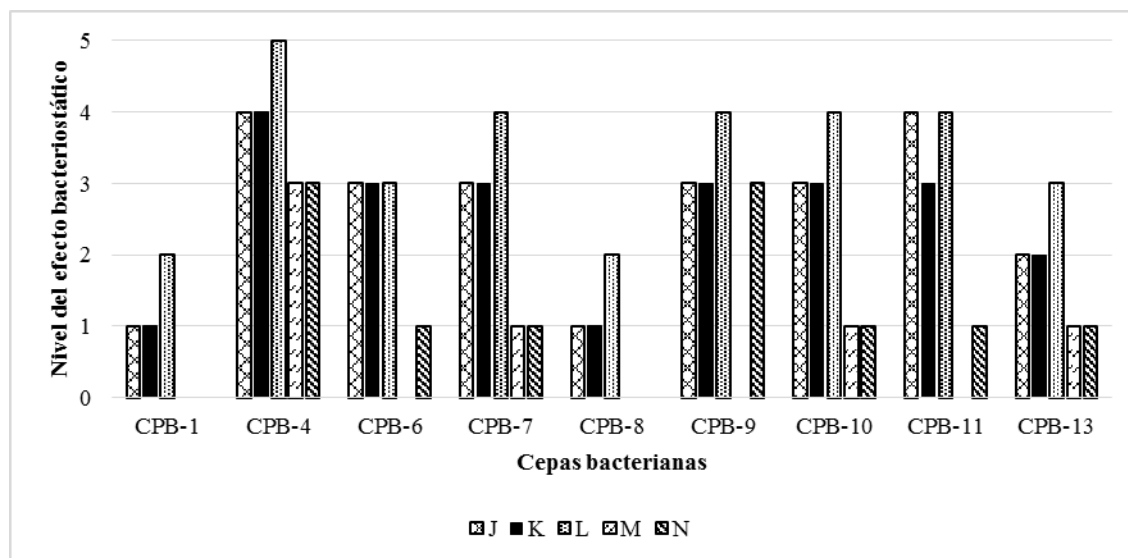


Figura 176. Niveles de los efectos bacteriostáticos de cada microdilución de los suplementos alimenticios elaborados con extractos liofilizados del hongo *Ganoderma lucidum* y semillas de amaranto nieves y nutrisol con las diferentes cepas. J= *G. lucidum* 2 g: amaranto nieves 2 g; K= *G. lucidum* 2 g: amaranto nutrisol 2 g; L= *G. lucidum* 4 g: amaranto nutrisol 0 g; M= *G. lucidum* 0 g: amaranto nieves 4 g; N= *G. lucidum* 0 g: amaranto nutrisol 4 g.

8.16 Comparación del efecto bactericida de los suplementos alimenticios (p/p) contra cada cepa bacteriana

En el cuadro 17, se muestra las diluciones de las mezclas de los suplementos alimenticios de las semillas de amaranto con las de *G. lucidum* que se realizaron y fueron probadas contra 9 cepas bacterianas para determinar el efecto bactericida.

Cuadro 17. Cantidad de extracto (mg/mL) en cada microdilución de los suplementos alimenticios liofilizados (p/p).

| Nivel dilución | Concentración (mg/mL) de los suplementos alimenticios | | | | |
|-----------------------|---|-------|--------|---------|-------|
| | J | K | L | M | N |
| Concentración inicial | 322.83 | 285.5 | 269.66 | 304.83 | 283 |
| D1 | 161.42 | 142.8 | 134.83 | 152.415 | 141.5 |
| D2 | 80.71 | 71.4 | 67.42 | 76.21 | 70.75 |
| D3 | 40.35 | 35.7 | 33.71 | 38.10 | 35.38 |
| D4 | 20.18 | 17.8 | 16.85 | 19.05 | 17.69 |
| D5 | 10.09 | 8.9 | 8.43 | 9.53 | 8.84 |
| D6 | 5.04 | 4.5 | 4.21 | 4.76 | 4.42 |
| D7 | 2.52 | 2.2 | 2.11 | 2.38 | 2.21 |

D1-D7 = Dilución del extracto, J= (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g), K= (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g), L= (*G. lucidum* 4 g), M= (Nieves 4 g), N= (Nutrisol 4 g).

El cuadro 18, se muestra las concentraciones en cada dilución de los suplementos alimenticios en miligramos por g de muestra liofilizado.

Cuadro 18. Cantidad de extracto (mg/g de liofilizado) en cada microdilución de los suplementos alimenticios liofilizados (p/p).

| Nivel dilución | Concentración mg/g de los suplementos alimenticios | | | | |
|-----------------------|--|--------|--------|--------|--------|
| | J | K | L | M | N |
| Concentración inicial | 807.08 | 713.75 | 674.15 | 762.08 | 709.15 |
| D1 | 403.54 | 356.88 | 337.08 | 381.04 | 354.58 |
| D2 | 201.77 | 178.44 | 168.54 | 190.52 | 177.29 |
| D3 | 100.88 | 89.22 | 84.27 | 95.26 | 88.64 |
| D4 | 50.44 | 44.61 | 42.13 | 47.63 | 44.32 |
| D5 | 25.22 | 22.30 | 21.07 | 23.81 | 22.16 |
| D6 | 12.61 | 11.15 | 10.53 | 11.91 | 11.08 |
| D7 | 6.31 | 5.58 | 5.27 | 5.95 | 5.54 |

D1-D7 = Dilución del extracto, J= (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g), K= (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g), L= (*G. lucidum* 4 g), M= (Nieves 4 g), N= (Nutrisol 4 g).

El suplemento alimenticio J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de nieves de extracto hidroalcohólico liofilizado, hubo efecto bactericida en su nivel de dilución D4 con una concentración de 20.18 mg/mL obteniendo una mayor inhibición completa del crecimiento de los microorganismos de la cepa CPB-4 *Streptococcus agalactiae* teniendo crecimiento nuevamente en la D5, en seguida la que presentó efecto fue en el nivel de dilución D3 con una concentración de 40.35 mg/mL, tuvo efecto contra las cepas CPB-6 *Pseudomonas aeruginosa*, CPB-9 *Bacillus subtilis* y CPB-11 *Listeria monocytogenes* volviendo a crecer nuevamente en la D4, la siguiente fueron en el nivel de dilución D2 con una concentración de 80.71 mg/mL, contra las cepas CPB-7 *Stenotrophomonas maltophilia*, CPB-10 *Staphylococcus aureus* y CPB-13 *Pseudomonas aeruginosa* creciendo de nueva cuenta en la D3, con la cepa que tuvo menor efecto fue las CPB-8 en el nivel de dilución D1 con una concentración de 161.42 mg/mL y con la que no tuvo efecto fue la CPB-1 *Salmonella typhi* ya que creció desde la D1 (Fig. 177).

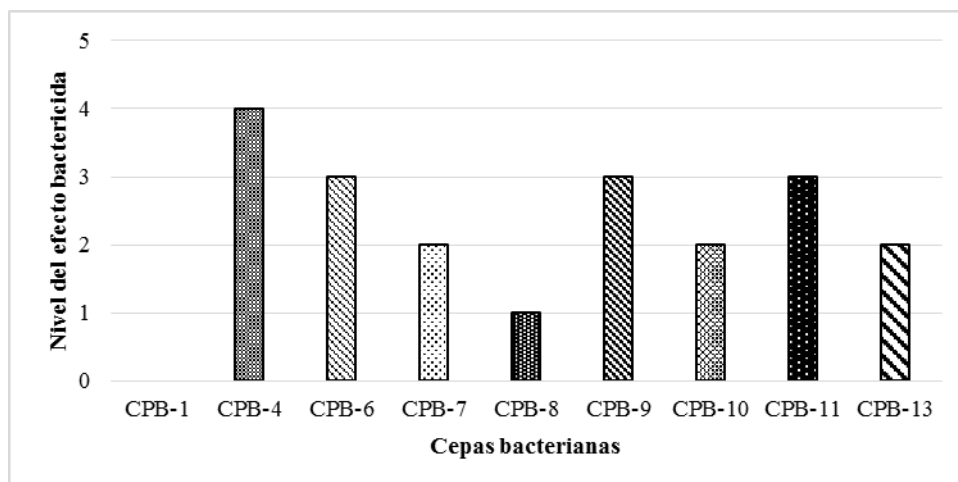


Figura 177. Nivel del efecto bactericida de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave J (*G. lucidum* 2 g; nieves 2 g) sobre las bacterias estudiadas.

El suplemento alimenticio K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de nutrisol de extracto hidroalcohólico liofilizado presentó un efecto irreversible con las células susceptibles ya que provocó la muerte total de las bacterias hasta en su nivel de dilución D3 con una concentración de 35.7 mg/mL, tuvo mayor efecto bactericida contra las cepa CPB-4 *Streptococcus agalactiae*, CPB-6 *Pseudomonas aeruginosa*, CPB-9 *Bacillus subtilis* y la CPB-11 *Listeria monocytogenes* ya que crecieron nuevamente en la D4, seguida por el nivel de dilución en la D2 con una concentración de 71.4 mg/mL, que presentó efecto bactericidas contra las cepas CPB-7 *Stenotrophomonas maltophilia*, CPB-10 *Staphylococcus aureus* y CPB-13 *Pseudomonas aeruginosa* y tuvieron su crecimiento otra vez en la D3, las que presentaron efecto en su nivel de dilución en la D1 con una concentración de 142.8 mg/mL, fue con CPB-8 *Escherichia coli* en la D1 y creció otra vez en la D2, mientras que con la CPB-1 *Salmonella typhi* no presentó efecto en sus niveles de dilución (Fig. 178).

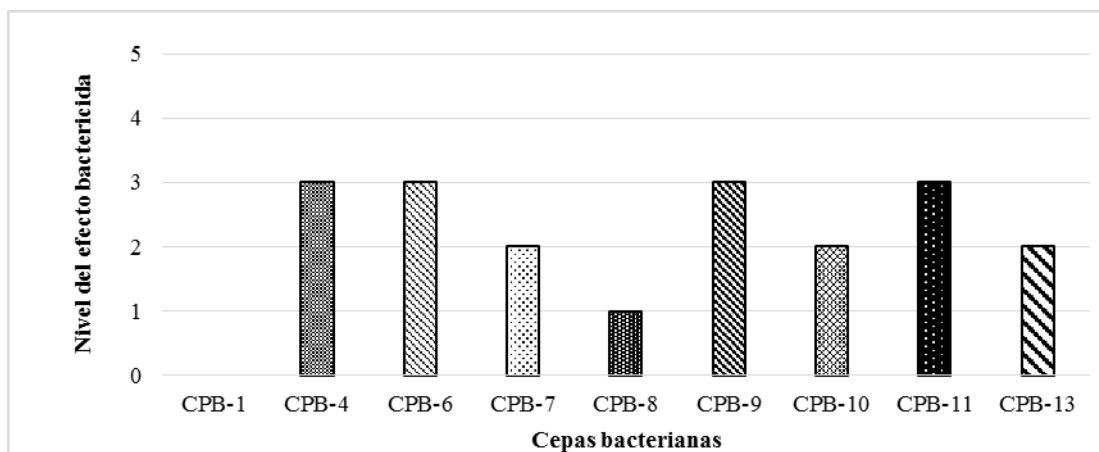


Figura 178. Nivel del efecto bactericida de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave K (*G. lucidum* 2 g: nutrisol 2 g) sobre las bacterias estudiadas.

El suplemento alimenticio L, compuesto con 4 g de *G. lucidum*, de extracto hidroalcohólico liofilizado en su nivel de dilución D4 con una concentración de 16.85 mg/mL, inhibió completamente el crecimiento de los microorganismos contra las cepas CPB-7 *Stenotrophomonas maltophilia* y CPB-9 *Bacillus subtilis* de manera que volvieron a crecer en la D5, seguido el efecto en el nivel de dilución D3 con una concentración de 33.71 mg/mL presentó efecto contra las cepas CPB-4 *Streptococcus agalactiae*, CPB-6 *Pseudomonas aeruginosa*, CPB-10 *Staphylococcus aureus*, CPB-11 *Listeria monocytogenes* y CPB-13 *Pseudomonas aeruginosa* ya que los microorganismos crecieron en su nivel de dilución D4 y con la cepas que tuvo menores efectos fueron con la CPB-1 *Salmonella typhi* y CPB-8 *Escherichia coli* en su nivel de dilución en la D1 con una concentración de 134.83 mg/mL ya que creció en D2 (Fig. 179).

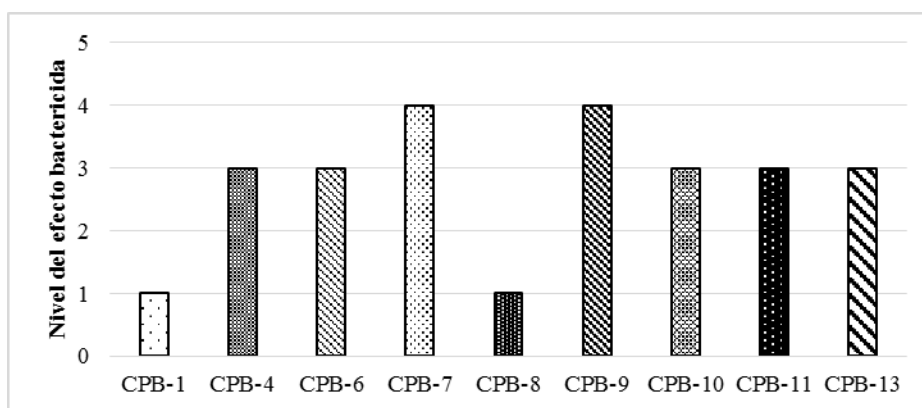


Figura 179. Nivel del efecto bactericida de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave L (*G. lucidum* 4 g) sobre las bacterias estudiadas.

Las cepas de bacterias no fueron susceptibles al suplemento alimenticio M, compuesto con 4 g de nieves de extracto hidroalcohólico liofilizado, ya que no hubo nivel bactericida porque crecieron los organismos en todas las concentraciones y no inhibió completamente el crecimiento de los organismos.

El suplemento alimenticio N, compuesto con 4 g de nutrisol con extracto hidroalcohólico liofilizado en su nivel de dilución D2 con una concentración de 70.75 mg/mL a lo cual las colonias de las bacterias que fueron susceptibles y ocasionó la muerte total de la población fue contra la cepa CPB-4, *Streptococcus agalactiae* y creció en su D3 y con las cepas que tuvo menor efecto fue con las CPB-6 *Pseudomonas aeruginosa*, CPB-7 *Stenotrophomonas maltophilia*, CPB-9, *Bacillus subtilis* CPB-11 *Listeria monocytogenes* y la CPB-13 *Pseudomonas aeruginosa* en su nivel de dilución D1 con una concentración de 141.5 mg/mL y crecieron en su D2, mientras que las cepas con las que no tuvo efecto y no condujo a la muerte celular de la población bacteriana fueron las cepas CPB-1 *Salmonella typhi*, CPB-8 *Escherichia coli* y la CPB-10 *Staphylococcus aureus* ya que crecieron en todas sus concentraciones (Fig. 180).

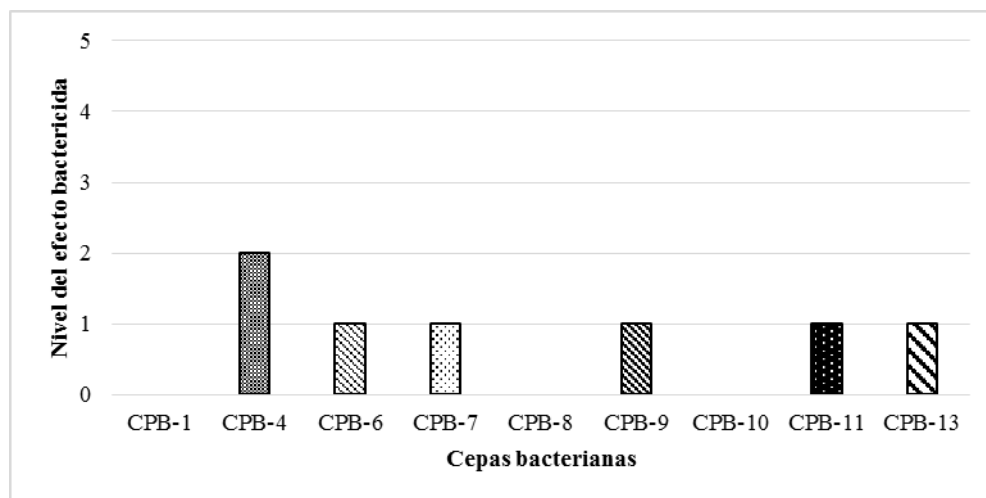


Figura 180. Nivel del efecto bactericida de cada microdilución del suplemento alimenticio elaborado con extracto liofilizado con clave N (Nutrisol 4 g) sobre las bacterias estudiadas.

La CPB-4 *Streptococcus agalactiae* fue la que presentó mayor debilidad ante 4 de las 5 suplementos, teniendo un efecto que fue irreversible con las células susceptibles ya que provocó la muerte total de las bacterias, excepto el suplemento M, compuesto con 4 g de nieves de extracto hidroalcohólico liofilizado no inhibió completamente el crecimiento de los organismos.

Mientras que la CPB-8 *Escherichia coli* fue la que tuvo mayor resistencia ante todos los suplementos alimenticios solamente teniendo efecto en su nivel de dilución D1 y la CPB-1 *Salmonella typhi* solo tuvo efecto con el suplemento alimenticio L, en la dilución D4.

El suplemento alimenticio K, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de nutrisol de extracto hidroalcohólico liofilizado, con el suplemento alimenticio J, compuesto con 2 g de *G. lucidum* y 2 g de nieves de extracto hidroalcohólico liofilizado se comportan igual teniendo un efecto que fue irreversible con las células susceptibles ya que provocó la muerte total de las bacterias en su nivel de dilución D1 con la cepa CPB-8 *Escherichia coli*, en la D2 con las cepas CPB-7 *Stenotrophomonas maltophilia*, CPB-10 *Staphylococcus aureus* y CPB-13 *Pseudomonas aeruginosa*, en D3 con las cepas CPB-6 *Pseudomonas aeruginosa*, CPB-9 *Bacillus subtilis*, y CPB-11 *Listeria monocytogenes*, excepto con la CPB-4 *Streptococcus agalactiae*, ya que el (J) tuvo efecto hasta D4, mientras que el K solo tuvo hasta la D3 y con la CPB-1 *Salmonella typhi* ninguna de las dos presentó efecto (Fig. 181).

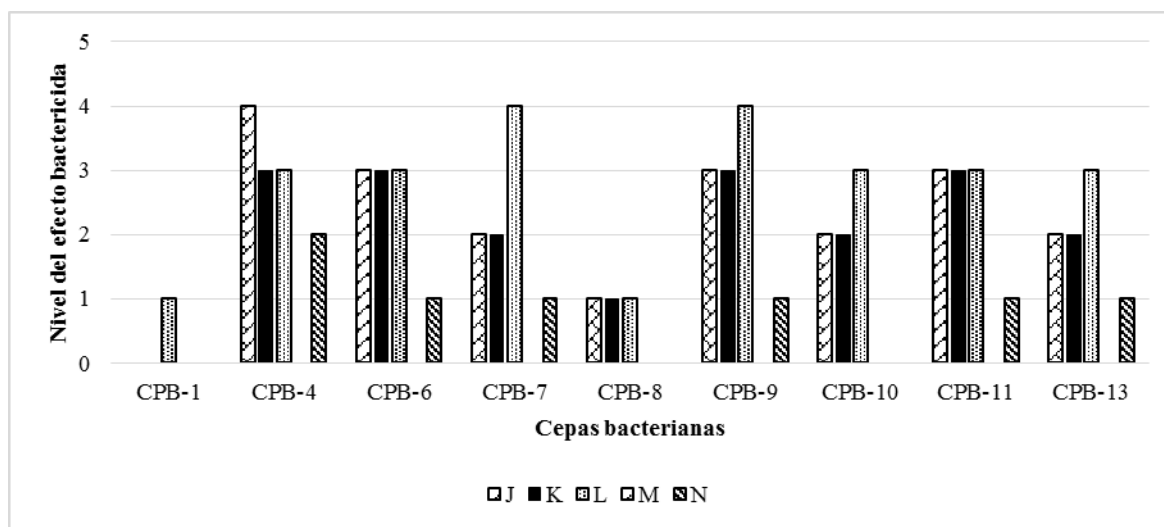


Figura 181. Niveles de los efectos bactericidas de cada microdilución de los suplementos alimenticios elaborados con extractos liofilizados del hongo *Ganoderma lucidum* y semillas de amaranto nieves y nutrisol con las diferentes cepas. J= *G. lucidum* 2 g; amaranto nieves 2 g; K= *G. lucidum* 2 g; amaranto nutrisol 2 g; L= *G. lucidum* 4 g; amaranto nutrisol 0 g; M= *G. lucidum* 0 g; amaranto nieves 4 g; N= *G. lucidum* 0 g; amaranto nutrisol 4 g.

IX DISCUSIÓN

Los valores más altos de polifenoles totales se encontraron en la semilla nutrisol NUE>20 con 0.37 mgEAG/g, mientras que en la semilla nieves fue la NIM18 con 0.25 mgEAG/g, y de acuerdo en el contenido de proteína las muestras que obtuvieron valores mayores fueron en las semillas no clasificadas por tamaño, en la nutrisol fue NUM con 74.39 $\mu\text{g/g}$ y nieves NIM con 62.88 $\mu\text{g/g}$.

En la elaboración de los suplementos alimenticios volumen/volumen, el suplemento alimenticio H, compuesto con 2 mL de extracto hidroalcohólico nieves se obtuvieron de polifenoles totales 0.22 ± 0.02 mgEAG/g y el suplemento alimenticio I, compuesto con 2 mL de extracto hidroalcohólico nutrisol obtuvo 0.29 ± 0.01 mgEAG/g, valores que coinciden con los reportados por Álvarez-Jubete *et al.* (2010), quienes obtuvieron 0.212 mgEAG/g utilizando extractos metanólicos. Por otro lado, Carrasco y Encina-Zelada (2008), estudiando *A. caudatus* obtuvieron de 0.19 a 0.30 mgEAG/g, valores parecidos a los obtenidos en el presente trabajo. El suplemento alimenticio B (v/v), compuesto con 1 mL *G. lucidum* y 1 mL con extracto hidroalcohólico nieves se obtuvo 1.40 mgEAG/g y el suplemento alimenticio E (v/v), compuesto con 1 mL *G. lucidum* y 1 mL nutrisol de extracto hidroalcohólico presentó 1.24 mgEAG/g, valores mayores a los de López *et al.* (2011), quienes utilizaron como solventes metanol y etanol en *A. hypochondriacus* y obtuvieron 0.57 mgEAG/g.

En los suplementos alimenticios liofilizados mezclando *G. lucidum* con amaranto nieves se obtuvo 59.86 mgEAG/100g de polifenoles totales, mientras que la mezcla de *G. lucidum* con amaranto nutrisol se obtuvo 63.77 mgEAG/100 g, siendo valores superiores a los de Caselato y Amaya 2012) quienes encontraron en *A. caudatus* y *A. paniculatus* valores de 39.17 mgEAG/100 g y 56.22 mgEAG/100 g. Por otro lado, Carrasco y Encina-Zelada (2010), obtuvieron valores de 16.8, 17.4, 20.9 y 32.9 mgEAG/100 g en semillas de amaranto.

Barba de la Rosa *et al.* (2009), en un estudio sobre los principales compuestos de polifenoles totales, encontraron que los compuestos que están presentes en algunas variedades de amaranto son: Isoquercitina, Nicotiflorin, Rutin, ácido 4- Hidroxibenzoico y Acido vanilico, por lo que sería muy interesante realizar estudios de los compuestos que se obtuvieron en nuestra investigación ya que algunos de ellos tienen algunas propiedades benéficas para el organismo humano.

De los extractos liofilizados de la cepa CP-145 de *G. lucidum* en 100 g de hongo seco se obtuvieron 190.77 mgEAG/100 g, siendo estos valores más altos a los obtenidos por Heleno *et al.* (2012), quienes obtuvieron 1.23 mgEAG/100 g. Por otro lado, Kozarski *et al.* (2012), utilizando como solvente agua caliente y diferentes concentraciones de etanol, obtuvieron en *G. applanatum* 4.7 gEAG/100 g, en *G. lucidum* 3.3 gEAG/100 g, en *L. edodes* 1.2 gEAG/100 g y en *T. versicolor* 18 gEAG/100 g, siendo estos resultados muy superiores a los obtenidos en el presente trabajo.

Proteína

Con respecto a los valores obtenidos en contenido de proteína de la semilla nieves (v/v), el valor más bajo correspondió al suplemento alimenticio H, compuesto con 2 mL de extracto hidroalcohólico nieves con 44.108 ± 1.084 $\mu\text{g/g}$, mientras que los valores en (p/p) con el suplemento alimenticio clave M compuesto con 4 g de extracto hidroalcohólico liofilizado nieves fue de 4758.44 $\mu\text{g}/100$ g y para el suplemento alimenticio I, compuesto con 2 mL de extracto hidroalcohólico nieves fue de 94.983 ± 4.42 $\mu\text{g/g}$, y el suplemento alimenticio N (p/p), compuesto con 4 g con extracto hidroalcohólico liofilizado nutrisol fue de 5072.48 $\mu\text{g}/100$ g. Por otro lado, Carrasco-Valencia *et al.*, (2010), obtuvieron valores de 12.80 ± 0.11 , 13.69 ± 0.11 , 14.54 ± 0.10 y 15.88 ± 0.10 g/100 g en *A. caudatus*. Castel *et al.* (2014), utilizando como solvente metanol, seguida de una extracción acidificada obtuvieron valores de 6.85 ± 0.09 mg/mL con la especie *A. mantegazzianus*, mientras que Caselato y Amaya (2012), empleando metanol como solvente para la extracción obtuvieron 13.56 g/100 g, estos valores reportados por los autores fueron más altos comparados con nuestra investigación.

Kozarski *et al.* (2012), utilizando como solvente agua caliente y etanol, obtuvieron valores de contenido de proteína para las especies de los hongos *G. applanatum* de 3.9 ± 0.4 g/100 g, *G. lucidum* de 2.7 ± 0.3 g/100 g, *L. edodes* con 5.2 ± 0.1 g/100 g y *T. versicolor* 3.9 ± 0.3 g/100 g, mientras que en nuestro trabajo utilizando la cepa CP-145 de *G. lucidum* encontramos valores de 19.243 mg/100 g.

Bacterias

En estudios de susceptibilidad bacteriana es importante determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) ya que nos permite confirmar la resistencia de los microorganismo en estudio a los agentes antimicrobianos y de esta forma determinar la actividad que poseen estos nuevos agentes (Andrews, 2001) En el presente trabajo, los efectos que obtuvimos con el

suplemento alimenticio L compuesto con 4 g de *G. lucidum* de extracto hidroalcohólico liofilizado contra la bacteria *Staphylococcus aureus* presentaron efectos de CMI y de CMB con concentraciones de sus extractos de 16.85 mg/mL y 33.71 mg/mL, respectivamente, mientras que Čilerdžića *et al.* (2014), al estudiar la actividad antimicrobiana del hongo *G. lucidum* de tres diferentes procedencias de cuerpos fructíferos utilizando como solventes agua caliente y etanol para los extractos, obtuvieron efectos en de CMI en concentraciones de sus extractos (BEOFB 431) de 1.0 ± 0.0 , en BEOFB 432 y BEOFB 434 de 1.7 ± 0.3 mg/mL y su efecto de CMB de 2.7 ± 0.7 , 2.7 ± 0.3 , 3.3 ± 0.7 mg/mL respectivamente. Por otro lado, Heleno *et al.*, (2013), encontraron valores menores en las concentraciones de sus extractos de *G. lucidum* obtuvieron una CMI con 0.025 y CMB de 0.035 mg/mL, utilizando como solventes metanol. Los resultados de ambos autores tuvieron un mayor efecto a menor concentración con respecto en nuestra investigación.

En la cepa CPB-10 de *S. aureus* se obtuvo una CMI con el suplemento alimenticio compuesto con 4 g de nieves (M) de 152.4 mg/mL y en el compuesto con 4 g de nutrisol (N) de 141.5 mg/mL y, en ambos suplementos alimenticios no tuvieron efecto en la CMB, mientras que Ahmed *et al.* (2013) encontró actividad antimicrobiana por el método de difusión, depositando 20 µg de extracto en disco contra la bacteria *S. aureus* con concentración de metanol al 100 % y rendimiento de 3.72 g/100 g tuvo una inhibición de 16 mm y en metanol al 80 % con rendimiento de 2.42 g/100 g obtuvo una inhibición de 18 mm. Se discute con estos datos debido a la escasa información encontrada con el método de microdilución empleado en esta investigación.

En los suplementos alimenticios de amaranto mezclados con el hongo *G. lucidum* se obtuvo una CMI y CMB de 161.42 mg/mL y 142 mg/mL, respectivamente, mientras que Ahmed *et al.* (2013), por el método de difusión probaron sus efectos con *E. coli* con extractos de *A. viridis* con metanol al 100 % obteniendo un rendimiento de 3.72 g/100 g y lograron una inhibición de 11 mm y metanol al 80 % con un rendimiento de 2.42 g/100 g obtuvieron una inhibición de 10 mm. Por otro lado, con el suplemento alimenticio clave L se tuvieron efectos de CMI y CMB con 67.415 mg/mL y 134.84 mg/mL, respectivamente, mientras que Čilerdžića *et al.* (2014), obtuvieron efectos CMI con menores concentraciones, que fueron de 1.3 ± 0.3 , 1.7 ± 0.3 , 1.7 ± 0.3 y (CMB) 2.7 ± 0.7 , 3.3 ± 0.7 y 2.0 ± 0.0 mg/mL.

Ćilerdžića *et al.* (2014), encontró efectos antimicrobianos en los extractos de *G. lucidum* sobre la bacteria *L. monocytogenes* a una CMI de 2.0 ± 0.0 , 1.3 ± 0.3 mg/mL y 2.7 ± 0.7 y una CMB de 4.0 ± 0.0 , 4.0 ± 0.0 y 4.0 ± 0.0 mg/mL, respectivamente. En otro estudio con la misma bacteria, Heleno *et al.* (2013), determinaron los efectos de CMI con 0.3 y una CMB de 0.75 mg/mL. Los estudios de ambos autores fueron mayores los efectos con menor concentración de sus extractos, ya que nuestros valores presentaron efectos en el suplemento alimenticio clave L), compuesto con 4 g de *G. lucidum* (extracto hidroalcohólico liofilizado) en CMI y CMB de 16.85 mg/mL.

E. coli evidenció el efecto del suplemento alimenticio L a CMI de 67.415 mg/mL y una CMB de 134.84 mg/mL. En otro estudio, Heleno *et al.*, (2013) reportaron una CMI de 0.35 y una CMB de 0.75 mg/mL, tales valores de sus extractos presentaron mayores efectos con menores concentraciones comparados con la presente investigación.

Ćilerdžića *et al.* (2014), reportaron efectos con la bacteria *P. aeruginosa* con valores en su CMI de 1.3 ± 0.2 , de 1.7 ± 0.3 y de 1.3 ± 0.2 mg/mL y en una CMB de 2.0 ± 0.0 , 3.3 ± 0.5 y 2.0 ± 0.0 mg/mL. Heleno *et al.*, (2013) determinaron una CMI de 0.75 y una CMB de 1.5 mg/mL, con lo cual tuvieron un efecto mayor a menor concentración de sus extractos, ya que el suplemento L, compuesto con 4 g de *G. lucidum* de extracto hidroalcohólico liofilizado tuvo un efecto de CMI y una CMB de 33.71 mg/mL. Con respecto a *B. subtilis* con el suplemento alimenticio L, se obtuvo una CMI a una concentración de 16.85 mg/mL. También Ćilerdžića *et al.* (2014), probaron los extractos contra *B. cereus* y obtuvieron una CMI de 1.3 ± 0.2 , 1.3 ± 0.3 y 1.7 ± 0.3 , mientras que la MIB fue de 1.7 ± 0.3 , 1.7 ± 0.3 y 2.7 ± 0.7 mg/mL, respectivamente. Igualmente Heleno *et al.* (2013), utilizando la misma bacteria obtuvieron una CMI de 0.0125 y una CMB de 0.035 mg/mL. En *S. typhi* con el suplemento alimenticio de 4 g de *G. lucidum* se obtuvo una CMI de 67.4 y una CMB 134.8 mg/mL, mientras que Ćilerdžića *et al.* (2014), al estudiar *S. typhimurium* y obtuvieron una CMI de 1.3 ± 0.3 , 1.3 ± 0.3 y 1.3 ± 0.3 y una CMB de 2.0 ± 0.0 , 2.0 ± 0.0 y 2.0 ± 0.0 mg/mL, mientras que Heleno *et al.*, (2013) obtuvieron una CMI con 0.35 y una CMB de 0.75 mg/mL con la misma bacteria, por lo que ambos autores obtuvieron mayores efectos con menor concentraciones de sus extractos.

X. CONCLUSIONES

Se encontró que las propiedades funcionales antioxidantes y antimicrobianas del hongo *G. lucidum* mejoran la calidad de los extractos de semillas de amaranto. Las semillas de amaranto de acuerdo a su origen tienen diferentes tamaños y propiedades. La semilla que tiene mejores propiedades fue la variedad nutrisol clave NUE>20 con 0.36 ± 0.02 mgEAG/g de polifenoles totales y 39.80 ± 1.54 $\mu\text{g/g}$ de proteína.

Se obtuvieron 12 extractos de las semillas clasificadas y se elaboraron 9 suplementos alimenticios líquidos en relación volumen a volumen y 5 suplementos alimenticios con extractos liofilizados en relación peso a peso con el hongo *G. lucidum* y semillas de amaranto. En los suplementos alimenticios en relación volumen a volumen el elaborado con 1.5 mL de *G. lucidum*: 0.5 mL de amaranto nieves (Clave F) presentó mayor cantidad de polifenoles totales con 1.85 ± 0.10 mgEAG/g y en el contenido de proteína fue del suplemento con 1.5 mL de *G. lucidum*: 0.5 mL de amaranto nutrisol (Clave C) de 242.005 ± 6.536 $\mu\text{g/g}$.

De los suplementos alimenticios en relación peso a peso el que mayor contenido polifenoles totales obtuvo fue el del hongo *G. lucidum* con 4 g de muestra liofilizada dando 17.88 ± 0.14 mgEAG/g y el que obtuvo más proteína fue el de la clave J (*G. lucidum* 2 g: amaranto nieves 2 g) con 2143.72 ± 21.77 $\mu\text{g/g}$.

El mejor efecto antibacteriano que se obtuvo en relación volumen a volumen fue el suplemento alimenticio C (1.5 mL de *G. lucidum*: 0.5 mL de amaranto nutrisol) con una Concentración Mínima Inhibitoria en la dilución D4 (6.35 mg/mL) y una Concentración Mínima Bactericida en la dilución D3 (12.70 mg/mL), contra la bacteria CPB-4 de *Streptococcus agalactiae*. En cuanto a los suplementos alimenticios en relación peso a peso el que presentó mayor efecto fue el suplemento alimenticio J (*G. lucidum* 2 g: nieves 2 g) en CMI en la D4 (20.18 mg/mL), contra las cepas CPB-4 de *Streptococcus agalactiae* y CPB-11 de *Listeria monocytogenes*, mientras que el mayor efecto de CMB fue también en la dilución D4 (20.18 mg/mL) contra la cepa CPB-4 de *S. agalactiae*.

Por primera vez se reporta que los extractos de amaranto tienen propiedades antioxidantes y antibacterianas y fueron mejoradas con extractos de *G. lucidum*.

XI. Estrategia para la elaboración de suplementos alimenticios con extractos del hongo *Ganoderma lucidum* y de semillas de amaranto

El objetivo de la estrategia a proponer a los cultivadores del hongo *G. lucidum* y *Amaranthus hypochondriacus*, amaranto criollo y mejorado, especies de importancia en el Estado de Puebla y en los Estados de Morelos, está dirigida en impactar en diferentes sectores sociales, principalmente al ser utilizados como un suplemento alimenticio o bebida funcional con un gran aporte proteico, nutrimental y funcional, además de sus efectos en la salud como antimicrobiano y antioxidante por la presencia de compuestos benéficos (Cuadro 19).

Cuadro 19. Objetivos de la propuesta estrategia para la elaboración de suplementos alimenticios con extractos del hongo *Ganoderma lucidum* y semillas de amaranto.

| | |
|------------------------|---|
| Objetivo general | Elaborar suplementos alimenticios con extractos de semillas de amaranto y el hongo <i>G. lucidum</i> cultivados en los Estados de Morelos y Puebla. |
| Objetivo específico | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Aprovechar las semillas de amaranto cultivadas y el hongo <i>G. lucidum</i> en los Estados de Morelos y Puebla. ✓ Mejorar la calidad de vida de las familias cultivadoras, productoras y comercializadoras de semillas de amaranto. |
| Resultados | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Elaborar de suplementos alimenticios con actividades funcionales <i>G. lucidum</i> y con semillas de amaranto. ✓ Incrementar de la producción de <i>G. lucidum</i> y amaranto. ✓ Manual para el cultivo de <i>G. lucidum</i> como potencial para incrementar las actividades biológicas de amaranto. |
| Actividades a realizar | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Determinar los metabolitos presentes en los suplementos alimenticios tanto <i>G. lucidum</i> y de las semillas de amaranto. ✓ Determinar las sustancias responsables que dan la actividad antibacteriana en los suplementos alimenticios. ✓ Degustar los suplementos alimenticios y comprobar su aceptabilidad. ✓ Elaborar de manuales para elaborar suplementos alimenticios con potencial medicinal en la salud. |

El papel del sector social rural es primordial, puesto que, al utilizar los recursos forestales y agrícolas, además de contribuir con la degradación de una gran cantidad de lignina (estructura de alto peso molecular) son capaces de producir la materia prima (hongo) para la extracción de los compuestos funcionales generando a su vez un alimento para autoabasto, para satisfacer los requerimientos en la elaboración de alimentos funcionales en su comunidad y en el mejor de los casos colaborando con la demanda que el país requiere, la cual, tan solo para este hongo e nivel mundial supera los 1.6 billones de dólares anuales, también, se generan fuentes de empleo al formalizar una pequeña empresa familiar.

Por otro lado, el sector social empresarial, es beneficiado al contar con la materia prima para la elaboración de medicamentos específicos y bebidas suplementadas para controlar o curar enfermedades de interés nacional como lo son el cáncer, desnutrición, diabetes, entre otros. El cultivo de amaranto, además de ser una actividad que genera empleos y alimentos, se convierte en la pieza clave para la generación de alimentos funcionales adicionados con compuestos extraídos de los hongos, esto por sus características y al ser un alimento de uso tradicional, impactan en todas las edades al ser consumido como una golosina (postre) y al estar incorporados alimentos con alto aporte proteico.

A continuación se enlistan los elementos y actores clave para esta estrategia planteada:

- 1.- Cultivadores de hongos comestibles, amaranto y pobladores de zonas rurales.
2. Consumidores de hongos comestibles así como del amaranto en diferentes presentaciones.
3. Empresas tequileras o microempresas que cuentan con los equipos de elaboración del producto, dulces de amaranto o tequileras.
4. Instituciones de investigación como el Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla, universidades, institutos, centros de investigación y asociaciones privadas, garantizando los elementos clave para la producción de alimentos con gran calidad, generando los paquetes tecnológicos necesarios para la producción de dichas especies e impactando con el desarrollo de productos y procesos innovadores para la obtención de alimentos funcionales.
4. Instituciones gubernamentales como SAGARPA, SEDESOL y SEDESOL, brindando apoyos financieros, información técnica, capacitación a los productores de hongos, amaranto y destilados de agave.

Paquete tecnológico

Actualmente se han desarrollado diferentes tecnologías de siembra de amaranto a diversos tipos de productores, para derivar un mayor valor agregado y aprovechar los nichos de mercado de la semilla de amaranto por lo cual se han desarrollado paquetes tecnológicos en zonas de siembra en condiciones orgánicas, aun así la tecnología desarrollada es específicamente en lo referente a variedades mejoradas convirtiendo a los productores en los proveedores de materia prima para la industria de productos elaborados de amaranto. Actualmente los productos agroindustriales de comida típica mexicana, alimentos y bebidas han mostrado demanda y potencialidad de crecimiento tanto en el mercado interno como en el

mercado externo por ello se han perfeccionado sus procesos de producción para presentar mayor competitividad.

Se necesitan de recursos económicos para el desarrollo de una tecnología que permitiese la explotación industrial a una escala de producción agrícola e industrial a gran escala de la semilla de amaranto, lo cual es una misión específica para la explotación integral del cultivo de amaranto por sus beneficios que puede traer a la sociedad. Promoviendo que el amaranto se desarrolle como un cultivo básico y que las personas mejoren la producción, industrialización, comercialización, investigación y desarrollo ya que el subsector agroindustrial de alimentos y bebidas tiene una participación importante dentro de la actividad económica nacional, se considera que la cadena productiva desde la producción primaria hasta la transformación y comercialización constituye un eje de desarrollo y por lo tanto los recursos se deben destinar al desarrollo tecnológico acompañado de mediante la generación de un paquete tecnológico para la generación de productos elaborados a base de concentrados de amaranto.

La cadena agroalimentaria emerge de los hongos comestibles, medicinales y funcionales involucra procesos biotecnológicos desarrollados a gran escala y a pequeña escala, esta cadena es competitiva que genera grandes beneficios sociales, económicos y ecológicos, a pesar de que el apoyo del sector público es mínimo. Los hongos comestibles representan una fuente de alimento con propiedades benéficas para la salud que son únicas y diferentes a las aportadas por los alimentos que son altamente consumibles, algunas de estas propiedades se pueden obtener mediante extractos acuosos y alcohólicos del cual se extraen las moléculas que influyen de manera positiva en el organismo humano.

La transferencia de tecnología del cultivo de hongos comestibles es un modelo que puede aplicarse a comunidades campesinas e indígenas rurales y suburbanos. Entre algunos de los hongos comestibles, medicinales y funcionales es el hongo *G. lucidum* que representa como un recurso que es de alta importancia para el crecimiento farmacéutico debido a sus propiedades medicinales y actualmente el paquete tecnológico para la producción de este hongo la tiene el Colegio de Postgraduados del Campus Puebla, mediante en el laboratorio de hongos comestibles medicinales y funcionales lo cual ya se cuenta desde lo que es la preparación de la semilla así como lo que es la obtención de metabolitos y hasta con diferentes pruebas para ver el efecto de estas moléculas.

Para la realización del paquete tecnológico es necesaria la integración multidisciplinaria de conocimientos, saber las necesidades de los consumidores, tecnologías de equipo, proceso, operación y de producto, Universidades, Institutos, Centros de investigación y desarrollo, colegios, empresas, organizaciones e institutos gubernamentales para proveer conjuntamente proyectos agropecuarios para desarrollar el cultivo de amaranto, estableciendo módulos de transferencia de tecnología de esta manera se tendrá que generar, validar y difundir tecnología en las zonas de producción del amaranto proporcionando asistencia técnica para el desarrollo del programa de producción y se promoverá la inversión y transferencia de tecnología en el campo y consiste en los siguientes pasos para llevar a cabo la realización del paquete tecnológico. De la manera más adecuada e importante es dar la propuesta de siembra de los dos tipos de semillas estudiadas criolla conocida como nieves y la variedad mejorada nutrisol especie (*Amaranthus hypochondriacus*).

Selección de semillas

Las semillas pueden ser obtenidas de los productores de Calpan, Puebla por el señor José Hernández Cortez, que nos proporcionó la variedad nutrisol y con el señor Efraín Javan Rivera del poblado de Huazulco, Temoac, Morelos que nos proporcionó la semilla criolla conocida como nieves o con el doctor Enrique Ortiz Torres Colegio de Postgraduados del Campus Puebla que trabaja en la producción de semillas de amaranto o pudiendo utilizar otras especies de semillas amaranto que son sembradas en los pueblos de los Estados de Morelos y Puebla. Aunque es mejor hacer la utilización de las semillas estudiadas en esta investigación ya que se sabe el contenido de polifenoles totales, proteínas y la propiedad antibacterianas.

Para la obtención de los basidiocarpos del hongo *G. lucidum* la siembra se puede hacer mediante el paquete tecnológico ya elaborado en el Colegio de Postgraduados del Campus Puebla, mediante en el laboratorio de hongos comestibles medicinales y funcionales.

Limpiezas de las semillas

La limpieza de las semillas trae como objetivo tener una mejor calidad de los compuestos obtenidos de amaranto se hace con la ayuda mediante un tamiz y mallas.

Separación de las semillas

La separación de las semillas tienen que hacer con un tamiz de pruebas físicas marca Mont inox con gradientes, número 18 (1000 micrones), 20 (841 micrones) y >20 (<841 micrones) lo cual este proceso es importante ya que en la investigación se observó que hay una diferencias en las concentraciones de compuestos como polifenoles totales y proteínas de acuerdo al tipo de tamaños de las semillas de los dos amarantos.

Preparación de la semillas y el hongo *Ganoderma lucidum* para la obtención de los compuestos bioactivos

Las semillas y el hongo tienen que molerse en 10 g con vasos de 200 ml con ayuda de una licuadora marca Osterizer, modelo 890-00 (Al moler el material se obtienen mayores resultados en los compuestos bioactivos que al no moler el material). El material ya molido se colocara con ayuda de una balanza analítica marca Ohaus, modelo Explorer digital ex 224, en sobres de papel filtro de 7.5 cm de ancho x 9 cm de largo que posteriormente tendrán que ser selladas perfectamente. Para obtener el extracto por maceración, se colocaran los sobres de papel filtro en un frasco estéril de vidrio con tapa de rosca de 200 mL y en seguida a cada frasco se le agregaran 150 mL de solvente (tequila) proceso de maceración (24 horas).

Recuperación de los concentrados de semillas de amaranto y el hongo *Ganoderma lucidum* en tequila

Después de las 24 horas las muestras tienen que procesarse con una prensa vertical, marca Oishii take, con capacidad de 150 mL con el fin de obtener un mejor rendimiento y serán filtrados en un matraz bola.

Extracción de los compuestos

El equipo para la extracción de compuestos se tiene que utilizar rotavapores marca Hahn Shin, modelo hs-2000 ns, con condiciones de operación a 38 °C y 90.

Esterilización de los extractos

El proceso de esterilización es importante para eliminar cualquier organismo que pueda contaminar nuestros extractos para eso se utilizara un sistema de esterilización por microfiltración marca esterifil con capacidad de 250 ml el extracto se pasara a través de un filtro marca esterifil diámetro 0.45 µm, 50 mm, los extractos serán depositados recipientes estériles, este proceso se tiene que llevar a cabo dentro de una campana de flujo laminar con norma ISO 9002 (filtro tipo HEPA).

Conservación de extractos

Los frascos tienen que mantenerse en un refrigerador marca Revco, modelo ult1340 a temperatura $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$, para hacer las mezclas en relaciones de volumen a volumen y para elaborar en relación peso a peso se pasaran por un procesos de liofilización con una liofilizadora marca Labconco, modelo freezone 4.5 a peso constante. Los procesos de elaboración de mezclas es importante saber que en las relaciones de peso a peso se utiliza más material en cuanto a las semillas de amaranto y el hongo *G. lucidum* en comparación con las de relación volumen a volumen, pero se obtienen mayores resultados en las propiedades encontradas en el proceso de mezclas de peso a peso. Y es importante establecer las proporciones de mezclas en peso a peso y volumen a volumen para ver la cantidad de concentraciones de antioxidantes y proteínas que se desean obtener en cierta cantidad deseada.

XII. LITERATURA CITADA

- Ahmed, S. A., S. Hanif y T. Iftkhar. 2013. Phytochemical Profiling with Antioxidant and Antimicrobial Screening of *Amaranthus viridis* L. Leaf and Seed Extracts. *Journal of Medical Microbiology* 3: 164-171.
- Andrews, J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48(Suppl. 1): 5–16.
- Algara, S. P., M. J. Gallegos y H. J. Reyes. 2013. Amaranto: efectos en la nutrición y la salud. *Tlatemoani Revista Académica de Investigación* 12:1-23.
- Álvarez-Jubete, L., H. Wijngaard., E. K. Arend y E. Gallagher. 2010. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry* 119:70-778.
- Alvídrez-Morales, M. A., M. B. Gonzáles-Martínez y S. Z. Jiménez-Salas. 2002. Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Revista Salud Pública y Nutrición* 3: 1-6.
- Arcila, N y Y. Mendoza. 2006. Elaboración de una bebida instantánea a base de semillas de amaranto (*Amaranthus cruentus*) y su uso potencial en la alimentación humana. *Revista de la Facultad de Agronomía* 23: 114-124.
- Ávila, C. A., V. A. Chávez, L. T. Shamah y F.H. Madrigal. 1993 .La desnutrición infantil en el medio rural mexicano: análisis de las encuestas nacionales de alimentación. *Salud Pública de México* 35:658-666.
- Ayala, A., D. Escobedo, L. Cortés y E. Espitia. 2010. El cultivo de amaranto en México, descripción de la cadena, implicaciones y retos. Capítulo XXII. Pp. 315-330. *In: Amaranto: Ciencia y Tecnología*. Eds. E. Espitia-Rangel. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuaria. Mejoramiento Genético de Cereales (Amaranto, Avena y Trigo), Celaya, Guanajuato, México.
- Azuola, A y P. Vargas. 2007. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en Marcha* 20:30-40.
- Barba de la Rosa, A. P., S. I. Fomsgaard, B. Laursen, G. A. Montensen, O. L. Martínez, C. Silva-Sánchez, A. Mendoza- Herrera, J. Gonzales-Castañeda y R. A. De León-Rodríguez. 2009. Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science* 49:117-121.
- Bhosle, S., K. Ranadive, G. Bapat, G. Deshpande y J. Vaidya. 2010 Taxonomy and Diversity of *Ganoderma* from the Western parts of Maharashtra (India). *Mycosphere* 3:249–262.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brennan, M. A., E. Derbyshire, B. K. Tiwari y C. S. Brennan. 2012. Enrichment of Extruded Snack Products with Coproducts from Chestnut Mushroom (*Agrocybe aegerita*) Production: Interactions between Dietary Fiber, Physicochemical Characteristics, and Glycemic Load J. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 4396–4401.
- Brizuela, M. A., L. García, L. Pérez y M. Mansur.1998. Basidiomicetos: Nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología* 15: 69-74.
- Calderón, E., J. M. González y R. Bressani. 1991. Características agronómicas, físicas, químicas y nutricias de quince variedades de amaranto. *Turrialba (IICA)* 4: 458-464.

- Carrasco, R. R y Z. R. Encina-Zelada. 2008. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: quinoa (*Chenopodium quinoa*), kaniwa (*Chenopodium pallidicaule*) y kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Revisión de la Sociedad Química de Perú* 74: 85–99.
- Carrasco-Valencia, R., J. Hellström, P. Matti y H. Mattila. 2010. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food Chemistry* 120: 128–133.
- Casal, I., J. García, J. Guisán, J. Martínez-Zapater y D. Ramón. 2003. *Biotecnología y alimentos (Preguntas respuestas)* (Sociedad Española de Biotecnología). 58 pp.
- Caselato, V. M. y F. J. Amaya. 2012. State of Knowledge on Amaranth Grain: A Comprehensive Review. *Journal of Food Science* 4: 93-104.
- Castel, V., O. Andrich, M. F. Netto, G. L. Santiago y R. C. Carrara. 2014. Total phenolic content and antioxidant activity of different streams resulting from pilot-plant processes to obtain *Amaranthus mantegazzianus* protein concentrates. *Journal of Food Engineering* 122: 62-67.
- Céspedes, M. E., C. K. Rodríguez, J. N. Llópiz y M. N. Cruz. 2000. Un acercamiento a la teoría de los radicales libres y el estrés oxidativo en el envejecimiento. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 191:86-90.
- Ćilerdžića, J., J. Vukojevića, M. Stajića, T. Stanojkovićb y J. Glamočlij. 2014. Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate. *Journal of Ethnopharmacology* 155:312–319.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S16CLSI, Wayne, PA.
- Contreras, L. E., J. O. Jaimez, J. C. Soto, O. A. Castañeda y M. J. Añorve. 2011. Aumento del contenido proteico de una bebida a base de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). *Revista Chilena de Nutrición* 3:322-330.
- Corey, E. M., B. R. Beelman y K. Seetharman. 2009. Potential for Nutritional Enrichment of Whole-Wheat Bread with Portabella Mushroom Powder (*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach, Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2:157-166.
- Corzo-Delgado, J. E. y J. M. Gómez-Mateos. 2006. *Stenotrophomonas maltophilia*, un patógeno nosocomial de importancia creciente. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 24:1-3.
- De Delahaye, P y M. E. Portillo. 1990. Enriquecimiento de harina precocida de maíz blanco (*Zea mays*) con harina de semilla de amaranto (*Amaranthus sp.*) *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 3:360-8.
- Días, V. y J. Gomes. 2010. Barras de amaranto enriquecidas com fructanos: aceitabilidade e valor nutricional Amaranth bars enriched with fructans: acceptability and nutritional value. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 60:291-297.
- Dos Reis, L. A., C. V. Días, P. M. Machado y A. J. Gomes. 2012. Effect of incorporation of amaranth on the physical properties and nutritional value of cheese bread. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 3: 427-431.
- Escudero, H., 2015. Obtención y caracterización de extractos de hongos comestibles con impacto potencial en la salud humana, y el desarrollo de estrategias para su

- implementación por parte de los productores de la región de Puebla, México. Tesis de Doctorado (en proceso). Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*.
- Espitia-Rangel, E. (2012). Entrevista directa a informante clave. Investigador del CIRCE, INIFAP. Agosto de 2012.
- Garro, M. G. 2012. Desarrollo de cultivos y alimento por técnicas de biotecnología moderna en Centroamérica. *Tecnología en Marcha* 5:40-45.
- Gispert-Cruells, M. 1997. La cultura alimentaria mexicana: fuente de plantas comestibles para el futuro. *Monografías del Jardín Botánico de Córdoba* 5:51-57.
- Heleno, S. A., R. I. Ferreira, P. A. Esteves, A. C'iric, J. Glamoclijac, A. Martins, M. Sokovic y R. M. Queiroza. 2013. Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters *Sandrina Food and Chemical Toxicology* 58:95–100.
- Heleno, S. A., L. Barros, A. Martins, R. M. Queiroz, B. C. Santos y R. I. Ferreira. 2012. Fruiting body, spores, and in vitro produced mycelium of *Ganoderma lucidum* from Northeast Portugal: A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts. *Food Research International* 46:135-140.
- Ji, Z., Q. Tang, J. Zhang, Y. Yang, W. Jia y Y. Pan. 2007. Immunomodulation of RAW264.7 macrophages by GLIS, proteopolysaccharide from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Ethnopharmacology* 3:445–450.
- Juárez-Rosete, C. R., J. A. Aguilar, M. E. Juárez, R. Bugarín, P. López y E. Cruz. 2013. Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación. *Revista BioCiencias* 2: 119-129.
- Klimczak, I., M. Malecka y B. Pacholek. 2002. Antioxidant activity of ethanolic extracts of amaranth seeds. *Nahrung/Food* 46:184–6.
- Kozarski, M., A. Klaus, M. Niksic, M. M. Viric, N. Todorovic, D. Jakovljevic y G. L. Van. 2012. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis* 2:144-153.
- Leskosek-Cukalovic, I. J., S. M. Despotovia y M. P. Niksia. 2009. Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* in the production of special beer types. *Proceedings for Natural Science* 117:111-117.
- López, V. R., G. S. Razzeto, M. S. Giménez y L. N. Escudero. 2011. Antioxidant Properties of *Amaranthus hypochondriacus* Seeds and their Effect on the Liver of Alcohol-Treated Rats Plant. *Plant Foods for Human Nutrition* 66: 157–162.
- Manrique de Lara Soria. B. (2011). Entrevista directa a informante clave. Presidente de San Miguel de Proyectos Agropecuarios Sociedad de Producción rural. Noviembre de 2011.
- Martínez-Carrera, D., M. Curvetto, P. Morales, M. Sobal y V. Mora. 2010. Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción- consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el siglo XXI. 1. Editorial El errante editor. San Pedro Cholula, Puebla, México. (648 p).
- Martínez-Carrera, D., M. Sobal, P. Morales, W. Martínez y Y. Mayett, Y. 2004. *Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales, y su contribución a la alimentación mexicana*. Colegio de Posgraduados México 7, 17 y 18.
- Moctezuma, P. 1994. Dulces, mujeres y trabajo en Huazulco. Voces y Trazos de Morelos. *Jardín* 2:7-13.

- Müller, L., S. Gnoyke, A. M. Popken y V. Böhm. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology* 43: 992-999.
- Parra, M., J. Durango y S. Máttar. 2002. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *MVZ-CÓRDOBA* 7:187-200.
- Pérez, D. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* 3: 57-67.
- Prodhan, U. K, K. M. M. R. Linkon, M. F. Al-Amin y M. S. Alan. 2015. Development and quality Evaluation of mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) enriched Biscuits. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. Doi: 10 9755/ejfa.2015.04.082.
- Rojas, D., A. M. Palacio, S. P. Ospina, P. Zapata y L. Atehortúa. 2012. Biotecnología de hongos basidiomicetes en el desarrollo de alimentos funcionales: procesos de secado vs. Capacidad antioxidante. *Vitae* 19:1-69.
- Rossi, M. L., A. Paiva, M. Tornese, S. Chianelli y A. Troncoso. 2008. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. *Revista Chilena de Infectología* 25: 328-335.
- Quiriz-Cerezo, F. A. 2012. Evaluación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de dos especies del hongo medicinal *Ganoderma* nativo de México y su contribución al desarrollo regional. Tesis de Maestría en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. Puebla. 45 pp.
- Sánchez-Marroquín, M. A y S. Maya. 1985. Industrial corn flour enrichment with whole amaranth flour and milling fractions in corn-based products. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 3:518-35.
- Santos, D. B., L. E. Silva, B. Amaral, J. Oliveira, A. Barufatti y K. M. Pires. 2012. Biotecnología aplicada a la alimentación y salud humana. *Revista Chilena de Nutrición* 39: 94-98.
- Seija, V. y R. Vignoli. 2008. Principales grupos de antibióticos, R. *Temas de Bacteriología y Virología Médica* 34:631-647.
- Sliva, D. 2006. *Ganoderma lucidum* in cancer research. *Leukemia Research* 30: 767-768.
- Solórzano-Santos, F y M. G. Miranda-Novales. 1998. Resistencia de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos. *Salud Pública de México* 40: 510-516.
- Sosa, J. L. 2013. El capital social grupal en la agregación de valor: caso de productores de amaranto de los municipios de Cohuecan, Puebla y Temoac, Morelos. Tesis de Doctorado en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional Colegio de Postgraduados. 32-51 pp.
- Teutónico, R. A y D. Knorr. 1985. Amaranth: composition, properties, and applications of a rediscovered food crop. *Food Technology* 39:49-61.
- Tomás-Barberán, F. A. 2003. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación Nutrición y Salud* 10: 41-53.
- Velázquez-Meza, M. E. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud Pública de México* 47:381-387.
- Vidal-Graniel, J. E. 2003. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. *Salud en Tabasco* 9:188-193.
- Vilar-Compte, D., B. Jacquemin, A. Díaz-González, C. Velásquez y P. Volkow. 2003. Brote por *Pseudomonas aeruginosa*, en el área de atención ambulatoria de heridas quirúrgicas, en pacientes posmastectomizadas. *Salud Pública de México* 45:371-378.

- Vitoria, M. I y S. J. Dalmau. 2009. Alimentos funcionales en pediatría. Situación legal actual e implicaciones prácticas. Unidad de Nutrición y Metabolopatías. *Acta Pediátrica Española* 5: 223-230.
- Vukosavljević, P., M. Novaković, B. Bukvić, M. Niksić, I. Stanisavljević y A. Klaus. 2009. Antioxidant activities of herbs, fruit and medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* extracts produced by microfiltration process. *Journal of Agricultural Sciences* 1:44-61.
- Wiegand, I., K. Hilpert y R. E. Hancock. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 2: 123-175.
- Xiao-Ling, Z., C. Alex-F y L. Zhi-Bin. 2007. *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance the function of immunological effector cells in immunosuppressed mice. *Journal of Ethnopharmacology* 111: 219–226.