



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y  
ANTIBACTERIANAS DEL “HONGO DE ENCINO” (*Lentinula boryana*) Y  
DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA PARA SU APROVECHAMIENTO**

**ALAN HELIOS ESCUDERO URIBE**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR 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 **Alan Helios Escudero Uribe**, 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 del Profesor **Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "**Análisis de las propiedades antioxidantes y antibacterianas del "hongo de encino" (*Lentinula boryana*) y desarrollo de una estrategia para su aprovechamiento**", 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, el Consejero o Director de Tesis 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, 5 de noviembre del 2015.

M.I.A. Alan Helios Escudero Uribe

Vo. Bo. Profesor Consejero  
Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera

La presente tesis, titulada: **Análisis de las propiedades antioxidantes y antibacterianas del “hongo de encino” (*Lentinula boryana*) y desarrollo de una estrategia para su aprovechamiento**, realizada por el alumno: **Alan Helios Escudero Uribe**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS


ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:

  
\_\_\_\_\_  
DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESORA:

  
\_\_\_\_\_  
DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
DR. ANTONIO MACÍAS LÓPEZ

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
DR. HERMILO LEAL LARA

Puebla, Puebla, México, a 27 de noviembre del 2015

# ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIBACTERIANAS DEL “HONGO DE ENCINO” (*Lentinula boryana*) Y DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA PARA SU APROVECHAMIENTO

Alan Helios Escudero Uribe, Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2015

Los recursos genéticos de hongos comestibles en México constituyen una fuente potencial de compuestos bioactivos con impacto en la salud humana y el desarrollo social y regional. En esta investigación, se analizaron las propiedades funcionales del hongo comestible *Lentinula boryana* nativo de México (Veracruz), comparativamente con una cepa de referencia de *L. edodes*. Las cepas estudiadas se cultivaron *in vitro*, así como en substrato sólido estéril a base de aserrín de encino hasta la obtención de basidiocarpos. Se realizaron extractos acuosos e hidroalcohólicos al 20% y 35%, empleando 10 g por muestra de basidiocarpos secos y molidos, así como de micelio, deshidratados a 38°C. Se evaluaron las siguientes variables: rendimiento del extracto; contenido de proteínas y polifenoles totales; actividad antioxidante por las técnicas de DPPH, ABTS,  $\beta$ -carotenos, ORAC; y las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana contra nueve bacterias, determinando las concentraciones mínimas inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB). El rendimiento fue mayor en los extractos acuosos, de 316.6 mg/mL y 252.3 mg/mL para *L. edodes* y *L. boryana*, respectivamente. En cambio, los rendimientos de los extractos hidroalcohólicos de *L. boryana* fueron mayores que aquellos de *L. edodes*. En el contenido de proteínas hubo diferencias entre los basidiocarpos (1.91  $\mu$ g/g de hongo seco) y el micelio (0.83  $\mu$ g/g de hongo seco). El solvente influyó en el contenido de antioxidantes, siendo mayor en el extracto acuoso con concentraciones de 3.96 mg EAG/g y 3.49 mg EAG/g de basidocarpo seco de *L. edodes* y *L. boryana*, respectivamente. En los extractos hidroalcohólicos al 35% de los basidiocarpos se obtuvieron las siguientes propiedades antioxidantes para *L. boryana* y *L. edodes*, respectivamente: 1.39 mg EAG/g y 0.96 mg EAG/g (Folin-Ciocalteu); 0.45 mg/mL y 0.70 mg/mL (CI 50%, DPPH); 0.52 mg/mL y 2.82 mg/mL (CI 50%, ABTS); 0.083 mg/mL y 0.101 mg/mL (CI 50%,  $\beta$ -carotenos); y 15.74 mmoltrolox/g y 16.69 mmoltrolox/g de hongo seco (ORAC). Con respecto a las propiedades antibacterianas, se encontraron diferentes actividades contra todas las cepas estudiadas dependiendo del tipo de extracto y la especie. Las propiedades bacteriostáticas (1.38 mg/mL) y bactericidas (44.27 mg/mL) más efectivas de *L. boryana* se obtuvieron con el extracto hidroalcohólico al 35%, seguidas por el extracto hidroalcohólico al 20% (8.65-138.33 mg/mL) y el extracto acuoso (15.77-126.17 mg/mL), respectivamente. La cepa CPB-13 de *Pseudomonas aeruginosa* no mostró susceptibilidad a los extractos acuosos de *L. boryana*, aunque fue susceptible a aquellos de *L. edodes* en altas concentraciones. En general, los extractos hidroalcohólicos al 35% de los basidiocarpos tuvieron mayor efecto antibacteriano que aquellos extractos del micelio de *L. boryana* y *L. edodes*. Se propone una estrategia de desarrollo para los productores de hongos comestibles, funcionales y medicinales con el objetivo de promover la agregación de valor con base en las propiedades funcionales estudiadas.

Palabras clave: actividad antibacteriana, *Lentinula boryana*, *Lentinula edodes*, antioxidantes.



# ANALYSIS OF ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES FROM THE OAK MUSHROOM (*Lentinula boryana*) AND DEVELOPMENT OF A STRATEGY FOR ITS MANAGEMENT

Alan Helios Escudero Uribe, Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2015

Mushroom genetic resources from Mexico represent a potential supply of bioactive compounds having impact on human health, social and regional development. In this study, the functional properties of the edible mushroom *Lentinula boryana*, native from Mexico (Veracruz), were analyzed in comparison with a reference strain of *L. edodes*. Studied strains were grown *in vitro*, as well as on sterile solid substrate containing oak sawdust for the production of basidiocarps in a mushroom growing chamber. Aqueous and hydroalcoholic (20%, 35%) extracts were obtained from of basidiocarps and mycelium, dried at 38°C and ground (10 g). The following variables were assessed: extract yield; content of protein and total polyphenols; antioxidant activity by DPPH, ABTS,  $\beta$ -Carotenes, and ORAC protocols; and bacterial susceptibility assays against nine strains assessing the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC). Greater yield was recorded in aqueous extracts of *L. edodes* (316.6 mg/mL) and *L. boryana* (252.3 mg/mL). The hydroalcoholic extracts of *L. boryana* were greater those from *L. edodes*. Protein content showed differences according to basidiocarps (1.91  $\mu$ g/g dried sample) and mycelium (0.83  $\mu$ g/g of dried sample). Antioxidant content was influenced by the solvent, aqueous extracts showed 3.96 mg GAE/g and 3.49 mg GAE/g of dried mushrooms from *L. edodes* and *L. boryana*, respectively. The following antioxidant properties were recorded in 35% hydroalcoholic extracts from *L. boryana* and *L. edodes*, respectively: 1.39 mg EAG/g and 0.96 mg EAG/g (Folin-Ciocalteu); 0.45 mg/mL and 0.70 mg/mL (IC 50%, DPPH); 0.52 mg/mL and 2.82 mg/mL (IC 50%, ABTS); 0.083 mg/mL and 0.101 mg/mL (IC 50%,  $\beta$ -carotenes); and 15.74 mmoltrolox/g and 16.69 mmoltrolox/g dried sample (ORAC). The antibacterial activity was different against all strains depending on the type of extract and mushroom species. The most effective bacteriostatic (1.38 mg/mL) and bactericidal (44.27 mg/mL) activity from *L. boryana* was recorded on 35% hydroalcoholic extracts, followed by 20% hydroalcoholic (8.65-138.33 mg/mL) and aqueous (15.77-126.17 mg/mL) extracts, respectively. The strain CPB-13 of *Pseudomonas aeruginosa* did not show any susceptibility to aqueous extracts of *L. boryana*, although it was susceptible to those from *L. edodes* at high concentrations. In general, 35% hydroalcoholic extracts of basidiocarps had greater antibacterial effect than those extracted from the mycelium of *L. boryana* and *L. edodes*. A strategy of development is proposed for growers of edible, functional and medicinal fungi in order to promote new added value products based on functional properties studied.

Key words: antibacterial activity, antioxidants, *Lentinula boryana*, *Lentinula edodes*.

## Dedicatoria

A mi esposa Katia, mi compañera de vida y fuente de inspiración, porque el fin de esta etapa es el principio de otra mejor.

A Karinita, quien es mi regalo de Dios y mi compañerita de estudio y travesuras.

A mi papá Benigno †, quien siempre me instruyó con su ejemplo.

A mi mamá Graciela, quien me motivó en tantos momentos.

A mi hermano Zeus, a quien también le agradezco por sus enseñanzas.

A mi hermana Selene, a quien siempre he admirado.

A mis cuñados, Rodolfo Jimenez, Maritza Cazares, Mónica Reyes, Roberto Avalos, Manue Jimenez, Tere Jimenez. Quienes son como hermanos y quiero tanto.

A mis Sobrinitas Casandra, Tali, Irene, Jimena y Dana. Que siempre tienen la alegría con que Dios las colmó.

A mi tía Aurora y tía Guty con mucho cariño.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme una hermosa familia y ponerme retos cada vez más difíciles, pero siempre alcanzables, los cuales me permiten ir mejorando como persona en forma integral.

A mi familia: Que es tan bonita, amorosa y por su apoyo siempre que les requería.

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

Al 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 los integrantes del Consejo Particular, integrado por el Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera, Dr. Porfirio Morales Almora, Dra. Mercedes Sobal Cruz, Dr. Antonio Macías López y Dr. Hermilo Leal Lara, 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: a la M.C. Myrna Bonilla Quintero, Biól. Wilfrido Martínez Sánchez, por su amistad y las atenciones dentro y fuera del laboratorio, así como a mis compañeros, colaboradores y amigos Fabiola Quiriz, Miguel Ángel Juárez Luna, Elizabeth Cruz, Apolo Gilmar Rendón Hernández, Vladimir Mitzi Ávila e Ivan Castillo Sebastián, quienes también me brindaron orientación, consejos y por todo el apoyo.

A Maria de Lourdes Rivas Romero “Lulú”, quien desde la biblioteca me brindó apoyo con artículos que a su vez me dieron bases sólidas para la realización de este proyecto.

A mis amigos del Colegio de Postgraduados: Paty Ramírez Carrasco, Alma Cuellar Sánchez, Zulma Bolaños García.

<b>CONTENIDO</b>		Páginas
<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II.</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	2
2.1	Relevancia de los recursos genéticos para el desarrollo.....	2
2.2	Generalidades de los hongos.....	2
2.3	Biotecnología de los hongos comestibles.....	3
2.4	Propiedades funcionales y medicinales de los hongos comestibles.....	3
2.5	Compuestos bioactivos de los hongos funcionales y medicinales.....	4
2.5.1	Clasificación.....	4
2.5.2	Extracción.....	5
2.5.2.1	Preparación de la muestra.....	5
2.5.2.2	Maceración.....	6
2.5.2.3	Selección del solvente.....	6
2.5.2.4	Métodos de extracción de compuestos bioactivos .....	8
2.6	El género <i>Lentinula</i> .....	9
2.7	Efecto de los antioxidantes.....	10
2.8	Bacterias de interés clínico.....	11
2.9	Mecanismos de inhibición de los extractos de hongos contra bacterias.....	11
2.10	Productos funcionales y medicinales a base de hongos.....	12
<b>III.</b>	<b>MARCO DE REFERENCIA</b> .....	13
3.1	Valor nutricional de <i>Lentinula</i> .....	13
3.2	<i>Lentinula</i> como fuente potencial de biomoléculas.....	13
3.3	Propiedades antioxidantes de <i>Lentinula</i> .....	15
3.4	Contenido de proteínas en <i>Lentinula</i> .....	16
3.5	Productos a base de hongos con valor agregado.....	17
3.6	Producción de biomasa de <i>Lentinula boryana</i> y <i>L. edodes</i> .....	19
3.7	Estudios de las propiedades funcionales del hongo <i>Lentinula</i> .....	19
3.8	Propiedades antimicrobianas de <i>Lentinula</i> .....	20
3.9	Estudios <i>in vitro</i> con bacterias de interés clínico.....	20
3.10	El cultivo de <i>Lentinula</i> en México.....	21
<b>IV.</b>	<b>PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	22
<b>V.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	23
<b>VI.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
6.1	Objetivo general.....	23
6.2	Objetivos particulares.....	23
<b>VII.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	24
7.1	Metodología general del proyecto.....	24
7.2	Material biológico.....	25
7.2.1	Cepas de hongos comestibles y bacterias estudiadas.....	25
7.2.2	Obtención de biomasa de <i>Lentinula boryana</i> y <i>L. edodes</i> en medios de cultivo líquido y dos condiciones de incubación.....	26
7.2.3	Caracterización de la biomasa.....	26
7.2.4	Producción de basidiocarpos de <i>Lentinula boryana</i> y <i>L. edodes</i> en sustrato sólido estéril.....	26
7.2.5	Cosecha y caracterización de los basidiocarpos.....	27
7.2.6	Preparación de las muestras.....	28

7.3	Maceración de las muestras en diferentes solventes.....	28
7.3.1	Concentración de los macerados para la obtención de los extractos.....	28
7.3.2	Obtención de los extractos.....	29
7.4	Esterilización de los extractos.....	29
7.4.1	Densidad del extracto .....	30
7.4.2	Rendimiento de los extractos.....	31
7.5	Determinación de proteínas en los extractos.....	31
7.6	Determinación de polifenoles totales en los extractos.....	32
7.6.1	Cuantificación de polifenoles totales como Equivalentes de Ácido Gálico	35
7.7	Determinación de la actividad antioxidante por el reactivo 1,1-difenil-2- picril-hidrazilo (DPPH).....	35
7.8	Determinación de la actividad antioxidante con el reactivo “ácido 2,2’- azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico” (ABTS).....	37
7.9	Cuantificación de, $\beta$ -carotenos.....	39
7.10	Determinación de la actividad antioxidante por el método ORAC.....	41
7.11	Prueba de susceptibilidad bacteriana de los extractos de CP-519 <i>Lentinula</i> <i>boryana</i> y CP-7 <i>L. edodes</i> sobre nueve cepas de bacterias de interés clínico	41
7.11.1	Curva poblacional con correlación a su densidad óptica.....	41
7.11.2	Obtención del inóculo bacteriano.....	42
7.11.3	Arreglo del bioensayo en la microplaca.....	43
7.11.4	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de <i>Lentinula boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 sobre el crecimiento de nueve bacterias de interés clínico.....	44
7.11.5	Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de <i>Lentinula boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 sobre el crecimiento de nueve bacterias de interés clínico.....	47
7.12	Análisis matemático y estadístico.....	48
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	49
8.1	Producción de biomasa en medio líquido PDB, EMB y CYM de <i>Lentinula</i> <i>boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 cultivado en condiciones estáticas y en agitación.....	49
8.2	Caracterización macroscópica y microscópica de la biomasa.....	59
8.3	Producción y caracterización de basidiocarpos de <i>Lentinula boryana</i> CP- 519 y <i>L. edodes</i> CP-7.....	60
8.4	Producción de extractos de <i>Lentinula boryana</i> y <i>L. edodes</i> por maceración con los solventes: agua y solución hidroalcohólicos al 20% y 35%.....	61
8.4.1	Caracterización de los diferentes extractos de <i>Lentinula boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7.....	62
8.4.2	Densidad, peso residual y rendimiento de los extractos de hongos.....	62
8.4.3	Contenido de proteínas.....	63
8.4.4	Contenido de polifenoles totales.....	64
8.4.5	Cuantificación de polifenoles totales como equivalentes de ácido gálico de los basidiocarpos en diferentes solventes.....	64



8.4.5.1	Cuantificación de polifenoles totales como equivalentes de ácido gálico para los extractos hidroalcohólicos al 35% de los basidiocarpos y micelio de los hongos <i>L. boryana</i> y <i>L. edodes</i> .....	66
8.4.6	Cuantificación de la actividad antioxidante por DPPH.....	68
8.4.7	Cuantificación de la actividad antioxidante por ABTS.....	68
8.4.8	Cuantificación de la actividad antioxidante por $\beta$ -carotenos.....	70
8.4.9	Determinación de antioxidantes por la capacidad de absorbanza del radical oxígeno (ORAC).....	72
8.5	Prueba de susceptibilidad bacteriana de los extractos de <i>L. boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 sobre nueve cepas de bacterias de interés clínico...	73
8.5.1	Concentración de los extractos de <i>L. boryana</i> y <i>L. edodes</i> en las diferentes diluciones en la microplaca.....	74
8.5.2	Bioensayo con la cepa CPB-1 de <i>Salmonella typhi</i> .....	75
8.5.2.1	Confirmación del inóculo.....	76
8.5.2.2	Efecto de los extractos de <i>L. boryana</i> CP-519.....	77
8.5.2.3	Efecto de los extractos de <i>Lentinula edodes</i> CP-7.....	79
8.5.3	Bioensayo con la cepa CPB-4 de <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	81
8.5.3.1	Efecto de los extractos de <i>L. boryana</i> CP-519.....	83
8.5.3.2	Efecto de los extractos de <i>L. edodes</i> CP-7.....	85
8.5.4	Bioensayo con la cepa CPB-6 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	88
8.5.4.1	Efecto de los extractos de <i>L. boryana</i> CP-519.....	89
8.5.4.2	Efecto de los extractos de <i>L. edodes</i> CP-7.....	91
8.5.5	Bioensayo con la cepa CPB-7 de <i>Stenotrophomona</i> .....	94
8.5.5.1	Efecto de los extractos de <i>L. boryana</i> CP-519.....	96
8.5.5.2	Efecto de los extractos de <i>L. edodes</i> CP-7.....	99
8.5.6	Bioensayo con la cepa CPB-8 de <i>Escherichia coli</i> .....	102
8.5.6.1	Efecto de los extractos de basidiocarpo de <i>L. boryana</i> CP-519.....	103
8.5.6.2	Efecto de los extractos de micelio de <i>L. boryana</i> CP-519.....	106
8.5.6.3	Efecto de los extractos de <i>L. edodes</i> CP-7.....	107
8.5.6.4	Efecto del extracto de micelio de <i>L. edodes</i> CP-7.....	110
8.5.7	Bioensayo con la cepa CPB-9 de <i>Bacillus subtilis</i> .....	111
8.5.7.1	Efecto de los extractos de basidiocarpo de <i>L. boryana</i> CP-519.....	113
8.5.7.2	Efecto de los extractos de micelio de <i>L. boryana</i> CP-519.....	115
8.5.7.3	Efecto de los extractos de <i>L. edodes</i> CP-7.....	116
8.5.7.4	Efecto del extracto de micelio de <i>L. edodes</i> CP-7.....	118
8.5.8	Bioensayo con la cepa CPB-10 de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	119
8.5.8.1	Efecto de los extractos de basidiocarpo de <i>L. boryana</i> CP-519.....	121
8.5.8.2	Efecto de los extractos de micelio de <i>L. boryana</i> CP-519.....	123
8.5.8.3	Efecto de los extractos de <i>L. edodes</i> CP-7.....	124
8.5.8.4	Efecto del extracto de micelio de <i>L. edodes</i> CP-7.....	127
8.5.9	Bioensayo con la cepa CPB-11 de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	127
8.5.9.1	Efecto de los extractos de basidiocarpo de <i>L. boryana</i> CP-519.....	129
8.5.9.2	Efecto de los extractos de micelio de <i>L. boryana</i> CP-519.....	132
8.5.9.3	Efecto de los extractos de <i>L. edodes</i> CP-7.....	133
8.5.9.4	Efecto del extracto de micelio de <i>L. edodes</i> CP-7.....	136

8.5.10	Bioensayo con la cepa CPB-13 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	137
8.5.10.1	Efecto de los extractos de basidiocarpo de <i>L. boryana</i> CP-519.....	139
8.5.10.2	Efecto de los extractos de micelio de <i>L. boryana</i> CP-519.....	142
8.5.10.3	Efecto de los extractos de <i>L. edodes</i> CP-7.....	143
8.5.10.4	Efecto del extracto de micelio de <i>L. edodes</i> CP-7.....	147
8.6	Análisis general de las cinéticas bacterianas.....	148
8.7	Caracterización morfológica de las cepas bacterianas.....	152
<b>IX.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	153
<b>X.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	164
<b>XI.</b>	<b>ESTRATEGIA PARA EL APROVECHAMIENTO DE LOS RECURSOS GENÉTICOS DEL “HONGO DE ENCINO” [<i>Lentinula boryana</i> (BERK. &amp; MONT.) PEGLER] DEBIDO A SUS PROPIEDADES FUNCIONALES</b> .....	165
<b>XIII.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	172
<b>Anexo I.</b>	<b>Abreviaturas</b> .....	177
<b>Anexo II</b>	<b>Medios para conservación y cultivo de cepas de hongos y bacterias</b> .....	178

<b>Índice de Figuras</b>		Página
<b>Figura 1.</b>	Hongo shiitake [ <i>L. edodes</i> (Berk.) Singer]. a: cuerpo fructífero, b: esporas, c: basidios, d) quelocistidio, e) elementos de la cutícula pileal (Solomon, 2005).....	10
<b>Figura 2.</b>	Estructura de glucanos de hongos: a, b y c: a-D-glucano, f y g: b-Dglucano, d y h: enlaces mixtos, e: ramificados de a-D-glucano, i y j: ramificados de b-D-glucano.....	15
<b>Figura 3.</b>	Hongos cultivados en unidades de producción en aserrín de encino. a) CP-519 <i>L. boryana</i> , b) CP-7 <i>Lentinula edodes</i> .....	21
<b>Figura 4.</b>	Metodología general de la investigación seguida en este trabajo.....	24
<b>Figura 5.</b>	Clasificación del material biológico en estudio.....	27
<b>Figura 6.</b>	Procesamiento del hongo. A) Molido, B) Sobre de papel filtro con 10 g de hongo, C) Matraz de 500 ml con 150 ml de solvente y el sobre totalmente inmerso, D) Filtrado, E) Evaporación del solvente en rotavapor, F) Aforado en matraz de 10 ml, G) Esterilizado por filtración en acrodisco 0.45mm y H) Almacenamiento en eppendorf a 4°C.....	29
<b>Figura 7.</b>	Se describen los pasos para la obtención de los extractos de <i>Lentinula</i> en los diferentes solventes.....	30
<b>Figura 8.</b>	Diagrama de la metodología para la determinación de proteínas.....	32
<b>Figura 9.</b>	Diagrama de la metodología para la determinación de polifenoles totales en microplacas. ....	34
<b>Figura 10.</b>	Distribución de las muestras en la microplaca de 96 pozos para su lectura de D.O. en la determinación de polifenoles totales.....	34
<b>Figura 11.</b>	Determinación de la actividad antioxidante por el reactivo 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH). ....	37
<b>Figura 12.</b>	Protocolo para la generación del radical catión ABTS•+.....	38
<b>Figura 13.</b>	Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS•+.....	39
<b>Figura 14.</b>	Diagrama de la metodología para la determinación de los β-carotenos... ..	40
<b>Figura 15.</b>	Ajuste de la cantidad de las bacterias a una concentración de 1x10 <sup>8</sup> bact./mL para el diseño experimental y, de 1x10 <sup>4</sup> bact./mL para verificar el inóculo con 50 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en cajas de Petri con medio de cultivo Agar Mueller Hinton.....	43
<b>Figura 16.</b>	Distribución de las microdiluciones en la microplaca para la prueba de susceptibilidad bacteriana .....	44
<b>Figura 17.</b>	Especificaciones de la inoculación de la bacteria en estudio para realizar la prueba de susceptibilidad bacteriana en esta investigación.....	45
<b>Figura 18.</b>	Vista longitudinal de la forma en que se realizó la microdilución de los extractos en la microplaca. El valor que está indicado dentro de cada pozo representa el volumen del extracto o del solvente en cada nivel o fila de la microplaca, el pozo subsecuente tiene el 50% de la concentración. El volumen total de cada pozo fue de 100 μL.....	46

<b>Figura 19.</b>	Forma en que se colocó la microplaca para evitar la pérdida de humedad	46
<b>Figura 20.</b>	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 extractos de <i>Lentinula boryana</i> y <i>L. edodes</i> en los diferentes solventes en estudio, 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.....	47
<b>Figura 21.</b>	Control de los medios de cultivo líquidos.....	49
<b>Figura 22.</b>	Cultivo de micelio de CP-7 <i>Lentinula edodes</i> en medio líquido, H: inoculado por homogenización con rotor, I: inoculado con 5 discos de 0.5 cm de diámetro. ....	51
<b>Figura 23.</b>	Cultivo de micelio de CP-492 <i>Lentinula edodes</i> en medio líquido, H: inoculado por homogenización con rotor, I: inoculado con 5 discos de 0.5 cm de diámetro.....	53
<b>Figura 24.</b>	Cultivo de micelio de CP-494 <i>Lentinula edodes</i> en medio líquido, H: inoculado por homogenización con rotor, I: inoculado con 5 discos de 0.5 cm de diámetro.....	55
<b>Figura 25.</b>	Cultivo de micelio de CP-519 <i>Lentinula boryana</i> en medio líquido, H: inoculado por homogenización con rotor, I: inoculado con 5 discos de 0.5 cm de diámetro. ....	57
<b>Figura 26.</b>	Esquema de micelio con aumento 40X.....	59
<b>Figura 27.</b>	Rendimiento de los extractos, <i>Lentinula edodes</i> CP-7, <i>L. boryana</i> CP-519 en agua M1, alcohol (tequila) M2 y agua alcohol (80:20 v:v) M3. Duncan 0.05 (n=4).....	63
<b>Figura 28.</b>	Determinación de proteínas.....	63
<b>Figura 29.</b>	Curva de calibración del ácido gálico para a: <i>Lentinula boryana</i> y b: <i>L. edodes</i> . Con réplicas (n=4).....	64
<b>Figura 30.</b>	Polifenoles totales de <i>Lentinula boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7, obtenidos por maceración en los siguientes solventes: agua (M1); alcohol (tequila) (M2) y agua: alcohol (M3). Duncan 0.05 (n=4).....	65
<b>Figura 31.</b>	Determinación de equivalentes de ácido gálico de los extractos de micelio y basidiocarpo de <i>L. boryana</i> y <i>L. edodes</i> .....	66
<b>Figura 32.</b>	Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de micelio y basidiocarpo de <i>L. boryana</i> y <i>L. edodes</i> con los controles de referencia..	66
<b>Figura 33.</b>	Determinación de antioxidantes por DPPH de los extractos de basidiocarpo de <i>Lentinula boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 en solvente hidroalcohólico al 35%.....	67
<b>Figura 34.</b>	Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de micelio y basidiocarpo de <i>L. boryana</i> y <i>L. edodes</i> con los controles de referencia.	68
<b>Figura 35.</b>	Determinación de antioxidantes por ABTS de los extractos de basidiocarpo de <i>Lentinula boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 en solvente hidroalcohólico al 35%.....	69
<b>Figura 36.</b>	Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de micelio y basidiocarpo de <i>L. boryana</i> y <i>L. edodes</i> con los controles de referencia.	70

<b>Figura 37.</b>	Determinación de antioxidantes por $\beta$ -carotenos de los extractos de basidiocarpo de <i>Lentinula boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 en solvente hidroalcohólico al 35%.....	71
<b>Figura 38.</b>	Determinación de antioxidantes por ORAC de los extractos de basidiocarpo de <i>L. boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 en solvente hidroalcohólico al 35%.....	72
<b>Figura 39.</b>	Cultivo de <i>Salmonella typhi</i> CPB-1 por microdilución en medio de cultivo Mueller Hinton a las 24 horas. ....	75
<b>Figura 40.</b>	UFC de <i>Salmonella typhi</i> CPB-1 al microscopio a las 24 horas.....	75
<b>Figura 41.</b>	Cinética de <i>Salmonella typhi</i> CPB-1, determinada por lectura de D.O. a 600 nm y UFC por conteo al microscopio en cámara de Neubauer (n=6)	76
<b>Figura 42.</b>	Efecto bacteriostático del extracto de <i>L. boryana</i> sobre <i>Salmonella typhi</i> CPB-1, a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	77
<b>Figura 43.</b>	Determinación del efecto bactericida de <i>L. boryana</i> como la inhibición del crecimiento de <i>S. typhi</i> CPB-1 a las 48 horas del experimento. a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	78
<b>Figura 44.</b>	Efecto bacteriostático del extracto de <i>L. edodes</i> sobre <i>Salmonella typhi</i> , a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	79
<b>Figura 45.</b>	Determinación del efecto bactericida de <i>L. edodes</i> como la inhibición del crecimiento de <i>S. typhi</i> a las 48 horas del experimento; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	80
<b>Figura 46.</b>	Cinética de <i>Streptococcus agalactiae</i> CPB-4 determinada por lectura de D.O. y UFC por conteo al microscopio en cámara de Neubauer (n=6)...	81
<b>Figura 47.</b>	Crecimiento de <i>Streptococcus agalactiae</i> CPB-4 por microdilución.....	82
<b>Figura 48.</b>	<i>Streptococcus agalactiae</i> CPB-4 al microscopio a las 24 horas.....	82
<b>Figura 49.</b>	Efecto del extracto de <i>Lentinula boryana</i> sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> , a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%	83
<b>Figura 50.</b>	Determinación de la CMB del extracto de <i>Lentinula boryana</i> CP-519 sobre la bacteria CPB-4 <i>Streptococcus agalactiae</i> ; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c y d: hidroalcohólico 35%.....	84
<b>Figura 51.</b>	Efecto del extracto de <i>Lentinula edodes</i> sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> CPB-4, a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	86
<b>Figura 52.</b>	Extracto de <i>Lentinula edodes</i> contra <i>Streptococcus agalactiae</i> CPB-4 en medio Mueller Hinton a las 24 horas; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	87
<b>Figura 53.</b>	Cinética de <i>Pseudomona aeruginosa</i> CPB-6 determinada por lectura de D.O. y UFC por conteo al microscopio óptico a 40x en cámara de Neubauer (n=6).....	88
<b>Figura 54.</b>	Crecimiento de <i>Pseudomona aeruginosa</i> CPB-6 por microdilución, 63 UFC. ....	89
<b>Figura 55.</b>	Cultivo de <i>Pseudomona aeruginosa</i> CPB-6 por microdilución en medio de cultivo Mueller Hinton a las 24 horas.....	89
<b>Figura 56.</b>	Efecto del extracto de <i>Lentinula boryana</i> sobre <i>P. aeruginosa</i> CPB-6, a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	90



<b>Figura 57.</b>	Cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB-6 en medio Mueller Hinton a las 48 horas, con las diferentes dosis de extracto de <i>Lentinula edodes</i> en los solventes; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%	91
<b>Figura 58.</b>	Efecto del extracto de <i>Lentinula edodes</i> sobre <i>P. aeruginosa</i> CPB-6, a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	92
<b>Figura 59.</b>	Cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB-6 en medio Mueller Hinton a las 24 horas con las diferentes dosis de extracto de <i>Lentinula edodes</i> en los solventes evaluados; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	94
<b>Figura 60.</b>	Cinética de <i>Stenotrophomona</i> CPB-7, determinada por lectura de D.O. y UFC por conteo en el microscopio óptico a 40x en cámara de Neubauer (n=6).....	95
<b>Figura 61.</b>	Cultivo de <i>Stenotrophomona</i> CPB-7 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas. a: Se observa la colonia puntiforme, b: Vista al microscopio.....	96
<b>Figura 62.</b>	Efecto del extracto de <i>Lentinula boryana</i> sobre <i>Stenotrophomona</i> CPB-7 a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	97
<b>Figura 63.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de <i>Stenotrophomona</i> CPB-7 con las diferentes dosis de extracto de <i>Lentinula boryana</i> en los solventes evaluados; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c y d: hidroalcohólico 35%.....	98
<b>Figura 64.</b>	Crecimiento de <i>Stenotrophomona</i> CPB-7 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas. ....	99
<b>Figura 65.</b>	Efecto del extracto de <i>Lentinula edodes</i> sobre <i>Stenotrophomona</i> CPB-7 a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	100
<b>Figura 66.</b>	Extracto de <i>Lentinula edodes</i> contra <i>Stenotrophomona</i> CPB-7 en medio Mueller Hinton a las 48 horas. Extractos; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	101
<b>Figura 67.</b>	Cinética de <i>Escherichia coli</i> CPB-8, determinada por lectura de D.O. y UFC por conteo en el microscopio óptico a 40X en cámara de Neubauer (n=6).....	102
<b>Figura 68.</b>	<i>Escherichia coli</i> CPB-8 al microscopio a las 24 horas.....	103
<b>Figura 69.</b>	Efecto del extracto de <i>Lentinula boryana</i> sobre <i>Escherichia coli</i> CPB-8: a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	104
<b>Figura 70.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de <i>Escherichia coli</i> CPB-8 con las diferentes dosis de extracto de <i>Lentinula boryana</i> en los solventes evaluados; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	105
<b>Figura 71.</b>	Efecto del extracto de micelio de <i>Lentinula boryana</i> sobre <i>Escherichia coli</i> CPB-8: en solvente hidroalcohólico 35%.....	106
<b>Figura 72.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de <i>Escherichia coli</i> CPB-8 con las diferentes dosis de extracto de micelio de <i>Lentinula boryana</i> en solvente hidroalcohólico 35%.....	106
<b>Figura 73.</b>	Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> CPB-8 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas.....	107

<b>Figura 74.</b>	Efecto del extracto de <i>Lentinula edodes</i> sobre <i>Escherichia coli</i> CPB-8, a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	108
<b>Figura 75.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de <i>Escherichia coli</i> CPB-8 con las diferentes dosis de extracto de <i>Lentinula edodes</i> en los solventes evaluados; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%...	109
<b>Figura 76.</b>	Efecto del extracto de <i>Lentinula edodes</i> sobre <i>Escherichia coli</i> CPB-8, en solvente hidroalcohólico 35%.....	110
<b>Figura 77.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de <i>Escherichia coli</i> CPB-8 con las diferentes dosis de extracto de micelio de <i>Lentinula edodes</i> en el solvente hidroalcohólico 35%.....	110
<b>Figura 78.</b>	Cinética de <i>Bacillus subtilis</i> CPB-9, determinada por lectura de D.O. y UFC por conteo en el microscopio óptico a 40X en cámara de Neubauer (n=6).....	111
<b>Figura 79.</b>	Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> CPB-9 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas. ....	112
<b>Figura 80.</b>	Efecto del extracto de <i>Lentinula boryana</i> sobre <i>Bacillus subtilis</i> CPB-9 a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	113
<b>Figura 81.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de <i>Bacillus subtilis</i> CPB-9 con las diferentes dosis de extracto de <i>Lentinula boryana</i> en los solventes evaluados; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	114
<b>Figura 82.</b>	Efecto del extracto del micelio de <i>Lentinula boryana</i> sobre <i>Bacillus subtilis</i> CPB-9 en solvente hidroalcohólico 35%.....	115
<b>Figura 83.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de <i>Bacillus subtilis</i> CPB-9 con las diferentes dosis de extracto del micelio de <i>Lentinula boryana</i> en el solvente hidroalcohólico 35%.....	115
<b>Figura 84.</b>	Efecto del extracto de <i>Lentinula edodes</i> sobre <i>B. subtilis</i> CPB-9 a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	116
<b>Figura 85.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de <i>Bacillus subtilis</i> CPB-9 con las diferentes dosis de extracto de <i>Lentinula edodes</i> en los solventes evaluados; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%...	117
<b>Figura 86.</b>	Efecto del extracto de micelio de <i>Lentinula edodes</i> sobre <i>B. subtilis</i> CPB-9 hidroalcohólico 35%.....	118
<b>Figura 87.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de <i>Bacillus subtilis</i> CPB-9 con las diferentes dosis de extracto de micelio de <i>Lentinula edodes</i> en el solventes hidroalcohólico 35%.....	118
<b>Figura 88.</b>	Cinética de <i>S. aureus</i> CPB-10, determinada por lectura de D.O. y UFC por conteo en el microscopio óptico a 40X en cámara de Neubauer (n=6).	119
<b>Figura 89.</b>	Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> CPB-10 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas.....	120
<b>Figura 90.</b>	Efecto del extracto de <i>Lentinula boryana</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> CPB-10, a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	121
<b>Figura 91.</b>	Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> CPB-10 en medio Mueller Hinton a las 24 horas con diferentes dosis de extracto de <i>Lentinula boryana</i> en los solventes evaluados; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	122

<b>Figura 92.</b>	Efecto del extracto de micelio de <i>Lentinula boryana</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> CPB-10, en solvente hidroalcohólico 35%.....	123
<b>Figura 93.</b>	Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> CPB-10 en medio Mueller Hinton a las 24 horas con diferentes dosis de extracto de micelio de <i>Lentinula boryana</i> en el solvente hidroalcohólico 35%.....	123
<b>Figura 94.</b>	Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> CPB-10 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas. ....	124
<b>Figura 95.</b>	Efecto del extracto de <i>Lentinula edodes</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> CPB-10, a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%....	125
<b>Figura 96.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de <i>Staphylococcus aureus</i> CPB-10 con las diferentes dosis de extracto de <i>Lentinula edodes</i> ; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	126
<b>Figura 97.</b>	Efecto del extracto del micelio de <i>Lentinula edodes</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> CPB-10, en solvente hidroalcohólico 35%.....	127
<b>Figura 98.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de <i>Staphylococcus aureus</i> CPB-10 con las diferentes dosis de extracto del micelio de <i>Lentinula edodes</i> en solvente hidroalcohólico 35%.....	127
<b>Figura 99.</b>	Cinética de <i>Listeria monocytogenes</i> CPB-11, determinada por lectura de D.O. y UFC por conteo en el microscopio óptico a 40X (n=6).....	128
<b>Figura 100.</b>	Cultivo de <i>Listeria monocytogenes</i> CPB-11 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas.....	129
<b>Figura 101.</b>	Efecto del extracto de <i>Lentinula boryana</i> sobre <i>Listeria monocytogenes</i> CPB-11, a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35% ....	130
<b>Figura 102.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de <i>Listeria monocytogenes</i> CPB-11 con las diferentes dosis de extracto de <i>Lentinula boryana</i> en los solventes evaluados; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	131
<b>Figura 103.</b>	Efecto del extracto del micelio de <i>Lentinula boryana</i> sobre <i>Listeria monocytogenes</i> CPB-11, en solvente hidroalcohólico 35%.....	132
<b>Figura 104.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de <i>Listeria monocytogenes</i> CPB-11 con las diferentes dosis de extracto del micelio de <i>Lentinula boryana</i> en el solvente hidroalcohólico 35%.....	132
<b>Figura 105.</b>	Cultivo de <i>Listeria monocytogenes</i> CPB-11 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas. ....	133
<b>Figura 106.</b>	Efecto del extracto de <i>Lentinula edodes</i> sobre <i>Listeria monocytogenes</i> CPB-11, a: acuoso (M1), b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%	134
<b>Figura 107.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton de <i>Listeria monocytogenes</i> CPB-11 con las diferentes dosis de extracto de <i>Lentinula edodes</i> ; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	135
<b>Figura 108.</b>	Efecto del extracto del micelio de <i>Lentinula edodes</i> sobre <i>Listeria monocytogenes</i> CPB-11, en solvente hidroalcohólico 35%.....	136
<b>Figura 109.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de <i>Listeria monocytogenes</i> CPB-11 con las diferentes dosis de extracto del micelio de <i>Lentinula edodes</i> ; en solvente hidroalcohólico 35%.....	137
<b>Figura 110.</b>	Cinética de <i>Pseudomona aeruginosa</i> CPB-13, determinada por lectura de D.O. y UFC por conteo en el microscopio óptico a 40X (n=6).....	138

<b>Figura 111.</b>	<i>Pseudomona aeruginosa</i> CPB-13 al microscopio a las 24 horas.....	139
<b>Figura 112.</b>	Efecto del extracto de <i>L. boryana</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB13 a: acuoso (M1), b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	140
<b>Figura 113.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB-13 con las diferentes dosis de extracto de <i>Lentinula boryana</i> ; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	141
<b>Figura 114.</b>	Efecto del extracto del micelio de <i>L. boryana</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB13 en solvente hidroalcohólico 35%.....	142
<b>Figura 115.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB-13 con las diferentes dosis de extracto del micelio de <i>Lentinula boryana</i> , en solvente hidroalcohólico 35%.....	142
<b>Figura 116.</b>	Cultivo de <i>Pseudomona aeruginosa</i> CPB-13 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas. ....	143
<b>Figura 117.</b>	Efecto del extracto de <i>Lentinula edodes</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB-13, a: acuoso (M1), b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35% .....	144
<b>Figura 118.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB-13 con las diferentes dosis de extracto de <i>Lentinula edodes</i> ; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c: hidroalcohólico 35%.....	146
<b>Figura 119.</b>	Efecto del extracto del micelio de <i>Lentinula edodes</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB-13, en solvente hidroalcohólico 35%.....	147
<b>Figura 120.</b>	Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB-13 con las diferentes dosis de extracto del micelio de <i>Lentinula edodes</i> , en solvente hidroalcohólico 35%.....	147
<b>Figura 121.</b>	Cinéticas de crecimiento de las bacterias en estudio, por lectura de D.O. en espectrofotómetro (Epoch). ....	148
<b>Figura 122</b>	Cinéticas de crecimiento de las bacterias en estudio por lectura en la cámara de Neubauer en microscopio.....	148
<b>Figura 123</b>	Efecto de los extractos de cada cepa de hongo sobre cada una de las bacterias en estudio; a: efecto bacteriostático, b: efecto bactericida. M1) acuoso, M2) hidroalcohólico 35% y M3) hidroalcohólico 20%.....	149
<b>Figura 124</b>	Actores de la estrategia para la producción y procesamiento de hongos.....	169
<b>Figura 125</b>	Principales procesos para el desarrollo de la estrategia y dar un valor agregado a los hongos comestibles, manteniendo las propiedades funcionales.....	172

<b>Índice de Cuadros</b>		Página
<b>Cuadro 1.</b>	Compuestos bioactivos y propiedades de los hongos en relación a la salud humana.....	4
<b>Cuadro 2.</b>	Efectos a la salud humana de algunos grupos funcionales.....	5
<b>Cuadro 3.</b>	Constante dieléctrica de los solventes más utilizados en extracciones.....	6
<b>Cuadro 4.</b>	Hongos con sustancias inmunomoduladoras.....	14
<b>Cuadro 5.</b>	Productos comercializados de hongos y sus principales características.....	17
<b>Cuadro 6.</b>	Cepas del género <i>Lentinula</i> utilizadas en el estudio.....	25
<b>Cuadro 7.</b>	Cepas de bacterias utilizadas en el estudio.....	25
<b>Cuadro 8.</b>	Cantidades y concentración de la curva de calibración utilizando suero de albúmina bovina. ....	31
<b>Cuadro 9.</b>	Concentraciones de ácido gálico ( $\mu\text{g/mL}$ ) en la curva de calibración de polifenoles totales.....	33
<b>Cuadro 10.</b>	Concentración de la muestra y estándares para la determinación de la actividad antioxidante con el reactivo DPPH.....	35
<b>Cuadro 11.</b>	Concentración de la muestra y estándares para la determinación de la actividad antioxidante con el reactivo ABTS.....	37
<b>Cuadro 12.</b>	Distribución de la prueba de susceptibilidad bacteriana usando extracto de hongo como agente antimicrobiano.....	45
<b>Cuadro 13.</b>	Producción de biomasa en matraces con diferentes medios de cultivo (CYM, PDB y EMB) inoculando con micelio de 0.5 cm de diámetro (I) u homogenizado (H), en condiciones de agitación o estático.....	58
<b>Cuadro 14.</b>	Producción micelial en tratamiento estático y agitación a 120 rpm en 50 ml de medio de cultivo.....	58
<b>Cuadro 15.</b>	Incubación de las cepas de <i>Lentinula</i> en 75 mL de medio líquido CYM para la producción de biomasa micelial.....	59
<b>Cuadro 16.</b>	Ciclo de las unidades de producción desde su inoculación en sustrato sólido hasta la última fructificación.....	60
<b>Cuadro 17.</b>	Biomasa deshidratada promedio de los basidiocarpos de <i>Lentinula boryana</i> y <i>L. edodes</i> .....	60
<b>Cuadro 18.</b>	Caracterización morfológica de basidiocarpos de <i>Lentinula boryana</i> y <i>L. edodes</i> . ....	61
<b>Cuadro 19.</b>	Densidad, peso residual y rendimiento de los extractos de hongos <i>Lentinula boryana</i> (CP-519) y <i>L. edodes</i> (CP-7) en los diferentes solventes. ....	62
<b>Cuadro 20.</b>	Muestra el concentrado de polifenoles por las diferentes técnicas en extractos hidroalcohólicos al 35%.....	73
<b>Cuadro 21.</b>	Concentración del extracto de <i>Lentinula boryana</i> en las diferentes microdiluciones en la microplaca.....	74
<b>Cuadro 22.</b>	Concentración del extracto de <i>Lentinula edodes</i> en las diferentes microdiluciones en la microplaca. ....	74



<b>Cuadro 23.</b>	Concentración Mínima Inhibitoria a las 24 horas de los extractos de <i>L. boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 contra <i>Salmonella typhi</i> CPB-1. ....	81
<b>Cuadro 24.</b>	Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de <i>L. boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 contra <i>S. agalactiae</i> CPB-4.....	87
<b>Cuadro 25.</b>	Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de <i>L. boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB-6.....	93
<b>Cuadro 26</b>	Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de <i>L. boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 contra <i>Stenotrophomona</i> CPB-7.....	101
<b>Cuadro 27.</b>	Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de <i>L. boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 contra <i>Escherichia coli</i> CPB-8.....	111
<b>Cuadro 28.</b>	Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de <i>L. boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 contra <i>B. subtilis</i> CPB-9.....	119
<b>Cuadro 29.</b>	Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de <i>L. boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 contra <i>Staphylococcus aureus</i> CPB-10.....	127
<b>Cuadro 30.</b>	Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de <i>L. boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 contra <i>Listeria monocytogenes</i> CPB-11.....	137
<b>Cuadro 31.</b>	Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de <i>L. boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB-13.....	147
<b>Cuadro 32.</b>	Efecto inhibitorio (bacteriostático) de las cepas de hongo comestible sobre las bacterias a las 24 horas.....	150
<b>Cuadro 33.</b>	Efecto bactericida de las cepas de hongo comestible sobre las bacterias a las 24 horas. ....	151
<b>Cuadro 34.</b>	Características morfológicas de las colonias desarrolladas en cajas de Petri con medio de cultivo Mueller Hinton agar.....	152
<b>Cuadro 35.</b>	Comparación de la producción micelial a partir de 5 núcleos de 0.5 cm de diámetro en 50 ml de medio de cultivo CYM a los 22 días en tratamiento en agitación a 120 rpm y estático.....	154

## I. INTRODUCCIÓN

La salud es uno de los principales problemas en nuestro país con enfermedades como la diabetes, la hipertensión y el colesterol que limitan para una buena calidad de vida. En los países de China y Japón a los hongos de la especie *Lentinula* se les atribuyen propiedades medicinales y el fortalecer el sistema inmune, se han utilizado para desarrollar alimentos funcionales diversos, tales como platillos, concentrados, extractos, aderezos entre otros, utilizando el micelio o cuerpos fructíferos en fresco o deshidratado. En México el hongo *Lentinula boryana* crece de manera silvestre y en producción intensiva por algunos pocos productores. Los extractos son una alternativa para dar un valor agregado a los hongos, aumentar la vida de anaquel y que se encuentre disponible para las personas que quieren consumir hongos por sus propiedades benéficas a su salud sin cambiar el sabor de los alimentos.

Con este proyecto se abrieron dos líneas de investigación en el laboratorio de biotecnología de hongos comestibles medicinales y funcionales. La primera línea se basó en la generación de extractos de hongos con concentraciones conocidas. Esto generó la posibilidad de analizar las propiedades funcionales de los hongos en estudio. La segunda línea se basó en el manejo de bacterias de interés clínico, optimizando el ajuste en la concentración de las bacterias por mililitro; con el método desarrollado se puede determinar y ajustar la concentración de cada cepa de las bacterias en tiempo real con una alta reproducibilidad, con la ventaja de obtener una concentración más exacta y rápida que con el método establecido por McFarland.

En este estudio se determinó el rendimiento de los extractos de micelio y de basidiocarpos obtenidos en diferentes solventes (agua y soluciones hidroalcohólicas al 20% y 35%), se determinaron las propiedades antioxidantes por los métodos de Folin-Ciocalteau, DPPH, ABTS,  $\beta$ -Carotenos y ORAC, la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra nueve cepas de bacterias de interés clínico. Finalmente, se presenta una estrategia para su aprovechamiento desde pequeños hasta grandes productores de hongos comestibles.

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Relevancia de los recursos genéticos para el desarrollo**

En el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) celebrado en Rio de Janeiro, Brasil, por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) en 1992, se definió como "material genético" a todo material de origen vegetal, animal o microbiano que contiene propiedades funcionales y que éstas son transmitidas por herencia. Por "recursos genéticos" se entiende como el material biológico descrito anteriormente, con valor real o potencial para satisfacer las necesidades alimentarias, de salud y de otra naturaleza de la población mundial en crecimiento (ONU, 1992). Es esencial el acceso a los recursos genéticos, las tecnologías y la participación de la población en el uso responsable de los recursos naturales; así como también la investigación de tecnologías que permitan conocer y aprovechar sus propiedades benéficas para incrementar el conocimiento científico, su comprensión y el desarrollo de productos comerciales.

### **2.2 Generalidades de los hongos**

En la naturaleza, los hongos constituyen un reino independiente al de las plantas y los animales, esto les confiere propiedades únicas y diferentes a las aportadas por otros alimentos. Algunos de ellos, debido a sus propiedades nutricionales y medicinales son clasificados como alimentos funcionales, los cuales promueven la salud del ser humano. Se estima que en el planeta hay 140,000 especies de hongos, de las cuales se conocen 22,000 especies (Stamets, 1993; Ulrike *et al.*, 2005).

Se calcula que hay 100,000 variedades de hongos, cada una con sus propias características distintivas, respecto al tamaño, forma, color, textura y compuestos, lo que les da la característica de ser comestibles, funcionales, psicotrópicos o venenosos (Mueller, 2007).

Las propiedades medicinales de los hongos comestibles, así como sus efectos benéficos en la salud humana, han sido reconocidas durante más de 2,000 años por diversas culturas en todos los continentes. En las últimas décadas, los extractos obtenidos a partir de hongos son ampliamente comercializados como nutraceuticos (Zhang *et al.*, 2007). Estos productos se encuentran en el mercado como concentrados o suplementos nutricionales, dietéticos o para mantener y mejorar la salud a través del fortalecimiento del sistema inmune y nervioso.

### **2.3 Biotecnología de los hongos comestibles**

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 de mejor sabor (Martínez-Carrera, *et al.*, 2010). 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 (Drechsler-Santos *et al.*, 2012).

### **2.4 Propiedades funcionales y medicinales de los hongos comestibles**

El sabor característico de los hongos se debe a los compuestos que contiene. Dentro de los Compuestos Orgánicos Volátiles (COV's) se encuentran los aromáticos, dentro de los Orgánicos No Volátiles (CONV's) se encuentran los aminoácidos libres y azúcares solubles. Los hongos sintetizan aminoácidos esenciales, que no pueden ser sintetizados por el cuerpo, por lo que tienen que ser suministrados en la dieta. Entre ellos se encuentran: arginina, valina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina y triptófano. Dentro de los carbohidratos encontramos la ribosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, glucosa, sucrosa y trealosa. El hongo *L. edodes* tiene 5.28 mg/g de aminoácidos esenciales y 15.68 mg/g de ácido glutámico, asimismo se identificó que en *L. edodes* no se encuentra el triptófano; en el hongo *Pleurotus ostreatus* se encontró una alta concentración de aminoácidos esenciales 19.25 mg/g (Aminuddin *et al.*, 2007; Steinmetz y Potter, 1991).

Dentro de los beneficios que aportan los hongos a la salud humana, se encuentra la estimulación al sistema inmune y al sistema nervioso. En este grupo de compuestos podemos encontrar antioxidantes, los cuales son una serie de compuestos con estructura química variada, que actúan a través de diferentes mecanismos, siendo de sus principales características su alta afinidad con los radicales libres (Pokorny *et al.*, 2003; Chen, 2008; Solan, 2008).

## 2.5 Compuestos bioactivos de los hongos funcionales y medicinales

Debido a la importancia de los prebióticos en la salud, estudios recientes han encontrado otras fuentes potenciales de obtención de los mismos. Los hongos tienen un alto potencial como prebióticos, ya que contienen hidrocarburos como quitina, hemicelulosa,  $\alpha$  y  $\beta$  glucanos, mananos, xilanos y galactanos. La quitina es un polisacárido insoluble en agua y se encuentra entre el 80 y 90% del material seco de la pared celular del hongo; son indigeribles por el humano y juega el rol de fibra dietética (Yuichi *et al.*, 2012). Hay varios registros en los cuales el extracto de los hongos *P. ostreatus* y *P. eryngii*, estimulan el crecimiento de probióticos como *Lactobacillus* spp. (4 cepas), *Bifido bacterium* spp. (3 cepas), *Enterococcus faecium* (2 cepas) (Synytsya *et al.* 2009; Aida *et al.*, 2009).

### 2.5.1 Clasificación

Algunos de los principales compuestos activos con propiedades benéficas para la salud que han sido extraídos de los hongos se muestran en la cuadro 1 (Georges, 2007).

**Cuadro 1.** Compuestos bioactivos y propiedades de los hongos en relación a la salud humana.

<b>Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Compuestos activos: <math>\beta</math>-D glucano "Lentinan", galacto glucommanano, hetero glucano proteína "LEM", eritadenina, péptidos alpha-mannan "KS-2", glycoproteína, ergosterol (Provitamina D2)</li><li>• Características medicinales: Estimula el sistema inmunológico y aumenta las defensas, preventivo contra el desarrollo de tumores, incrementa la producción de glóbulos blancos normales, tiene efectos anti virales; trata y previene la formación de cáncer; trata efectivamente el síndrome de fatiga crónica.</li></ul>
<b>Reishi (<i>Ganoderma lucidum</i>)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Compuestos activos: <math>\beta</math>-glucanos, hetero-<math>\beta</math>-glucanos, <math>\beta(1-6)</math> glucoronoglucano, mannogalactoglucano, ganoderans, ganoderico, ácidos-triterpenos ganodericos y proteínas ling zhi-8</li><li>• Características medicinales: aumenta y activa el sistema inmunológico, activa el sistema cardiovascular/respiratorio, aumenta la producción de defensas naturales, células "T" y los agentes para eliminar tumores. Como agente antitumoral: incrementa de 5 a 29 veces el factor de eliminación de tumores, estimula los linfocitos "T", es un fuerte inhibidor del crecimiento de las células de leucemia, es antioxidante, incrementa la producción de óxido nítrico a la vez que disminuye otros radicales libres. Es un anti inflamatorio utilizado en el tratamiento de artritis, es un tratamiento efectivo contra la aterosclerosis, como tratamiento para la inflamación del cerebro y como tratamiento de cirrosis por hepatitis.</li></ul>
<b>Maitake (<i>Grifola frondosa</i>)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Compuestos activos: beta glucanos, 1-6 <math>\beta</math>-glucano (grifolan), 1-4 <math>\beta</math>-D glucanos, 1-3 <math>\beta</math>-D glucanos, manogalactoglucano, mannoxyloglucano- N-cetyl galactosamina con lectina ('GFL') específica.</li><li>• Características medicinales: anti tumoral (especialmente pecho, próstata, y cáncer colorectal), antiviral (normalmente son sujetos de investigación en el tratamiento de SIDA), activador del sistema inmunológico, anti <i>Candida</i> spp., regula la presión y azúcar de la sangre, reduce el colesterol y es benéfico para pulmones.</li></ul>



---

**Phellinus (*Phellinus linteus*)**

---

- Compuestos activos: polisacáridos-ergosterol, provitamina D2- ciclofenil, heteroglicopéptidos.
  - Características medicinales: anti bacteriano, anti inflamatorio, antitumoral y antiviral
- 

Si se profundiza en el análisis de los compuestos bioactivos, se observa que cada hongo tiene una gran diversidad de compuestos. Es importante destacar que en muchos casos, el efecto biológico se consigue ingiriendo una gran cantidad de hongo. Una alternativa para poder ingerir la cantidad requerida es el purificar o aumentar la concentración del o los compuestos activos; en el cuadro 2 se muestran algunos de los grupos funcionales que se han purificado.

**Cuadro 2.** Efectos a la salud humana de algunos grupos funcionales.

Compuesto	Efecto
Lectinas	Mitogénico
Polisacáridos	Antifibrótico Antiherpético Antiinflamatorio Hepatoprotectivo Hipoglicémico Inmunomodulador Antitumoral Antioxidante
Terpenoides	Antibacterial Antiinflamatorio Antioxidante Antiviral Citotóxico
LZ-8	Hipotensivo Inmunomodulador Inmunosupresor

---

## 2.5.2 Extracción

### 2.5.2.1 Preparación de la muestra

La preparación de la muestra es un factor determinante en la recuperación de los compuestos activos. Si la muestra se deshidrata, cuando se agrega el solvente, éste entrará en las células y favorecerá la extracción de los compuestos. Si la célula se rompe por algún proceso físico como es el molido, también favorece la extracción al no estar la pared celular como barrera física. No obstante, el proceso de molido calienta la muestra, lo cual hace que algunos compuestos termolábiles pudieran ser degradados. En un estudio para comprobar el efecto de la temperatura en el proceso de molido de muestras para la recuperación de aceites

esenciales, se señala que un proceso de molido en frío con nitrógeno líquido o dióxido de carbono líquido tiene una recuperación de compuestos del 25% más que sin enfriamiento (Sharapin, 2000; Pal *et al.*, 2008).

### 2.5.2.2 Maceración

Es el método de extracción más simple, consiste en moler el producto a extraer, poniéndolo en recipientes fijos como vitroleros o garrafones, inmersos con el solvente (agua, etanol potable, tequila o coñac). El almacenamiento suele ser de 8 a 72 h, en el caso de algunas empresas farmacéuticas como Propulsora de Homeopatía, S.A. de C.V. (Similia). El tiempo de extracción es de hasta 3 meses, y se recupera el extracto por decantación, se filtra y prensa, repitiendo el paso anterior usualmente hasta tres veces.

### 2.5.2.3 Selección del solvente

Antes de iniciar un proceso de extracción, se debe definir la selectividad, polaridad o constante dieléctrica del solvente a utilizar en el proceso. Dependiendo del propósito al que se destine, se puede obtener un extracto que contenga la mayor parte de los compuestos activos, o un extracto que contenga exclusivamente los constituyentes químicos con una determinada característica. En el primer caso que son extractos generales, se utiliza un solvente polar o de constante dieléctrica alta, en el segundo caso, para compuestos selectivos, se emplea un solvente selectivo o mezcla de ellos, con una constante dieléctrica menor. En el Cuadro 3, se observa la constante dieléctrica de varios solventes.

**Cuadro 3.** Constante dieléctrica de los solventes más utilizados en extracciones.

Solvente	Constante dieléctrica (25°C)	Solvente	Constante dieléctrica (25°C)
Hexano	1.89	Diclorometano	9.14
Ciclohexano	2.02	Piridina	12.3
Tetracloruro de carbono	2.24	2-butanol	15.8
Benceno	2.28	1-butanol	17.8
Acetonitrilo	3.88	1-propanol	18.3
Éter etílico	4.34	Acetona	20.7
Cloroformo	4.87	Etanol	24.3
Acetato de etilo	6.02	Metanol	33.6
Ácido acético	6.15	Glicerina	43.0
Tetrahidrofurano	7.58	Agua	78.3

(Sharapin, 2000).

La capacidad dieléctrica o polaridad de una mezcla de solventes puede ser calculada. La constante dieléctrica del sistema depende de la constante de cada uno de los solventes y de

su respectivo porcentaje en la mezcla, se puede calcular la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) del sistema a través de la fórmula:

$$\epsilon \text{ del sistema} = \frac{\epsilon A \times \%A + \epsilon B \times \%B + \dots \epsilon n \times \%n}{100}$$

En nuestro estudio las constantes dieléctricas de los solventes fueron:

Agua: 78.3

Hidroalcohólico al 20%

$$\epsilon \text{ del sistema} = \frac{78.3 \times 80 + 60 \times 20}{100} = 74.64$$

Hidroalcohólico al 35%

$$\epsilon \text{ del sistema} = \frac{78.3 \times 65 + 60 \times 35}{100} = 71.89$$

Se han realizado pruebas de antioxidantes de *L. edodes* en diferentes extractos: éter de petróleo, acetato de etilo, agua y en metanol por diferentes métodos (Hardborne, 1984). Los extractos se obtuvieron por soxhlet a tres horas de reflujo a temperatura de ebullición, se evaporó el solvente en rotavapor y se llevó a sequedad por liofilización. Los dos primeros solventes tuvieron un rendimiento menor del 4% por lo que no se analizaron, los extractos en agua y metanol con rendimiento del 16 y 33 % respectivamente, se analizaron por el método de cuantificación de radicales atrapados por el 1,1-difenil-2-picrilhydrazil (DPPH) y por determinación de polifenoles totales con la reacción de Folin y Ciocalteau y expresado como equivalentes de ácido gálico (EAG) (Singleton *et al.*, 1965; Cheung *et al.*, 2003; Soriano-Santos *et al.*, 2006). En pruebas realizadas en *L. edodes* para determinar el efecto de la temperatura y el tiempo de extracción, se calentó el extracto acuoso a 100 y 121°C por 15 y 30 minutos. Se hicieron las determinaciones por (DDPH) y por determinación de polifenoles totales con la reacción de Folin-Ciocalteau y expresado como equivalentes de ácido gálico (EAG) (Choi *et al.*, 2006). En pruebas para determinar el método de secado de los carpóforos, se comparó entre secado al sol, microondas, liofilizado y horno. El mejor método de secado fue la liofilización. Los métodos de extracción que presentaron mejores condiciones fueron en maceración a 90°C con solvente etanol al 40% y tiempo de extracción de 2 horas (Zuofa *et al.*, 2009).

#### 2.5.2.4 Métodos de extracción de compuestos bioactivos

Una extracción de compuestos bioactivos 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. Los métodos para extraer son los siguientes:

##### Métodos tradicionales

Extracción por solventes: se basan principalmente en la selección de solventes que pueden ser soluciones hidrosolubles o alcohólicas, 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 muestra, 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. Se colocan el material y solvente, dejándolos reposar tapados durante un período de 2 a 14 días. 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. Por ejemplo 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 asistida por microonda*). Fluido supercrítico que 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 un solvente de baja viscosidad, altas tasas de difusión y sin tensión superficial (*Extracción por fluidos supercríticos*).

En la *extracción eléctrica* se aplican descargas eléctricas a la mezcla de extracción hasta un 25% al formarse burbujas de cavitación. La extracción que utiliza sonidos de alta frecuencia,

con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal se llama *extracción asistida por ultrasonido*.

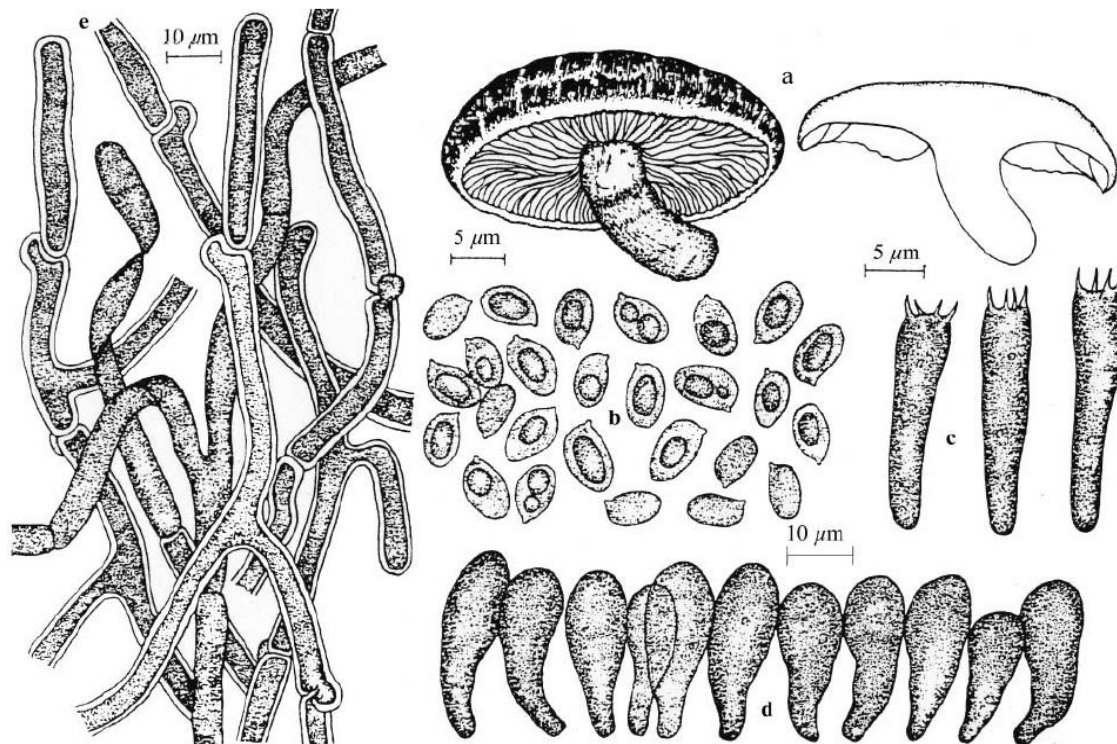
## **2.6 El género *Lentinula***

En el género *Lentinula* se encuentran 7 especies, 3 especies originarias de Asia: *L. edodes* (Berk y Mont), *L. lateritia* (Berk.) Pegler, y *L. novaezealandiae* (Stev.) Pegler y 4 especies originarias de América: *L. boryana* (Berk. & Mont.) Pegler, *L. guarapiensis* (Speg.) Pegler, *L. raphanica* (Murrill) (Mata & R.H. Petersen) y *L. aciculospora* (Mata & R.H. Petersen) (Pegler, 1975).

El género *Lentinula* se había clasificado antes de 1975 como parte del género *Lentinus*, y fue Pegler quien diferenció a *Lentinula boryana* al analizar la estructura hifal. La especie de *L. boryana* es mucho más próxima a *L. edodes* en cuanto a su estructura, pero macroscópicamente estas dos especies son diferentes y ampliamente separadas por su geografía; ubicándose *L. edodes* en el continente asiático y *L. boryana* en el continente americano en un clima intertropical. Dentro de las similitudes se encuentra el que ambos son comestibles, crecen en ramas, tocones y árboles caídos de *Quercus* (Pegler, 1975).

*L. edodes* fue la primera cepa en ser clasificada y es la más estudiada de todas (Fig. 1), es conocida como *shiitake*, proviene del japonés shii (árbol) y take (hongo) y *Lentinula aciculospora* es la última en haber sido clasificada en el 2000. El *shiitake* es considerado un excelente alimento funcional que proporciona beneficios a la salud y ayuda a prevenir o aliviar enfermedades si se consume regularmente dentro de la dieta (Martínez-Carrera *et al.*, 2004). Sus propiedades medicinales se han popularizado y comercializado en suplementos alimenticios para reducir la hipertensión y tratar enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, y artritis. Datos epidemiológicos desarrollados en Japón indicaron que el consumo de hongos comestibles está asociado a tasas inferiores de muerte por cáncer (Zhang *et al.*, 2007).

*Lentinula boryana* es un hongo que tiene estudios en su clasificación (Pegler, 1975), morfología, micromorfología (Mata, 2000) y ADN, pero a diferencia de *L. edodes* no se han realizado estudios en sus propiedades funcionales como antioxidantes ni efectos bactericidas entre otros.



**Figura 1.** Hongo shiitake [*L. edodes* (Berk.) Singer]. a: cuerpo fructífero, b: esporas, c: basidios, d) quelocistidio, e) elementos de la cutícula pileal (Solomon, 2005).

## 2.7 Efecto de los antioxidantes

El sol probé de energía necesaria para la vida en la tierra, pero también emite radiaciones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , así como rayos-x, luz ultravioleta, visible e infraroja y microondas. Relativo al estrés foto oxidativo y enfermedades relacionadas a la exposición del sol, la radiación UV y visible juega un papel muy importante, incluye la longitud de onda de 280 a 750 nm, normalmente la atmósfera retiene el 96% de esta radiación y menos del 4% toca la superficie de la tierra pero como la capa de ozono se está adelgazando, cada día es mayor la exposición a los rayos UV lo que promueve reacciones químicas en biomoléculas relevantes y genera procesos con oxígeno reactivo en tejidos de la piel. La modificación de moléculas importantes por reacciones foto oxidativas ha sido asociado a procesos patológicos en el desarrollo de varias enfermedades en los tejidos de la piel, incluyendo yagas, eritemas y cáncer (Pokorny *et al.*, 2003 y Kitzberger *et al.*, 2007), carcinogénesis y artritis reumatoide (Mujic *et al.*, 2010). Hay evidencias de que los antioxidantes consumidos en la dieta como son los carotenoides, tocoferol y ascorbatos entre otros si presentan una protección contra las reacciones foto

oxidativas. Los carotenoides y tocoferoles son eficientes para quelatar los radicales peroxilos (Pokorny *et al.*, 2003).

## **2.8 Bacterias de interés clínico**

Se han realizado algunos experimentos antibacterianos con micelio de *L. edodes* (Hearst *et al.*, 2009; Hirasawa *et al.*, 1999) y solo un trabajo reportado con micelio de *L. boryana* (De Carvalho *et al.*, 2007) para determinar el efecto bacteriostático o bactericida sobre cepas con relevancia clínica Gram positivas, como son: *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* y las Gram negativas: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *Stenotrophomona*, entre otros. Existen referencias de trabajos realizados con *L. boryana* y *L. edodes* donde se resalta la importancia de realizar estudios con las cepas de bacterias que permitan validar los resultados así como conocer los alcances del micelio de *L. boryana* sobre las bacterias y de lo más importante es el determinar el efecto antimicrobiano de los cuerpos fructíferos de los cuales para *L. boryana* no se tiene registro.

## **2.9 Mecanismos de inhibición de los extractos de hongos contra bacterias**

Los estudios existentes se enfocan en las diferentes rutas de los compuestos presentes en los extractos para la inhibición de la reproducción de virus en las células. Las rutas son llevadas a cabo por inhibidores de la entrada viral, de la síntesis de ARN, de la proteasa viral NS3, de la maduración e inhibidores a nivel de la expresión génica (Talarico, 2008).

Otros compuestos presentes son los polisacáridos naturales y sintetizados con derivados sulfatados, los cuales han sido estudiados ampliamente, debido a su efecto bioactivo.

Los compuestos  $\beta$ -glucanos presentes en los extractos, siguen el mecanismo de acción antiviral en la actividad enzimática celular; esto puede deberse a la disminución de los metabolitos producidos en la célula infectada; debido a esta actividad enzimática, se incrementa la demanda de la síntesis del RNA y DNA en las células infectadas, evitando la ruta metabólica para la producción de nucleótidos virales (Streeter *et al.*, 1973).

Los compuestos con azufre y/o fósforo en los extractos tienen actividad biológica antiviral (Wang *et al.*, 2010), y antibacteriana (Fermor *et al.*, 1981) por su efecto en la lisis de la pared celular debido al aumento en la presión osmótica y aprovechando la propiedad de que las bacterias tienen una pared débil denominada imperfecta (Yukawa *et al.*, 2012).

## 2.10 Productos funcionales y medicinales a base de hongos

En el mercado mexicano existen productores que le dan valor agregado a sus cultivos, pudiendo utilizar los hongos que por sobreproducción no pudieron acomodar en el mercado, tienen un tamaño pequeño o sufrieron algún defecto físico durante la manipulación (ruptura). Sin embargo, el número de productores que han implementado algún proceso es mínimo, en comparación a los productores que pueden aprovechar esta ventaja en sus cultivos incluyendo a los que día a día se integran en el cultivo de los hongos.

El hongo *L. edodes* es utilizado en la industria cosmética para activar las células de Langerhans con efecto benéfico en pieles sensibles y atópicas. El compuesto 1,6- $\beta$ -D-glucano presente en el hongo es hidratante y estimulante de la síntesis de colágeno. También se utiliza en cosméticos para pieles infantiles, despigmentadores y para cuidado diario de la piel (Costa, 2009). Recientemente se ha enfocado la atención en los metabolitos secundarios producidos por los hongos, principalmente por *L. edodes* con crecimiento en medio de cultivo líquido enriquecidos con nutrientes en fermentadores de laboratorio (Nikitina *et al.*, 2007).

El lentinan, es un compuesto producido por *L. edodes* (shiitake) y es el que tiene el mayor número de evidencias clínicas con actividad antitumoral (Zhong *et al.*, 2012). Los polisacáridos de los hongos no atacan a las células del cáncer directamente, su medio de acción es por activar la respuesta inmune de la persona, estimulando las células B y T, estimulando la respuesta del sistema inmune macrófago-dependiente. La acción inmuno moduladora de los polisacáridos de los hongos es principalmente por la profilaxis, prevención de metástasis y como co-tratamiento con la quimioterapia (Nikitina *et al.*, 2007). En el cultivo de micelio de *L. edodes* en medio líquido, inoculado con el hongo *Aspergillus parasiticus*, se observó la inhibición de aflotoxinas (Nikitina *et al.*, 2007).



### **III. MARCO DE REFERENCIA**

#### **3.1 Valor nutricional de *Lentinula***

El *shiitake* (*Lentinula edodes*), está ganando popularidad a través de productos nutricionales y medicinales en Asia, Europa y América. El valor nutricional de los hongos se encuentra conformado por la presencia del 19 al 35% de proteína en base seca. Contienen aminoácidos esenciales como: lisina, triptófano, leucina, vitaminas, minerales, entre 4 y 20% de fibra y poco contenido de grasa. Su contenido de carbohidratos oscila entre el 58 al 60% del peso seco (Chang y Buswell, 1997). El *shiitake* es conocido tradicionalmente por ser un hongo comestible de alto valor nutritivo, ya sea en fresco o deshidratado. Sus principales compuestos son: agua (88-92%), proteínas (20-23%), lípidos (3-4%), carbohidratos (58-60%), fibra (9-10%), vitaminas, minerales y cenizas (4-5%). Cabe destacar que la cantidad de nutrientes y compuestos activos difieren entre cepas y son afectadas por el sustrato, condiciones de fructificación y métodos de cultivo. Entre las vitaminas que contienen los hongos se encuentran: provitamina D2, ergosterol 325 mg/g de hongo seco, el cual bajo la luz UV y calor, es precursor de la vitamina D2. También contiene vitaminas del complejo B, incluyendo B1, B2, B12 y ácido pantoténico (Bisen *et al.*, 2010).

Entre los minerales presentes en el hongo seco (mg/g) se encuentran: Fe, 2.36; Mn, 1.2; K, 15.1; Ca, 22; Mg, 44-78; Cd, 0.96; Cu, 89.1; P, 281; Zn, 282; Sr, 164; Br, 11.4; Ge, 3 y Ni, 52.5 todos en (mg/g). Este contenido nutrimental los hace una excelente materia prima para la obtención de suplementos alimenticios, medicamentos y diversos tipos de productos útiles al hombre (Solomon, 2005).

#### **3.2 *Lentinula* como fuente potencial de biomoléculas**

Debido a la importancia de los prebióticos en la salud, estudios recientes han encontrado la necesidad de buscar en otras fuentes potenciales. Los hongos tienen un alto potencial como prebióticos, ya que contienen hidrocarburos como quitina, hemicelulosa,  $\alpha$  y  $\beta$  glucanos, mananos, xilanos y galactanos. La quitina es un polisacárido insoluble en agua y se encuentra entre el 80 y 90% del material seco de la pared celular del hongo; son indigeribles por el humano y juega el rol de fibra dietética (Yuichi *et al.*, 2012). Hay varios registros en los cuales el extracto de los hongos *P. ostreatus* y *P. eryngii*, estimulan el crecimiento de

probióticos como *Lactobacillus* spp. (4 cepas), *Bifido bacterium* spp. (3 cepas), *Enterococcus faecium* (2 cepas) (Synytsya *et al.* 2009; Aida *et al.*, 2009).

#### Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios que se pueden encontrar en los hongos comestibles y que presentan un efecto potencial en la salud humana son: terpenos, acetilenos, glicolípidos, policetonas, nucleósidos, sales de diazonio (Brizuela *et al.*, 1998), como se muestra en el cuadro 4 (Ulrique *et al.*, 2005) y algunos de estos metabolitos tienen efectos antioxidantes y antimicrobianos (Costa de Oliveira, 2009).

**Cuadro 4.** Hongos con sustancias inmunomoduladoras.

Nombre científico	Nombre común	Inmunomodulador	Estructura del inmunomodulador
<i>L. edodes</i>	Shiitake	Lentinan, KS-2. LEM	(1-3)- $\beta$ -D- glucano con cadenas laterales de (1-6)- $\beta$ -D-glucosílicos
<i>G. lucidum</i>	Reishi, Ling Zhi	GLP (AI), Ganopaly, Ganoderans	$\beta$ -D-Glucan, heteropolisacáridos, Glicoproteinas
<i>G. frondosa</i>	Maitake, gallina de la madera	Fracción MD	(1-6)- $\beta$ -D- glucano con cadenas laterales de (1-6)- $\beta$ -D

#### Terpenos y esteroides en hongos comestibles

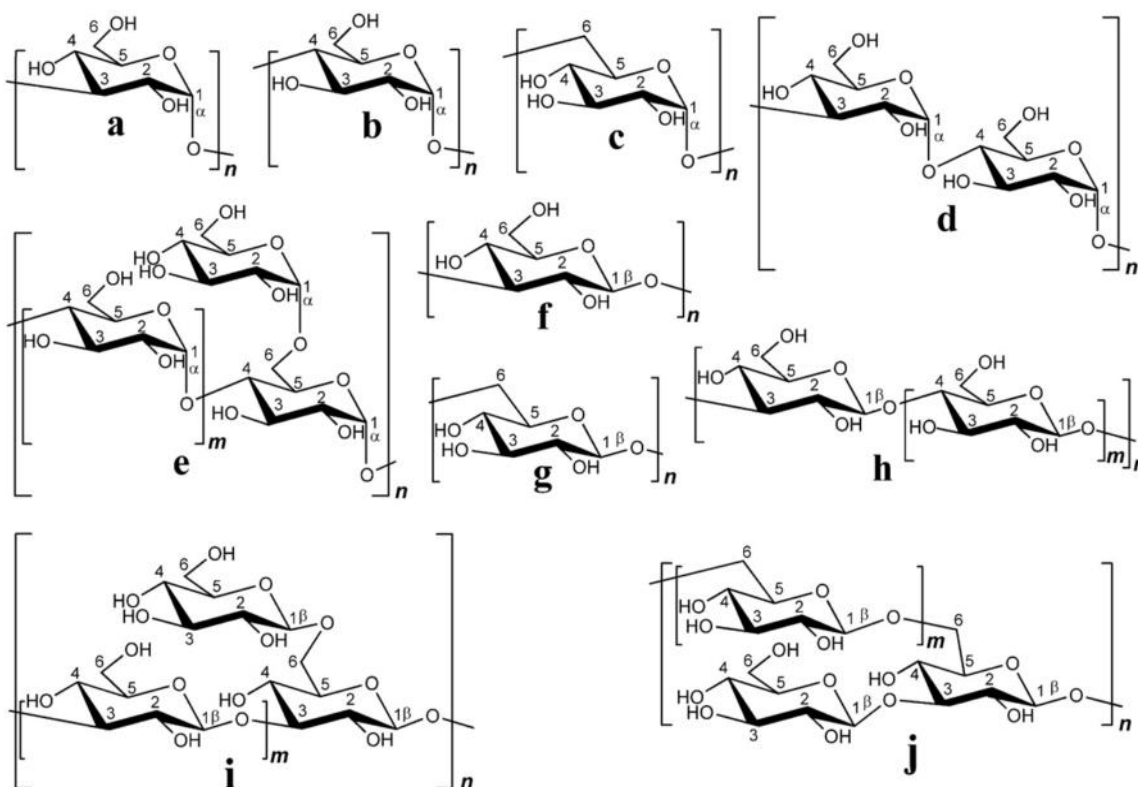
El término terpeno se refiere a un grupo de sustancias que se biosintetizan siguiendo la llamada “regla de isopreno”, diseñada por Wallach en 1866. Pueden clasificarse como monoterpenos (C 10), sesquiterpenos (C 15), diterpenos (C 20) triterpenos (C 30) y tetraterpenos (C 40), según el número de unidades de isopreno que los forman (Connolly y Hill, 1991; Herrmann, 2010).

Los monoterpenos constituyen un importante grupo de hidrocarburos, alcoholes y cetonas, que son los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales obtenidos de hojas, raíces, corteza y flores de diversas plantas. Pueden presentarse como compuestos acíclicos, monocíclicos y policíclicos (Herrmann, 2010).

#### Polisacáridos y polisacaropéptidos en hongos comestibles

Los glucanos son polímeros de la D-glucopiranososa (D-Glcp). Constituyen una parte obligatoria de la pared celular en el micelio y el cuerpo fructífero de los micro y macromicetes. En la figura 2 se muestra la estructura básica de algunos glucanos comunes, que a pesar de la simplicidad de su composición, generan una gran diversidad de compuestos

debido a su configuración que incluye: la ramificación de la cadena, repetición de las unidades de monosacáridos y la posición de enlace del glucano o grupo funcional en la cadena ramificada. Cuando se une por enlace covalente con péptidos, forma los polisacarpéptidos que son solubles en agua y con gran potencial industrial y de importancia médica (Andriy y Miroslav, 2013).



**Figura 2.** Estructura de glucanos de hongos: a, b y c: α-D-glucano, f y g: β-D-glucano, d y h: enlaces mixtos, e: ramificados de α-D-glucano, i y j: ramificados de β-D-glucano.

### 3.3 Propiedades antioxidantes de *Lentinula*

Se han realizado pruebas de antioxidantes de *Lentinula edodes* en diferentes extractos: éter de petróleo, acetato de etilo, agua y en metanol por diferentes métodos (Hardborne, 1984). Los extractos se obtuvieron por soxhlet a tres horas de reflujo a temperatura de ebullición, se evaporó el solvente en rotavapor y se llevó a sequedad por liofilización. Los dos primeros solventes tuvieron un rendimiento menor del 4% por lo que no se analizaron, los extractos en agua y metanol con rendimiento del 16 y 33 % respectivamente, se analizaron por el método de cuantificación de radicales atrapados por el 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y

por determinación de polifenoles totales con la reacción de Folin y Ciocalteau y expresado como equivalentes de ácido gálico (EAG) (Singleton *et al.*, 1965, Cheung *et al.*, 2003 y Soriano-Santos *et al.*, 2006).

En pruebas realizadas en *L. edodes* para determinar el efecto de la temperatura y el tiempo de extracción, se calentó el extracto acuoso a 100 y 121°C por 15 y 30 minutos. Se hicieron las determinaciones por (DDPH) y por determinación de polifenoles totales con la reacción de Folin-Ciocalteau y expresado como equivalentes de ácido gálico (EAG) (Choi *et al.*, 2006). En pruebas para determinar el método de secado de los carpóforos, se comparó entre secado al sol, microondas, liofilizado y horno. El mejor método de secado fue la liofilización. Los métodos de extracción que presentaron mejores condiciones fueron en maceración a 90°C con solvente etanol al 40% y tiempo de extracción de 2 horas (Zuofa *et al.*, 2009).

### **3.4 Contenido de proteínas en *Lentinula***

Las proteínas son biomoléculas formadas básicamente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Pueden además contener azufre y en algunos tipos de proteínas, fósforo, hierro, magnesio y cobre entre otros elementos. Prácticamente todos los procesos biológicos dependen de su presencia y/o actividad. Son proteínas casi todas las enzimas, catalizadores de reacciones metabólicas de las células. Existen diferentes métodos para su cuantificación los cuales pueden ir de métodos físicos hasta los químicos. Dentro de los físicos podemos encontrar la absorbancia del enlace peptídico a 190 nm, se basa en la propiedad que tiene el enlace peptídico de absorber a esa longitud de onda. Otro método físico es la absorbancia de los aminoácidos aromáticos a 280 nm, su principal limitación es que no todas las proteínas tienen la misma proporción de estos aminoácidos, lo que le resta exactitud.

Dentro de los métodos químicos tenemos la reacción de Kjeldahl, considerado históricamente como el método referencial. Otro método que se debe de tomar en cuenta es el método de Lowry, que se basa en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteau provocada por el complejo unión peptídico-Cu<sup>2+</sup> en medio alcalino con la participación de restos fenólicos (tirosilos).

Finalmente, encontramos que el método de Bradford es una técnica sensible que consiste en la medición del cambio en el espectro visible de un colorante (Coomasie Blue G-250) cuando éste se une a las proteínas (lectura a 595 nm). Esta unión se realiza a través de grupos

ionizados y se comprueba proporcionalidad con la concentración de proteínas contenidas en la muestra. Para construir la curva de calibración se requiere contar con una solución testigo de proteína de concentración conocida (generalmente se utiliza albúmina sérica bovina (BSA)). Se preparan por lo menos 4 tubos testigos con distintas cantidades de proteínas (T1, T2, T3 y T4) y otro tubo denominado blanco (agua). En forma simultánea, se procesan las muestras a determinar.

### 3.5 Productos a base de hongos con valor agregado

En el mercado mexicano existen productores que le dan valor agregado a sus cultivos, sin embargo, el número de productores que han implementado algún proceso es mínimo, en comparación a los productores que pueden aprovechar esta ventaja en sus cultivos y que día a día siguen adoptando el cultivo de los hongos.

**Cuadro 5.** Productos comercializados de hongos y sus principales características.

Nombre de la empresa:	Irlany-D
Nombre del producto:	Extractor R4
Hongos como ingredientes:	<i>Agaricus</i> , <i>Coriolus</i> , Reishi, Shiitake, Plantas mexicanas
Funcionalidad:	Anticancerígeno y estimulador inmunológico
Precio:	\$380
Presentación:	Gotero 60 ml
Localidad de la empresa:	Monterrey, N.L.

Nombre de la empresa:	Pilz
Nombre del producto:	Hongo Michoacano
Hongos como ingredientes:	Reishi
Funcionalidad:	Antioxidante, antibacteriano, antiviral, moderador del azúcar en la sangre, potenciador inmunológico
Localidad de la empresa:	HongoMex® A.P.# 6, Cerro del Fortin, Calle María Sabina, Huautla de Jiménez, C.P. 68507 Michoacán. México

Nombre de la empresa:	Oishii Take
Nombre del producto:	Condimentos y especias varias
Hongos como ingredientes:	Shiitake
Funcionalidad:	Potenciador inmunológico
Localidad de la empresa:	Chipilo, Puebla

Nombre de la empresa:	Setas
Nombre del producto:	Pomada, jabón
Hongos como ingredientes:	<i>Pleurotus</i>
Funcionalidad:	antioxidante, antibacteriano
Localidad de la empresa:	Puebla

El hongo *L. edodes* es utilizado en la industria cosmética para activar las células de Langerhans con efecto benéfico en pieles sensibles y atópicas. El compuesto 1, 6 -1,3  $\beta$ -glucano presente en el hongo es hidratante y estimulante de las síntesis de colágeno. También se utiliza en cosméticos para pieles infantiles, despigmentadores y para cuidado diario de la piel (Costa, 2009).

Recientemente se ha enfocado la atención en los metabolitos secundarios producidos por los hongos, principalmente por *L. edodes*. La producción de *L. edodes* se ha modernizado con técnicas de cultivo cada vez mejores, pero la más estable en cuanto a la calidad de los nutrientes es por el crecimiento en medio de cultivo líquido en fermentadores de laboratorio (Nikitina *et al.*, 2007). El lentinan, es un compuesto producido por *L. edodes* (shiitake) y es el que tiene el mayor número de evidencias clínicas con actividad antitumoral (Zhong *et al.*, 2012). Los polisacáridos de los hongos no atacan a las células del cáncer directamente, su medio de acción es por activar la respuesta inmune de la persona, estimulando las células B y T, estimulando la respuesta del sistema inmune macrófago-dependiente. La acción inmunomoduladora de los polisacáridos de los hongos es principalmente por la profilaxis, prevención de metástasis y como co-tratamiento con la quimioterapia (Nikitina *et al.*, 2007). En el cultivo de micelio de *L. edodes* en medio líquido, inoculado con el hongo *Aspergillus parasiticus*, se observó la inhibición de aflotoxinas (Nikitina *et al.*, 2007).

### **3.6 Producción de biomasa de *Lentinula boryana* y *L. edodes***

El micelio crece en medio de cultivo PDA a temperaturas de 20 a 28°C, en pH de 3.8 a 7.2 y no precisamente requiere de una fuente externa de nitrógeno, aunque si le favorece el enriquecer el medio de cultivo con extracto de malta al 0.5%, en el estudio de Faria, 2003 se observa que *L. edodes* normalmente crece más rápido que *boryana*, aunque de 20 a 22 °C *boryana* presenta un mejor crecimiento; el pH no muestra ningún efecto en el crecimiento para ninguna de las dos especies y finalmente el enriquecer el medio de cultivo tuvo su principal aportación con malta al 0.5%.

### **3.7 Estudios de las propiedades funcionales del hongo *Lentinula***

Se han realizado estudios del micelio de *Lentinula edodes* (LEM) sobre ratones y estos han probado eficacia en melanoma subcutáneo en células T mediante la inmunosupresión mediada por Treg y reducción de cáncer de colon (Tanaka *et al.*, 2012). Esta registrado que ayuda contra enfermedades hepáticas (Yukawa *et al.*, 2012; Mizoguchi y Yamamoto, 1985), el extracto del micelio de *L. edodes* tiene efecto antitumoral (Zhong *et al.*, 2012). El extracto de la piel (color café) del píleo de *L. boryana* se ha estudiado por tener tyrosinasa y L-dopa, que son compuestos contra el tratamiento del mal de Parkinson (Faria *et al.*, 2007; Halaouli *et al.*, 2005). En animales mayores se ha estudiado el efecto del hongo sobre la flora bacteriana (Van *et al.*, 2003).

En la determinación de la actividad antioxidante se hacen pruebas en diferentes concentraciones para determinar la concentración requerida de muestra para inhibir un efecto al 50% (IC 50%), cabe destacar que entre menor sea la cantidad de material requerido para alcanzar el 50% de efecto, la muestra es más eficiente. Para determinar la magnitud de la actividad antioxidante, Lee *et al.*, (2008) reportó que todo extracto que tenga efecto antioxidante (IC 50%) con una concentración menor a 10 mg/mL es considerado un antioxidante efectivo. Por sus propiedades antioxidantes se han realizado estudios en extractos etanólicos de los basidiocarpos de *Lentinula edodes* por la técnica de DPPH determinando que *L. edodes* tiene un efecto de inhibición al 50% (IC 50%) con 0.198 mg/mL (Mujic *et al.*, 2010) y 0.283 mg/mL (Sushila *et al.*, 2014) a lo que en base a lo establecido por Lee, los autores consideraron una actividad antioxidante muy alta.

### **3.8 Propiedades antimicrobianas de *Lentinula***

El hongo *Lentinula edodes* (shiitake) contiene compuestos sulfatados derivados del lentinán, estos compuestos presentan un efecto antibacteriano y antiviral contra el virus de la bronquitis aviar. La sustitución del compuesto sulfatado, presenta una relación directa del efecto de inhibición viral, respecto al peso de la molécula en sustitución (Wang *et al.*, 2010; Rojas 2012).

Mecanismos de inhibición de los extractos de hongos contra bacterias

Los estudios existentes se enfocan en las diferentes rutas de los compuestos presentes en los extractos para la inhibición de la reproducción de virus en las células. Las rutas son llevadas a cabo por inhibidores de la entrada viral, de la síntesis de ARN, de la proteasa viral NS3, de la maduración e inhibidores a nivel de la expresión génica (Talarico, 2008).

Otros compuestos presentes son los polisacáridos naturales y sintetizados con derivados sulfatados, los cuales han sido estudiados ampliamente, debido a su efecto bioactivo.

Los compuestos  $\beta$ -glucanos presentes en los extractos, activan el mecanismo de acción antiviral enzimática celular; esto puede deberse a la disminución de los metabolitos producidos en la célula infectada. Debido a esta actividad enzimática, se incrementa la demanda de la síntesis del RNA y DNA en las células infectadas, evitando la ruta metabólica para la producción de nucleótidos virales (Streeter *et al.*, 1973).

Los compuestos con azufre y/o fósforo son de los métodos más comunes y eficientes con actividad biológica antiviral (Wang *et al.*, 2010) y antibacteriana (Fermor *et al.*, 1981) por su efecto en la lisis de la pared celular debido al aumento en la presión osmótica y aprovechando la propiedad de que las bacterias tienen una pared débil denominada imperfecta (Yukawa *et al.*, 2012).

### **3.9 Estudios *in vitro* con bacterias de interés clínico**

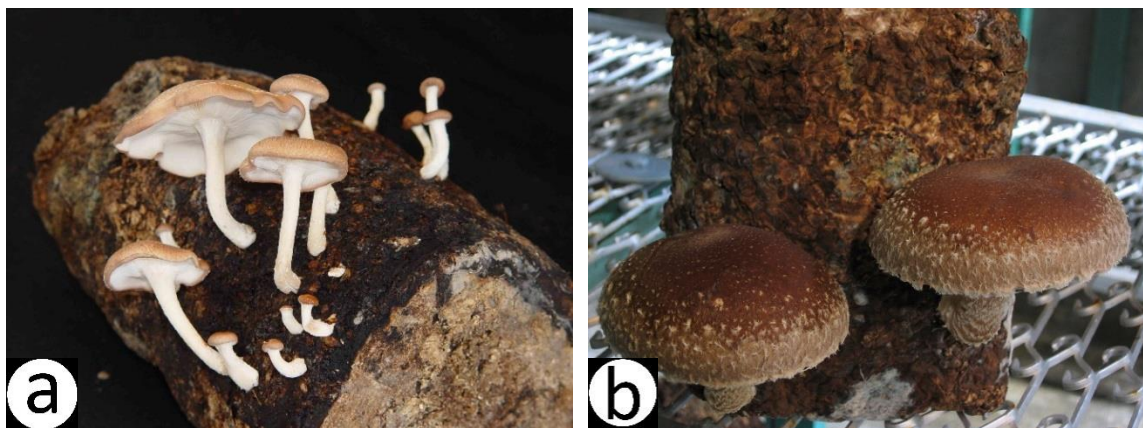
Se han realizado algunos experimentos antibacterianos con micelio de *L. edodes* (Hearst *et al.*, 2009; Hirasawa *et al.*, 1999) y solo un trabajo reportado con micelio de *L. boryana* (De Carvalho *et al.*, 2007) para determinar el efecto bacteriostático o bactericida sobre cepas con relevancia clínica Gram positivas, como son: *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* y las Gram negativas: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *Stenotrophomona*, entre otros. Existen referencias de trabajos realizados con *L. boryana* y *L. edodes* donde se



resalta la importancia de realizar estudios con las cepas de bacterias que permitan validar los resultados así como conocer los alcances del micelio de *L. boryana* sobre las bacterias y de lo más importante es el determinar el efecto antimicrobiano de los cuerpos fructíferos de los cuales para *L. boryana* no se tiene registro.

### 3.10 El cultivo de *Lentinula* en México

Por parte de pequeños y medianos productores de hongos comestibles ubicados en diversos estados de la república ha habido intentos intermitentes por cultivar *Lentinula edodes*, sin embargo a la fecha no se ha logrado consolidar su producción comercial y consistente a gran escala, en parte debido a la falta de investigaciones de corte básico y aplicado para adaptar los métodos tradicionales o modernos de cultivo a las condiciones locales, así como a la falta de una estrategia que considere el desarrollo de un paquete tecnológico integral que considere entre otros aspectos el biotecnológico y el comercial, de forma que permita la inversión empresarial y la concientización del mercado consumidor en el cual se destaquen sus propiedades funcionales y medicinales, teniendo como consecuencia positiva el poder disfrutar de una mejor calidad de vida (Sobal *et al.*, 2010). En la figura 3 se muestran unos ejemplares de las unidades de producción de *Lentinula* en su primer etapa de fructificación.



**Figura 3.** Hongos cultivados en unidades de producción en aserrín de encino suplementados con otras maderas; en el módulo experimental del Colegio de Postgraduados. a) CP-519 *Lentinula boryana*, b) CP-7 *Lentinula edodes*.

#### **IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

Uno de los principales problemas de los productores de hongos comestibles es la falta del desarrollo de una estrategia que permita su máximo aprovechamiento y agregación de valor. Asimismo, no existen estudios que determinen las propiedades funcionales de *Lentinula boryana*, conocido como “hongo de encino” por las comunidades rurales, el cual constituye un recurso genético importante nativo de México.

En la actualidad unos pocos productores recurren a darle un valor agregado a sus hongos comestibles haciendo extractos con equipos que eventualmente les pueden prestar algunas universidades. Sin embargo, no les es posible producir un extracto de buena calidad en las cantidades que les exige el mercado.

En la presente investigación se ofrece una alternativa que consiste en estandarizar un método sencillo de elaboración de extractos de *L. boryana* en forma accesible para los productores de hongos comestibles, generando evidencia científica sobre sus propiedades funcionales y medicinales. Se tomó como referencia *L. edodes*, especie filogenéticamente cercana y muy apreciada en el sureste asiático por sus propiedades medicinales, anticancerígenas, antidiabéticas, y anticolesterolémicas, entre otras. Se realizó un análisis del extracto con diferentes solventes y se estudiaron algunas de sus propiedades funcionales (antioxidantes, antibacterianas), específicamente el rendimiento, el contenido de proteínas y polifenoles totales, así como las pruebas de susceptibilidad contra nueve bacterias de interés clínico. Los solventes analizados fueron agua, alcohol al 20% y 35% v/v. Se realizaron pruebas de cuantificación de antioxidantes presentes en los extractos con diferentes técnicas y se realizó la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida.

## **V. HIPÓTESIS**

Los extractos del hongo comestible nativo de la especie *Lentinula boryana* tienen propiedades funcionales diferentes de aquellas obtenidas en *L. edodes*, basadas en la determinación de antioxidantes y propiedades antibacterianas en diferentes solventes.

## **VI. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

Analizar las propiedades antioxidantes y antibacterianas de diferentes extractos de *Lentinula boryana*, importante recurso genético de los bosques de niebla de México, en forma comparativa con una cepa comercial de *L. edodes*, a fin de generar un método estandarizado para la obtención del extracto y con éste una estrategia que permita su aprovechamiento por productores de hongos comestibles.

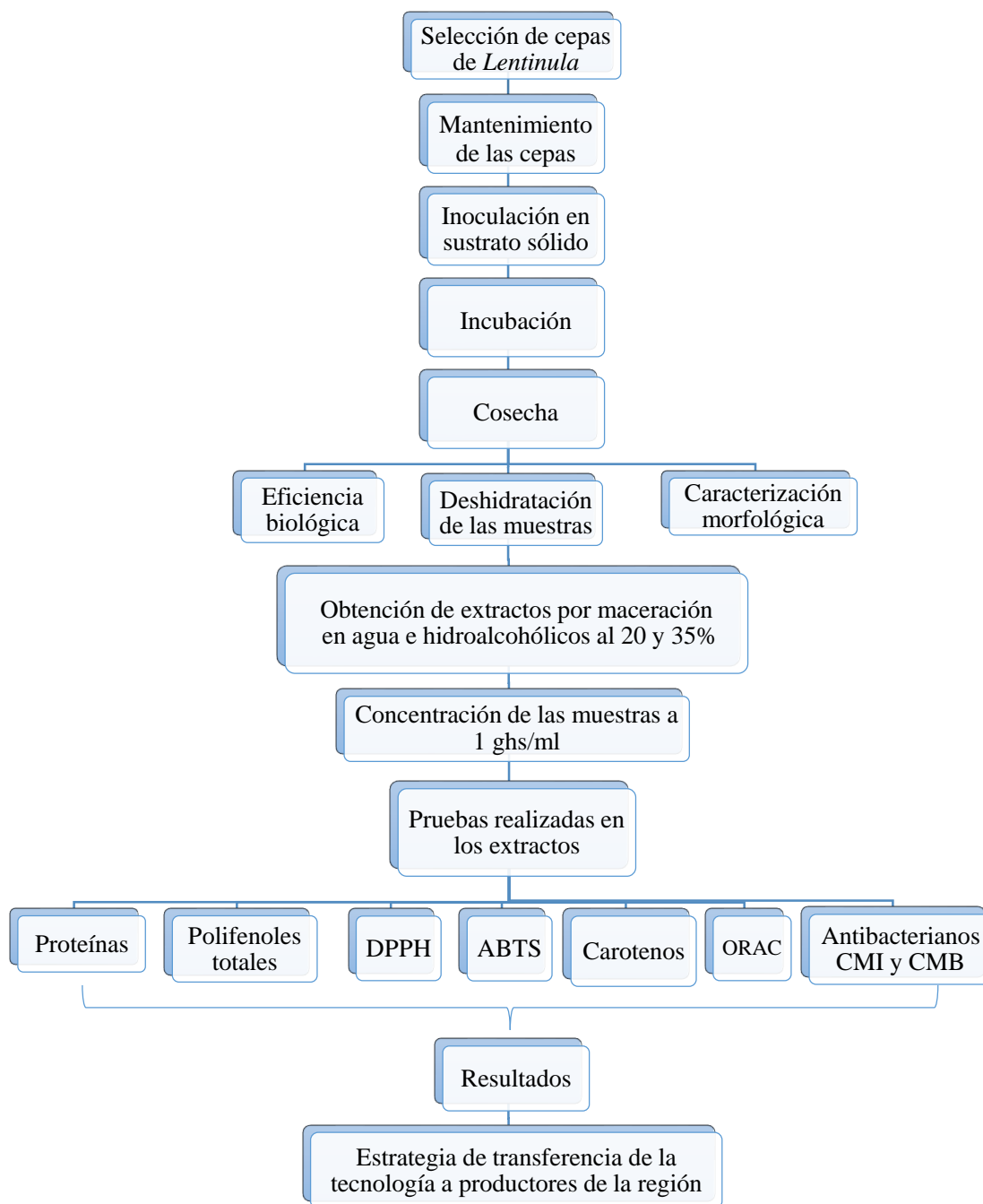
### **6.2 Objetivos particulares**

- 1) Determinar a través de diferentes protocolos las propiedades antioxidantes de los extractos de *L. boryana* y *L. edodes* obtenidos por diferentes solventes.
- 2) Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos estudiados de *L. boryana* y *L. edodes*, en relación con nueve cepas bacterianas de interés clínico.
- 3) Desarrollar una estrategia para que los productores de hongos comestibles puedan darle un valor agregado a los hongos que cultivan, mediante la elaboración de extractos, manteniendo las propiedades funcionales estudiadas.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Metodología general del proyecto

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio y módulo experimental del área de biotecnología de hongos comestibles, medicinales y funcionales, del Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla. El diagrama general de trabajo se muestra en la figura 4.



**Figura 4.** Metodología general de la investigación seguida en este trabajo.

## 7.2 Material biológico

### 7.2.1 Cepas de hongos comestibles y bacterias estudiadas

El material biológico utilizado es parte del Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGENHCFyM) del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. En los cuadros 6 y 7 se enlista el material biológico utilizado.

**Cuadro 6.** Cepas del género *Lentinula* utilizadas en el estudio.

Registro	Género y especie	Procedencia
CP-7	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.)	Hong Kong, China
CP-519	<i>Lentinula boryana</i> (Berk. & Mont. Pegler)	Veracruz, México

Las bacterias utilizadas fueron adquiridas en American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA, E.U.A. y por convenio con la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), como se detalla en el cuadro 7.

**Cuadro 7.** Cepas de bacterias utilizadas en el estudio.

Registro	Especie	Gram	Procedencia
CPB-1	<i>Salmonella typhi</i> (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar	-	Donación Cs. Qs. BUAP
CPB-4	<i>Streptococcus agalactiae</i> Lehmann and Neumann	+	Donación Cs. Qs. BUAP
CPB-6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula	-	Donación Cs. Qs. BUAP
CPB-7	<i>Stenotrophomona</i> (Hugh) Palleroni and Bradbury	-	Donación Cs. Qs. BUAP
CPB-8	<i>Escherichia coli</i> (Migula) Castellani and Chalmers	-	ATCC 25922
CPB-9	<i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn	+	ATCC 6633
CPB-10	<i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach	+	ATCC 25923
CPB-11	<i>Listeria monocytogenes</i> (Murray <i>et al.</i> ) Pirie	+	ATCC 19111
CPB-13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula	-	ATCC 27853

### 7.2.2 Obtención de biomasa de *Lentinula boryana* y *L. edodes* en medios de cultivo líquido y dos condiciones de incubación

Obtención de biomasa en medio agar

Para obtener el micelio de las cepas CP-519 *L. boryana* y CP-7 *L. edodes* se cultivaron inicialmente en medio PDA en cajas de Petri de 60 x 100. Se incubaron en obscuridad a temperatura ambiente (22°C) por aproximadamente de 25 a 30 días, dependiendo de la velocidad de crecimiento de la cepa. Posteriormente el micelio se fraccionó en inóculos de 0.5 cm de diámetro y con ayuda de una aguja de disección se separó el micelio del agar semisólido para su uso en el cultivo de biomasa micelial en medio líquido PDB. Estos inóculos también se utilizaron para su propagación en trigo, para posteriormente usarlos como semilla para inocular el substrato sólido a base de aserrín, formulación Colpos-17 (Anexo II).

#### Obtención de biomasa micelial en medio líquido

Para obtener el micelio de las cepas estudiadas, se cultivaron a partir del micelio desarrollado en medio PDA en cajas de Petri. Se utilizó el medio de cultivo líquido PDB en frascos de 100 ml con volumen de 20 ml de medio cada uno y se agregaron 5 círculos de 0.5 cm de diámetro cada uno en dos diferentes modalidades 1) en inóculos como se encuentran los discos y 2) homogenizado por 3 segundos para que se dispersen las hifas. Se incubaron a temperatura ambiente (22°C), por aproximadamente de 25 a 30 días en una repisa sin agitación y otros en una incubadora con agitación, el tiempo de incubación dependió de la velocidad de crecimiento de la cepa.

#### **7.2.3 Caracterización de la biomasa**

Para la caracterización del micelio se utilizó un microscopio estereoscópico marca Zeiss, con el objetivo de encontrar y medir las estructuras características del micelio de los hongos basidiomicetos (fíbulas). La medición se llevó a cabo con ayuda de la reglilla del microscopio.

#### **7.2.4 Producción de basidiocarpos de *Lentinula boryana* y *L. edodes* en substrato sólido estéril**

En el caso de los hongos *L. boryana* y *L. edodes* CP-519 y CP-7, respectivamente, se sembraron las cepas en medio PDA en cajas de Petri. Posteriormente el micelio se pasó a frascos con 200 g de trigo cosido y estéril con cal y yeso (Anexo II). Una vez que el micelio invadió todo el trigo, se mezcló con el substrato sólido a base de aserrín en bolsas de 3 kg con la formulación Colpos-17 (Anexo II). Las bolsas inoculadas se incubaron por un tiempo de 3 a 3.5 meses, hasta la formación de una costra color café. Las Unidades de Producción

(UP) se indujeron por medio de un choque térmico sumergiéndolos en agua fría por 8 horas. Las UP se cultivaron en el módulo de producción experimental por un periodo de 3 hasta 6 meses. El módulo de producción se mantuvo en condiciones controladas de ventilación, temperatura promedio de 21°C y humedad relativa del 73%, con 2 ó 3 riegos al día. Aproximadamente a los 23 días del choque térmico se realizó el primer corte de basidiocarpos, el riego se mantuvo por tres semanas y se indujeron nuevamente con un segundo choque térmico. Se realizó un segundo corte un mes después de la inducción y se repitió el proceso para obtener una tercera cosecha.

### 7.2.5 Cosecha y caracterización de los basidiocarpos

Una vez que se desarrollaron los cuerpos fructíferos y antes de su esporulación, se realizó el primer corte y al momento se caracterizaron por tamaño y peso (Fig. 5).



**Figura 5.** Clasificación del material biológico en estudio; G1 menores de 3 cm, G2 de 3.1 a 7 cm y G3 mayores de 7 cm.

La clasificación de los hongos se basó en la guía del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Medicinales y Funcionales del Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*. Para la cepa CP-7 *Lentinula edodes* la clasificación fue con base en el peso: menores de 3 g (G1), de 3.1 a 7 g (G2) y mayores de 7.1 g (G3). Para la cepa CP-519 *Lentinula boryana* la

clasificación fue por tamaño: menores de 3 cm (G1), de 3.1 a 7 cm (G2) y mayores de 7 cm (G3). También se registró el número de hongos cortados y peso del total cosechado por cada grupo “G” de cada bloque; finalmente se midió el largo y ancho del píleo y del estípite.

### **7.2.6 Preparación de las muestras**

Los basidiocarpos se rebanaron en cortes de 3 mm de espesor y se deshidrataron en horno de secado a una temperatura menor de 40°C para evitar cualquier degradación de compuestos activos termolábiles. Posteriormente, se guardaron en bolsas de poliuretano de alta densidad selladas con la menor cantidad de aire posible y se almacenaron a -26°C hasta su uso. A partir del hongo seco, se colocaron 3.5 g en un vaso de licuadora (marca Osterizer), la muestra se molió en seco, con 2 pulsos de 10 s cada uno para evitar que se caliente la muestra. Se colocaron 10 g del hongo molido en bolsas plásticas selladas y se almacenaron a -26°C hasta su uso (Fig. 6A). Para su uso, el hongo molido se trasvasó a sobres de papel filtro poro medio de 6.5 cm x 9.0 cm con las orillas cosidas con hilo blanco marca Seralón (Fig. 6B).

### **7.3 Maceración de las muestras en diferentes solventes**

En un matraz de 500 ml con boca ancha, se colocó un sobre de papel filtro con la muestra de hongo a extraer y 150 ml del solvente (agua; hidroalcohólico al 20%, o hidroalcohólico al 35%), esto se realizó por triplicado (Fig. 6C). La muestra se dejó reposar por 24 horas, con uso de guantes, se exprimió el sobre con el extracto hasta obtener un peso húmedo aproximado de 20 g. El solvente se filtró con papel filtro de poro medio (Fig. 6D).

#### **7.3.1 Concentración de los macerados para la obtención de los extractos**

El macerado se concentró en un rotavapor marca Hanshin (Fig. 6E) a presión reducida y temperatura de 38°C y 90 rpm hasta obtener un peso aproximado de 7 g, con un volumen menor de 10 ml (Fig. 6F), se aforó a 10 ml con el mismo tipo solvente (nuevo), el cual también se utilizó para el lavado del matraz en el que se concentró el extracto.

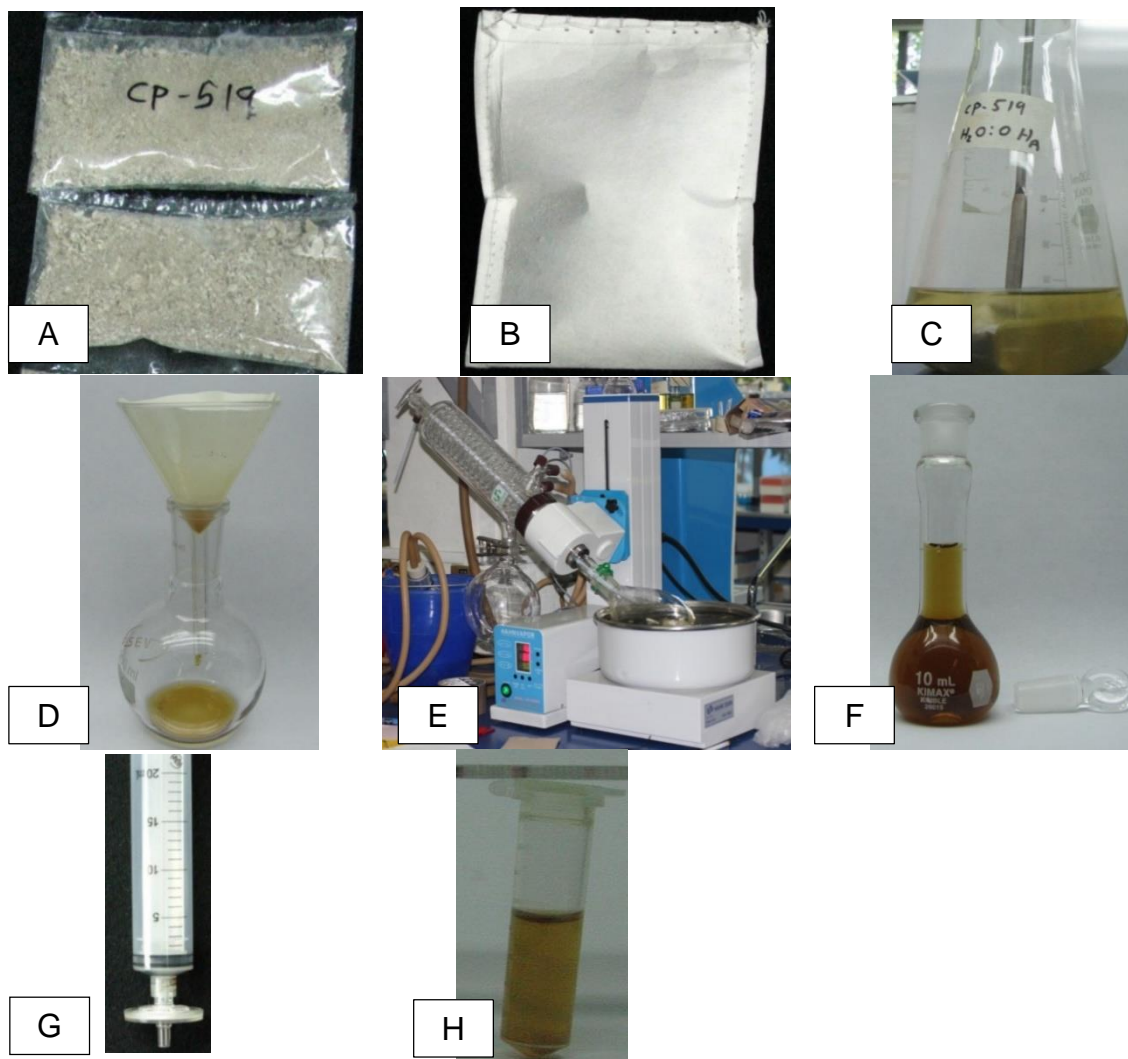
#### **7.3.2 Obtención de los extractos**

Las muestras maceradas de cada uno de los hongos *Lentinula* en cada uno de los diferentes solventes, cuando fueron concentradas en el rotavapor y aforadas en un matraz volumétrico a 10 mL, recibieron el nombre de “extracto”.



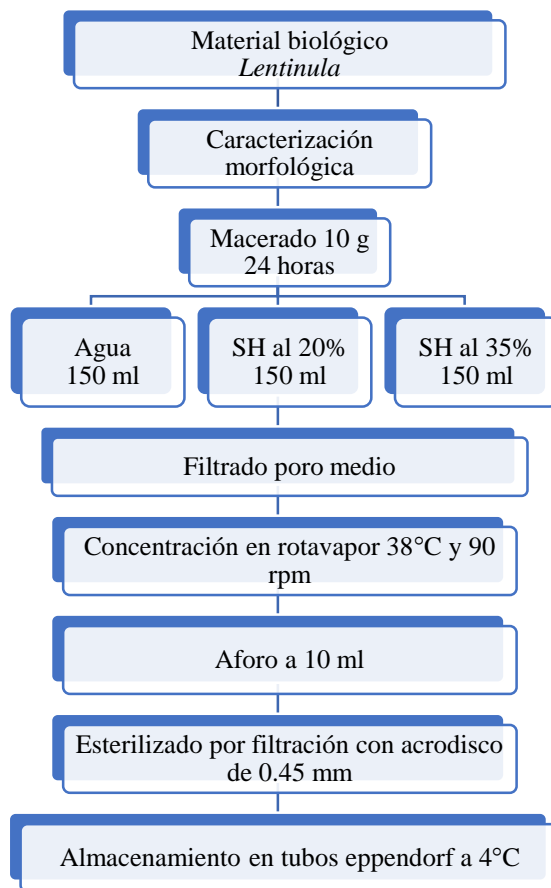
#### 7.4 Esterilización de los extractos

El extracto se esterilizó por microfiltración con acrodiscos de 0.45 $\mu$ m (Fig. 6G) colectándose directamente en tubos eppendorf de 2 ml nuevos y estériles (Fig. 6H), en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar; se almacenó a 4°C hasta su uso.



**Figura 6.** Procesamiento del hongo. A) Molido, B) Sobre de papel filtro con 10 g de hongo, C) Matraz de 500 mL con 150 mL de solvente y el sobre totalmente inmerso, D) Filtrado, E) Evaporación del solvente en rotavapor, F) Aforado en matraz de 10 mL, G) Esterilizado por filtración en acrodisco 0.45 mm y H) Almacenamiento en eppendorf a 4°C.

En el diagrama de flujo (Fig. 7), se describen los pasos para la obtención de los extractos de *Lentinula* en los diferentes solventes.



**Figura 7.** Se describen los pasos para la obtención de los extractos de *Lentinula* en los diferentes solventes. SH= Solución hidroalcohólica.

#### 7.4.1 Densidad del extracto

Para obtener la densidad de los extractos se tomó en cuenta que por su definición, la densidad es la relación del peso de la muestra en un volumen determinado.

$$Densidad = \frac{\text{peso de la muestra}}{\text{volumen de la muestra}}$$

Con apoyo de una micropipeta de 1 ml (marca Thermo Scientific, Finnpiquette) se registró el peso de 0.5 mL de extracto en una balanza analítica (marca Ohaus). Para llevar las unidades a 1 mL, el peso promedio de cinco muestras (n=5) se dividió entre el volumen utilizado en cada muestra 0.5.

#### 7.4.2 Rendimiento de los extractos

De los extractos obtenidos por los diferentes solventes y con apoyo de una micropipeta de 1 ml (marca Thermo Scientific, Finnpiquette) se pusieron 0.5 mL en cajas de Petri previamente pesadas (n=5). Se evaporó el disolvente a temperatura de 38°C hasta sequedad y peso

constante, siendo el rendimiento la relación del peso residual sobre el volumen del extracto que se llevó a sequedad multiplicado por 100.

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{peso de la muestra seca}}{\text{volumen de la muestra}} \times 100$$

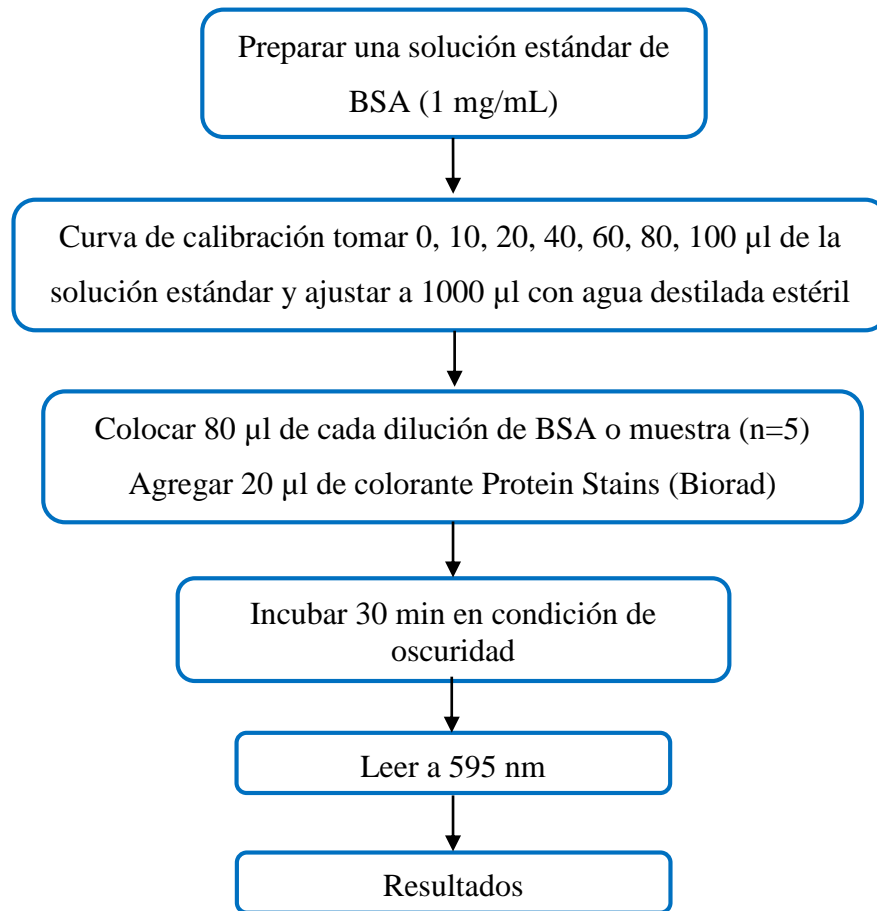
### 7.5 Determinación de proteínas en los extractos

Se preparó una solución Stock de Albúmina de Suero Bovino (BSA) con concentración (1 mg/mL) en un tubo eppendorf de 2 mL, se pesó 1 mg de albúmina de suero bovino en 1 mL de agua destilada y se agitó en vortex por 1 minuto. Se preparó la curva de calibración con concentraciones conocidas (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL) (cuadro 8), La muestra a analizar también se diluyó en las mismas concentraciones que el BSA (cuadro 8, Fig. 8).

Distribución en la microplaca: La curva de calibración se dispuso en las tres primeras columnas. A partir de las siguientes columnas se agregaron las muestras con réplicas (n=3). En cada pozo de la microplaca se colocaron 80 µl de muestra a analizar o curva de calibración, se agregaron 20 µl de colorante (Bio-Rad protein stains), se homogenizó cada muestra, por lo cual fue necesario utilizar puntas nuevas en cada muestra. En caso de haber burbujas hay que eliminarlas con ayuda de un alfiler metálico. Se dejaron reaccionar durante 30 minutos en oscuridad previo a su lectura en el espectrofotómetro “EPOCH” a la longitud de onda de 595 nm. El espectrofotómetro UV (EPOCH) cuenta con el “protocolo protein stains” integrado, por lo cual en automático analizó y generó el valor de la concentración correspondiente a cada muestra en forma directa.

**Cuadro 8.** Cantidades y concentración de la curva de calibración utilizando suero de albúmina bovina.

Solución Estándar		Solución Stock (mg/mL)		H <sub>2</sub> O (mL)	
(µg/mL)	(mg/mL)	(mL)	(µl)	(mL)	(µl)
10	0.01	0.001	10	0.990	990
20	0.02	0.002	20	0.980	980
40	0.04	0.004	40	0.960	960
60	0.06	0.006	60	0.940	940
80	0.08	0.008	80	0.920	920
100	0.1	0.01	100	0.900	900



**Figura 8.** Diagrama de la metodología para la determinación de proteínas.

### 7.6 Determinación de los polifenoles totales en los extractos

Reactivos para la determinación de polifenoles totales

Para la cuantificación de los polifenoles totales como equivalentes de ácido gálico, se prepararon los siguientes reactivos.

Solución saturada de carbonato de sodio. Se disolvieron 7.5 g de carbonato de sodio en 100 ml de agua destilada. Para inducir a la precipitación se agregaron 0.3 g de carbonato de sodio y se colocó en refrigeración durante una hora.

Folin-Ciocalteu. En un matraz volumétrico de 10 ml se puso 1 mL del reactivo Folin-Ciocalteu y se aforó con agua.

Solución stock de ácido gálico a 1000 mg/L. Se pesaron 0.010050 g de ácido gálico y se disolvió en 1 ml de etanol para ayudar a su disolución, se aforó a 10 ml con agua destilada.

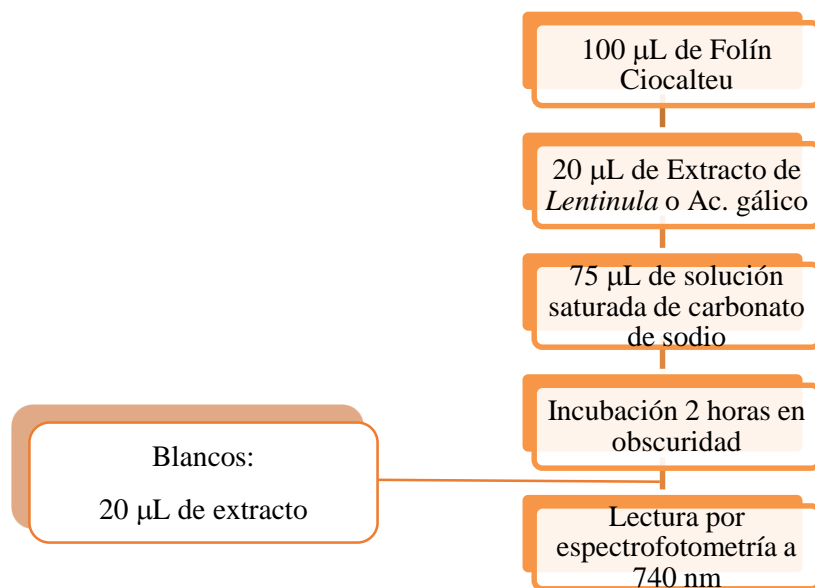
Para evaluar en forma cuantitativa la concentración de polifenoles totales como equivalente del ácido gálico, se hizo una curva de calibración para cada uno de los extractos por los diversos solventes. En matraces aforados de 10 mL y envueltos con papel aluminio para evitar la luz, se pusieron 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mL de la solución stock de ácido gálico a 1000 mg/L y se aforaron con agua destilada. Dichas soluciones tuvieron una concentración de 0, 25, 50, 100, 150 y 200 mg/L, respectivamente (cuadro 9).

**Cuadro 9.** Concentraciones de ácido gálico ( $\mu\text{g/mL}$ ) en la curva de calibración de polifenoles totales.

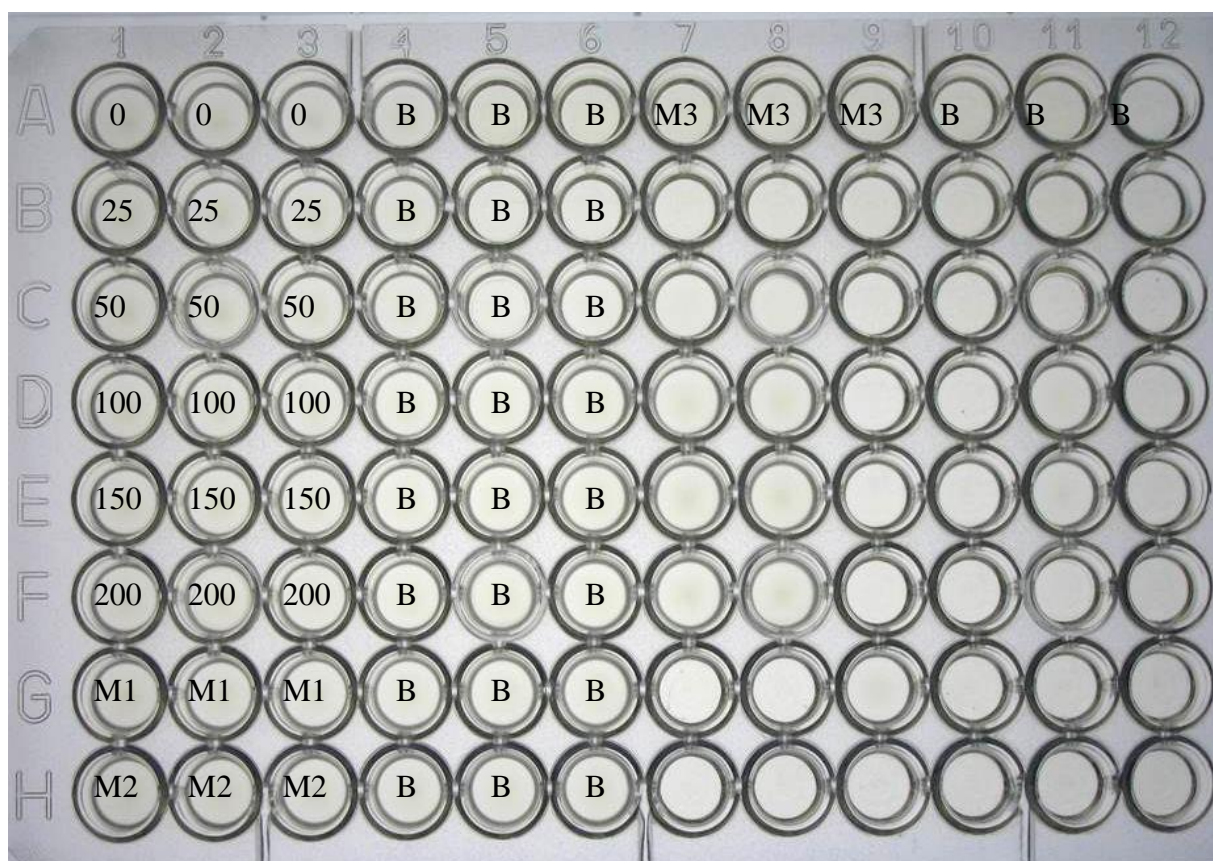
Concentración	0	25	50	100	150	200	mg/L
Ácido gálico sol. stock	0	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0	ml
Agua destilada	10	9.75	9.5	9.0	8.5	8.0	ml

#### Procedimiento

En una microplaca de 96 pozos (Fig. 10), se pusieron en orden consecutivo 100  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu, se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de extracto y 75  $\mu\text{L}$  de solución saturada de carbonato de sodio, las réplicas se consideraron en pozos por triplicado. La placa se incubó a temperatura ambiente y en obscuridad por 2 horas, el blanco de la muestra se obtiene adicionando los 20  $\mu\text{L}$  del extracto después de transcurridas las dos horas de incubación en la obscuridad, justo antes de hacer la lectura. Al término del tiempo de incubación, se leyó la placa en un espectrofotómetro de microplacas (EPOCH) a una longitud de onda de 740 nm. Es importante el seguir la secuencia que se observa en el diagrama de la figura 9.



**Figura 9.** Diagrama de la metodología para la determinación de polifenoles totales en microplacas.



**Figura 10.** Distribución de las muestras en la microplaca de 96 pozos para su lectura de D.O. en la determinación de polifenoles totales. 0 a 200: Curva de calibración en  $\mu\text{g/mL}$ , M: extracto, B: blanco correspondiente a la muestra de análisis en el mismo renglón.

### 7.6.1 Cuantificación de polifenoles totales como equivalentes de ácido gálico

La ecuación para el cálculo de polifenoles totales se determinó en el programa de cómputo Excel, en base a los datos graficados de la curva de calibración representada con la siguiente ecuación: En donde “X” son microgramos de equivalente de ácido gálico por mililitro de extracto y “Y” es la densidad óptica. La R<sup>2</sup> de la ecuación fue de 0.9977.

$$Y = 0.0095 X + 0.0986$$

### 7.7 Determinación de la actividad antioxidante por el reactivo 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

Preparación de la muestra

A partir de los extractos en sus diferentes solventes de las soluciones stock, en el programa en Excel “Diluciones”, se determinaron las respectivas alícuotas, necesarias para preparar concentraciones de 1000, 500, 250, 100, 50, 10 y 0 µg/mL de los extractos.

Preparación de los estándares

A partir de una solución stock de cada estándar en el programa Excel archivo “DPPH Original” se hicieron diluciones para determinar las curvas de concentración siendo las mostradas en el cuadro 10.

**Cuadro 10.** Concentración de la muestra y estándares para la determinación de la actividad antioxidante con el reactivo DPPH.

Muestra (µg/mL)	BHA (µg/mL)	BHT (µg/mL)	α-tocoferol (µg/mL)	Ác. ascórbico (µg/mL)
0	0	0	0	0
10	0.25	0.25	0.25	0.25
50	0.5	0.5	0.5	0.5
100	0.75	0.75	0.75	0.75
250	1	1	1	1
500	5	5	5	5
1000	10	10	10	15
2000	25	25	25	40

Preparación de la solución de DPPH

La solución del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (0.4 mM) en metanol grado analítico se preparó en un matraz completamente cubierto con papel aluminio. El volumen a preparar depende de la cantidad de muestras a evaluar (4 mL por microplaca de 96 pozos).

El peso molecular del DPPH es de 394.32 g/L

Para preparar 10 mL en concentración 0.4 mM se requiere de 0.0015773 g de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH).

Preparación de la microplaca

Se hicieron réplicas por columnas (n=3); se pusieron 160 µL del extracto en sus diferentes concentraciones y 40 µL de la solución de DPPH (0.4mM); se incubaron en oscuridad por 30 minutos; se reventaron las burbujas y se leyó en el espectrofotómetro Epoch a la longitud de onda de 517nm como se muestra en el diagrama de la figura 11.

Cálculos

A partir de las absorbancias obtenidas se determinó el porcentaje de actividad antioxidante con la ecuación que se presenta en la siguiente ecuación (Murillo *et al.*, 2007)

$$Actividad\ Antioxidante\ (\%) = \frac{A_{control(-)} - A_{extracto}}{A_{control}} \times 100$$

Acontrol (-): Absorbancia del DPPH (solo) al tiempo 0.

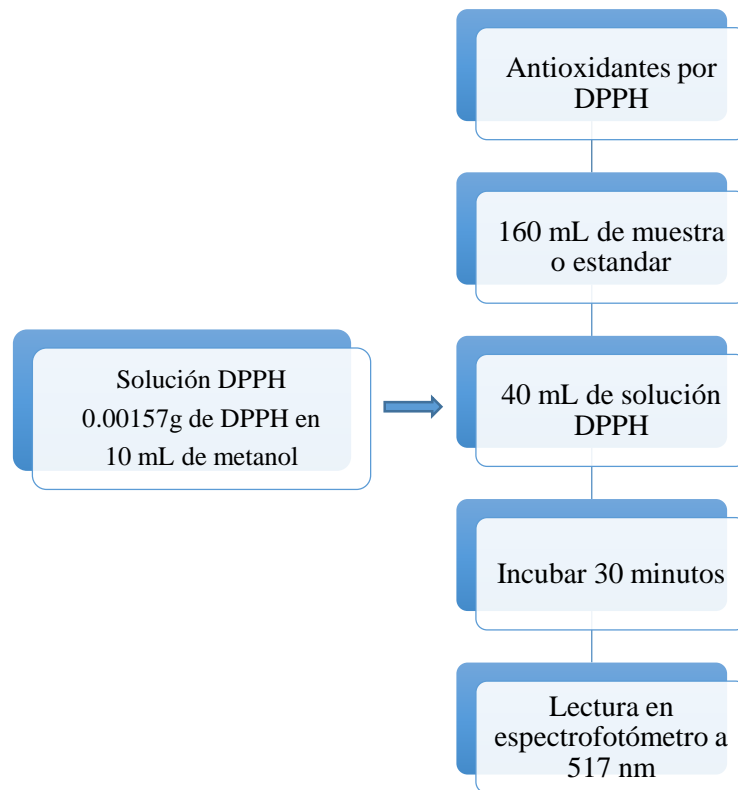
Aextracto: Absorbancia de los extractos.

Criterios para el IC50

El IC50 está definido como la cantidad de antioxidante al disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto (Deng *et al.*, 2011).

En otros trabajos se reportaron criterios de selección para extractos vegetales con base en el IC50; considerando de alto potencial antioxidante aquellos con concentraciones menores a 30 µg/mL, con moderado potencial ubicados en un rango entre 30 µg/mL y 100 µg/mL y de bajo potencial antioxidante aquellos con un IC50 por encima de 100 µg/mL (Ramos *et al.*, 2003).





**Figura 11.** Determinación de la actividad antioxidante por el reactivo 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH).

### 7.8 Determinación de la actividad antioxidante con el reactivo “ácido 2,2’-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico” (ABTS)

Preparación de la muestra y de los estándares

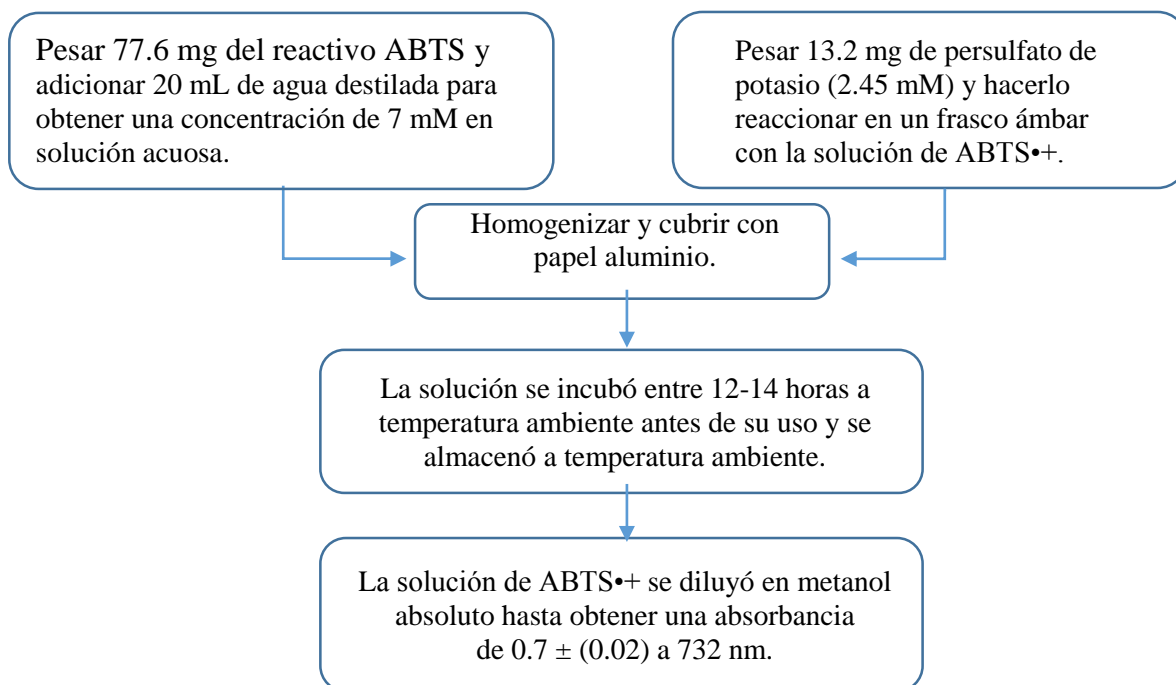
A partir de los extractos obtenidos se tomaron alícuotas para preparar concentraciones de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 25  $\mu\text{g/mL}$  basados en el rendimiento de cada extracto. Los datos de los rendimientos se pasaron en el programa *Excel archivo DPPH Original* para determinar las curvas de concentración, mostradas en el cuadro 11.

**Cuadro 11.** Concentración de la muestra y estándares para la determinación de la actividad antioxidante con el reactivo ABTS.

Muestra ( $\mu\text{g/mL}$ )	BHA ( $\mu\text{g/mL}$ )	BHT ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ác. ascórbico ( $\mu\text{g/mL}$ )
0	0	0	0	0
1	5	5	5	5
2	10	10	10	10
3	20	20	20	20
4	40	40	40	40
5	60	60	60	60
10	80	80	80	80
25	100	100	100	100

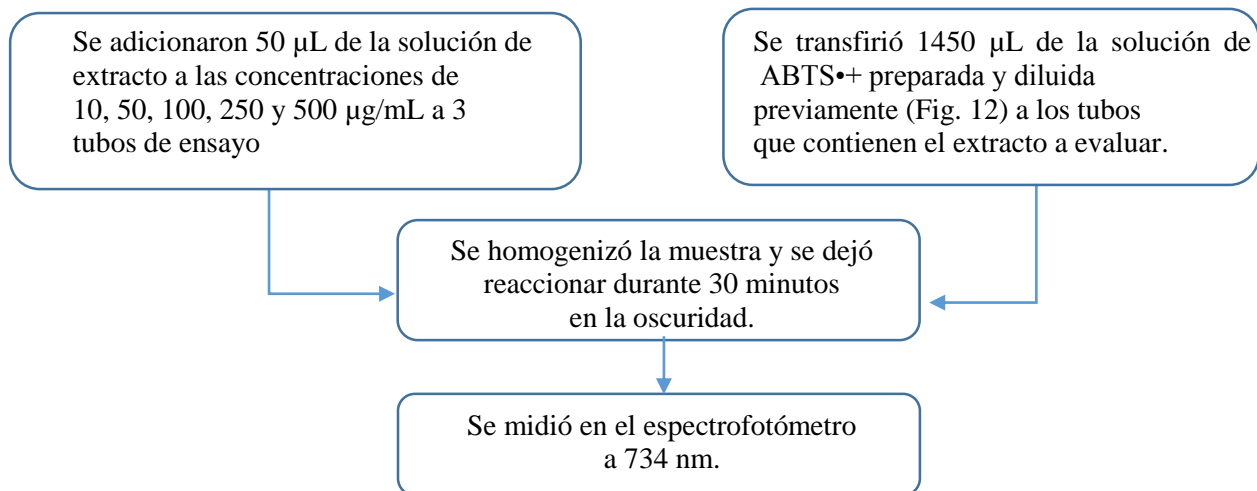
### Generación del radical catión ABTS•+

La solución del radical catión ABTS•+ solo es estable durante máximo dos días; por tal razón se preparó el volumen para el experimento programado para cada día; en un matraz completamente cubierto con papel aluminio se pesó 77.6 mg del reactivo ABTS, se adicionaron 20 mL de agua destilada para obtener una concentración de 7 mM en solución acuosa; se pesaron 13.2 mg de persulfato de potasio (2.45 mM), para hacerlo reaccionar, se homogenizó en un equipo vortex y se almacenó a temperatura ambiente de 12 a 16 horas antes de usarse, leyendo a una longitud de onda de 734 nm, se ajustó la absorbancia a  $0.7 \pm (0.02)$  diluyendo con etanol grado analítico al 99%. El protocolo para la preparación de la solución de ABTS•+ se describe en las Figs. 12 y 13 (Re *et al.*, 1999).



**Figura 12.** Protocolo para la generación del radical catión ABTS•+.

El blanco de los extractos se preparó a partir de 50  $\mu$ L del extracto y 1450  $\mu$ L de la mezcla de agua y etanol (1:2). Esta solución fue medida a una longitud de onda de 732 nm (Mathew *et al.*, 2005).



**Figura 13.** Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS•+.

#### Preparación de la microplaca

Se ponen 50 µL del extracto en sus diferentes concentraciones en tubos con 1450 µL de la solución de ABTS; se hacen réplicas por columnas (n=3) de 200 µL de extracto en la microplaca; se incuba en obscuridad por 30 minutos; se revientan las burbujas si es que hay en los pozos; se lee en el espectrofotómetro a 734 nm.

#### 7.9 Cuantificación de β-carotenos

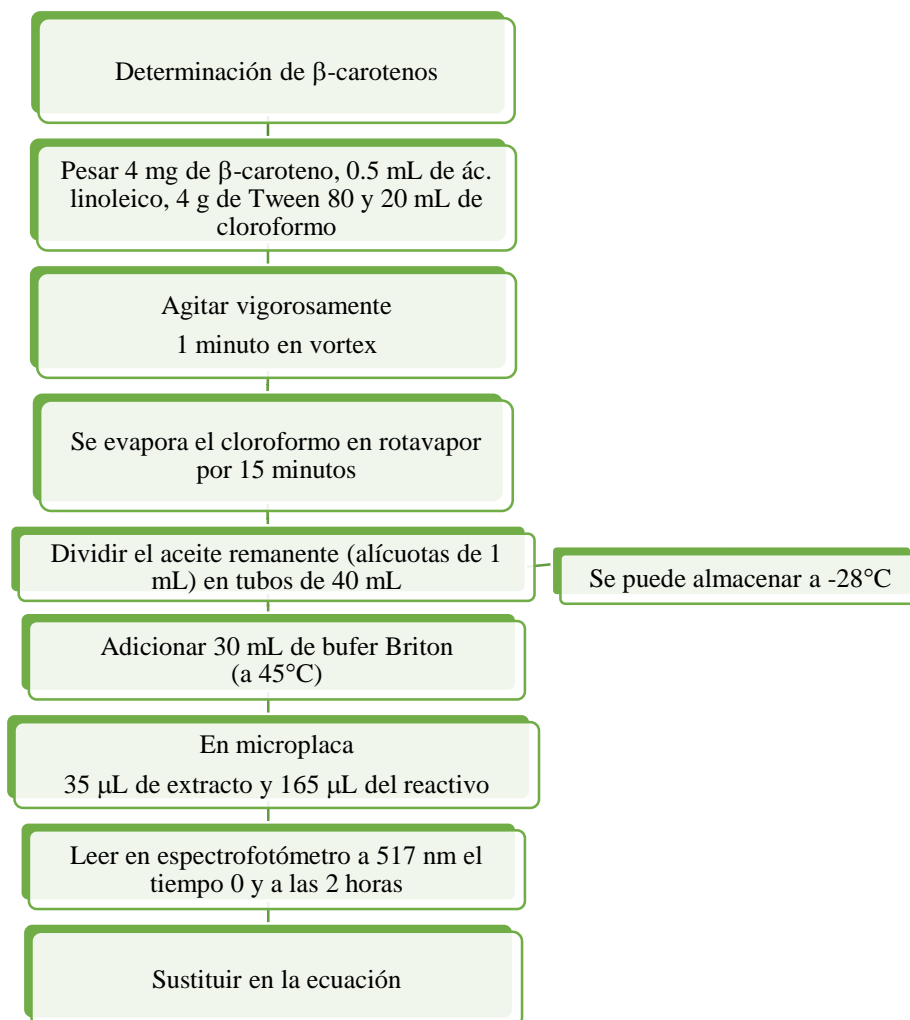
La determinación de β-carotenos se realizó por el método de blanqueamiento por lectura de la densidad óptica con apoyo de un espectrofotómetro haciendo la prueba de β-caroteno linoleico con ligeras modificaciones (Prieto *et al.*, 2012). En un matraz se pusieron 4 mg de β-caroteno, 0.5 mL de ácido linoleico, 4 g de Tween 80 y 20 mL de cloroformo, la suspensión se agitó vigorosamente durante un minuto en un equipo vortex y se removió el cloroformo en rotavapor con vacío a 40°C por un tiempo de 15 minutos. El residuo aceitoso se dividió en alícuotas de 1 mL en tubos de 40 mL, los cuales se mantuvieron a -28°C hasta su uso. Para su uso, se adicionan 30 mL de buffer Briton (en concentración de 100 mM, pH de 6.5 en agua “mili-Q” previamente calentada a 45°C) (Fig. 14). El reactivo de un tubo alcanzó para las muestras de una microplaca de 96 pozos.

La reacción se realizó con 35 µL de extracto con concentraciones que fueron de 0 a 5.0 mg/µL y 165 µL del reactivo, se midió la absorbancia en diferentes tiempos (10, 20, 30, 60, 90 y

120), siendo el óptimo a 120 min, se leyó la microplaca a 517 nm. El contenido de  $\beta$ -carotenos se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de } \beta\text{-carotenos} = \frac{D.O. \text{ al tiempo } t_0}{D.O. \text{ al tiempo } t_{120}} \times 100$$

La concentración con actividad antioxidante al 50% (EC50) que tiene cada extracto fue calculada por interpolación de la gráfica de porcentajes de  $\beta$ -carotenos contra la concentración del extracto (Vaz *et al.*, 2011). Se realizaron corridas a diferentes concentraciones de diferentes estándares [BHA (0.0-25.0  $\mu\text{g/mL}$ ), BHT (0.0-25.0  $\mu\text{g/mL}$ ),  $\alpha$ -tocopherol (0.0-25.0  $\mu\text{g/mL}$ ) y ácido ascórbico (0.0- 40.0  $\mu\text{g/mL}$ )] para comparar la actividad antioxidante de las muestras respecto a los estándares.



**Figura 14.** Diagrama de la metodología para la determinación de los  $\beta$ -carotenos.

## **7.10 Determinación de la actividad antioxidante por el método ORAC**

El análisis de las muestras se determinaron por las técnicas establecidas por Huang *et al.*, (2002).

## **7.11 Prueba de susceptibilidad bacteriana de los extractos de CP-519 *Lentinula boryana* y CP-7 *L. edodes* sobre nueve cepas de bacterias de interés clínico**

Se preparó medio agar Mueller Hinton marca 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 marca Difco, disolviendo 21 g en agua destilada, se hirvió de 3 a 5 minutos en un horno de microondas. Se vertieron 20 mL del medio en matraces Erlenmeyer con tapa de rosca de 125 mL y se esterizaron bajo las mismas condiciones que el medio de agar.

### **7.11.1 Curva poblacional con correlación a su densidad óptica**

A partir de una caja con el cultivo reciente de la bacteria en estudio incubada en Mueller Hinton agar se tomó una asada y se colocó en un matraz con medio Mueller Hinton líquido. La bacteria se incubó en agitación a 35.5°C con 120 rpm durante 12 horas, a este tiempo el medio de cultivo se observó turbio. De esta solución se vertieron 100 µl en tres matraces con 20 ml de medio de cultivo líquido de Mueller Hinton. A partir de ese momento y cada hora (exacta), se tomaron muestras por triplicado para contar las bacterias en la cámara de Neubauer y otras muestras por triplicado para leer la densidad óptica (D.O.) en un espectrofotómetro marca Epoch de Biotek a una longitud de onda de 600 nm. Los valores de las dos cinéticas a 12 horas se graficaron en el programa Excel y se obtuvo la ecuación de tercer orden correspondiente de cada curva. De cada bacteria se obtuvieron dos curvas respecto al tiempo, una de Densidad Óptica (D.O.) y otra de concentración poblacional de bacterias por cada ml (bacterias/mL) obtenida por conteo en la cámara de Neubauer. Para poder relacionar una curva con la otra, se requirió despejar la variable “X” de la ecuación de la curva de la D.O. Para que ese valor pueda ser utilizado como el valor de “X”, en la ecuación de la curva de la cinética del conteo bacteriano en la cámara de Neubauer, obteniendo en “Y” el valor de la concentración de bacterias/ml correspondiente al valor en “Y” de lectura de la

D.O. obtenido de la muestra en estudio. Para poder despejar la variable “X” de la ecuación de la curva de la cinética de la D.O., se utilizó el método de resolución numérica de ecuaciones diferenciales de tercer orden de “Runge-Kutta”. Para el procesamiento de las ecuaciones se realizó una hoja dinámica en Excel con nombre “Cálculo de bacterias”, en la cual se seleccionó la bacteria en estudio.

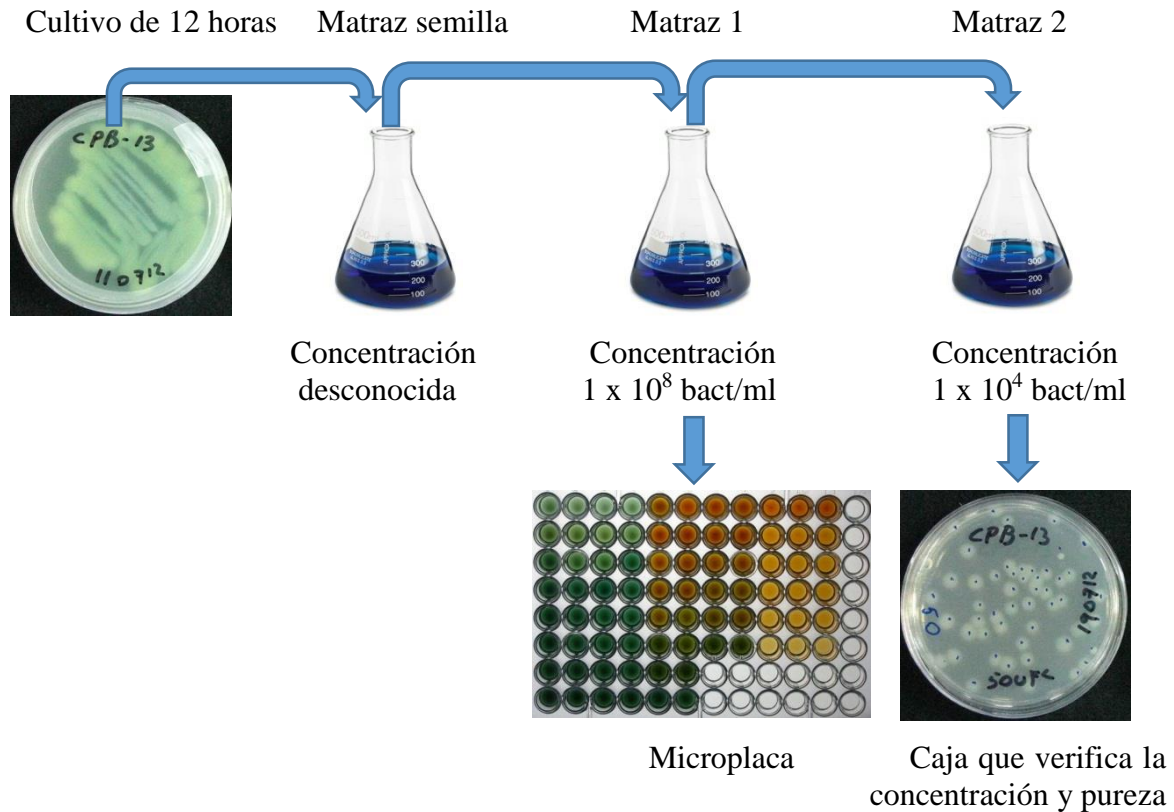
### **7.11.2 Obtención del inóculo bacteriano**

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 nombre “Matraz semilla”. 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 ésas 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 matraz semilla se pudo determinar con la siguiente ecuación, la alícuota requerida para tener una concentración de  $1 \times 10^8$  bacterias/ml en el matraz 1.

$$\text{Concentración 1} \times \text{Volumen 1} = \text{Concentración 2} \times \text{Volumen 2}$$

$$\text{Volumen 1} = \frac{\text{Concentración 2} \times \text{Volumen 2}}{\text{Concentración 1}}$$

Para confirmar dicha concentración poblacional de las bacterias, se determinó el volumen a transferir del matraz 1 (4 µL) al matraz 2, de este último se sembraron 50 µL en cajas de Petri con medio de cultivo Agar Mueller Hinton para confirmar una población de 50 Unidades Formadoras de Colonias (Fig. 15). Con dicho rango se confirma que el matraz 1 puede usarse como inóculo para los bioensayos.

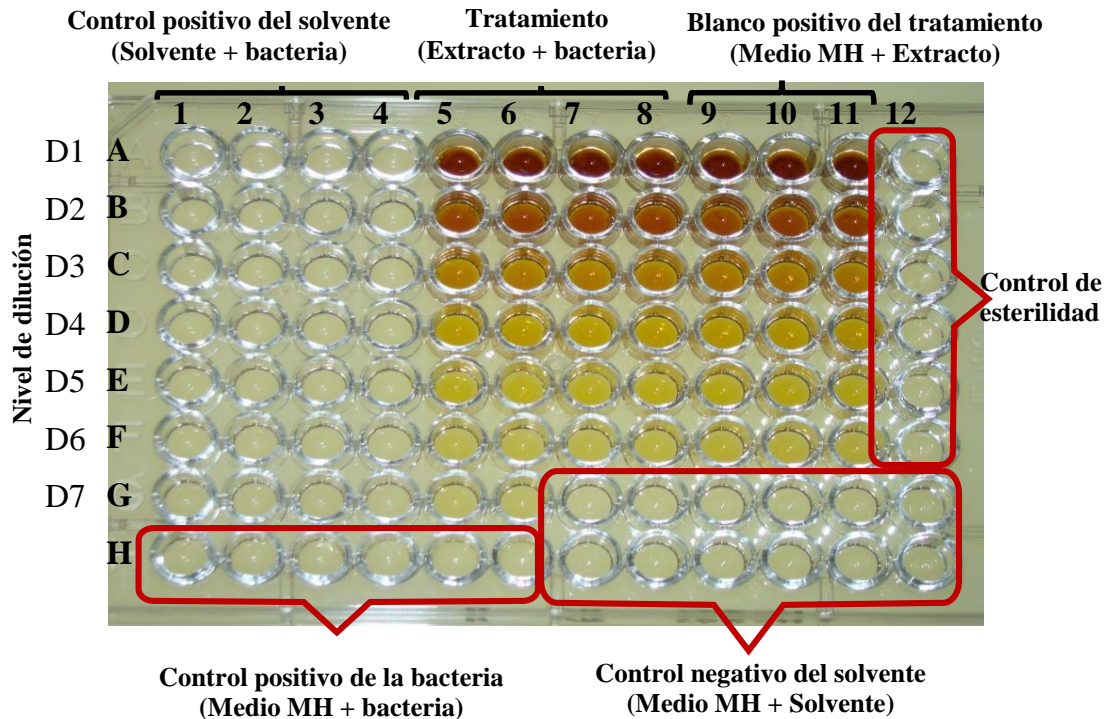


**Figura 15.** Ajuste de la cantidad de las bacterias a una concentración de  $1 \times 10^8$  bact./mL para el diseño experimental y, de  $1 \times 10^4$  bact./mL para verificar el inóculo con 50 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en cajas de Petri con medio de cultivo Agar Mueller Hinton.

### 7.11.3 Arreglo del bioensayo 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  $100 \mu\text{L}$  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. 16). 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. 16).



**Figura 16.** Distribución de las microdiluciones en la microplaca para la prueba de susceptibilidad bacteriana.

#### 7.11.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de *Lentinula boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 sobre el crecimiento de nueve bacterias de interés clínico

La figura 17 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 extracto (tratamiento). Después de realizada la distribución se procedió a inocular la microplaca con 2  $\mu$ L de inóculo bacteriano (B), según se indica en la figura 17. El volumen final de cada pozo fue de 102  $\mu$ L.



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						

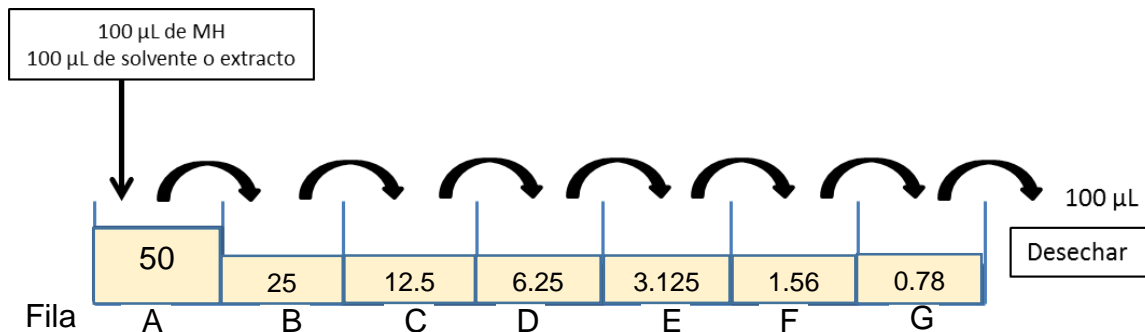
**Figura 17.** Especificaciones de la inoculación de la bacteria en estudio para realizar la prueba de susceptibilidad bacteriana en esta investigación.

El cuadro 12, 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.

**Cuadro 12.** Distribución de la prueba de susceptibilidad bacteriana usando extracto de hongo como agente antimicrobiano. Toda la placa contenía 100  $\mu$ L de medio de cultivo estéril Mueller Hinton (MH).

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

La concentración del extracto (tratamiento) en cada microdilución está representada en la figura 18. Se mezcló cada pozo, se tomaron 100  $\mu$ L de ese pozo y se transfirieron a la siguiente fila y así sucesivamente, hasta el último pozo de cada tratamiento. Los últimos 100  $\mu$ L de cada pozo se eliminaron.



**Figura 18.** Vista longitudinal de la forma en que se realizó la microdilución de los extractos en la microplaca. El valor que está indicado dentro de cada pozo representa el volumen del extracto en cada nivel o fila de la microplaca, el pozo subsecuente tiene el 50% de la concentración. El volumen total de cada pozo fue de 100 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. 19a) y se incubó en una incubadora (Biometra, modelo OV5) a 35.5 °C (Fig. 19b). 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 extracto sobre las bacterias en estudio.

**A**



**B**



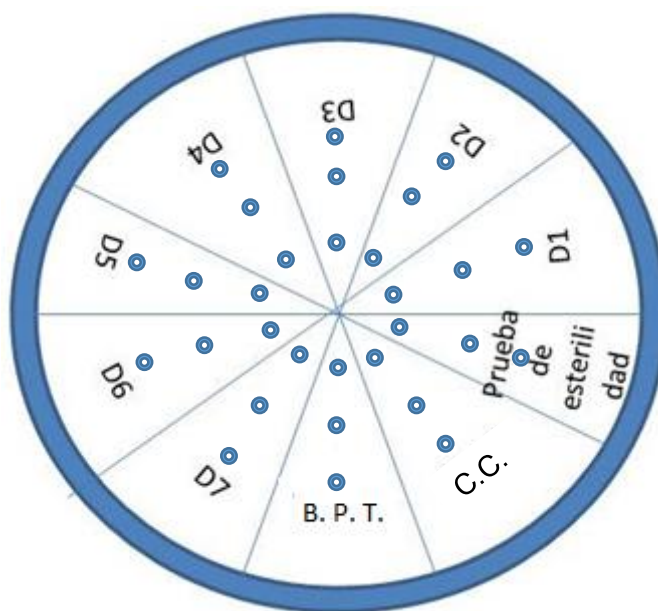
**Figura 19.** Forma en que se colocó la microplaca para evitar la pérdida de humedad (a) e incubadora donde se colocó la microplaca durante 24 horas (b).

Para comprobar el efecto bactericida o el efecto bacteriostático del extracto en cada solvente, 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. 16).

### 7.11.5 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de *Lentinula boryana* y *L. edodes* sobre el crecimiento de nueve bacterias de interés clínico

Para comprobar la actividad bactericida de los diferentes extractos probados en cada una de las bacterias, se diseñó una caja de Petri con medio de cultivo agar Mueller Hinton (Fig. 20). Después de leer en el espectrofotómetro la placa de la prueba de susceptibilidad bacteriana (24 horas de incubación), se sembraron tres puntos con 1.0  $\mu$ L 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 extracto 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 20.** 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 extractos de *Lentinula boryana* y *L. edodes* en los diferentes solventes en estudio, 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.

## 7.12 Análisis matemático y estadístico

La estadística es un conjunto de técnicas para la recolección, manejo, descripción y análisis de información, de manera que las conclusiones obtenidas de ella tengan un grado de confiabilidad especificado.

**Regresión:** Es una herramienta que conjunta técnicas para construir y evaluar modelos que describen la relación entre variables independientes, y para formular inferencias basadas en modelos. Al análisis estadístico que resulta de aplicarlas se le denomina *análisis de regresión*.

El análisis de regresión permite estudiar la influencia de una variable (regresión lineal simple) o más variables independientes (regresión múltiple) sobre las variables dependientes.

Diseño experimental

Sean  $X_1, \dots, X_n$  y  $Y_1, \dots, Y_n$  dos muestras aleatorias independientes de poblaciones cuyos modelos probabilísticos tienen como medianas a  $M_x$  y  $M_y$ . Para probar cualquiera de los siguientes juegos de hipótesis:

- a)  $H_0: M_x = M_y$  en oposición a  $H_a: M_x \neq M_y$ ,
- b)  $H_0: M_x \leq M_y$  en oposición a  $H_a: M_x \geq M_y$ .
- c)  $H_0: M_x \geq M_y$  en oposición a  $H_a: M_x \leq M_y$ ,

Se utiliza la estadística:

$$T_+ = \sum_{i=1}^n R(X_i) - \frac{n(n+1)}{2}$$

Donde  $R(X_i)$  es el rango que corresponde a  $X_i$  en el ordenamiento de la observación 1 a la observación  $n$

Diseño completamente al azar

En el presente estudio se siguió un diseño experimental completamente al azar con un factorial de  $3 \times 7$  asumiendo igualdad de condiciones en la microplaca e incubadora.

Análisis estadístico (SAS)

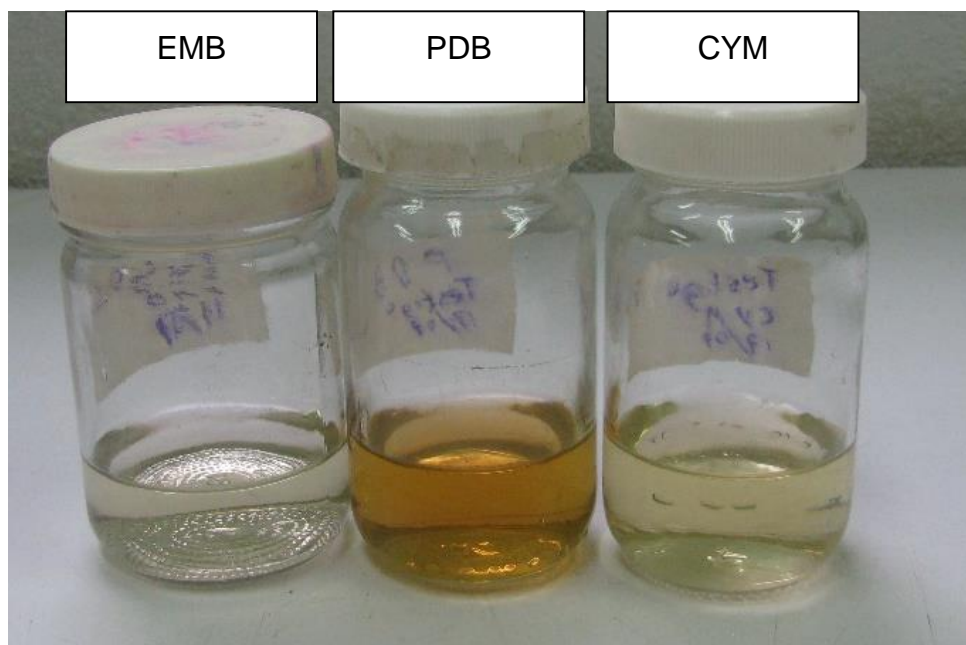
En todos los experimentos los cultivos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron mediante un diseño experimental completamente al azar y se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), se les aplicó la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), todos los análisis se realizaron con el programa SAS 9.4.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Producción de biomasa en medio líquido PDB, EMB y CYM de *Lentinula boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 cultivado en condiciones estáticas y de agitación

Con base en la producción de micelio en medio líquido, se realizó una caracterización y comparación de los micelios y medios de cultivo entre las cepas *Lentinula edodes* (CP-7 y CP-492) y *L. boryana* (CP-494 y CP-519) a los 46 días de su cultivo. Con un inóculo correspondiente de cada cepa, se tomaron 5 núcleos de 5mm de diámetro o su equivalente para el proceso de homogenización, se colocaron en 75 ml de medio líquido nutritivo PDB, EMB y CYM. Los testigos de los medios de cultivo EMB, PDB y CYM (Fig. 21); tuvieron coloración amarillo claro cristalino, correspondiendo a la Tabla de Pantone con los siguientes códigos: EMB, Pantone 607-c; PDB, Pantone 124-c y CYM, Pantone 609-c.

Para la descripción de los tratamientos se tomaron en cuenta las siguientes abreviaturas: H: Homogenización; I: Núcleos de 50 mm de diámetro; S: Superficie; IN: Inmerso; P: Pared; D1: Densidad baja; D2: Densidad media; D3: Densidad alta.



**Figura 21:** Control de los medios de cultivo líquidos.

En cuanto a los tratamientos, para la cepa *L. edodes* CP-7 en medio PDB por núcleos o inóculos (I) (Fig. 22) se formó micelio blanco con coloraciones cafés. El micelio cubrió el 100% de la superficie y fue tan denso que inclinando el frasco no se observó paso o

movimiento del medio de cultivo líquido. Las coloraciones cafés se presentaron en las 4 repeticiones y cubrieron del 5 al 30% de la superficie. El micelio creció sobre las paredes del frasco con una densidad media a una altura promedio de 2 cm. Por debajo de la superficie, el micelio del fondo se fusionó al micelio desarrollado en la base del frasco, con densidad baja (pelusas). El medio de cultivo se observó con viscosidad ligera, con color Pantone 124-c. Para la cepa *L. edodes* CP-7 en PDB por homogenización (H) (Fig. 22) se formó el micelio color blanco, el micelio cubrió el 100% de la superficie con una densidad escasa con pequeñas unidades formadoras de colonia. El micelio creció sobre las paredes a una altura promedio de 1.5 cm con una densidad escasa. El micelio que creció por debajo de la superficie cubrió del 80 al 100% del volumen del medio de cultivo. El desarrollo se observó con una conformación algodonosa poco densa y con crecimiento tanto de la superficie hacia abajo como de la base del frasco hacia arriba. También se observó un segmento del medio de cultivo sin micelio, a la mitad de la altura del medio de cultivo.

Para la cepa *L. edodes* CP-7 en EMB por núcleos o inóculos (I) (Fig. 22) se formó micelio blanco, el micelio de la superficie cubrió el 100%, con una densidad escasa con pequeñas unidades formadoras de colonia. El micelio creció sobre las paredes a una altura promedio de 1.5 cm con una densidad escasa. El micelio que creció por debajo de la superficie cubrió del 60 al 80% el volumen del medio de cultivo, en conformación algodonosa y con crecimiento de la superficie al fondo del frasco, sin mostrar crecimiento del fondo del frasco hacia la superficie.

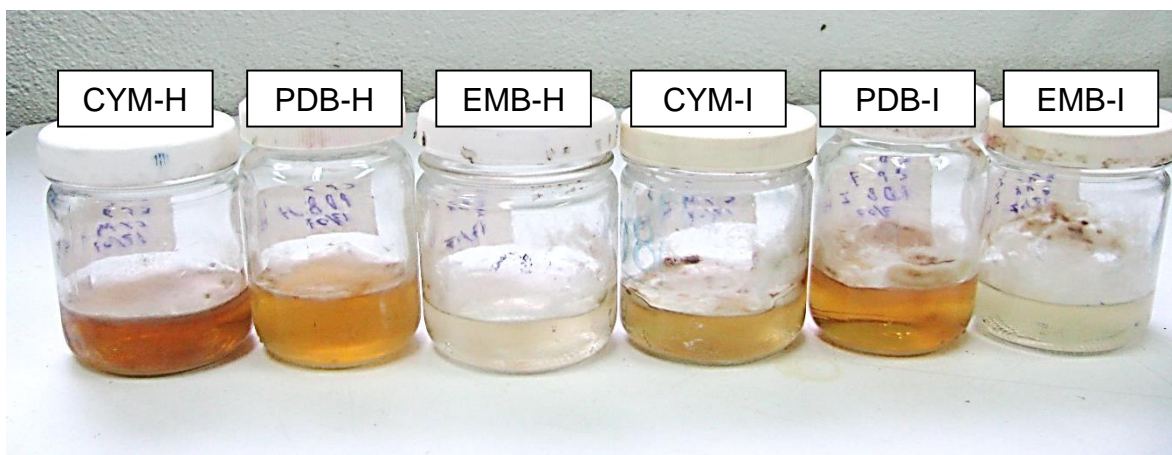
Para la cepa *L. edodes* CP-7 inoculado en EMB por homogenización (H) (Fig. 22) se formó micelio blanco, el micelio de la superficie cubrió el 100%, con una densidad escasa con pequeñas unidades formadoras de colonia. El micelio creció sobre las paredes a una altura promedio de 1.5 cm con una densidad escasa. El micelio que creció por debajo de la superficie cubrió del 80 al 90% el volumen del medio de cultivo, en conformación algodonosa y con crecimiento de la superficie al fondo del frasco. Se desarrolló de la base del frasco hacia arriba, mostrándose una ventana de medio sin micelio a la mitad de la altura del medio de cultivo.

Para la cepa *L. edodes* CP-7 inoculado en CYM por núcleos o inóculos (I) (Fig. 22) se formó micelio blanco con coloraciones cafés, el micelio cubrió la superficie al 100%, con una densidad variable entre las réplicas, siendo más denso en la repetición 1 y escasa en la

repetición 5. Las coloraciones cafés se presentaron en 3 repeticiones y cubrieron del 15 al 35% de la superficie. El micelio creció sobre las paredes a una altura promedio de 1.5 cm con una densidad media. El micelio que creció por debajo de la superficie cubrió del 70 al 90% el volumen del medio de cultivo, en conformación algodonosa y con crecimiento de la superficie al fondo del frasco. No se observó crecimiento del fondo del frasco hacia la superficie. El medio de cultivo varió en la tonalidad, siendo un café más intenso para la repetición 1, los colores extremos variaron del Pantone 124-c al Pantone 121-c.

Para la cepa *L. edodes* CP-7 inoculada en CYM por homogenización (H) (Fig. 22) se formó un micelio blanco, el micelio de la superficie cubrió al 100%, con una densidad media. El micelio creció sobre las paredes a una altura promedio de 1.5 cm con una densidad muy escasa. El micelio que creció por debajo de la superficie cubrió del 50 al 70% el volumen del medio de cultivo, en conformación algodonosa y con crecimiento de la superficie al fondo del frasco, y de la base del frasco hacia arriba. Los colores del medio son Pantone 151-c a excepción de la repetición 2 que tiene color Pantone 1225-c.

Con base en la caracterización de los tratamientos para la cepa *L. edodes* CP-7, (Fig. 22) en la comparación de los tratamientos evaluados se observó que el tratamiento que visualmente tuvo un desarrollo micelial más denso y vigoroso fue en medio de cultivo PDB, inoculado por núcleos de 5mm de diámetro (Fig. 22).



**Figura 22.** Cultivo de micelio de CP-7 *Lentinula edodes* en medio líquido, H: inoculado por homogenización con rotor, I: inoculado con 5 discos de 0.5 cm de diámetro.

Para la cepa *L. edodes* CP-492 (Fig. 23) inoculada en PDB por núcleos (I), se formó micelio blanco con coloraciones cafés, el micelio cubrió el 100% de la superficie y fue muy denso. Las coloraciones cafés cubrieron del 5 al 15% de la superficie. El micelio creció sobre las paredes de los frascos con una densidad escasa a una altura promedio de 3 mm. Por debajo de la superficie, el micelio creció pegado al micelio de la superficie, en forma densa y menos abundante en la base del frasco, con densidad baja (pelusas). El medio de cultivo se observó con viscosidad ligera, con color Pantone 159-c.

Para la cepa *L. edodes* CP-492 (Fig. 23) inoculada en PDB por homogeneización (H), tuvo un crecimiento uniforme, con micelio blanco, el micelio superficial cubrió del 80 al 90% con densidad alta, iniciado su crecimiento con unidades formadoras de colonia. El micelio creció sobre las paredes a una altura promedio de 0.5 cm con una densidad escasa. El micelio que creció por debajo de la superficie cubrió el 20% del volumen del medio de cultivo. Su desarrollo se observó en conformación algodonosa poco densa y con crecimiento tanto de la superficie hacia abajo como en la base del frasco, mostrándose la mayor parte del medio sin micelio. El color del medio de cultivo fue Pantone 173-c.

Para la cepa *L. edodes* CP-492 (Fig. 23) inoculado en EMB por núcleos (I), se formó micelio blanco, el micelio de la superficie cubrió el 50%, con una densidad alta. El micelio creció sobre las paredes a una altura promedio de 0.3 cm con una densidad escasa. El micelio que creció por debajo de la superficie cubrió el 40% del volumen del medio de cultivo, en conformación algodonosa y con crecimiento de la superficie al fondo del frasco, y en forma de núcleos en el fondo del frasco. El color del medio de cultivo fue Pantone 124-c.

Para la cepa *L. edodes* CP-492 inoculado en EMB por homogeneización (H) (Fig. 23) se formó micelio blanco, el micelio de la superficie cubrió del 45 al 95% de la superficie, con una densidad alta. El micelio creció sobre las paredes a una altura promedio de 0.2 cm con una densidad escasa. El micelio que creció por debajo de la superficie cubrió del 40 al 60% del volumen del medio de cultivo, en conformación algodonosa y con crecimiento de la superficie al fondo del frasco, y en forma de pequeños núcleos en el fondo del frasco. El color del medio de cultivo fue Pantone 156-c.

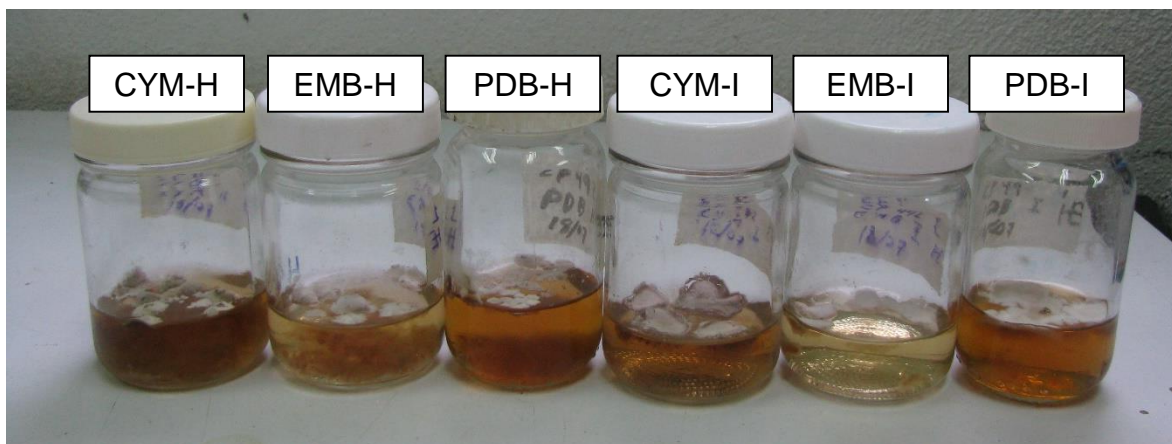
Para la cepa *L. edodes* CP-492 inoculado en CYM por núcleos (I) (Fig. 23) se formó micelio café claro, el micelio cubrió el 50% de la superficie, con una densidad alta. El micelio inició el crecimiento sobre las paredes, con una densidad escasa. El micelio que creció por debajo



de la superficie cubrió el 35% del volumen del medio de cultivo, en conformación algodonosa y con crecimiento de la superficie al fondo del frasco, y en forma de núcleos en el fondo del frasco. El color del medio de cultivo fue Pantone 131-c.

Para la cepa *L. edodes* CP-492 inoculado en CYM por homogenización (H) (Fig. 23) se formó micelio blanco y café claro, el micelio de la superficie cubrió del 30 al 55%, con una densidad alta. El micelio no creció sobre las paredes. El micelio que creció por debajo de la superficie cubrió del 70 al 80% del volumen del medio de cultivo, en conformación algodonosa y con crecimiento de la superficie al fondo del frasco, y en forma similar en el fondo del frasco. El color del medio de cultivo fue Pantone 1817-c. Las repeticiones 3 y 4 presentaron contaminación por bacterias en los primeros días del experimento.

Con base en la caracterización de los tratamientos para la cepa *L. edodes* CP-492, (Fig. 23) en la comparación de los tratamientos evaluados se observó que el tratamiento que visualmente tuvo un crecimiento micelial más denso y vigoroso fue en medio de cultivo CYM por homogenización y casi igual en PDB, inoculado por núcleos de 5mm de diámetro, con un color Pantone 1817-c (café oscuro rojizo).



**Figura 23.** Cultivo de micelio de CP-492 *Lentinula edodes* en medio líquido, H: inoculado por homogenización con rotor, I: inoculado con 5 discos de 0.5 cm de diámetro.

Para la cepa *L. boryana* CP-494 inoculado en PDB por núcleos (I) (Fig. 24) se formó micelio blanco con coloraciones café claro, el micelio cubrió del 50 al 80% de la superficie. Las coloraciones cafés se presentaron en todas las repeticiones y se observaron en el 50% de la superficie. El micelio creció sobre las paredes del frasco con una densidad media a una altura

promedio de 0.5 cm. Por debajo de la superficie, el micelio creció pegado al micelio de la superficie, en forma densa y minoritariamente en la base del frasco y con densidad baja en forma de pelusas. El medio de cultivo tuvo color Pantone 152-c

Para la cepa *L. boryana* CP-494 inoculada en PDB por homogeneización (H) (Fig. 24) se formó micelio blanco, el micelio superficial cubrió del 15 al 30% con una densidad alta, con formaciones del tipo primordio de 0.5 cm de diámetro con 0.3 cm de altura; se presentó una formación de primordio por frasco en tres repeticiones. El micelio no creció sobre las paredes. El micelio que creció por debajo de la superficie cubrió el 20% del volumen del medio de cultivo, con formación de pequeños núcleos en la base del frasco, mostrándose la mayor parte del medio sin micelio. El color del medio de cultivo fue Pantone 136-c.

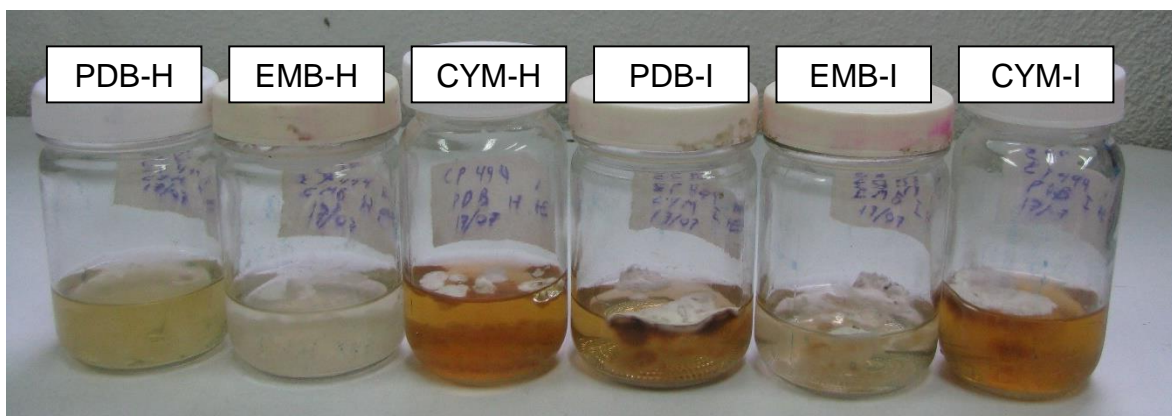
Para la cepa *L. boryana* CP-494 inoculada en EMB por núcleos (I) (Fig. 24) se formó micelio blanco con coloraciones café claro. El micelio cubrió del 30 al 50% de la superficie, con formaciones del tipo primordio de 0.3 cm de diámetro con 0.2 cm de altura, los cuales se presentaron en tres repeticiones. Las coloraciones cafés se presentaron en todas las repeticiones y cubrieron el 15% de la superficie. El micelio no creció sobre las paredes del frasco. Por debajo de la superficie, el micelio creció pegado al micelio de la superficie, en forma densa y minoritariamente en la base del frasco y con densidad baja. El medio de cultivo tuvo color Pantone 7401-c.

Para la cepa *L. boryana* CP-494 inoculado en EMB por homogeneización (H) (Fig. 24) se formó micelio blanco, el micelio superficial cubrió del 10 al 15% con una densidad alta, con formaciones del tipo primordio de 0.7 a 1.2 cm de diámetro con 0.5 cm de altura. Se presentó una formación tipo primordio por frasco en cuatro repeticiones. El micelio no creció sobre las paredes. El micelio que creció por debajo de la superficie cubrió el 30% del volumen del medio de cultivo, en conformación de pequeños núcleos en la base del frasco, mostrándose la mayor parte del medio sin micelio. El color del medio de cultivo es Pantone 7401-c.

Para la cepa *L. boryana* CP-494 inoculada en CYM por núcleos (I) (Fig. 24) se formó micelio blanco con coloraciones café claro, el micelio cubrió el 50% de la superficie. Las coloraciones cafés se presentaron en cuatro repeticiones y cubrieron del 50 al 70% de la superficie. El micelio creció sobre las paredes del frasco, con una densidad media a una altura promedio de 0.4 cm. Por debajo de la superficie, el micelio creció pegado al micelio de la superficie, en forma densa y en la base del frasco, con densidad baja. El medio de cultivo

tuvo color Pantone 124-c. Para la cepa *L. boryana* CP-494 inoculada en CYM por homogeneización (H) (Fig. 24) se formó micelio blanco, el micelio superficial cubrió del 10 al 25% con una densidad alta. Se observaron formaciones del tipo primordio de 0.5 y 1.4 cm de diámetro y con 0.5 y 0.8 cm de altura, se presentó una formación de primordio por frasco en dos repeticiones. El micelio no creció sobre las paredes. El micelio que creció por debajo de la superficie cubrió el 50% del volumen del medio de cultivo, en conformación de pequeños núcleos en la base del frasco. El color del medio de cultivo fue Pantone 461-c. La réplica 5 se contaminó con el moho *Trichoderma* en el micelio superficial.

Con base en la caracterización de los tratamientos para la cepa *L. boryana* CP-494, (Fig. 24) en la comparación de los tratamientos evaluados se observó que el tratamiento que visualmente tuvo un crecimiento micelial más denso y vigoroso fue en medio de cultivo CYM, inoculado por núcleos de 5mm de diámetro y casi igual en PDB, inoculado por núcleos de 5mm de diámetro, con un color Pantone 1817-c (café rojizo).



**Figura 24.** Cultivo de micelio de CP-494 *Lentinula edodes* en medio líquido, H: inoculado por homogeneización con rotor, I: inoculado con 5 discos de 0.5 cm de diámetro.

Para la cepa *L. boryana* CP-519 en PDB por núcleos (I) (Fig. 25) se formó micelio blanco, ligeramente color crema. El micelio cubrió del 40 al 60% de la superficie, las coloraciones cafés se presentaron en dos repeticiones. El micelio creció sobre las paredes del frasco con una densidad baja, a una altura promedio de 0.4 cm. Por debajo de la superficie, cubrió el 20% del volumen el micelio creció adherido al micelio de la superficie, en forma densa y minoritariamente en la base del frasco, con densidad baja en forma de pelusas. El medio de cultivo tuvo color Pantone 124-c.

Para la cepa *L. boryana* CP-519 inoculada en PDB por homogeneización (H) (Fig. 25) se formó micelio blanco, el micelio superficial cubrió del 25 al 50% con una densidad alta y en forma de pequeños núcleos. El micelio creció sobre las paredes del frasco con una densidad media a una altura promedio de 0.5 cm. El micelio que creció por debajo de la superficie cubrió el 30% del volumen del medio de cultivo, en conformación algodonosa en la base del frasco. El color del medio de cultivo fue Pantone 136-c.

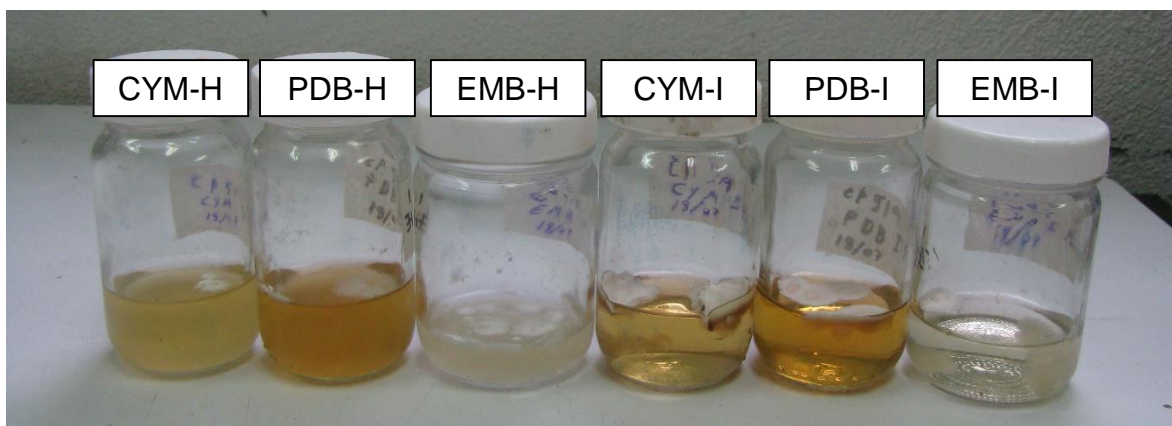
Para la cepa *L. boryana* CP-519 inoculada en EMB por núcleos (I) (Fig. 25) se formó micelio color blanco. El micelio cubrió del 30 al 40% de la superficie con coloraciones cafés, las cuales se presentaron en dos repeticiones y cubrieron el 10% de la superficie. El micelio creció sobre las paredes del frasco con una densidad baja, a una altura promedio de 0.4 cm. Por debajo de la superficie, el micelio creció pegado al micelio de la superficie, en forma algodonosa y minoritariamente en la base del frasco, con densidad baja en forma de pelusas. El medio de cultivo tuvo color Pantone 461-c.

Para la cepa *L. boryana* CP-519 inoculada en EMB por homogeneización (H) (Fig. 25) se formó micelio color blanco. El micelio superficial cubrió del 20 al 35% con una densidad alta y en forma de pequeños núcleos. El micelio creció sobre las paredes del frasco con una densidad baja, a una altura promedio de 0.6 cm. El micelio que creció por debajo de la superficie cubrió el 40% del volumen del medio de cultivo, en conformación algodonosa en la base del frasco. El color del medio de cultivo fue Pantone 461-c.

Para la cepa *L. boryana* CP-519 inoculada en CYM por núcleos (I) (Fig. 25) se formó micelio color blanco. El micelio cubrió del 60 al 95% de la superficie con coloraciones cafés, las cuales se presentaron en todas las repeticiones. El micelio creció sobre las paredes del frasco con una densidad baja, a una altura promedio de 0.4 cm. Por debajo de la superficie, cubrieron del 50 al 95% del volumen, el micelio creció pegado al micelio de la superficie, en forma algodonosa y minoritariamente en la base del frasco, con densidad baja en forma de pelusas. El medio de cultivo tuvo color Pantone 131-c.

Para la cepa *L. boryana* CP-519 inoculada en CYM por homogeneización (H) (Fig. 25) se formó micelio color blanco. El micelio superficial cubrió del 15 al 40% con una densidad alta y en forma de núcleos. El micelio no creció sobre las paredes del frasco. El micelio que creció por debajo de la superficie cubrió el 50% del volumen del medio de cultivo, en

conformación algodonosa, mayoritariamente en la base del frasco. El color del medio de cultivo fue Pantone 141-c.



**Figura 25.** Cultivo de micelio de CP-519 *Lentinula boryana* en medio líquido, H: inoculado por homogenización con rotor, I: inoculado con 5 discos de 0.5 cm de diámetro.

#### Observaciones generales

En todos los tratamientos de todas las cepas y en todos los medios de cultivo, se observó la formación de micelio en la superficie, en rangos del 10% como en la cepa CP-519 en CYM por homogeneización hasta el 100% con densidad muy alta como en la cepa CP-7 en PDB. Se observó el micelio sumergido en un 5% para la cepa CP-519 en CYM inoculada por nucleación y hasta un 95% para el caso de la cepa CP-7 en PDB inoculada por homogeneización. El medio de cultivo que tuvo mayor coloración fue el de la cepa CP-492 en CYM por homogeneización con un color café oscuro rojizo Pantone 1817-c y el de menor color sin considerar los testigos fue el de la cepa CP-519 en EMB por nucleación, con color amarillo muy claro Pantone 726-c. Los hongos se estudiaron respecto a su producción micelial cultivándolos en diferentes solventes (CYM, PDB y EMB) y diferentes condiciones del inóculo inicial (núcleos de 0.5 cm de diámetro y homogeneización) y condiciones de incubación (estático y en agitación) los resultados se presentan en el Cuadro 13.

**Cuadro 13.** Producción de biomasa en matraces con diferentes medios de cultivo (CYM, PDB y EMB) inoculando con micelio de 0.5 cm de diámetro (I) u homogeneizado (H), en condiciones de agitación o estático.

Registro	Muestra	Biomasa producida estático (mg/mL)	Biomasa producida en agitación (mg/mL)
CP-519	CYM I	2.76	3.8364
CP-7	CYM I	2.62	3.013
CP-519	CYM H	2.5	2.95
CP-519	PDB H	2.46	3.3702
CP-7	PDB I	0.23	0.2875
CP-519	PDB I	1.85	2.183
CP-7	CYM H	1.77	2.2302
CP-7	EMB I	1.5	1.92
CP-519	EMB I	1.45	1.856
CP-7	PDB H	0.94	1.1374
CP-519	EMB H	0.87	1.0962
CP-7	EMB H	0.6	0.738

CYM, PDB y EMB (Medios de cultivo líquidos). I= Inóculo de 0.5 cm de radio. H= Inóculo homogeneizado por 5 s.

La producción de biomasa de los experimentos en agitación tuvo de un 15 a un 39% más que los experimentos estáticos.

Producción de micelio en medio líquido de *Lentinula boryana* y *L. edodes* comparando entre los tratamientos: estático y agitación a 120 rpm

A partir de los cultivos de micelio de las cepas de *Lentinula boryana* CP-494 y *L. edodes* CP-7 en medio líquido CYM, se comparó su producción de biomasa micelial entre los tratamientos: estático y en agitación a 120 rpm en 50 ml de medio de cultivo CYM. Se obtuvo un 20% más de producción en el tratamiento con agitación a 120 rpm (Cuadro 14).

**Cuadro 14.** Producción micelial en tratamiento estático y agitación a 120 rpm en 50 mL de medio de cultivo.

Registro	Estático (mg/frasco)	Agitación a 120 rpm (mg/frasco)	rpm/estático (%)
CP-7	510	610	19.01
CP-494	400	480	20.84
CP-519	552	654.67	18.60

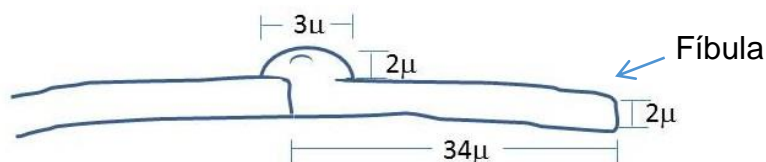
**Cuadro 15.** Incubación de las cepas de *Lentinula* en 75 mL de medio líquido CYM para la producción de biomasa micelial.

Registro	Código	Días de incubación	Peso fresco	Rend. Prom. fresco (mg/mL)	Peso seco	Rend. Prom. deshidratado (mg/mL)
<i>L. boryana</i>	CP-491	22	117.62	47.59	11.15	2.72
<i>L. boryana</i>	CP-494	22	147.82	50.91	15.54	3.53
<i>L. boryana</i>	CP-519	26	169.43	58.32	9.29	2.51
<i>L. edodes</i>	CP-7	22	84.11	28.31	5.30	1.63
<i>L. edodes</i>	CP-351	26	55.43	23.68	3.90	2.49
<i>L. edodes</i>	CP-580	22	101.96	33.62	8.00	1.90

Se analizaron los rendimientos de producción con diferentes volúmenes del medio de cultivo (50 y 75 mL) siendo el óptimo en 50 mL (Cuadro 15). En los experimentos con volúmenes mayores se presentó medio de cultivo al centro del frasco sin presencia de micelio.

## 8.2 Caracterización macroscópica y microscópica de la biomasa

A partir de un promedio de 5 bolsas de producción (40 x 60 cm, de 3 kg) con substrato de aserrín inoculadas con *L. boryana*, con 20 días de incubación, se determinó una caracterización macroscópica del micelio. Se determinó un crecimiento micelial del 100%, con textura lanosa, presencia de micelio aéreo, densidad micelial regular, hifas no erguidas y de color blanco. (Con base en la clasificación micelial de hongos comestibles del Laboratorio del CREGENH). Con ayuda de un microscopio óptico marca Zeiss, se observaron las estructuras microscópicas características del micelio de los hongos comestibles. Se detectó la presencia de fíbulas de manera abundante, así como micelio septado tipo monomítico de 2  $\mu$ m de ancho, con un largo de la hifa de 34  $\mu$ m, fíbulas de 3  $\mu$ m x 2  $\mu$ m. La estructura representativa se muestra en la figura 26.



**Figura 26.** Esquema de micelio con aumento 40X.

### 8.3. Producción y caracterización de basidiocarpos de *Lentinula boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7

La incubación de las unidades de producción, desde la inoculación en sustrato sólido hasta la última cosecha, presentó la formación de una costra café en la superficie. Los tiempos de la aparición de primordios, la inducción térmica y las fructificaciones se muestran en el cuadro 16.

**Cuadro 16.** Ciclo de las unidades de producción desde su inoculación en sustrato sólido hasta la última fructificación.

Muestra	Registro	Costra café (días)	A la inducción (días)	A la 1ª cosecha (días)	A la última cosecha (días)
<i>L. boryana</i>	CP-491	78	190	232	275
<i>L. boryana</i>	CP-494	82	176	211	245
<i>L. boryana</i>	CP-519	85	168	180	235
<i>L. edodes</i>	CP-7	63	130	142	268
<i>L. edodes</i>	CP-351	73	84	97	155
<i>L. edodes</i>	CP-580	83	124	127	157

La producción de la biomasa deshidratada de los hongos cultivados en el módulo experimental de producción del Colegio de Postgraduados en condiciones controladas de humedad y ventilación se muestra en el cuadro 17.

**Cuadro 17.** Biomasa deshidratada promedio de los basidiocarpos de *Lentinula boryana* y *L. edodes*.

Registro	Muestra	UP elaboradas	UP contaminadas	UP fructificadas	Biomasa fresca (g)	Biomasa deshidratada (g)	Humedad (%)
(CP-491)	<i>L. boryana</i>	33	22	5	510.04	55.85	89.05
(CP-494)	<i>L. boryana</i>	34	9	21	1527.17	224.80	85.28
(CP-519)	<i>L. boryana</i>	20	7	10	2250.29	284.74	87.35
(CP-7)	<i>L. edodes</i>	188	62	13	6,563.3	783	88.07
(CP-351)	<i>L. edodes</i>	91	13	10	3,878.67	633	83.68
(CP-580)	<i>L. edodes</i>	62	10	10	2,453.59	304	87.61

UP: unidad de producción.

#### Caracterización de los basidiocarpos

Una vez obtenidos los basidiocarpos de *L. boryana* y *L. edodes*, se caracterizaron según su morfología de píleo y estípite (Cuadro 18).



**Cuadro 18.** Caracterización morfológica de basidiocarpos de *Lentinula boryana* y *L. edodes*.

Píleo	<i>L. boryana</i> (CP-519)	<i>L. edodes</i> (CP-7)	Estípite	<i>L. boryana</i>	<i>L. edodes</i>
Diámetro (cm)	14.0 x 11.9	11.5 x 11.0	Diámetro (cm)	1.0 x 1.9	4.5
Grosor (cm)	5.4	4.6	Largo (cm)	6.5	1.2
Forma	Semicircular	Semicircular	Peso Máximo/promedio	48 / 33	54/37
Textura	Escamosa	Escamosa	Textura	Fibrosa	Fibrosa
Consistencia	Blanda	Blanda	Color	Pantone 730 C	Pantone 727 C
Color	Pantone 727C	Pantone 724C	Tipo de bulbo	Oblicuo	Oblicuo

Para *Lentinula boryana* se realizó una clasificación por tamaño de los hongos frescos, se determinaron las clases del tamaño del hongo con el siguiente criterio:  $< 3$  cm (G1);  $\geq 3$  cm y  $< 7$  cm (G2);  $\geq 7$ cm (G3). Los porcentajes de producción por la clasificación de tamaño fueron: G1 = 12.5%; G2 = 40.0% y G3 = 47.5%. El píleo más chico registrado fue de 2.3 x 2.5 cm, y el más grande fue de 13.9 x 14.4 cm, el promedio y moda fue de 7.0 x 7.2 cm. El píleo más chico registrado pesó 1.1 g y el más grande pesó 27.9 g, el promedio fue de 4.6 g. Para *Lentinula edodes* se realizó una clasificación por tamaño de los hongos frescos, se determinaron las clases del tamaño del hongo con el siguiente criterio:  $< 3$  g (G1);  $\geq 3$  g y  $\leq 7$  g (G2);  $> 7$ g (G3). Los porcentajes de producción por la clasificación de tamaño fueron: G1 = 9.7%; G2 = 38.0% y G3 = 52.3%. El píleo más chico registrado fue de 2.7 x 2.8 cm, y el más grande fue de 15.2 x 15.9 cm, el promedio fue de 7.2 x 7.6 cm. El píleo más chico registrado pesó 2 g y el más grande pesó 48 g, el promedio fue de 27.6 g.

#### **8.4 Producción de extractos de *Lentinula boryana* y *L. edodes* por maceración con los solventes: agua y solución hidroalcohólicos al 20% y 35%**

Una vez obtenidos cada uno de los macerados por 24 horas de 10 g de hongo deshidratado en los solventes agua e hidroalcohólicos al 20% y 35%, se filtraron con papel filtro de poro tamaño medio. Los extractos se concentraron a menos de 10 ml y se aforaron a 10 ml con el mismo solvente con el que se extrajeron, se esterilizó por microfiltración, se tomaron muestras para su caracterización y el resto se guardó a 4°C hasta su uso. El volumen obtenido después de esterilizar por microfiltración fue de 9 mL para los hidroalcoholicos y 8 mL para los de agua.

#### 8.4.1 Caracterización de los diferentes extractos de *Lentinula boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7

#### 8.4.2 Densidad, peso residual y rendimiento de los extractos de hongos

Se midió el volumen por cuadruplicado (0.5 ml), se pesó en una caja de Petri y se llevó a sequedad (38°C) por 3 días, hasta obtener un peso constante, obteniendo los resultados de densidad, peso residual y rendimiento. La densidad se obtuvo de dividir el promedio del peso de las muestras (n=4) sobre el volumen de la misma (0.5 ml). El peso residual se obtuvo de llevar 0.5 ml (n=4) del extracto del hongo a peso seco (constante) a 38°C. El rendimiento de los extractos de hongo fue obtenido de dividir el peso seco (constante) a 38°C del extracto de hongos sobre el volumen de la muestra y el resultado multiplicado por 100, como se muestra en la siguiente ecuación y su resultado en el cuadro 19.

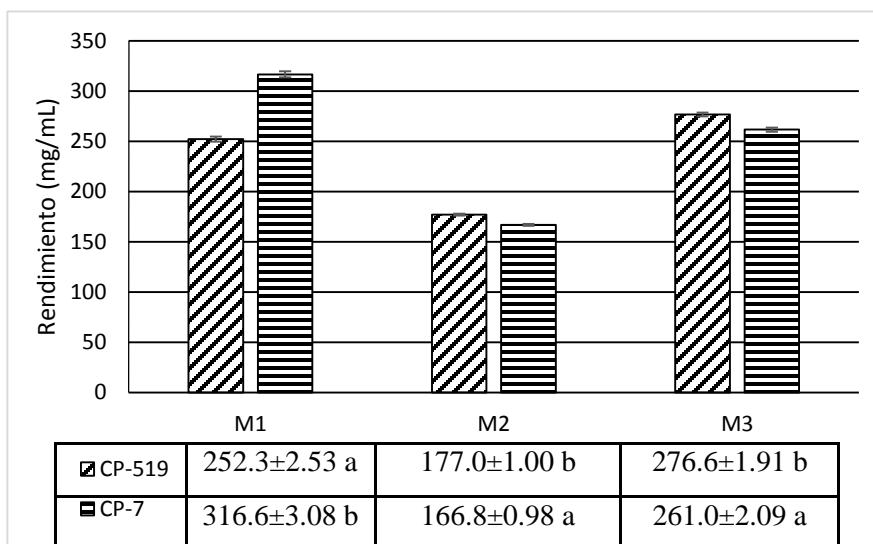
$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{peso residual promedio}}{\text{volumen de la muestra}} \times 100$$

**Cuadro 19.** Densidad, peso residual y rendimiento de los extractos de hongos *Lentinula boryana* (CP-519) y *L. edodes* (CP-7) en los diferentes solventes.

Registro	Solvente	Densidad (g/mL)	Peso residual (g/mL)	Rendimiento (%)
CP-519	Agua	1.12	0.2523	25.23
CP-519	Agua : alcohol 20%	1.09	0.2766	27.66
CP-519	Agua : alcohol 35%	1.05	0.1770	17.7
CP-7	Agua	1.15	0.3166	31.66
CP-7	Agua : alcohol 20%	1.16	0.2617	26.17
CP-7	Agua : alcohol 35%	1.06	0.1668	16.68

Réplicas= 4.

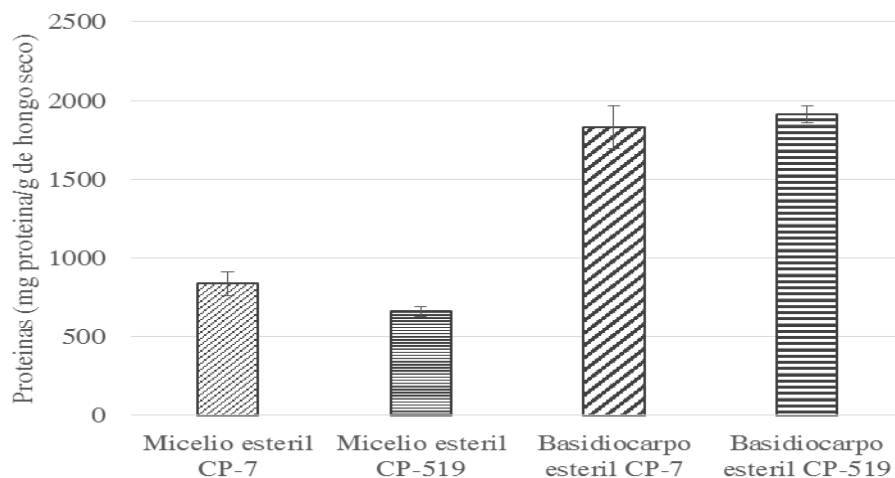
En la figura 27 se muestran los rendimientos de los extractos obtenidos.



**Figura 27.** Rendimiento de los extractos de *Lentinula edodes* CP-7, *L. boryana* CP-519, acuoso (M1), hidroalcohólico 35% (M2), hidroalcohólico 20% (M3), a y b son grupos estadísticamente diferentes, Tukey 0.05 (n=4).

El rendimiento del extracto de *Lentinula edodes* CP-7 por maceración en agua fue del 42.46%, hidroalcohólico al 20% del 35.62% e hidroalcohólico al 35% del 21.91% en peso; para el extracto de *L. boryana* CP-519, el rendimiento en agua fue del 35.21%, hidroalcohólico al 20% del 39.44% e hidroalcohólico al 35% del 25.35% en peso, como se muestra en la figura 27.

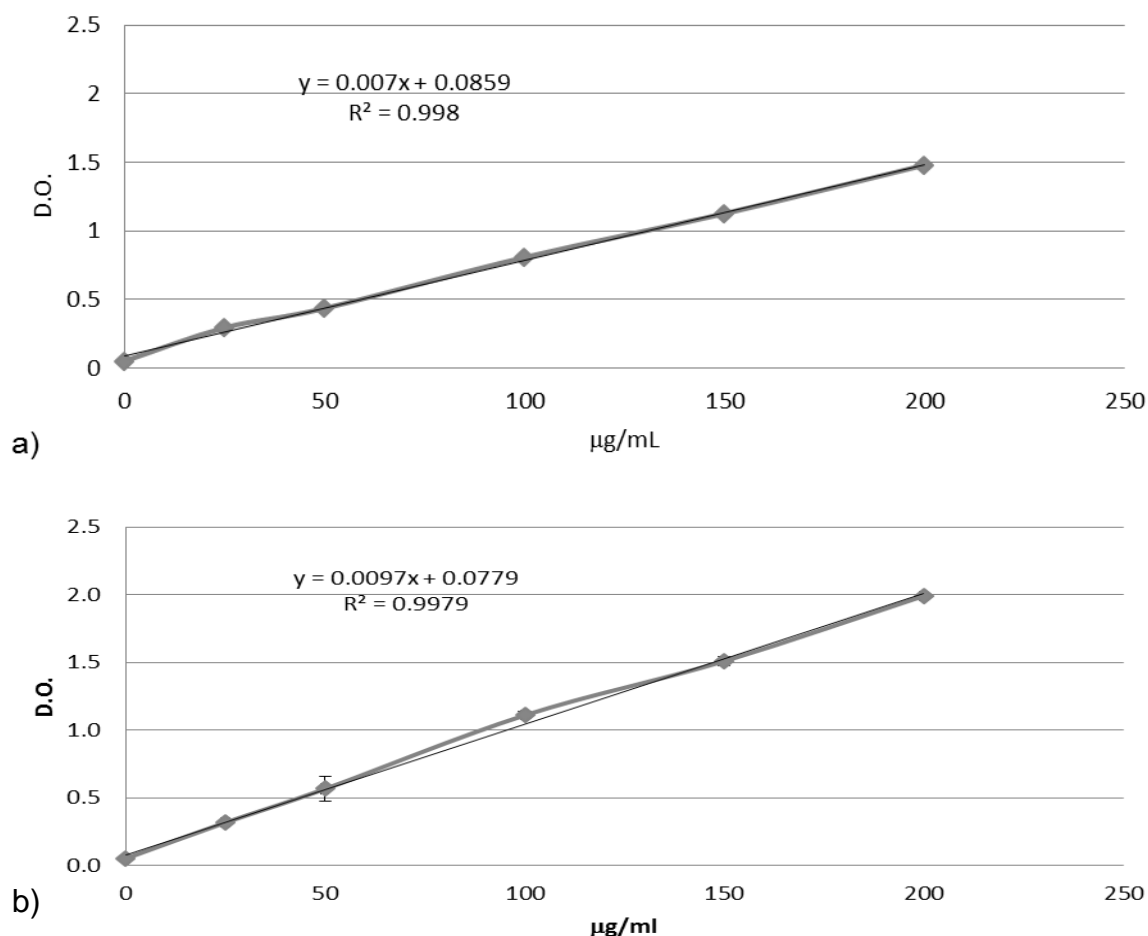
### 8.4.3 Contenido de proteínas



**Figura 28.** Determinación de proteínas, en donde se muestra que los basidiocarpos tienen el doble que el micelio y que estadísticamente ambas especies tienen la misma concentración. Se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de Tukey  $\alpha=0.05$  (n = 3).

#### 8.4.4 Contenido de polifenoles totales

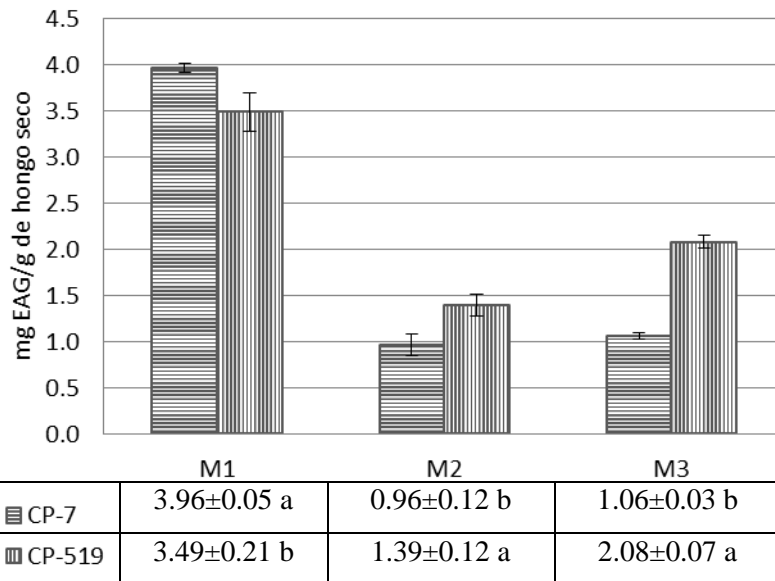
Para la determinación de polifenoles totales en *Lentinula boryana* y *L. edodes* como equivalentes de ácido gálico, se corrieron inicialmente las curvas de calibración de ácido gálico, siendo las que se muestran en la figura 29, con concentraciones de 0 a 200 mg/L.



**Figura 29.** Curva de calibración del ácido gálico para a: *Lentinula boryana* y b: *L. edodes* (n=4).

#### 8.4.5 Cuantificación de polifenoles totales como equivalentes de ácido gálico de los basidiocarpos en diferentes solventes

Los polifenoles totales obtenidos del extracto por maceración de *L. boryana* y *L. edodes* son equivalentes a los mg de ácido gálico (EAG) por gramo de hongo seco y sus resultados se muestran en la figura 30.

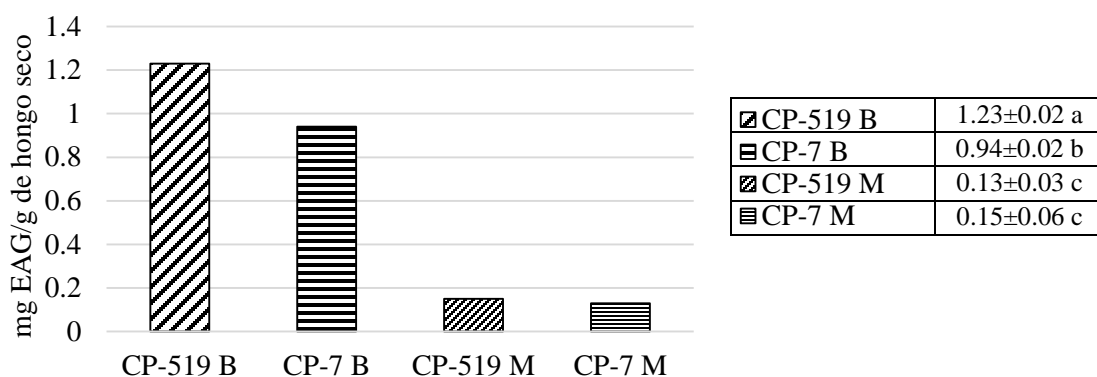


**Figura 30.** Polifenoles totales de *Lentinula boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7, obtenidos por maceración en los extractos, acuoso (M1), hidroalcohólico 35% (M2), hidroalcohólico 20% (M3), a y b son grupos estadísticamente diferentes, Tukey 0.05 (n=4).

Para determinar si existen diferencias significativas en los extractos de los hongos *L. boryana* y *L. edodes* en cuerpos fructíferos y entre los solventes, se realizó un análisis de varianza con un sentido de clasificación dando como resultado un valor de  $F = 366.12$  y una significancia de  $<0.0001$  lo que determina que si existen diferencias significativas entre los extractos. Con el fin de determinar que extractos son diferentes, se realizó la prueba de separación de medias de Tukey observándose que el extracto del basidiocarpo de *L. boryana* CP-519 se diferencia en los tres solventes, siendo el extracto en agua el más importante, el extracto de *L. edodes* tiene independiente el extracto acuoso y en otro grupo los extractos hidroalcohólicos.

El valor más alto de polifenoles totales de *Lentinula edodes* CP-7 fue de  $3.96 \pm 0.05$  y *Lentinula boryana* CP-519 con  $3.49 \pm 0.21$  mg EAG/g de hongo seco en el extracto acuoso y de  $2.08 \pm 0.07$  y  $1.39 \pm 0.12$  mg EAG/g de hongo seco en los extractos hidroalcohólicos (20%) e hidroalcohólicos (35%) respectivamente, estos dos últimos extractos tuvieron una concentración de polifenoles totales mayor que sus respectivos de *L. edodes*.

#### 8.4.5.1 Cuantificación de polifenoles totales como equivalentes de ácido gálico para los extractos hidroalcohólicos al 35% de los basidiocarpos y micelio de los hongos *L. boryana* y *L. edodes*.



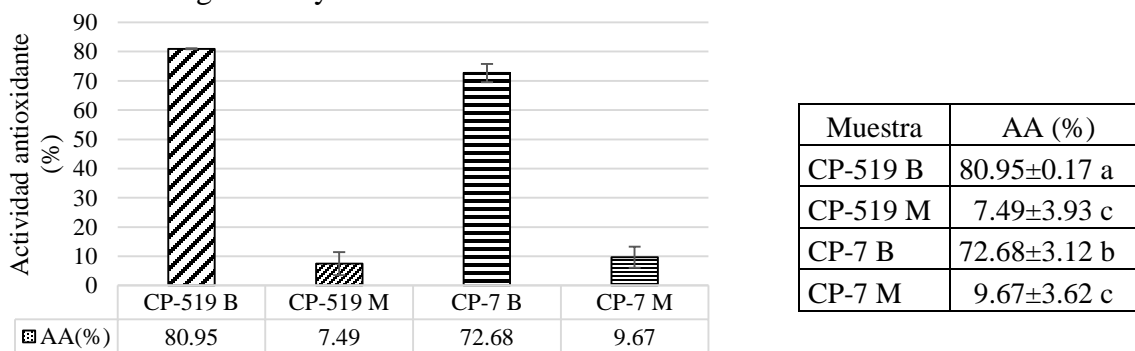
**Figura 31.** Determinación de equivalentes de ácido gálico de los extractos de micelio y basidiocarpio de *L. boryana* y *L. edodes*. B: basidiocarpio; M: micelio; \*Medias con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una  $\alpha \leq 0.05$ .

Esta prueba tuvo una  $F = 279.74$  y una significancia de  $<0.0001$  lo que determina que si existen diferencias significativas entre los extractos. Con el fin de determinar que extractos son diferentes, se realizó la prueba de separación de medias de Tukey observándose que el extracto del basidiocarpio de *L. boryana* CP-519 se diferencia del extracto de basidiocarpio de *L. edodes* CP-7 y como un grupo aparte se encuentran los extractos del micelio.

Cabe destacar que los extractos de basidiocarpio se hicieron por separado entre las dos pruebas y estos presentan valores muy similares para cada cepa.

#### 8.4.6 Cuantificación de la actividad antioxidante por DPPH

Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos al 35% por DPPH, se realizó utilizando el reactivo 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo. Los resultados se muestran en las figuras 32 y 33.

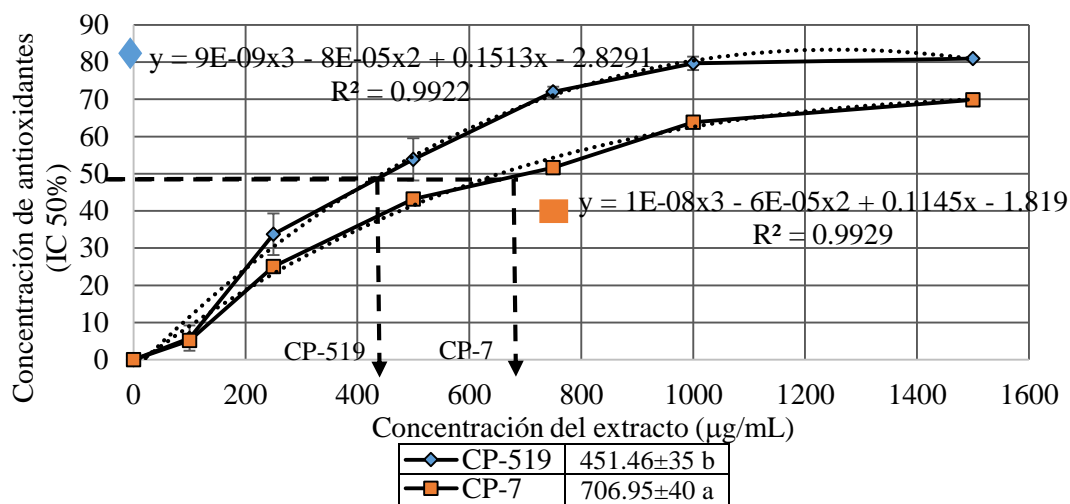


**Figura 32.** Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de micelio y basidiocarpio de *L. boryana* y *L. edodes* con los controles de referencia. AA: Actividad antioxidante; B: basidiocarpio; M: micelio; \*Medias con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una  $\alpha \leq 0.05$ .

Para determinar si existen diferencias significativas en los extractos de los hongos *L. boryana* y *L. edodes* en cuerpos fructíferos y en micelio se realizó un análisis de varianza con un sentido de clasificación dando como resultado un valor de  $F = 292.21$  y una significancia de

<0.0001 lo que determina que si existen diferencias significativas entre los extractos. Con el fin de determinar que extractos son diferentes, se realizó la prueba de separación de medias de Tukey observándose que el extracto del basidiocarpo de *L. boryana* CP-519 se diferencia de los extractos del basidiocarpo de *L. edodes* y los extractos del micelio componen otro grupo diferente.

La actividad antioxidante alcanzada por los extractos de los basidiocarpos fueron muy cercanas a las de los controles, pero la concentración requerida para obtener la EC50% fue mucho mayor que los controles, siendo para estos últimos de 20 mg/mL. En el caso de los extractos hidroalcohólicos al 35% de basidiocarpos de *L. boryana* y *L. edodes* se requirieron de 451 y 706 mg/mL respectivamente, para el caso del micelio, no se pudo determinar por requerirse una concentración muy elevada (figuras 30a y 30b).

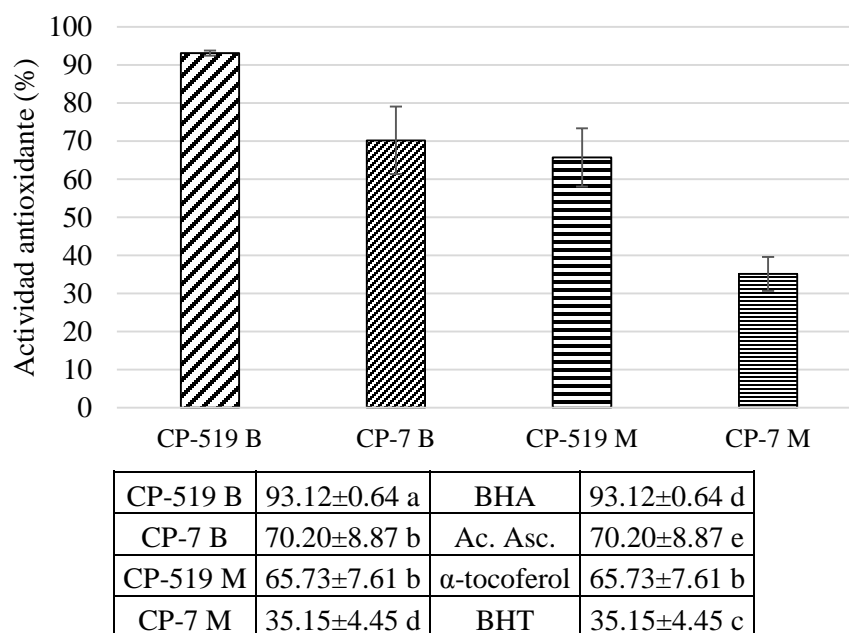


**Figura 33.** Determinación de antioxidantes por DPPH de los extractos de basidiocarpo de *Lentinula boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 en solvente hidroalcohólico al 35%. Los datos fueron calculados por análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey con  $\alpha=0.05$  ( $n=3$ ). IC 50%: Concentración de inhibición al 50%; \*Medias con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a un  $\alpha \leq 0.05$ .

El análisis de varianza con un sentido de clasificación dió como resultado un valor de  $F = 13.15$  y una significancia de  $<0.0222$  lo que determina que si existen diferencias significativas entre los extractos. Con el fin de determinar que extractos son diferentes, se realizó la prueba de separación de medias de Tukey observándose que el extracto del basidiocarpo de *L. boryana* CP-519 se diferencia de los extractos del basidiocarpo de *L. edodes* y los extractos del micelio componen otro grupo diferente.

#### 8.4.7 Cuantificación de la actividad antioxidante por ABTS

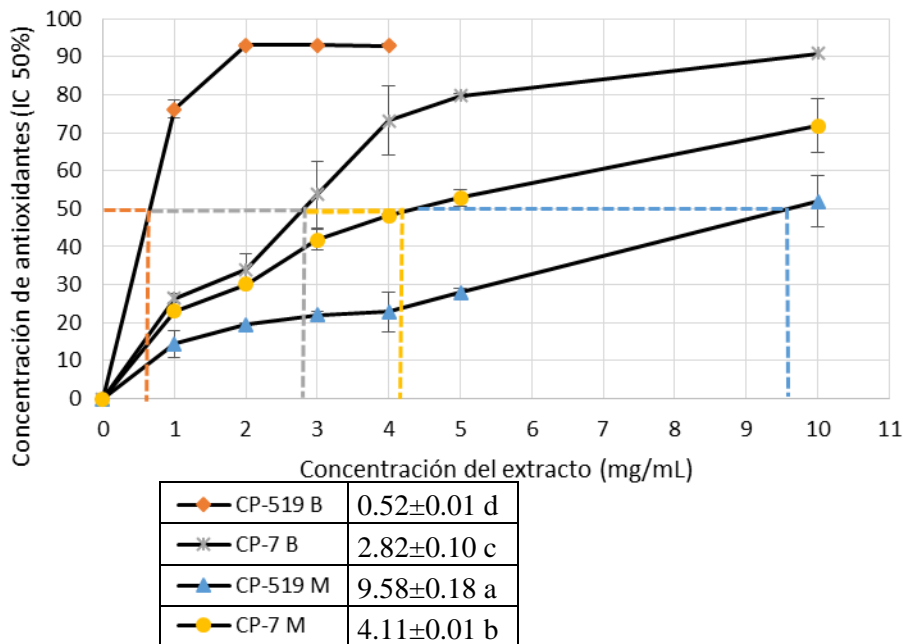
Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos al 35% por ABTS, se realizó utilizando el reactivo 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 34 y 35.



**Figura 34.** Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de micelio y basidiocarpo de *L. boryana* y *L. edodes* con los controles de referencia. AA: Actividad antioxidante; B: basidiocarpo; M: micelio; \*Medias con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una  $\alpha \leq 0.05$ .

Para determinar si existen diferencias significativas en los extractos de los hongos *L. boryana* y *L. edodes* en cuerpos fructíferos y en micelio se realizó un análisis de varianza con un sentido de clasificación dando como resultado un valor de  $F = 41.23$  y una significancia de  $<0.0001$  lo que determina que si existen diferencias significativas entre los extractos. Con el fin de determinar que extractos son diferentes, se realizó la prueba de separación de medias de Tukey observándose que el extracto del basidiocarpo de *L. boryana* CP-519 se diferencia de los extractos del basidiocarpo de *L. edodes* y micelio de *L. boryana* quienes componen otro grupo diferente al extracto del micelio de *L. edodes*, siendo éste último el que presentó la menor actividad antioxidante.





**Figura 35.** Determinación de antioxidantes por ABTS de los extractos de basidiocarp de *Lentinula boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 en solvente hidroalcohólico al 35%. Los datos fueron calculados por análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey con  $\alpha=0.05$  y ( $n=3$ ). IC 50%: Concentración de inhibición al 50%; \*Medias con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a un  $\alpha\leq 0.05$ .

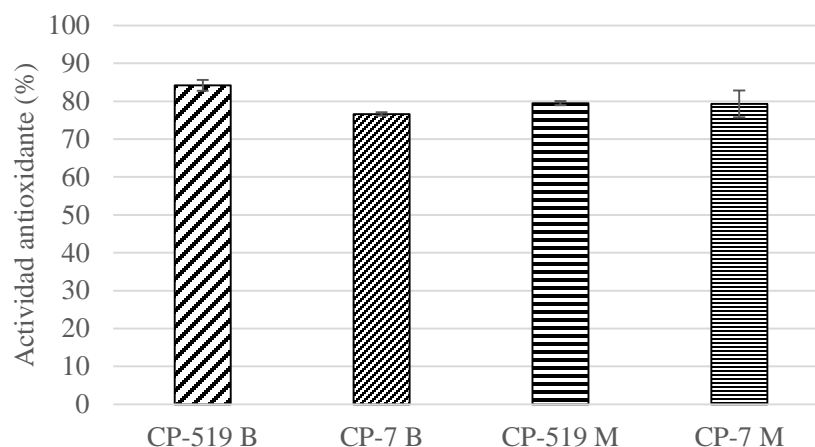
Para determinar si existen diferencias significativas en los extractos de los hongos *L. boryana* y *L. edodes* en cuerpos fructíferos y en micelio se realizó un análisis de varianza con un sentido de clasificación dando como resultado un valor de  $F = 42.24$  y una significancia de  $<0.0001$  lo que determina que si existen diferencias significativas entre los extractos. Con el fin de determinar que extractos son diferentes, se realizó la prueba de separación de medias de Tukey observándose que el extracto del basidiocarp de *L. boryana* CP-519 se diferencia de los extractos del basidiocarp de *L. edodes* y micelio de *L. boryana* quienes componen otro grupo diferente al extracto del micelio de *L. edodes*, siendo éste último el que presentó la menor actividad antioxidante. En el caso de la determinación de la actividad antioxidante se observó que los extractos hidroalcohólicos al 35% de la cepa *L. boryana* CP-519 fue la que tuvo una actividad antioxidante más alta en comparación con las otras cepas, incluyendo los controles (Fig. 34). Esto se debe a que la concentración de antioxidantes (IC 50%) en el basidiocarp de la cepa CP-519 fue mayor que la encontrada en la cepa CP-7 (Fig. 35).

Para la determinación de la actividad antioxidante en el micelio de la cepa CP-519 se observó una actividad similar que el extracto del basidiocarp de *L. edodes* CP-7, siendo

estadísticamente iguales (Fig. 34). En el caso de la concentración de antioxidantes (IC 50%) del micelio de la cepa de *L. edodes* CP-7 tuvo el doble que el observado en la cepa CP-519 (Fig. 35).

#### 8.4.8 Cuantificación de la actividad antioxidante por $\beta$ -carotenos

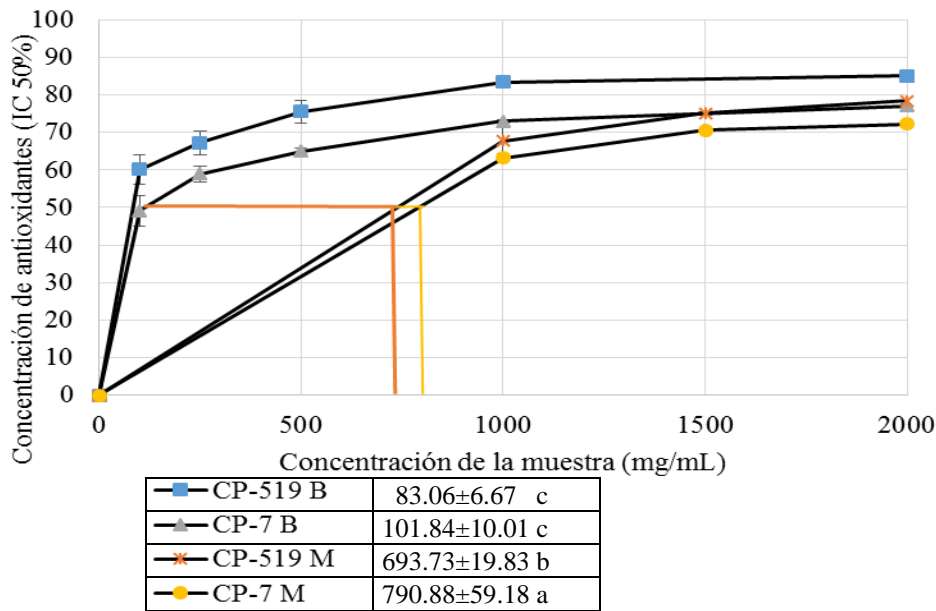
En el caso de la determinación de la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos al 35% por  $\beta$ -carotenos, se observó que todas las muestras evaluadas tuvieron un porcentaje de actividad entre un 76 y 84%. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 36 y 37.



Muestra	AA(%)	Muestra	AA(%)
CP-519 B	84.19±1.46 a	BHA	96.89±0.36 a
CP-7 B	76.61±0.47 b	Ac. Asc.	74.22±0.5 d
CP-519 M	79.47±0.56 ab	$\alpha$ -tocoferol	99.30±0.58 a
CP-7 M	79.29±3.55 ab	BHT	98.26±0.29 a

**Figura 36.** Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de micelio y basidiocarpo de *L. boryana* y *L. edodes* con los controles de referencia. AA: Actividad antioxidante; B: basidiocarpo; M: micelio; \*Medias con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una  $\alpha \leq 0.05$ .

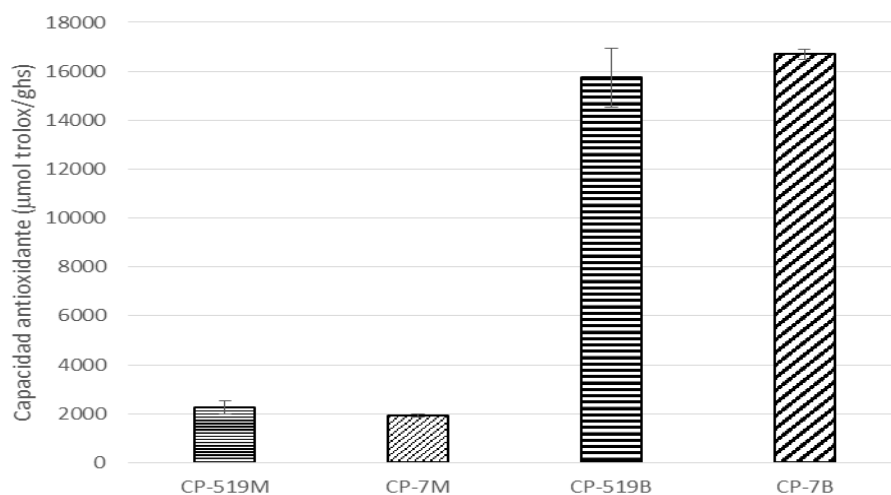
Se observa que todos tienen una alta actividad antioxidante a través del tiempo con una  $F= 1.99$  y una significancia de 0.1936, por lo que no existe una diferencia en ninguno de los tratamientos, destacando que todos son altos.



**Figura 37.** Determinación de antioxidantes por  $\beta$ -carotenos de los extractos de basidiocarpo de *Lentinula boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 en solvente hidroalcohólico al 35%. Cálculos por análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey con  $\alpha=0.05$  ( $n=3$ ). IC 50%: Concentración de inhibición al 50%; \*Medias con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a un  $\alpha \leq 0.05$ .

En la determinación de antioxidantes por b-carotenos, se observó que los extractos de los basidiocarpos tuvieron una concentración siete veces mayor que el micelio correspondiente (Fig. 37) lo que corresponde a una  $F=111.36$  y una significancia de  $<0.0001$  lo que determina que si existen diferencias significativas entre los extractos. Con el fin de determinar que extractos son diferentes, se realizó la prueba de separación de medias de Tukey observándose que los extracto del basidiocarpo se diferencian de los extractos del micelio, teniendo mejores características el basidiocarpo, entre los extractos de micelio si se obtuvieron diferencias siendo mejor el de *L. boryana*.

#### 8.4.9 Determinación de antioxidantes por la Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)



CP-519M	2258±251.34 b
CP-7M	1920±50.58 b
CP-519B	15742±1216.2 a
CP-7B	16694±190.92 a

**Figura 38.** Determinación de antioxidantes por ORAC de los extractos de basidiocarpo de *Lentinula boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 en solvente hidroalcohólico al 35%. Los datos fueron calculados por análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey con  $\alpha=0.05$  y (n=3). \*Medias con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a un  $\alpha \leq 0.05$ .

Para determinar si existen diferencias significativas en los extractos de los hongos de *L. boryana* y de *L. edodes* en cuerpos fructíferos y en micelio se realizó un análisis de varianza con un sentido de clasificación dando como resultado un valor de  $F = 32.06$  y una significancia de  $<0.0001$  lo que determina que si existen diferencias significativas entre los extractos. Con el fin de determinar que extractos son diferentes, se realizó la prueba de separación de medias de Tukey observándose que los extractos de los basidiocarpos se diferencian de los extractos del micelio; en esta técnica se observa que no existe diferencia entre ninguno de los hongos en estudio, ni en basidiocarpos ni en micelio.

En la determinación de antioxidantes por la técnica del radical oxígeno ORAC, se observó que los extractos de los basidiocarpos tuvieron una concentración siete veces mayor que su micelio correspondiente (Fig. 38), observándose la misma tendencia que en la determinación por  $\beta$ -carotenos.

**Cuadro 20.** Muestra el contenido de antioxidantes por las diferentes técnicas en extractos hidroalcohólicos al 35% de las cepas CP-519 de *Lentinula boryana* y CP-7 de *Lentinula edodes*.

Registro	Muestra	Polifenoles totales (µg EAG/ghs)	DPPH IC 50% (µg/mL)	ABTS IC 50% (µg/mL)	β- carotenos IC 50% (µg/mL)	ORAC (µmol trolox/ghs)
CP-519	B	123.13±1.96 a	451.46±66.09 b	0.52±0 e	108.51±11.51 b	15742±1216 a
CP-519	M	14.99±6.51 c		13.89±3.19 b	536.31±34.35 a	2258±251 b
CP-7	B	13.79±2.68 b	645.3±64.76 a	5.4±0.18 d	137.18±17.33 b	16694±191 a
CP-7	M	94.28±1.74 c		2.82±0.01 c	801.2±102.37 a	1920±50.5 b
	BHA		15.93±0.94 d	6.89±0.18 c	0.57±0.02 c	
	BHT		26.43±6.93 c	4.92±0.08c	0.55±0.00 c	
	AA		17.81±0.85 d	22.57±0.86 a	0.78±0.03 c	
	a-t		4.83±0.08 d	6.36±0.09 c	0.56±0.01 c	

B: basidiocarpo. M: micelio. AA: ácido ascórbico. α-t: α-tocoferol. IC 50%: Concentración de inhibición al 50%. Ghs: gramos de hongo seco.\*Medias con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una  $\alpha \leq 0.05$ .

Haciedo una correlación de Pearson entre las diferentes técnicas para determinar la actividad y concentración de antioxidantes en los diferentes extractos hidroalcohólicos al 35% (cuadro 20), se observó que la correlación entre las técnicas es mayor del 90% con una  $F < 0.0001$ , lo cual da el soporte para el contraste de la hipótesis en la cual se determina que si existe diferencia entre los extractos debido a su naturaleza entre micelio y basidiocarpo, entre cepas de *L. boryana* y *L. edodes* en los extractos hidroalcohólicos al 35%.

## **8.5 Prueba de susceptibilidad bacteriana de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 sobre nueve cepas de bacterias de interés clínico**

### **8.5.1 Concentración de los extractos de *L. boryana* y *L. edodes* en las diferentes diluciones en la microplaca**

El extracto de 10 g de hongo seco se concentró y se aforó a 10 mL, con los solventes de agua y soluciones hidroalcohólicas al 20% y 35%, en una concentración inicial de un gramo de hongo seco por mililitro (1 ghs/mL), esto se llevó a cabo por triplicado para cada solvente. El nivel de dilución, el volumen y la concentración del extracto correspondiente a cada nivel de dilución en la microplaca para *L. boryana* y *L. edodes* se muestra en los Cuadros 21 y 22.

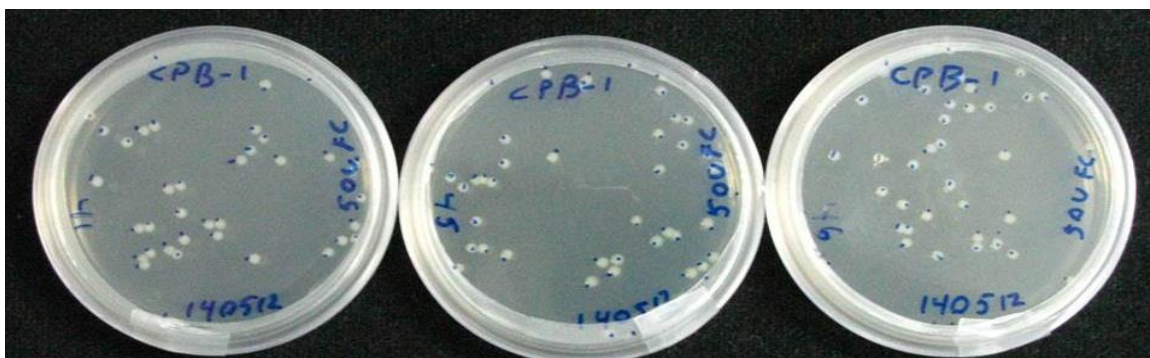
**Cuadro 21.** Concentración del extracto de *Lentinula boryana* CP-519 en las diferentes microdiluciones en la microplaca.

Dilución	Extracto ( $\mu$ l)	Acuoso (mg/mL)	Hidroalcohólico al 20% (mg/mL)	Hidroalcohólico al 35% (mg/mL)
D1	50	126.17	138.33	88.53
D2	25	63.08	69.17	44.27
D3	12.5	31.54	34.58	22.13
D4	6.25	15.77	17.29	11.07
D5	3.125	7.89	8.65	5.53
D6	1.563	3.94	4.32	2.77
D7	0.781	1.97	2.16	1.38
D8	0.391	0.99	1.08	0.69
D9	0.195	0.49	0.54	0.35
D10	0.098	0.25	0.27	0.17
D11	0.049	0.12	0.14	0.09
D12	0.024	0.06	0.07	0.04

**Cuadro 22.** Concentración del extracto de *Lentinula edodes* CP-7 en las diferentes microdiluciones en la microplaca.

Dilución	Extracto ( $\mu$ L)	Acuoso (mg/mL)	Hidroalcohólico al 20% (mg/mL)	Hidroalcohólico al 35% (mg/mL)
D1	50	158.30	130.85	83.40
D2	25	79.15	65.43	41.70
D3	12.5	39.58	32.71	20.85
D4	6.25	19.79	16.36	10.43
D5	3.125	9.89	8.18	5.21
D6	1.563	4.95	4.09	2.61
D7	0.781	2.47	2.04	1.30
D8	0.391	1.24	1.02	0.65
D9	0.195	0.62	0.51	0.33
D10	0.098	0.31	0.26	0.16
D11	0.049	0.15	0.13	0.08
D12	0.024	0.08	0.06	0.04

### 8.5.2 Bioensayo con la cepa CPB-1 de *Salmonella typhi*



**Figura 39.** Cultivo de *Salmonella typhi* CPB-1 por microdilución en medio de cultivo Mueller Hinton a las 24 horas.



**Figura 40.** Imagen de las UFC de *Salmonella typhi* CPB-1 al microscopio a las 24 horas de incubación.

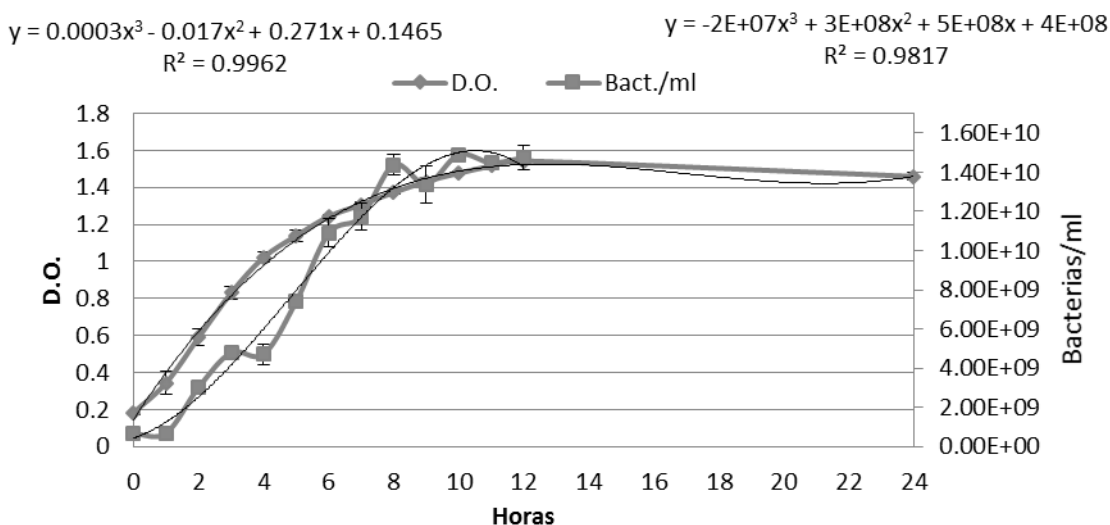
En las figuras 39 y 40 se muestran las cajas del crecimiento de colonias de *Salmonella typhi*, después de diluir  $2 \times 10^6$  veces el número de bacterias. Esta prueba verifica el número de bacterias inoculadas en cada pozo del experimento en la microplaca, siendo el correspondiente de multiplicar el número de UFC de la caja de Petri por 200, siendo para este caso de  $0.88 \pm 0.06 \times 10^4$  bacterias/pozo. A su vez, este procedimiento permite validar la muestra bacteriana al identificarse el crecimiento de un solo tipo de colonia en el medio de cultivo y la caracterización de la misma (Fig. 40).

Se observaron las siguientes características morfológicas:

Forma	Borde	Elevación	Textura	Color
Circular	Entero	Convexa	Viscosa	Blanco opaco

### 8.5.2.1 Confirmación del inóculo

En la figura 41 se observa la relación entre la curva de crecimiento de *Salmonella typhi* CPB-1 determinada por la Densidad Óptica (D.O.) y la curva de crecimiento determinada por conteo en el microscopio en cámara de Neubauer en número de bacterias/ml. La D. O. está representada en la ecuación de tercer orden de la esquina superior izquierda, y el conteo de bacterias está representado en la ecuación de tercer orden del lado superior derecho. La relación entre las dos curvas tiene una  $R^2$  final de 0.9779 al utilizar una ecuación como dependiente de la otra.

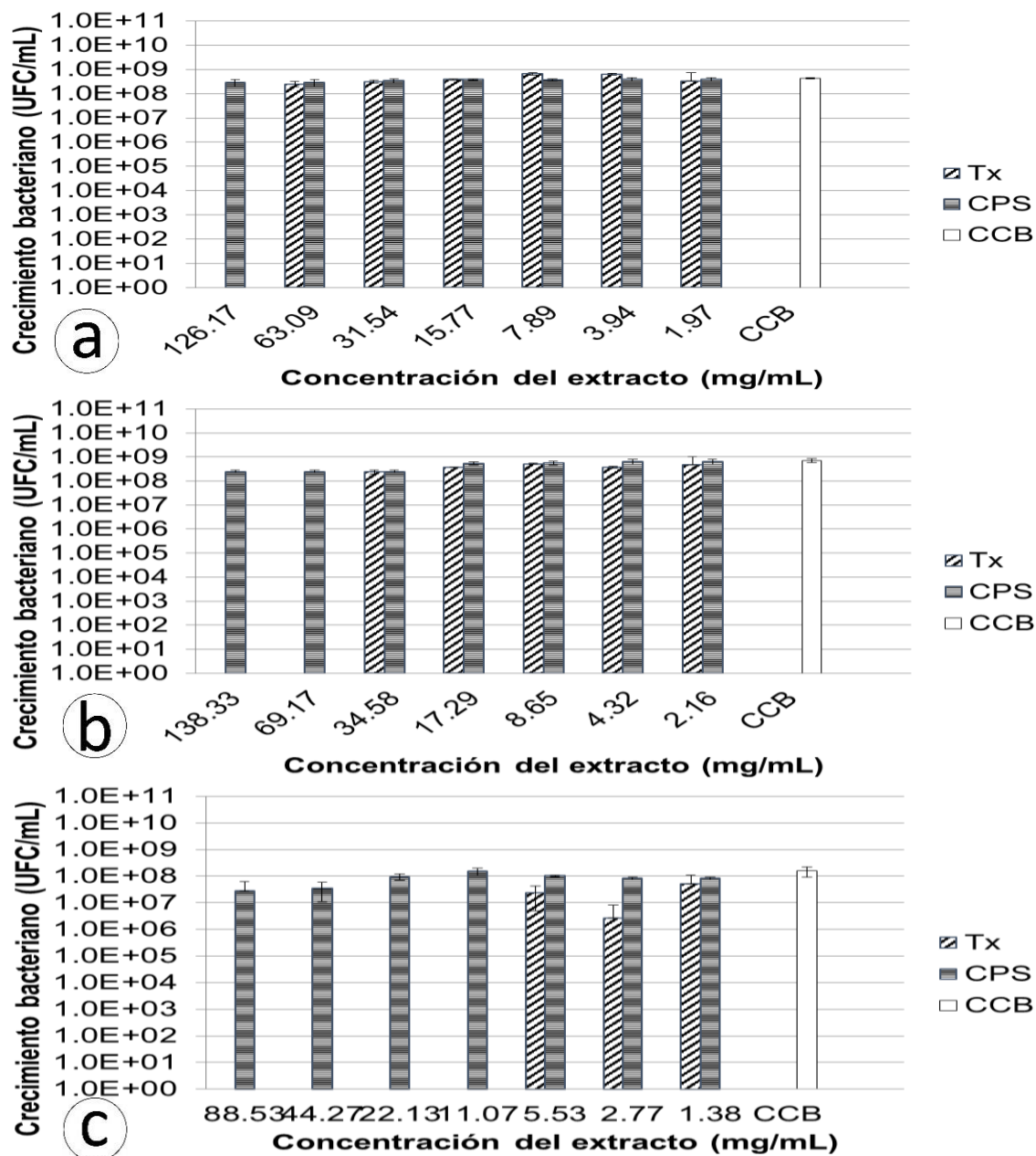


**Figura 41.** Cinética de *Salmonella typhi* CPB-1, determinada por lectura de D.O. a 600 nm y UFC por conteo al microscopio en cámara de Neubauer (n=6). La concentración máxima calculada por interpolación en la cinética de *S. typhi* fue de  $1.57 \times 10^{10}$  bacterias/ml.

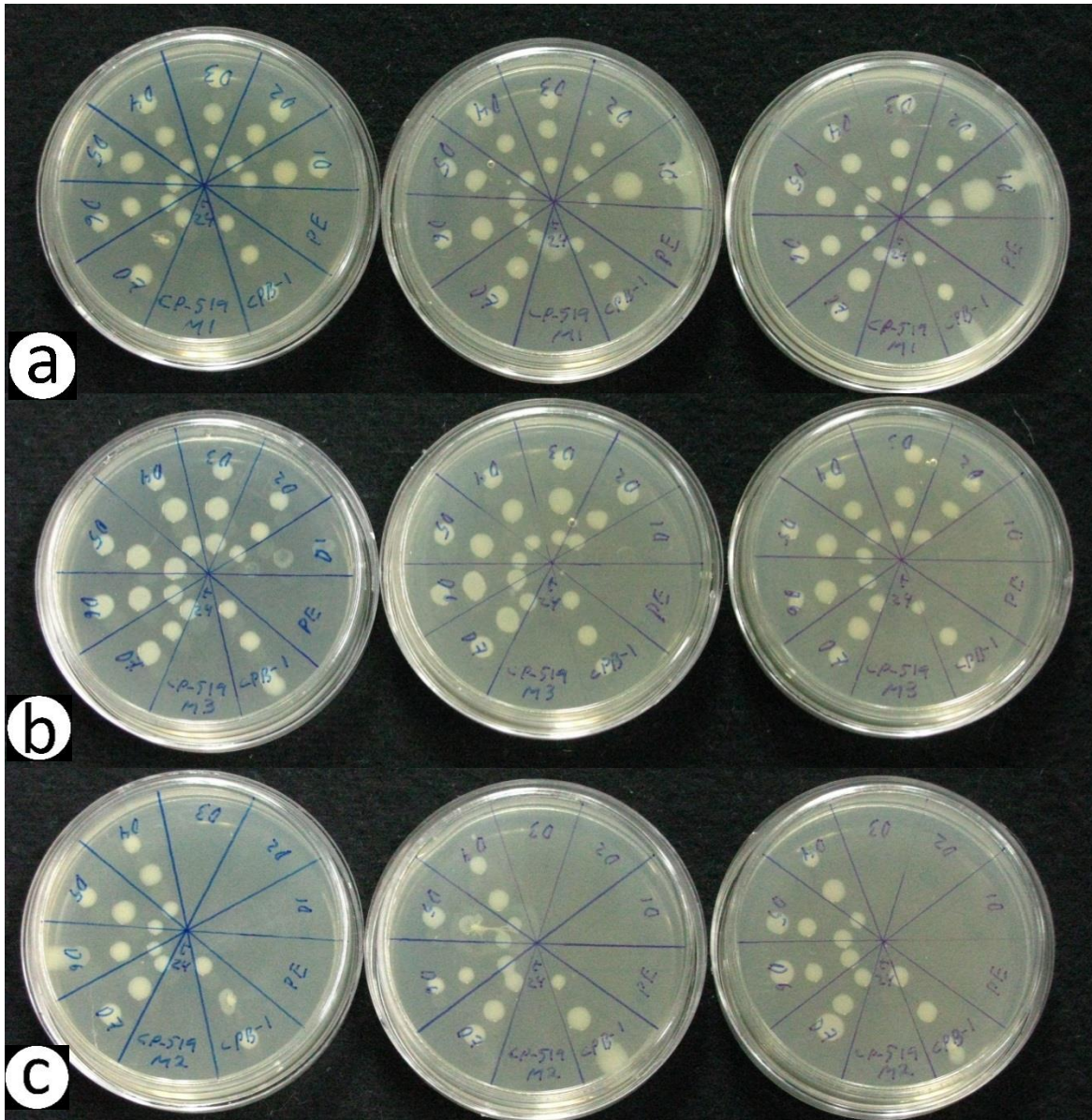
### 8.5.2.2 Efecto de los extractos de *L. boryana* CP-519

El efecto del extracto de *L. boryana* sobre la bacteria *Salmonella typhi* CPB-1 a una concentración constante de  $0.88 \times 10^4$  bacterias/ml (Fig. 40), se observó por medio de la lectura de la D.O. de cada muestra (Fig. 42). Se realizó su resiembra en medio sólido que se presenta en la figura 43. Este diseño experimental nos permitió determinar el efecto de crecimiento o la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB), las cuales se muestran en el cuadro 23.





**Figura 42.** Efecto bacteriostático del extracto de *L. boryana* sobre *Salmonella typhi* CPB-1, a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35% (M3). Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: control de crecimiento de la bacteria.

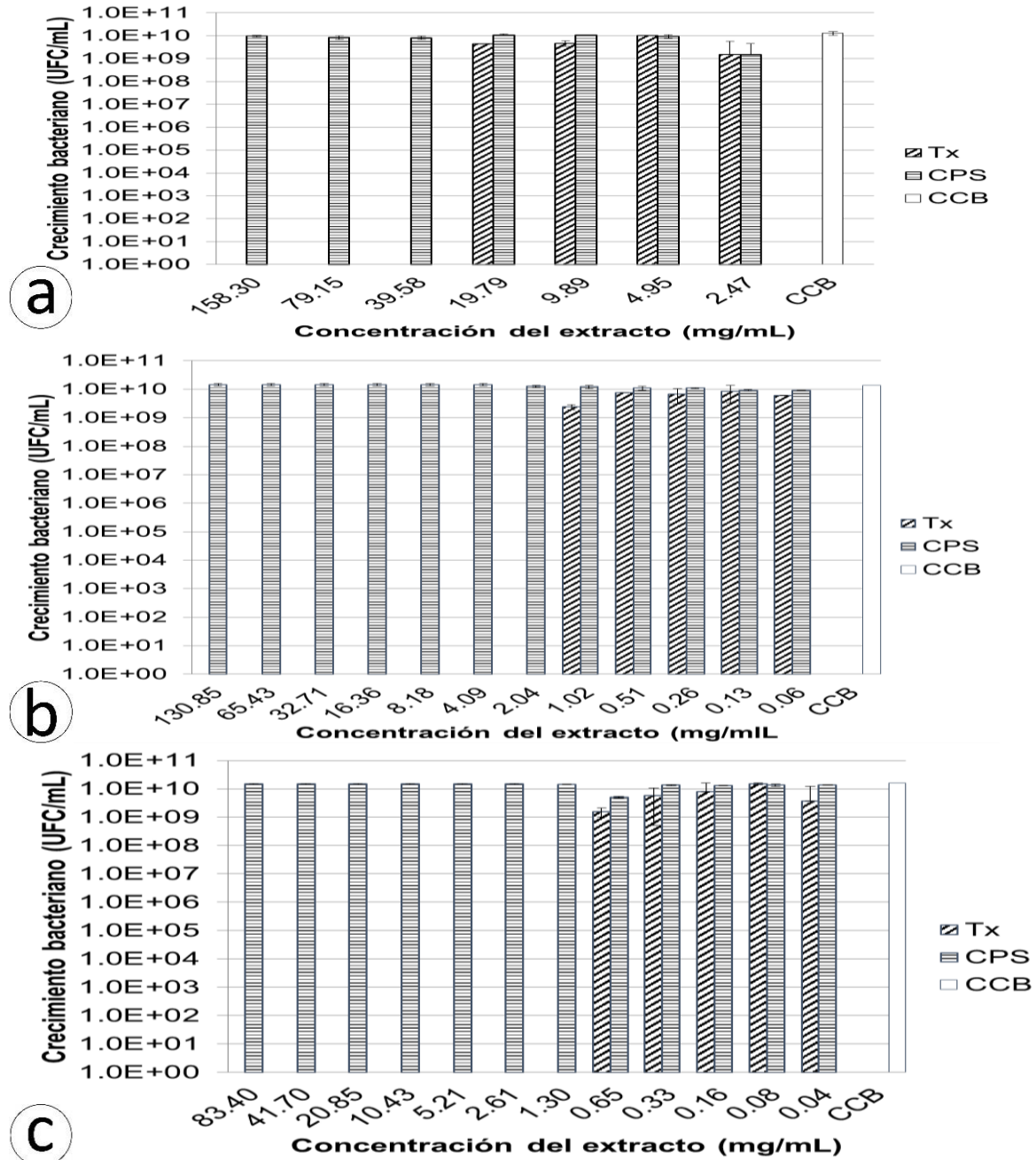


**Figura 43.** Determinación del efecto bactericida de *L. boryana* como la inhibición del crecimiento de *S. typhi* CPB-1 a las 48 horas del experimento. a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%.

En la figura 42 se observa el efecto bacteriostático del extracto de *L. boryana* sobre *Salmonella typhi* CPB-1 y en la figura 43 se observa el efecto bactericida. Cuando se extrae con agua (figuras 42a y 43a), existe un efecto inhibitorio a las 24 horas, pero no presenta efecto bactericida con dosis de 126.17 mg/ml, el agua fue el solvente que presentó el menor efecto contra esta bacteria pero mayor propiedad antioxidante. En el caso de las figuras 42c y 43c, el extracto hidroalcohólico al 35%, mostró que tuvo un efecto bacteriostático en la dilución (D4) y un efecto bactericida en la dilución D3 con dosis de 11.07 y 22.13 mg/ml

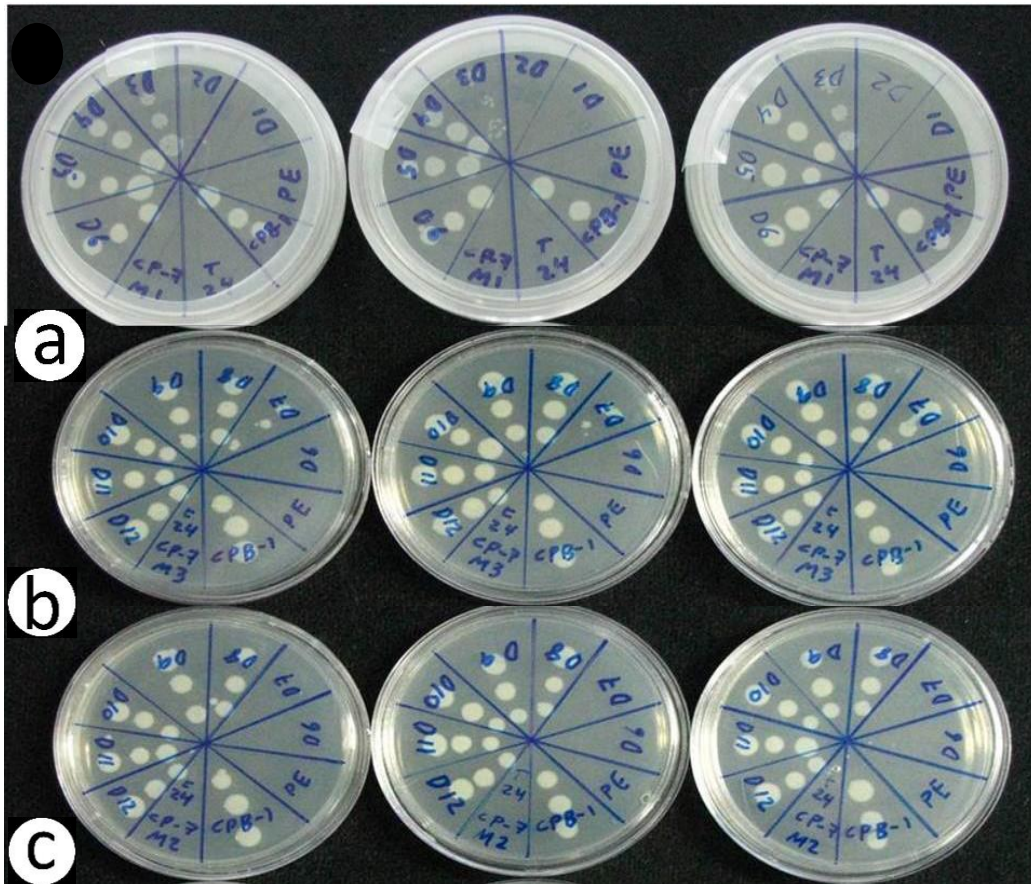
respectivamente. Este solvente es el que presentó el principal efecto contra esta bacteria. En el caso de las Figuras 42b y 43b, el extracto hidroalcohólico al 20% tuvo un efecto bacteriostático en D2 con dosis de 69.17 mg/ml y un efecto bactericida en D1 con dosis de 138.33 mg.

### 8.5.2.3 Efecto de los Extractos de *Lentinula edodes* CP-7



**Figura 44.** Efecto bacteriostático del extracto de *L. edodes* sobre *Salmonella typhi*, a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.





**Figura 45.** Determinación del efecto bactericida de *L. edodes* como la inhibición del crecimiento de *S. typhi* a las 48 horas del experimento; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%.

En la figura 44 se observa el efecto bacteriostático y en la figura 45 se observa el efecto bactericida del extracto de *L. edodes* sobre la bacteria *Salmonella typhi* CPB-1 a concentración constante de  $1.66 \times 10^4$  bacterias/ml. En el caso del agua como solvente, en la figura 44a se observó un efecto inhibitorio a las 24 horas en D3, con dosis de 39.58 mg/ml y en la figura 45a hubo un efecto bactericida en D2, con dosis de 79.15 mg/ml, el agua es el solvente que presentó menor efecto contra esta bacteria pero mayor propiedad antioxidante. En el caso del extracto hidroalcohólico (20%) como solvente, en la figura 44b, tuvo un efecto bacteriostático en D7 con dosis de 2.04 mg/ml y en la figura 45b se observó un efecto bactericida en D6 con dosis de 4.09 mg/ml. En el caso del extracto hidroalcohólico (35%) como solvente, en la figura 44c se observó que tuvo un efecto bacteriostático y en la figura 45c bactericida en la dilución D7 con dosis de 1.30 mg/ml, este solvente fue el que presentó el principal efecto contra la bacteria *Salmonella typhi* CPB-1. En el cuadro 23 se presenta la

CMI de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *Salmonella typhi* CPB-1.

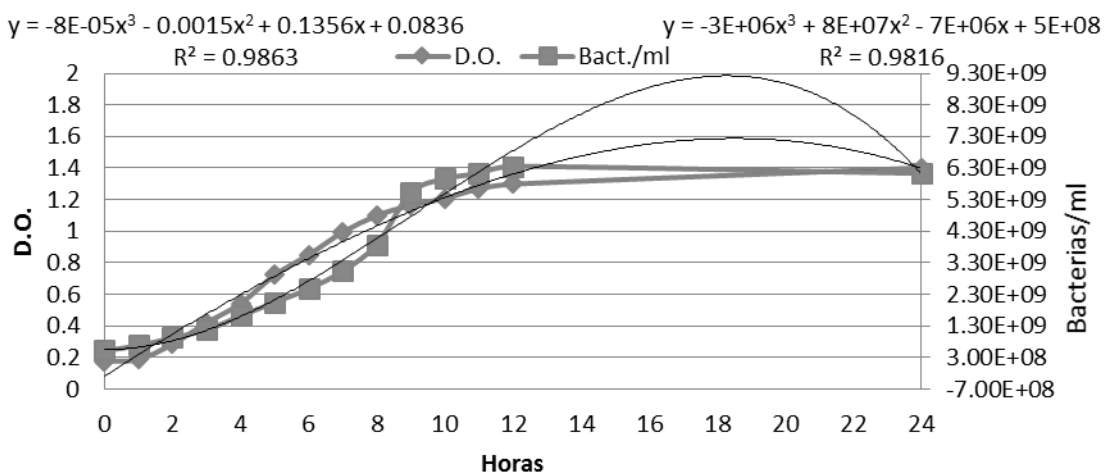
**Cuadro 23.** Concentración Mínima Inhibitoria a las 24 horas de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *Salmonella typhi* CPB-1.

Registro	Agua			Hidroalcohólico (20%)			Hidroalcohólico (35%)		
	Dilución	Extracto (µl)	Conc. (mg/mL)	Dilución	Extracto (µL)	Conc. (mg/mL)	Dilución	Extracto (µL)	Conc. (mg/mL)
CP-519	D1	50	126.17	D2	25	69.17	D4	6.25	11.07
CP-7	D3	12.5	39.58	D7	0.781	2.04	D7	0.781	1.30

Conc.: Concentración

### 8.5.3 Bioensayo con la cepa CPB-4 de *Streptococcus agalactiae*

En la figura 46 se observa la curva de crecimiento de *Streptococcus agalactiae* CPB-4, determinada por densidad óptica (D.O.) y las unidades formadoras de colonias (UFC) por conteo en el microscopio. La relación entre las dos curvas tiene una  $R^2$  final de 0.9863 al utilizar una ecuación como dependiente de la otra.

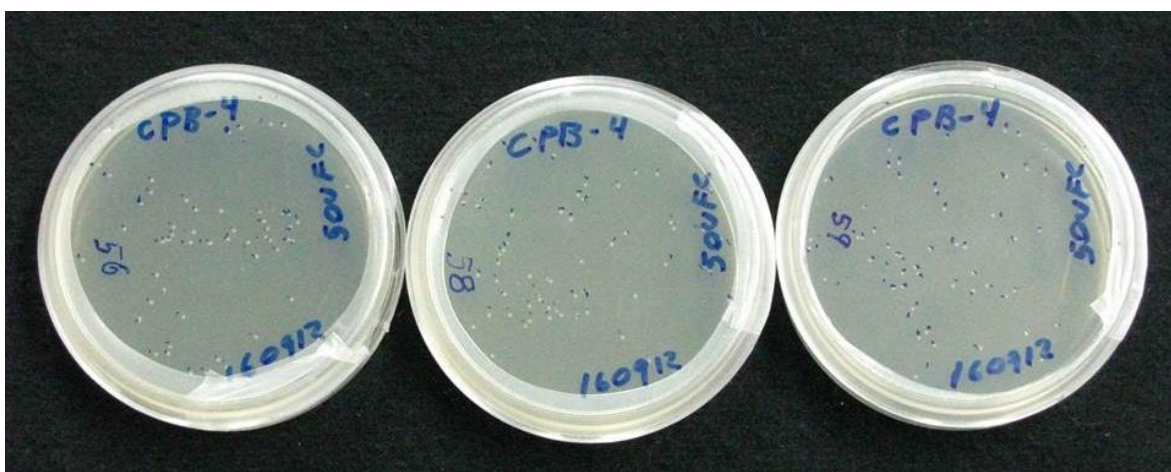


**Figura 46.** Cinética de *Streptococcus agalactiae* CPB-4 determinada por lectura de D.O. y UFC por conteo al microscopio en cámara de Neubauer (n=6).

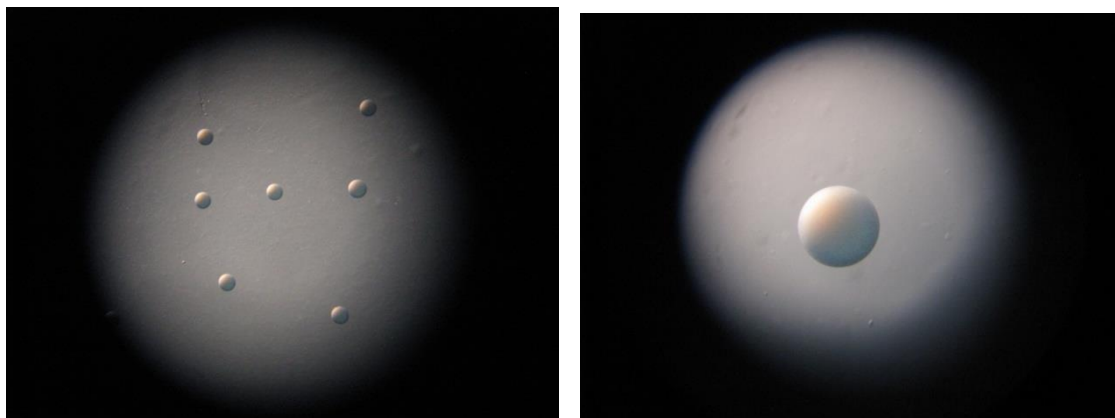
La concentración máxima calculada por interpolación en la cinética de *Streptococcus agalactiae* fue de  $4.2 \times 10^9$  bacterias/mL. En la figura 47 se muestran las cajas del crecimiento de colonias de *Streptococcus agalactiae* CPB-4, después de diluir  $2 \times 10^6$  veces el número de bacterias, esta prueba verificó el número de bacterias inoculadas en cada pozo del experimento en la microplaca, siendo el correspondiente de multiplicar el número de UFC

de la caja de Petri por 200 con una cantidad de  $1.16 \pm 0.04 \times 10^4$ . A su vez, este procedimiento permitió validar la muestra bacteriana al identificar el crecimiento de un solo tipo de colonia en el medio de cultivo y la caracterización de la misma (Fig. 48).

Registro	Cepa	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color
CPB-4	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Puntiforme	Entero	Convexa	Seca	Blanco opaco



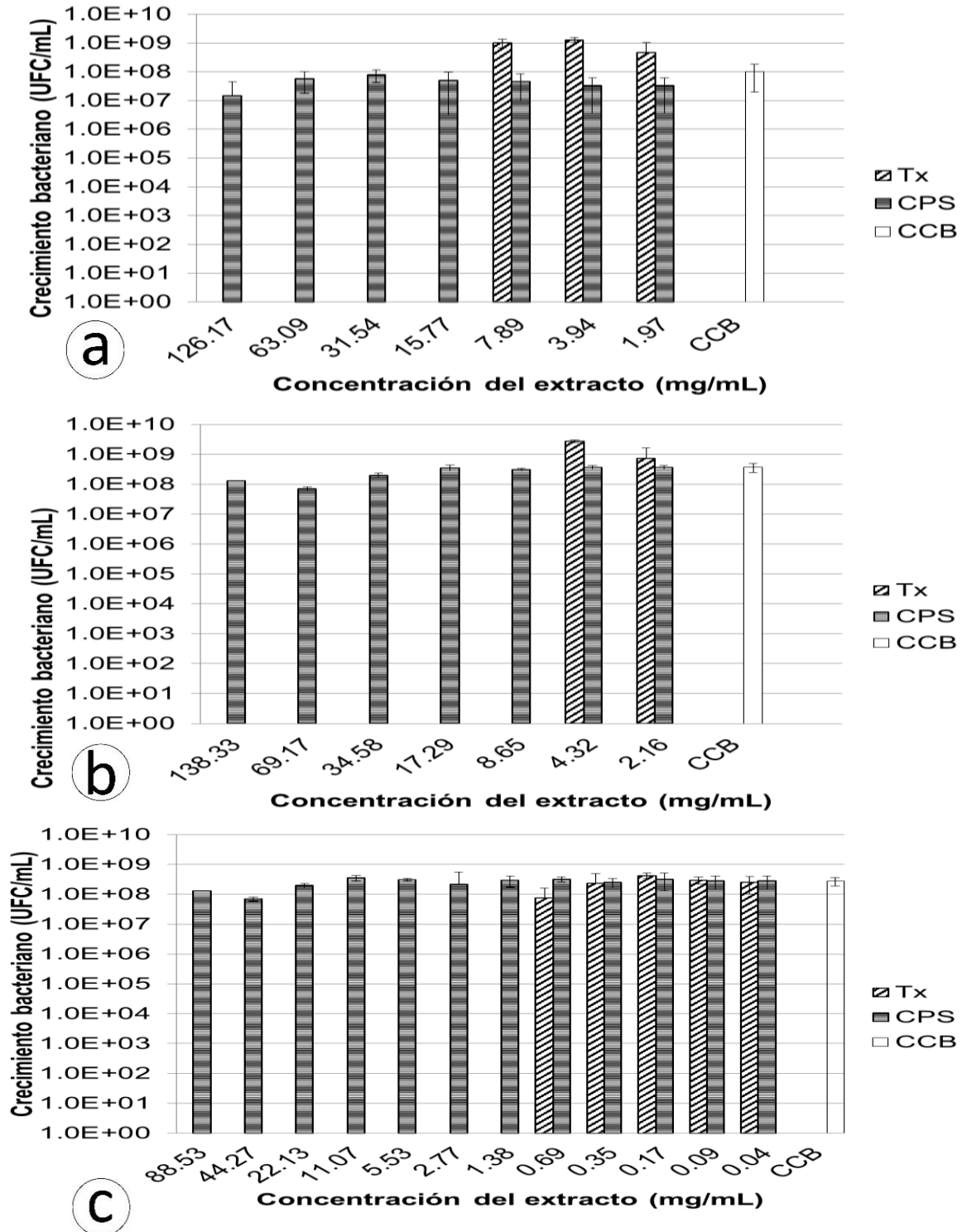
**Figura 47.** Crecimiento de *Streptococcus agalactiae* CPB-4 por microdilución. El número de bacterias en cada pozo fue de  $0.91 \times 10^4$  bacterias.



**Figura 48.** *Streptococcus agalactiae* CPB-4 al microscopio a las 24 horas.

### 8.5.3.1 Efecto de los extractos de *L. boryana* CP-519

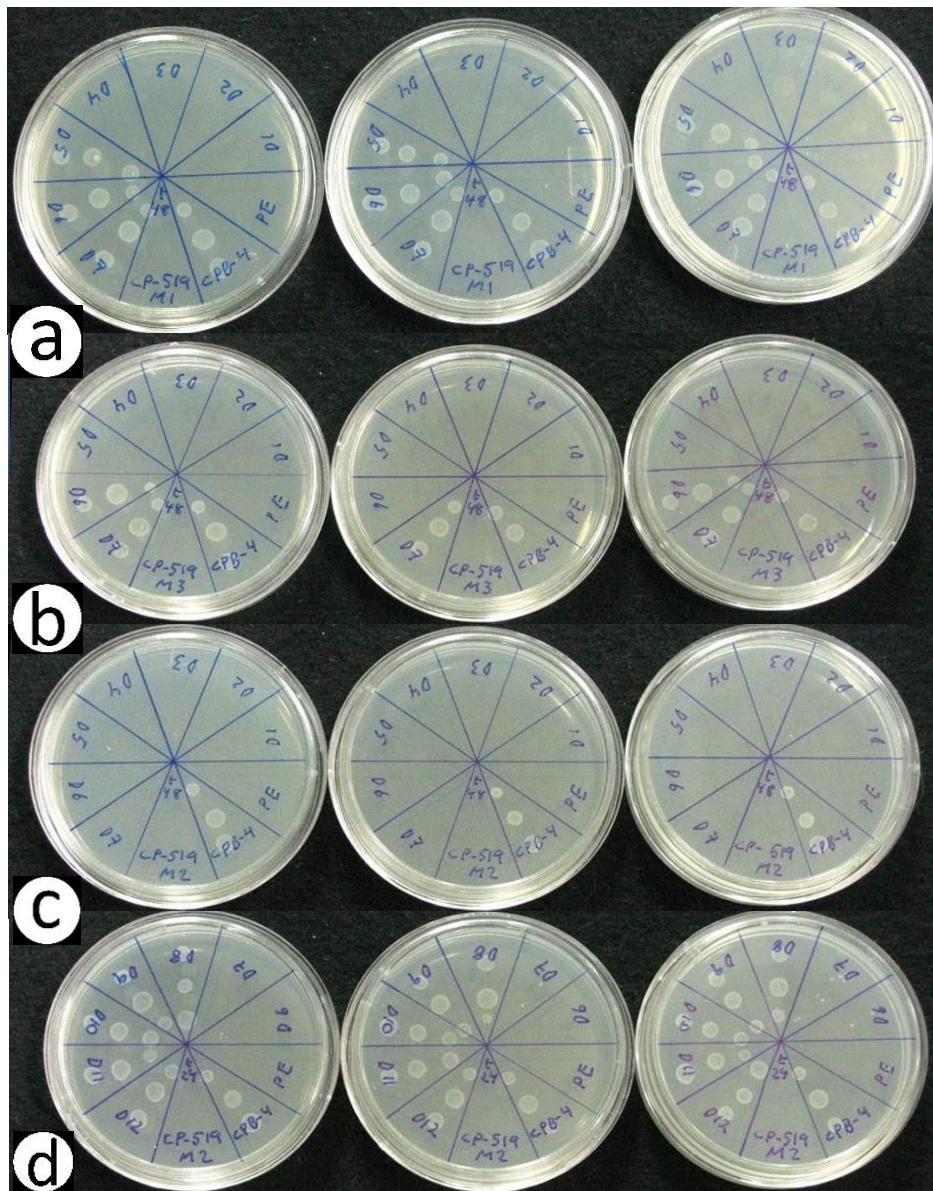
El número de bacterias de *S. agalactiae* CPB-4 en cada pozo fue de  $1.16 \times 10^4$  bacterias.



**Figura 49.** Efecto del extracto de *Lentinula boryana* sobre *Streptococcus agalactiae*, a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.



En la figura 49 se observa el efecto del extracto de *Lentinula boryana* sobre *S. agalactiae* en una concentración de  $1.15 \times 10^4$  bacterias por pozo. En la figura 49a, se observa que con el extracto acuoso, la CMI a las 24 horas es de 15.77 mg/mL, éste es el solvente que presenta menor efecto bactericida pero mayor efecto antioxidante. En la figura 49b, el extracto hidroalcohólico al 20% tiene efecto de CMI con 8.65 mg/mL, a las 24 horas. En la figura 45c, en el extracto hidroalcohólico al 35%, se observó una CMI de 1.38 mg/mL. El resumen se muestra en el Cuadro 24.



**Figura 50.** Determinación de la CMB del extracto de *Lentinula boryana* CP-519 sobre la bacteria CPB-4 *Streptococcus agalactiae*; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20%, c y d: hidroalcohólico 35%.

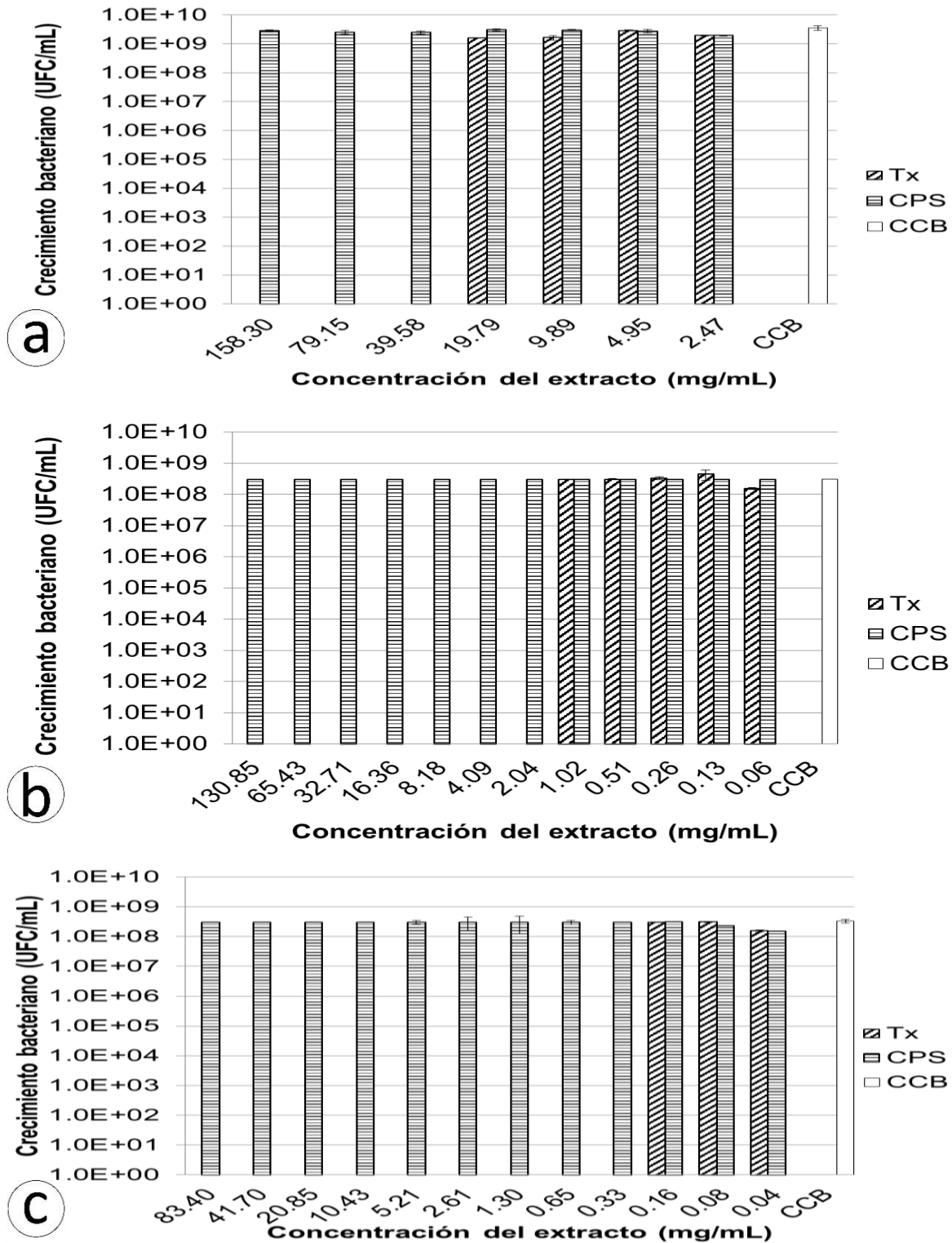


### 8.5.3.2 Efecto de los extractos de *L. edodes* CP-7

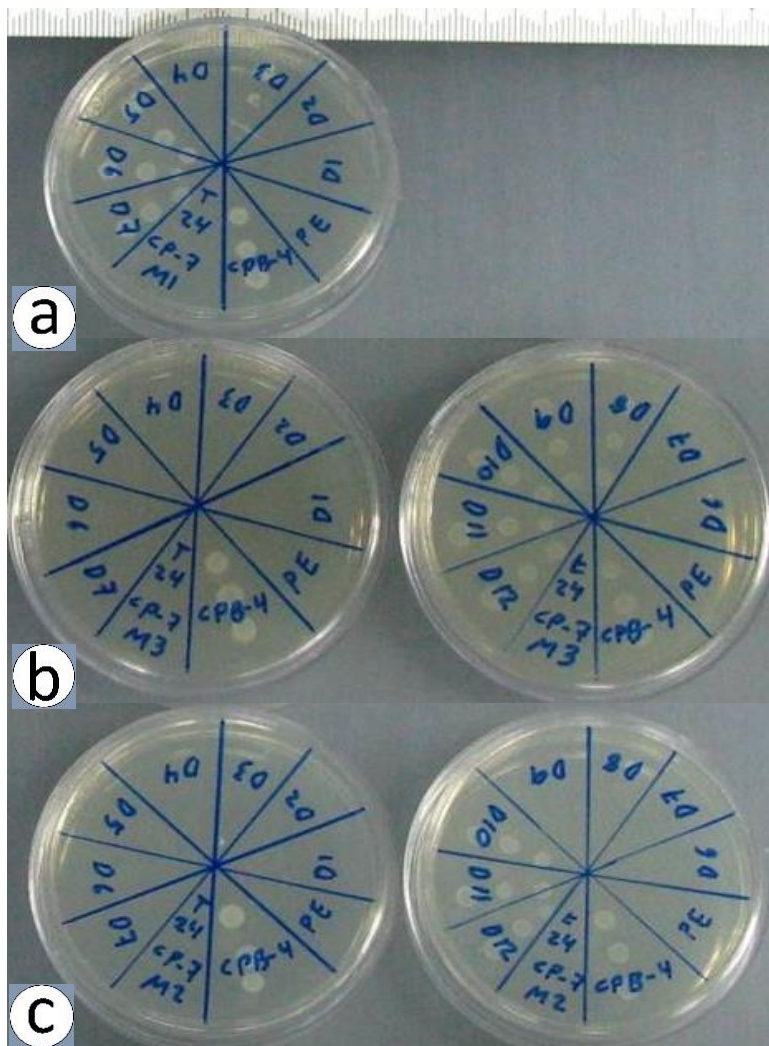
En la figura 51a se observa que con el extracto acuoso la CMB es en D4, con 15.77 mg/mL. En la figura 51c y d, el solvente hidroalcohólico al 35% fue de la D7 con 1.38 mg/mL. En la figura 51b, se observó que la CMB fue en D5 con 8.65 mg/ml. En todos los casos de este experimento se presentó el crecimiento de bacterias en el mismo nivel de dilución que lo que se detectó a través de la lectura de D.O.; el efecto inhibitorio en las concentraciones más altas, se mantuvo con el paso de los días.

En la figura 52 se observa el efecto del extracto de *Lentinula edodes* sobre *Streptococcus agalactiae* en una concentración de  $0.91 \times 10^4$  bacterias por pozo. En la figura 52a, se observa que con el extracto acuoso, la CMI a las 24 horas fue de 39.58 mg/mL, fue el solvente que presentó el menor efecto bactericida pero mayor efecto antioxidante. En la figura 52b, con el extracto hidroalcohólico al 20% tuvo un efecto de CMI con 2.04 mg/mL, a las 24 horas, En la figura 52b, con el extracto hidroalcohólico al 35%, se observó una CMI de 0.33 mg/mL. El resumen se muestra en el Cuadro 24.

En el cuadro 24 se observa el resumen de todo el experimento de *L. edodes* contra *S. agalactiae*, por la aplicación de muestra del pozo de la microplaca en cada una de las diluciones del extracto sobre las bacterias. Esta prueba verificó la inhibición del crecimiento de la bacteria en donde la lectura de D.O. tiende a cero y la viabilidad del crecimiento de la bacteria cuando el extracto se encuentra en una cantidad menor a la concentración mínima inhibitoria, siendo para esta bacteria de 79.146 mg para M1, 0.652 mg para M2 y 1.022 mg/mL para M3.



**Figura 51.** Efecto del extracto de *Lentinula edodes* sobre *Streptococcus agalactiae* CPB-4, a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.



**Figura 52.** Extracto de *Lentinula edodes* contra *Streptococcus agalactiae* CPB-4 en medio Mueller Hinton a las 24 horas; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%.

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *S. agalactiae* CPB-4 se presenta en el cuadro 24.

**Cuadro 24.** Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *Streptococcus agalactiae* CPB-4.

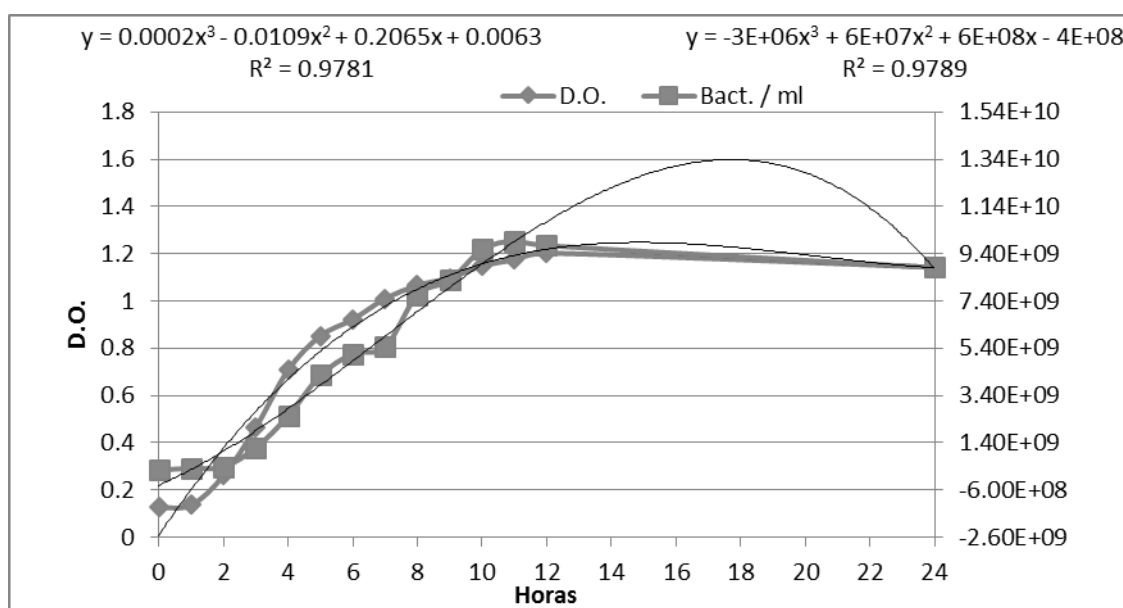
Registro	Agua			Hidroalcohólico (20%)			Hidroalcohólico (35%)		
	Dilución	Extracto (µl)	Conc. (mg)	Dilución	Extracto (µl)	Conc. (mg)	Dilución	Extracto (µl)	Conc. (mg)
CP-519	D4	6.25	15.77	D5	3.13	8.65	D7	0.78	1.38
CP-7	D3	12.5	39.58	D7	0.78	2.04	D9	0.20	0.33

Conc.: Concentración

### 8.5.4 Bioensayo con la cepa CPB-6 de *Pseudomonas aeruginosa*

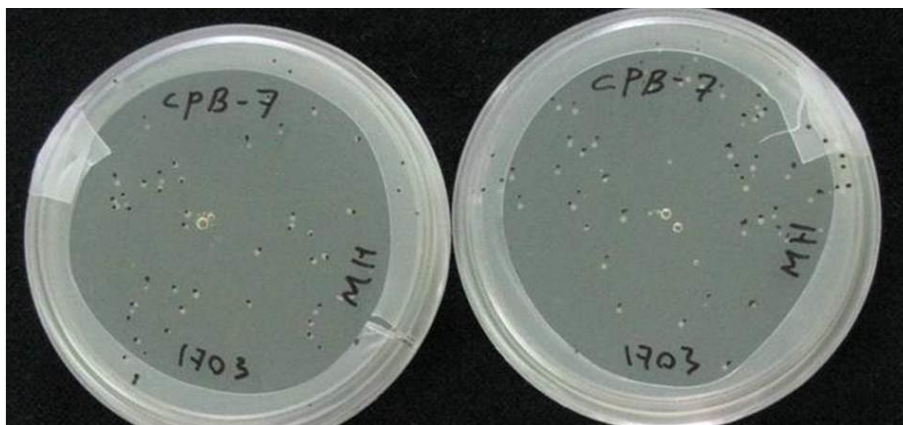
En la curva de crecimiento de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* CPB-6 (Fig. 53), fue determinada por densidad óptica (D.O.) y las unidades formadoras de colonias (UFC) por conteo en el microscopio. Se obtuvo la ecuación de tercer orden (esquina superior izquierda) correspondiente a la ecuación determinada por la D.O. y la ecuación del lado derecho corresponde al conteo de la bacteria en la cámara de Neubauer en el microscopio.

La relación entre las dos curvas tiene una  $R^2$  final de 0.9574 al utilizar una ecuación como dependiente de la otra.



**Figura 53.** Cinética de *Pseudomonas aeruginosa* CPB-6 determinada por lectura de D.O. y UFC por conteo al microscopio óptico a 40x en cámara de Neubauer (n=6).

El número de bacterias inoculadas en el experimento fue de  $1.26 \times 10^8$  bacterias/ml, después de diluir 200 veces el número de bacterias de *Pseudomonas aeruginosa* CPB-6 de un pozo en estudio  $1.26 \times 10^4$  bacterias, lo cual se encuentra dentro del rango establecido en la metodología establecida por la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Se obtuvieron las UFC para contar en caja de Petri, esto permitió validar la muestra bacteriana al identificarse un solo tipo de colonia (Fig. 54).



**Figura 54.** Crecimiento de *Pseudomonass aeruginosa* CPB-6 por microdilución, 63 UFC.

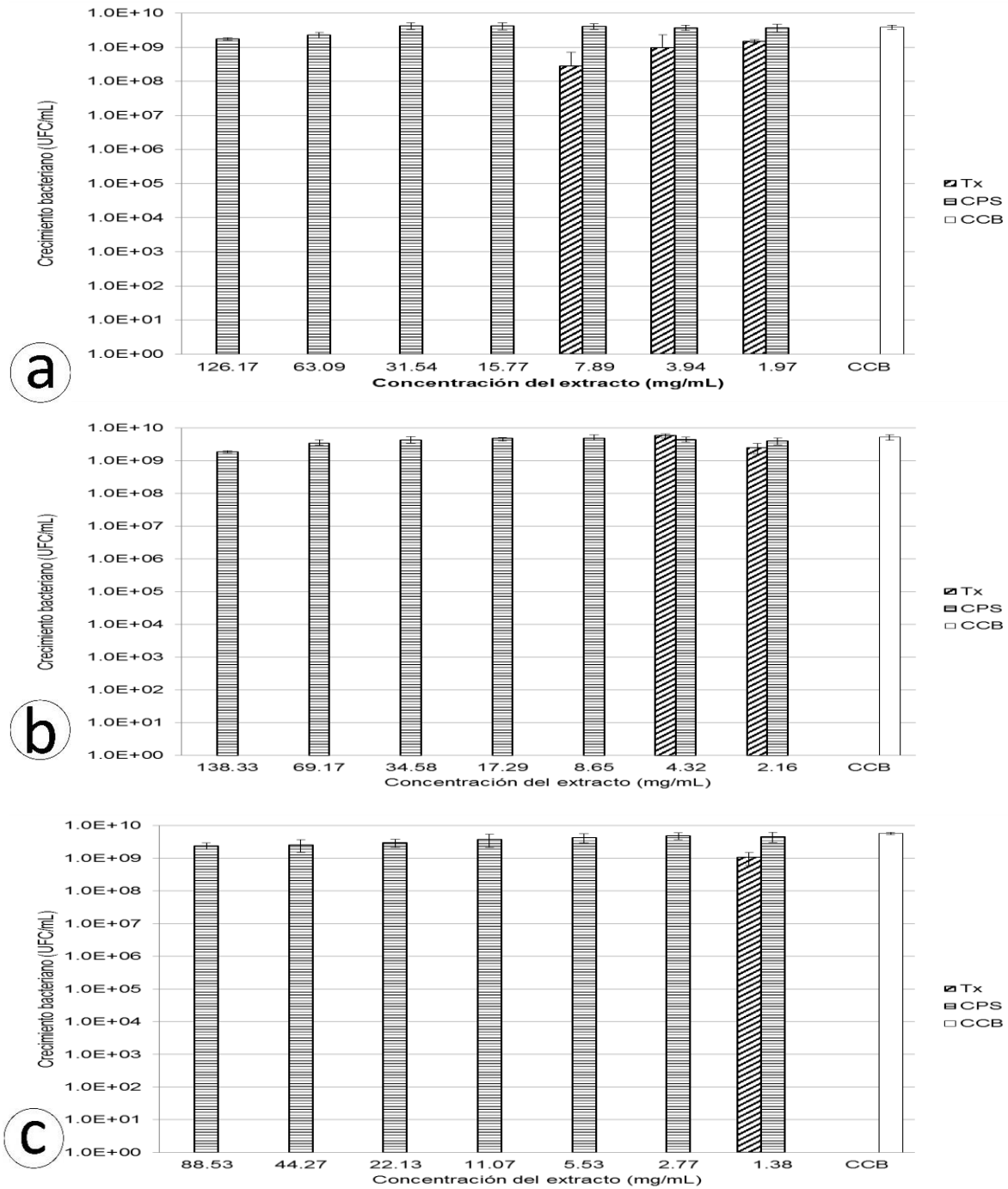


**Figura 55.** Cultivo de *Pseudomonass aeruginosa* CPB-6 por microdilución en medio de cultivo Mueller Hinton a las 24 horas.

Clave	Cepa	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color
CPB-6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Circular	Entero	Elevada	Viscosa	Blanco opaco

#### 8.5.4.1 Efecto de los extractos de *L. boryana* CP-519

El efecto del extracto de *L. boryana* sobre la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* CPB-6 a concentración constante de  $1.26 \times 10^4$ , se observa por medio de la lectura de la D.O. de cada muestra y se presenta en la figura 56. Este diseño experimental nos permitió determinar el efecto de crecimiento o inhibición de la bacteria y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) la cual se encuentra un resumen en el Cuadro 25.

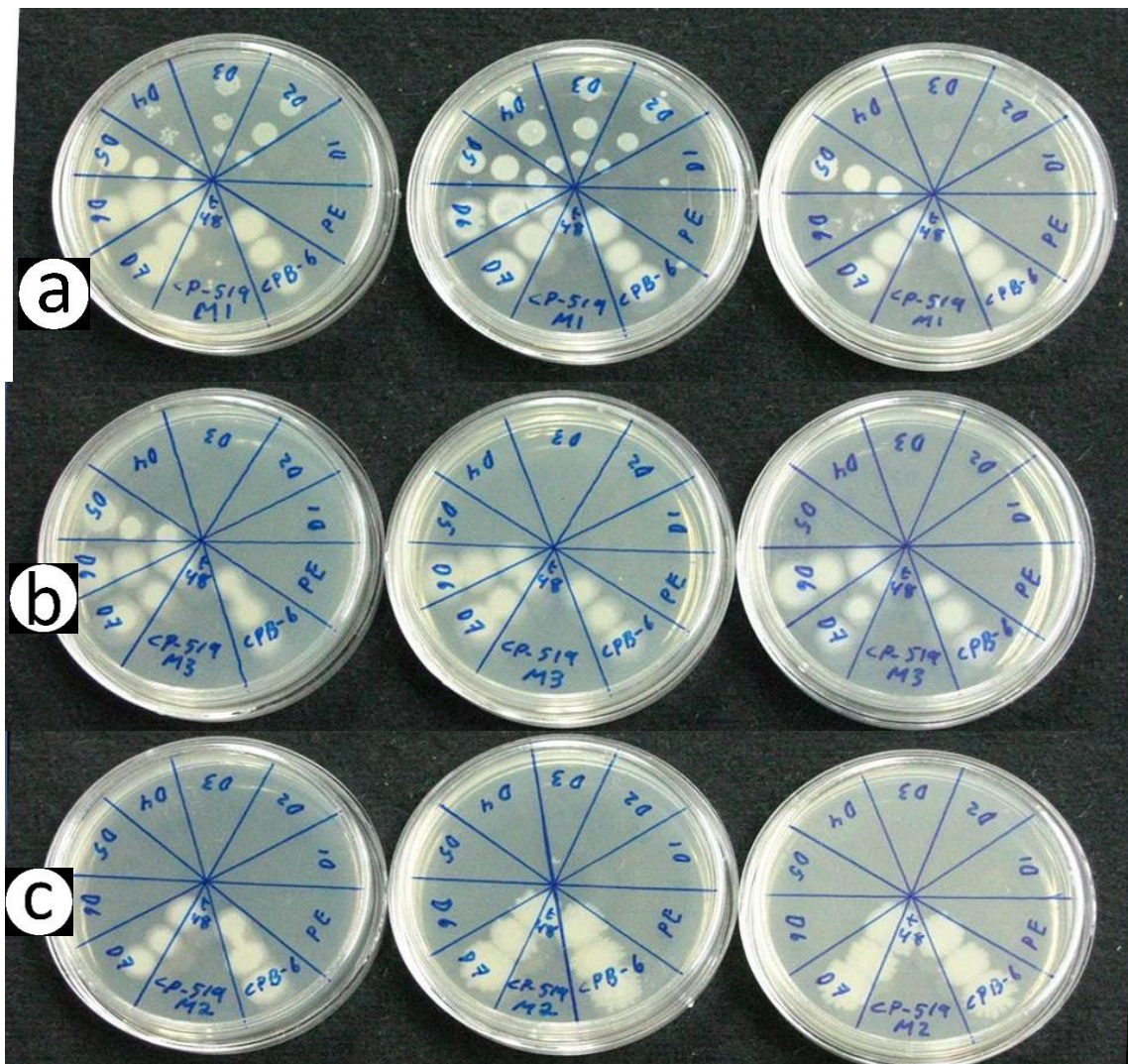


**Figura 56.** Efecto inhibitorio del extracto de *Lentinula boryana* sobre *P. aeruginosa* CPB-6, a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.

En la figura 56 se observa el efecto del extracto de *Lentinula boryana* sobre *Pseudomonas aeruginosa* CPB-6 en una concentración de  $1.26 \times 10^4$  bacterias por pozo. En la figura 56a,



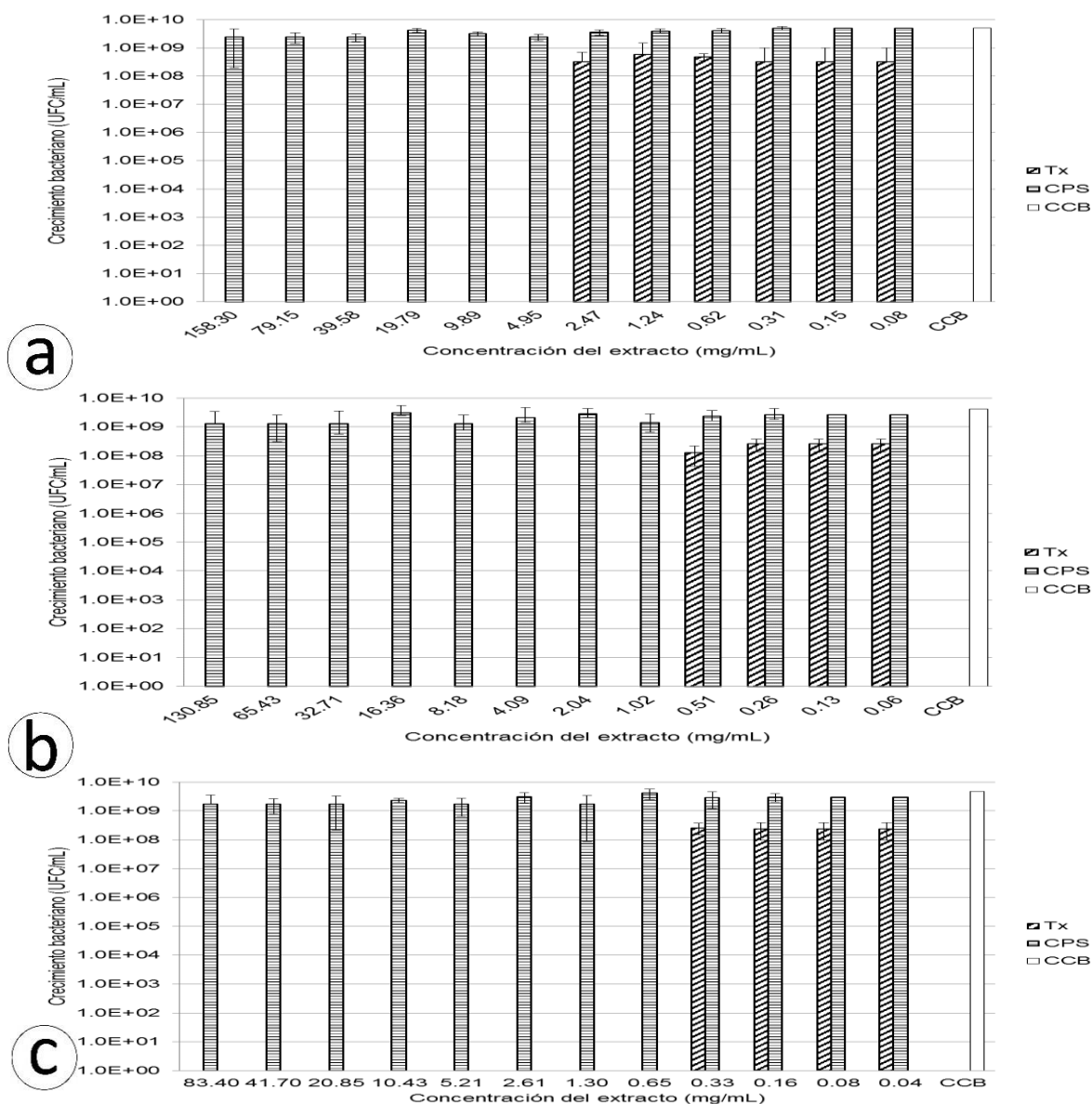
se observa que cuando se extrae con agua, existe un efecto inhibitorio a las 24 horas en D4 con dosis de 15.77 mg/ml. Este solvente presentó un menor efecto inhibitorio pero mayor efecto antioxidante. En la figura 56b, el extracto hidroalcohólico (20%) tuvo un efecto bacteriostático en D5 con dosis de 8.65 mg/ml. En la figura 56c, el extracto hidroalcohólico (35%), tuvo un efecto bacteriostático en la dilución D6 con dosis de 2.77 mg. En la figura 57 se observan las muestras tomadas de las microplacas a las 24 horas de incubación, y se incubaron las cajas por otras 24 horas, el muestreo se realizó posterior a la lectura de D.O. En todos los casos de este experimento se presentó el crecimiento de bacterias en el mismo nivel de dilución que lo que se detectó a través de la lectura de D.O.



**Figura 57.** Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* CPB-6 en medio Mueller Hinton a las 48 horas, con las diferentes dosis de extracto de *Lentinula edodes* en los solventes; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%.

### 8.5.4.2 Efecto de los extractos de *L. edodes* CP-7

El efecto del extracto de *L. edodes* CP-7 sobre la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* CPB-6 a concentración constante de  $1.26 \times 10^4$  bacterias, se observa por medio de la lectura de la D.O. de cada muestra y se presenta en la figura 58. Este diseño experimental nos permitió determinar tanto el efecto de crecimiento, como la inhibición del desarrollo bacteriano, así como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). El resumen de la CMI se encuentra en el Cuadro 25.



**Figura 58.** Efecto del extracto de *Lentinula edodes* sobre *P. aeruginosa* CPB-6, a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: control de crecimiento de la bacteria.



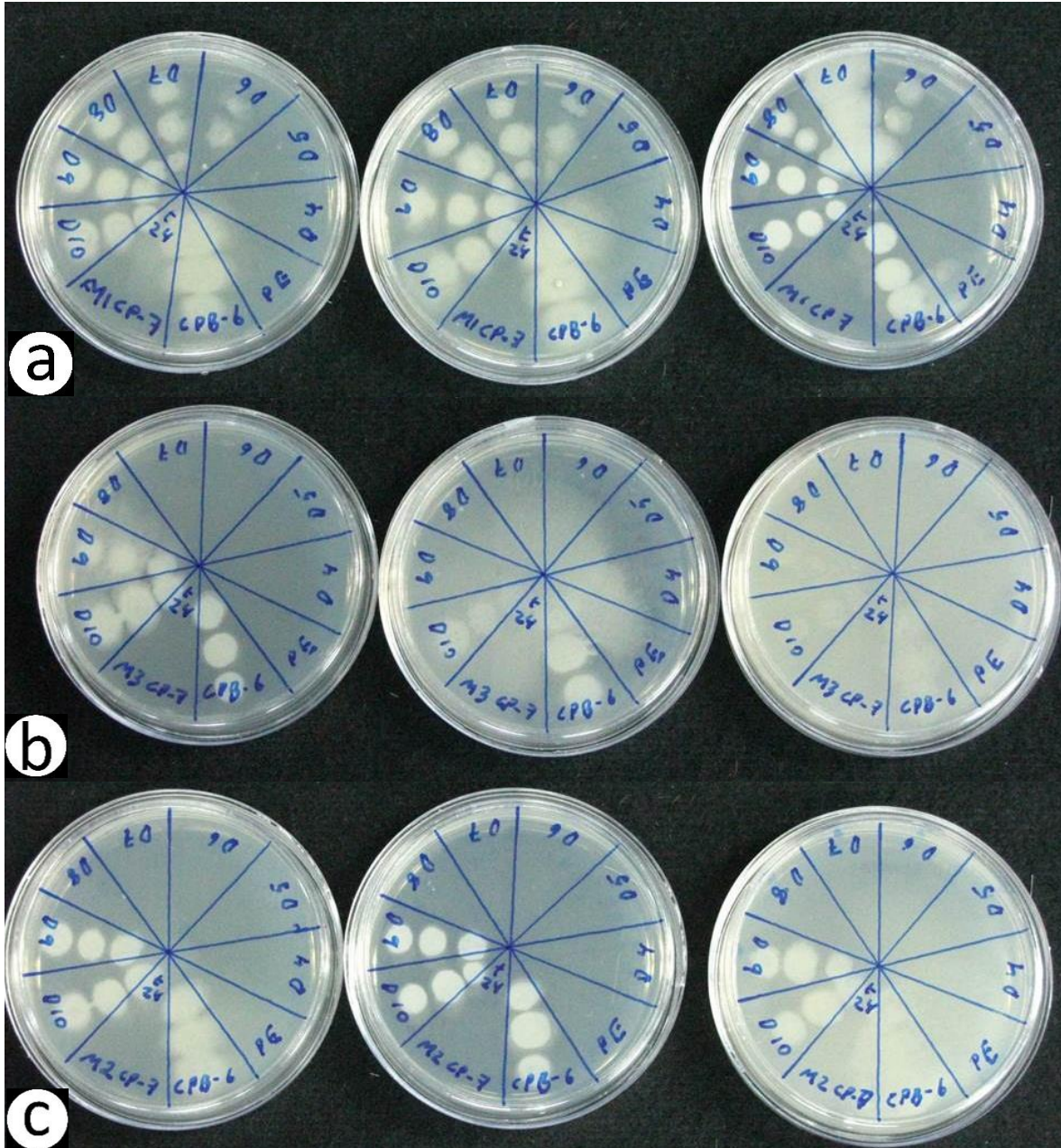
En la figura 58 se observa el efecto del extracto de *Lentinula edodes* sobre *Pseudomonas aeruginosa* CPB-6 en una concentración de  $1.26 \times 10^4$  bacterias por pozo: En la figura 58a, se observa que con el extracto acuoso, existe un efecto inhibitorio a las 24 horas en D6 con una dosis de 4.95 mg/mL. El agua es el solvente que presenta menor efecto bactericida pero mayor efecto antioxidante. En la figura 58b, el extracto hidroalcohólico (20%) tuvo efecto bactericida en D8 con dosis de 1.02 mg a las 24 horas. En la figura 58c, con el extracto hidroalcohólico (35%), se observó el principal efecto bacteriostático en la dilución D8 con dosis de 0.65 mg a las 24 y 48 horas. La determinación de la CMI de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *P. aeruginosa* CPB-6 se presenta en el Cuadro 25.

**Cuadro 25.** Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *Pseudomonas aeruginosa* CPB-6.

Registro	H	Agua (M1)			Hidroalcohólico (20%)			Hidroalcohólico (35%)		
		Dilución	Extracto (μL)	Conc. (mg)	Dilución	Extracto (μL)	Conc. (mg)	Dilución	Extracto (μL)	Conc. (mg)
CP-519	24	D4	6.25	15.77	D5	3.13	8.65	D6	1.56	2.77
CP-7	24	D6	1.56	4.95	D8	0.78	2.04	D8	0.78	1.30

H: horas de incubación; Conc.: Concentración

En la figura 59 se observan las muestras tomadas de las microplacas a las 24 horas de incubación. Se colocaron 2.5 μL en cada segmento de las cajas, se incubaron por otras 24 horas. El muestreo se realizó posterior a la lectura de D.O. En el caso del extracto acuoso se observó que el efecto bactericida fue en una dilución menor que la concentración con efecto bacteriostático. En los otros solventes hidroalcohólicos al 20% y 35% se presentó el crecimiento de bacterias en el mismo nivel de dilución que detectado a través de la lectura de D.O. El efecto inhibitorio se mantuvo con el paso de los días.

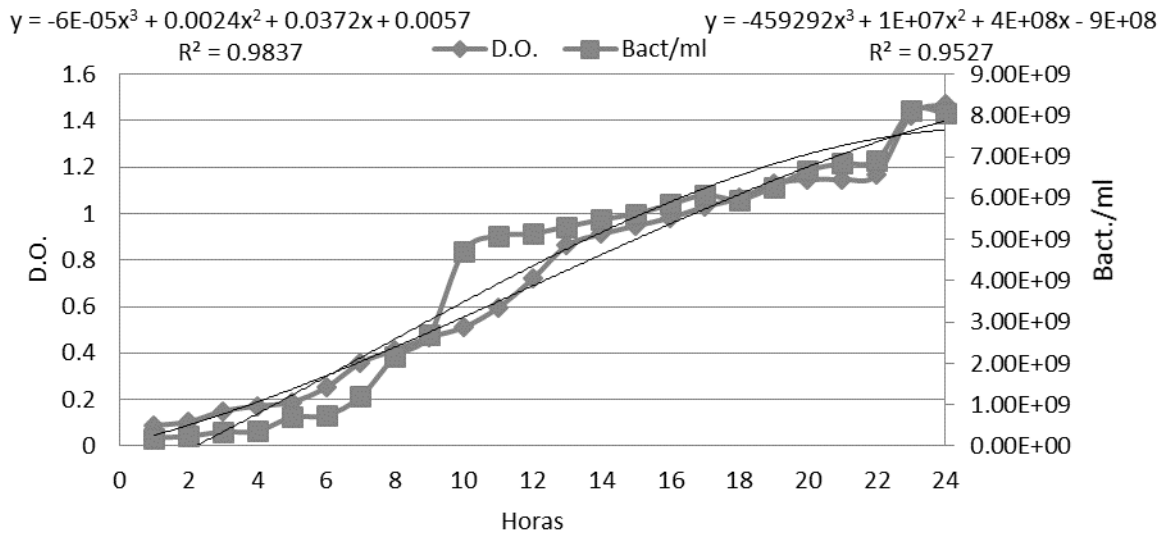


**Figura 59.** Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* CPB-6 en medio Mueller Hinton a las 24 horas con las diferentes dosis de extracto de *Lentinula edodes* en los solventes evaluados; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%.

### 8.5.5 Bioensayo con la cepa CPB-7 de *Stenotrophomona*

En la figura 60 se observa la curva de crecimiento de *Stenotrophomona* CPB-7, determinada por densidad óptica (D.O.) y las unidades formadoras de colonias (UFC) por conteo en el microscopio. La ecuación de tercer orden de la esquina superior izquierda corresponde a la ecuación determinada por la D.O. y la ecuación del lado derecho corresponde al conteo de la

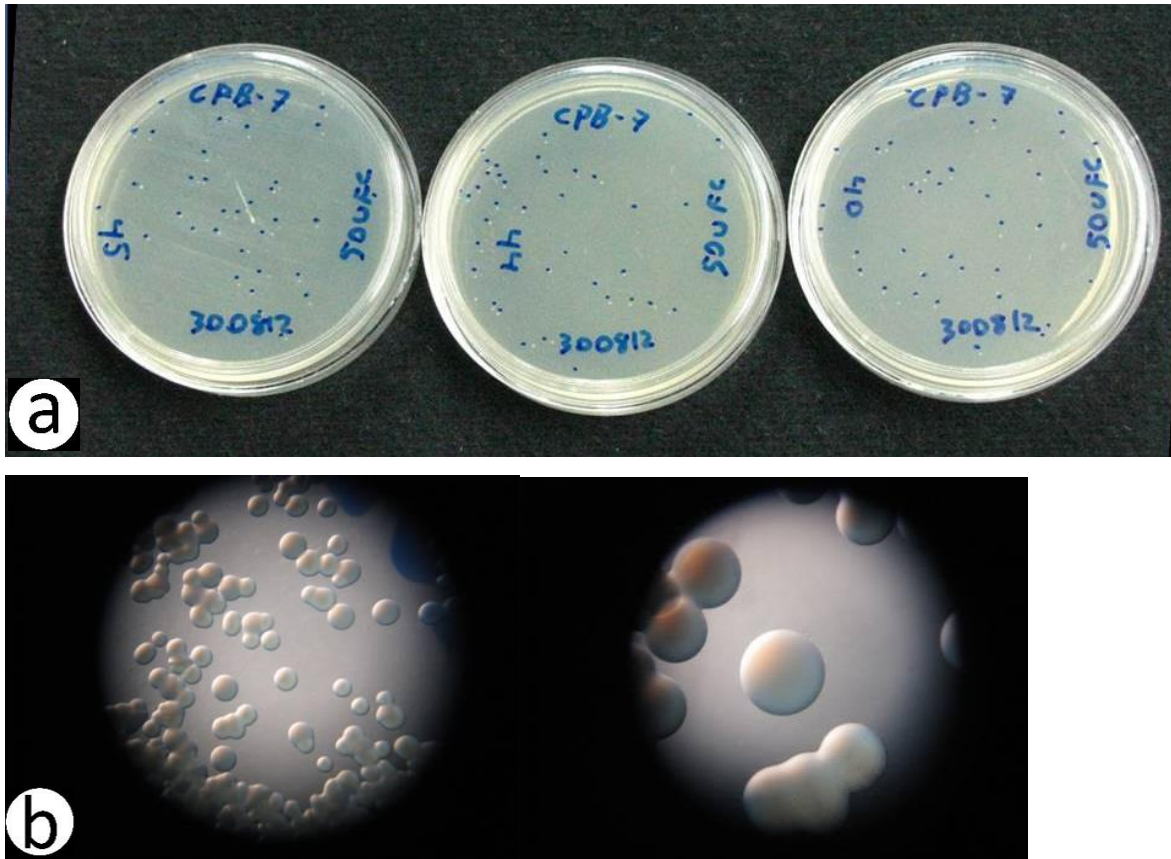
bacteria por microscopio en la cámara de Neubauer. La relación entre las dos curvas tuvo una  $R^2$  final de 0.9371 al utilizar una ecuación como dependiente de la otra.



**Figura 60.** Cinética de *Stenotrophomona* CPB-7, determinada por lectura de D.O. y UFC por conteo en el microscopio óptico a 40x en cámara de Neubauer (n=6).

En la figura 61 se muestra un ejemplo del crecimiento de colonias de *Stenotrophomona* en caja de Petri. Esta prueba verificó el número de bacterias inoculadas en cada pozo del experimento, correspondientes a multiplicar el número de UFC de la caja de Petri por 200, siendo para este caso una cantidad de  $1.16 \pm 0.06 \times 10^4$  bacterias por pozo. Esta cantidad se encuentra dentro del rango establecido en la metodología establecida por la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Este procedimiento permitió validar la muestra bacteriana al identificarse el crecimiento de un solo tipo de colonia en el medio de cultivo.

Clave	Cepa	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color
CPB-7	<i>Stenotrophomona</i>	Circular	Entero	Convexa	Viscosa	Blanco opaco



**Figura 61.** Cultivo de *Stenotrophomonas* CPB-7 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas. a: Se observa la colonia puntiforme. b: Vista al microscopio.

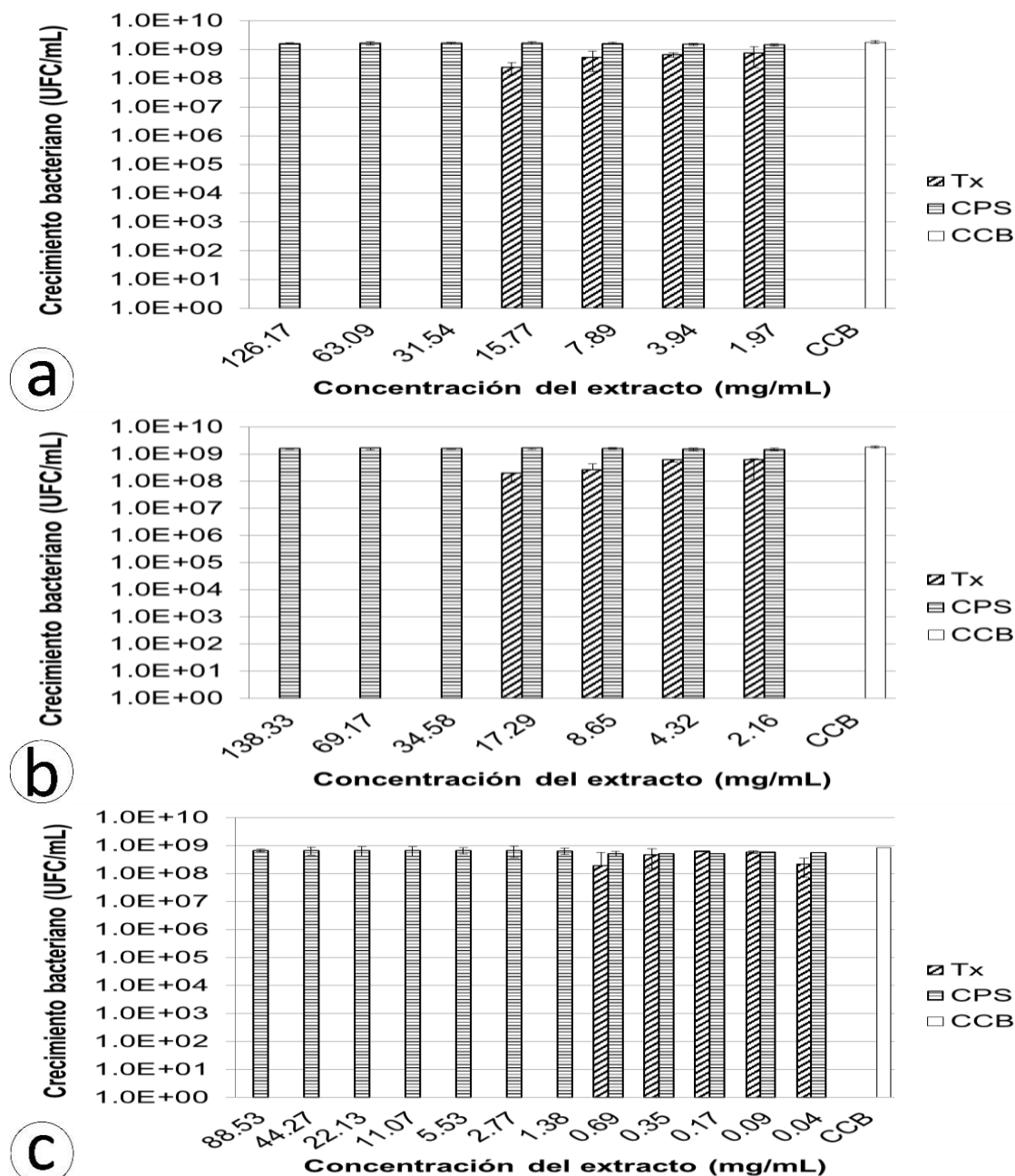
#### 8.5.5.1 Efecto de los extractos de *Lentinula boryana* CP-519

El efecto del extracto de *L. boryana* CP-519 sobre la bacteria *Stenotrophomonas* CPB-7 a concentración constante de  $1.16 \times 10^4$ , se observa por medio de la lectura de la D.O. de cada muestra y se presenta en la figura 62. Este diseño experimental permitió determinar el efecto de crecimiento o inhibición de la bacteria y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) la cual se encuentra un resumen en el Cuadro 26.

En la figura 62a, se observa que con el extracto acuoso tiene un efecto inhibitorio a las 24 horas en D3 con dosis de 31.54 mg/mL. El solvente agua presentó el menor efecto bactericida pero mayor efecto antioxidante. En la figura 62c, con el extracto hidroalcohólico (35%), se observa que tuvo un efecto bacteriostático en la dilución D7 con dosis de 1.38 mg/mL. Este solvente es el que presentó el principal efecto contra esta bacteria, en la figura 62b, el extracto hidroalcohólico (20%) tuvo un efecto bacteriostático en D3 con dosis de 34.58 mg/mL. En la figura 63 se observan las muestras tomadas de las microplacas a las 24 horas de incubación,



incubadas en las cajas por otras 24 horas. El muestreo se realizó posterior a la lectura de D.O. En todos los casos de este experimento se presentó el crecimiento de bacterias en el mismo nivel de dilución que lo que se detectó a través de la lectura de D.O. El efecto inhibitorio en las concentraciones más altas, se mantuvo con el paso de los días.

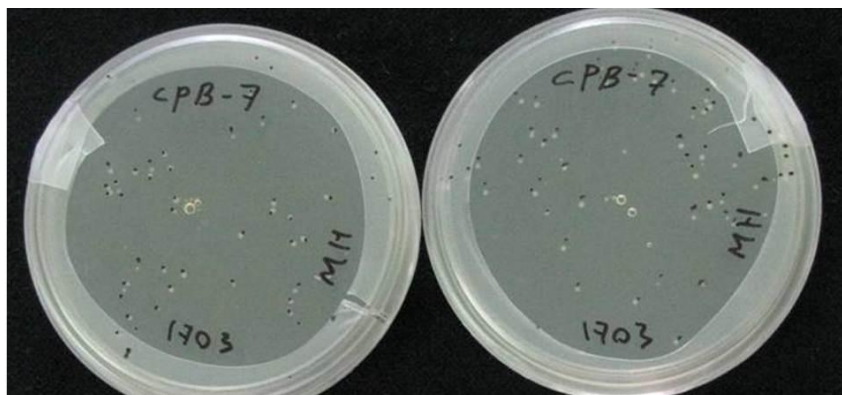


**Figura 62.** Efecto inhibitorio del extracto de *Lentinula boryana* sobre *Stenotrophomona* CPB-7 a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.



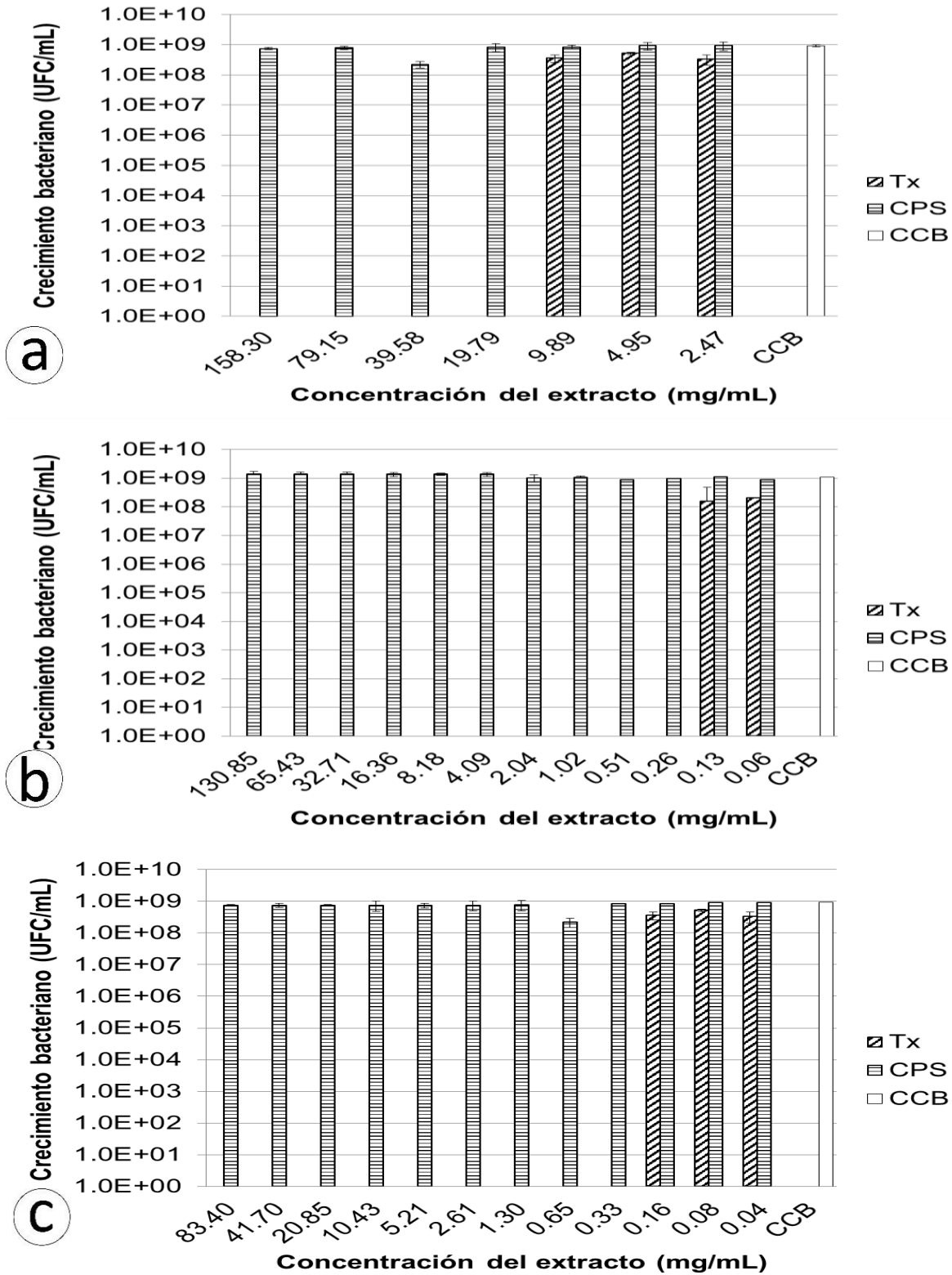
### 8.5.5.2 Efecto de los extractos de *L. edodes* CP-7

El efecto del extracto de *L. edodes* CP-7 sobre la bacteria *Stenotrophomona* CPB-7 a concentración constante de  $1.96 \times 10^4$  (Fig. 64) bacterias, se observa por medio de la lectura de la D.O. de cada muestra y se presenta en la figura 65. Este diseño experimental nos permitió determinar el efecto de crecimiento o inhibición de la bacteria y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), de la cual se encuentra un resumen en el Cuadro 26.



**Figura 64.** Crecimiento de *Stenotrophomona* CPB-7 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas.

En la figura 65a, se observa que con el extracto acuoso, existe un efecto inhibitorio a las 24 y 48 horas en D4 con una dosis de 19.79 mg. El solvente agua fue el solvente que presentó menor efecto bactericida pero mayor efecto antioxidante. En la figura 65c, el extracto hidroalcohólico (35%), tuvo un efecto de inhibición en la dilución D9 con dosis de 0.033 mg/mL a las 24 y 48 horas. En la figura 65b, con el extracto hidroalcohólico (20%), se observó el principal efecto inhibitorio en la dilución D10 con dosis de 0.26 mg/mL a las 24 y 48 horas.



**Figura 65.** Efecto inhibitorio del extracto de *Lentinula edodes* sobre *Stenotrophomonas* CPB-7 a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.

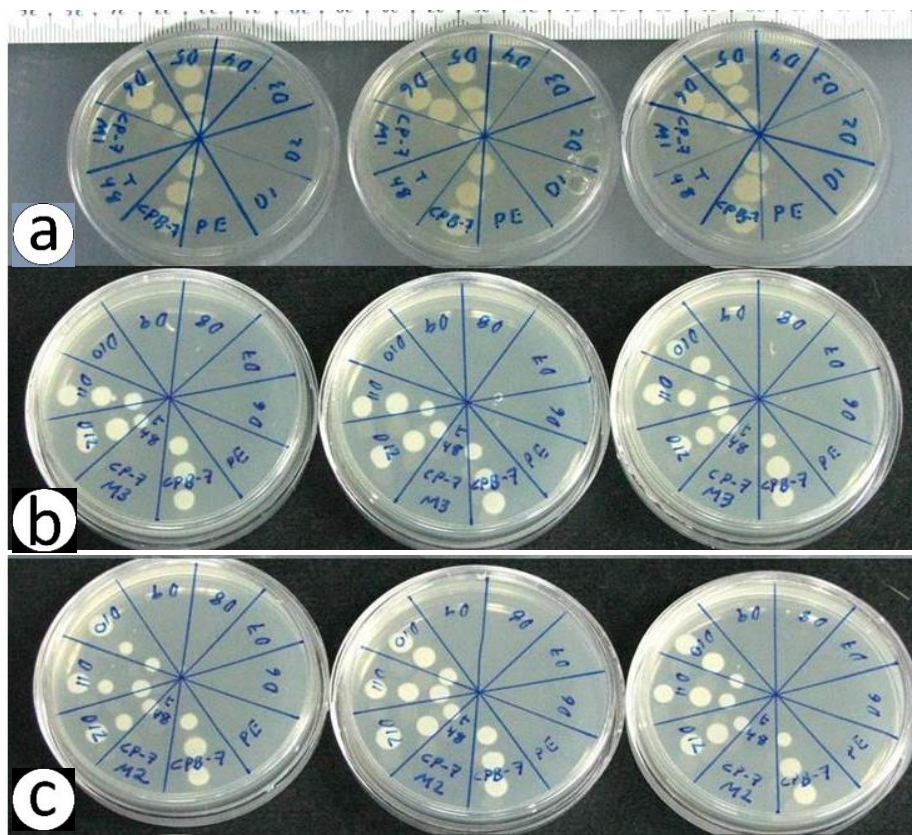


La determinación de la CMI de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *Stenotrophomona* CPB-7 se presenta en el cuadro 26.

<b>Cuadro 26.</b> Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de <i>L. boryana</i> CP-519 y <i>L. edodes</i> CP-7 contra <i>Stenotrophomona</i> CPB-7.										
Cepa	H	Agua			Hidroalcohólico (20%)			Hidroalcohólico (35%)		
		Dilución	Extracto (µL)	Conc. (mg)	Dilución	Extracto (µL)	Conc. (mg)	Dilución	Extracto (µL)	Conc. (mg)
CP-519	24	D3	12.5	31.54	D3	12.5	34.58	D7	0.78	1.38
CP-7	24	D4	6.25	19.79	D10	0.098	0.26	D9	0.2	0.33

H: horas de incubación, Conc.: Concentración

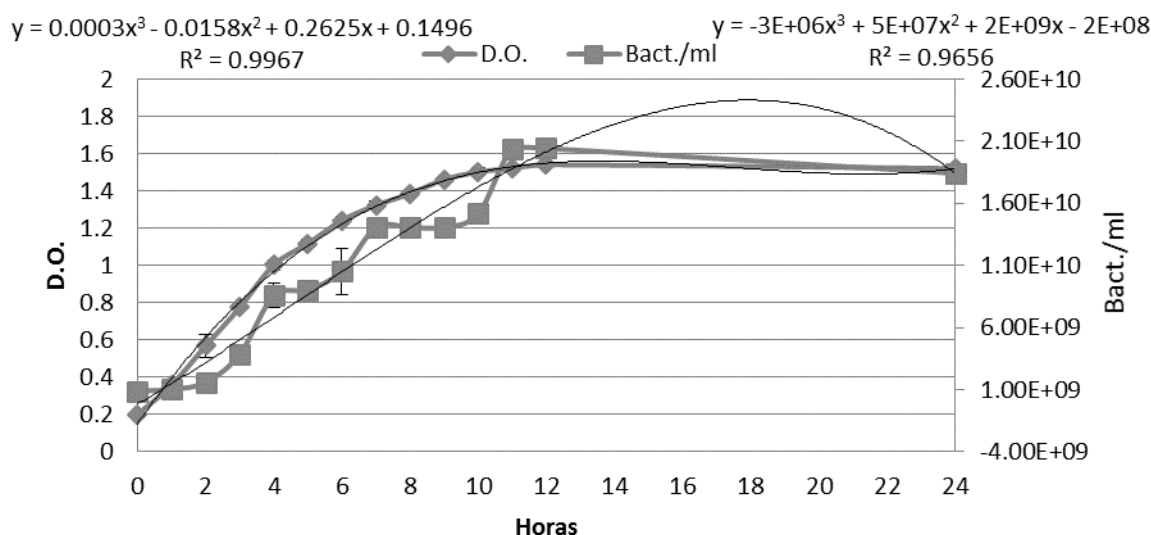
En la figura 66. Se observa el resumen de todo el experimento de *L. edodes* contra *Stenotrophomona*, por la aplicación de muestra del pozo de la microplaca en cada una de las diluciones del extracto sobre las bacterias. Esta prueba determinó que la CMB es la misma que la determinada como CMI.



**Figura 66.** Extracto de *Lentinula edodes* contra *Stenotrophomona* CPB-7 en medio Mueller Hinton a las 48 horas. Extractos; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%.

### 8.5.6 Bioensayo con la cepa CPB-8 de *Escherichia coli*

En la figura 67 se observa la curva de crecimiento de *Escherichia coli* CPB-8, determinada por densidad óptica (D.O.) y las unidades formadoras de colonias (UFC) por conteo en el microscopio. La ecuación de tercer orden de la esquina superior izquierda corresponde a la ecuación determinada por la D.O. y la ecuación del lado derecho corresponde al conteo de la bacteria por microscopio. La relación entre las dos curvas tiene una  $R^2$  final de 0.9624 al utilizar una ecuación como dependiente de la otra.



**Figura 67.** Cinética de *Escherichia coli* CPB-8, determinada por lectura de D.O. y UFC por conteo en el microscopio óptico a 40X en cámara de Neubauer (n=6).

En la figura 68 se muestra un ejemplo del crecimiento de colonias de *E. coli*, después de diluir 200 veces el número de bacterias de un pozo en estudio. Esta prueba verificó el número de bacterias inoculadas en el experimento. En esta prueba fueron  $0.94 \pm 0.06 \times 10^4$  bacterias por caja, lo cual se encuentra dentro del rango establecido en la metodología; a su vez permitió validar la muestra bacteriana al identificarse un solo tipo de colonia.

Clave	Cepa	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color
CPB-8	<i>Escherichia coli</i>	Circular	Entero	Convexa	Butirosa	Blanco opaco

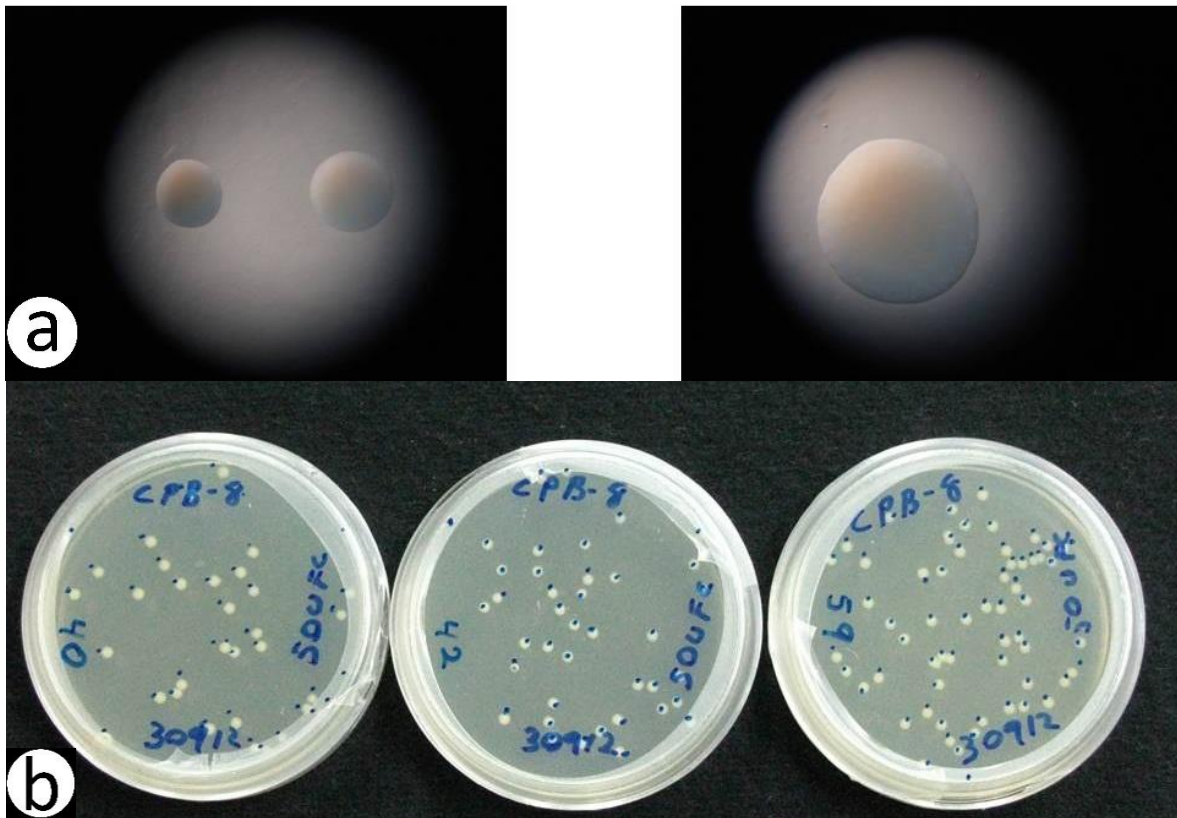
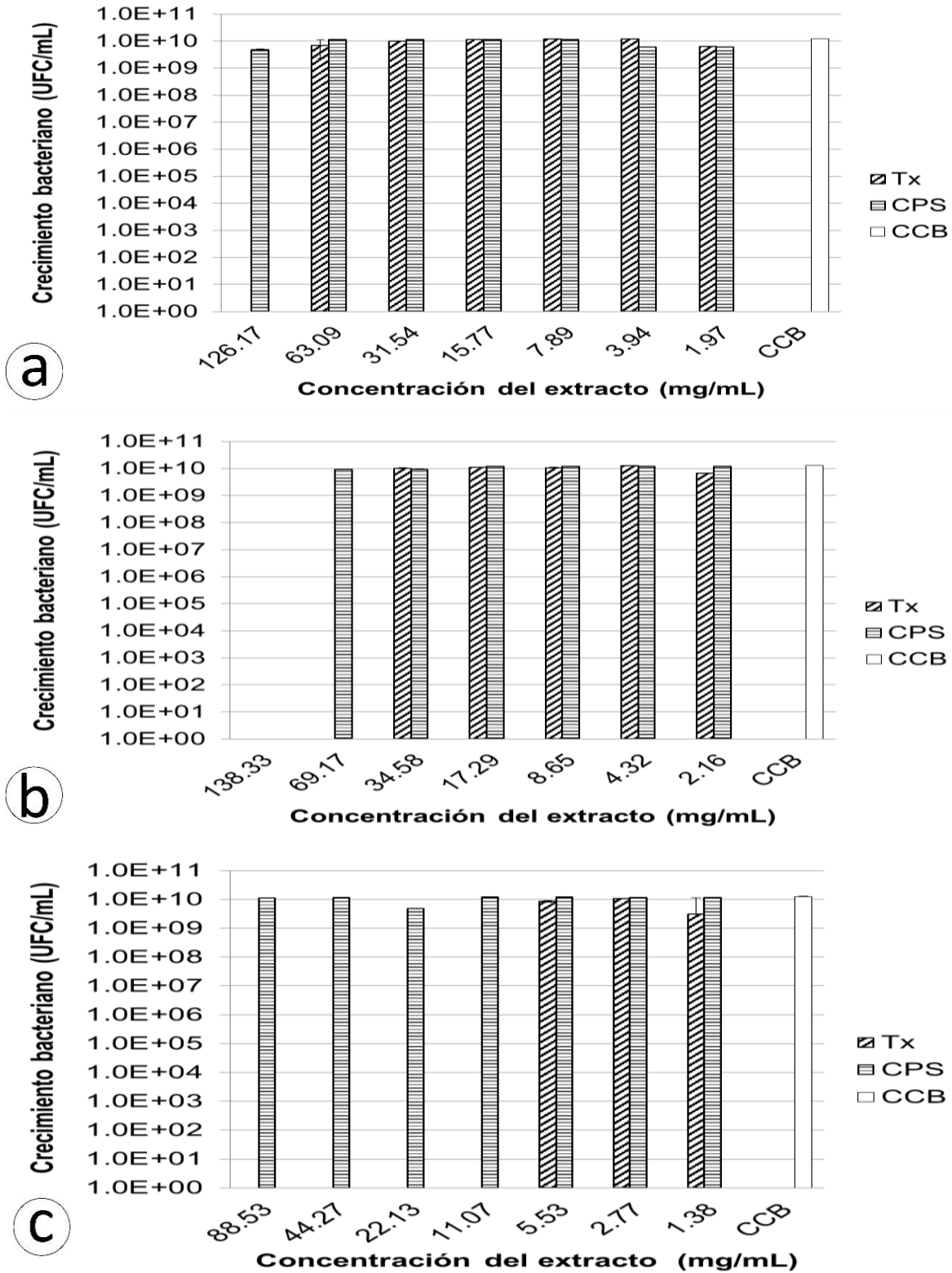


Figura 68. *Escherichia coli* CPB-8 al microscopio a las 24 horas.

#### 8.5.6.1 Efecto de los extractos de basidiocarpo de *L. boryana* CP-519

El efecto del extracto de *L. boryana* CP-519 sobre la bacteria *Escherichia coli* CPB-8 a concentración constante de  $0.96 \times 10^4$ , se observa por medio de la lectura de la D.O. de cada muestra y se presenta en la figura 65. Este diseño experimental nos permitió determinar el efecto de crecimiento o inhibición de la bacteria y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) la cual se encuentra un resumen en el Cuadro 27.



**Figura 69.** Efecto inhibitorio del extracto de *Lentinula boryana* sobre *Escherichia coli* CPB-8: a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.



En la figura 69a, se observa que con el extracto acuoso se presentó un efecto bacteriostático a las 24 horas en D1 con dosis de 126.17 mg/mL. Este solvente fue el que presentó menor efecto bactericida pero mayor efecto antioxidante. En la figura 69c, con el extracto hidroalcohólico al 35%, se observó un efecto bactericida en la dilución D4 con dosis de 11.07 mg/mL. Este solvente fue el que presentó el principal efecto contra esta bacteria. En la figura 69b, el extracto hidroalcohólico al 20% tuvo efecto bacteriostático en D2 con dosis de 69.17 mg/mL.

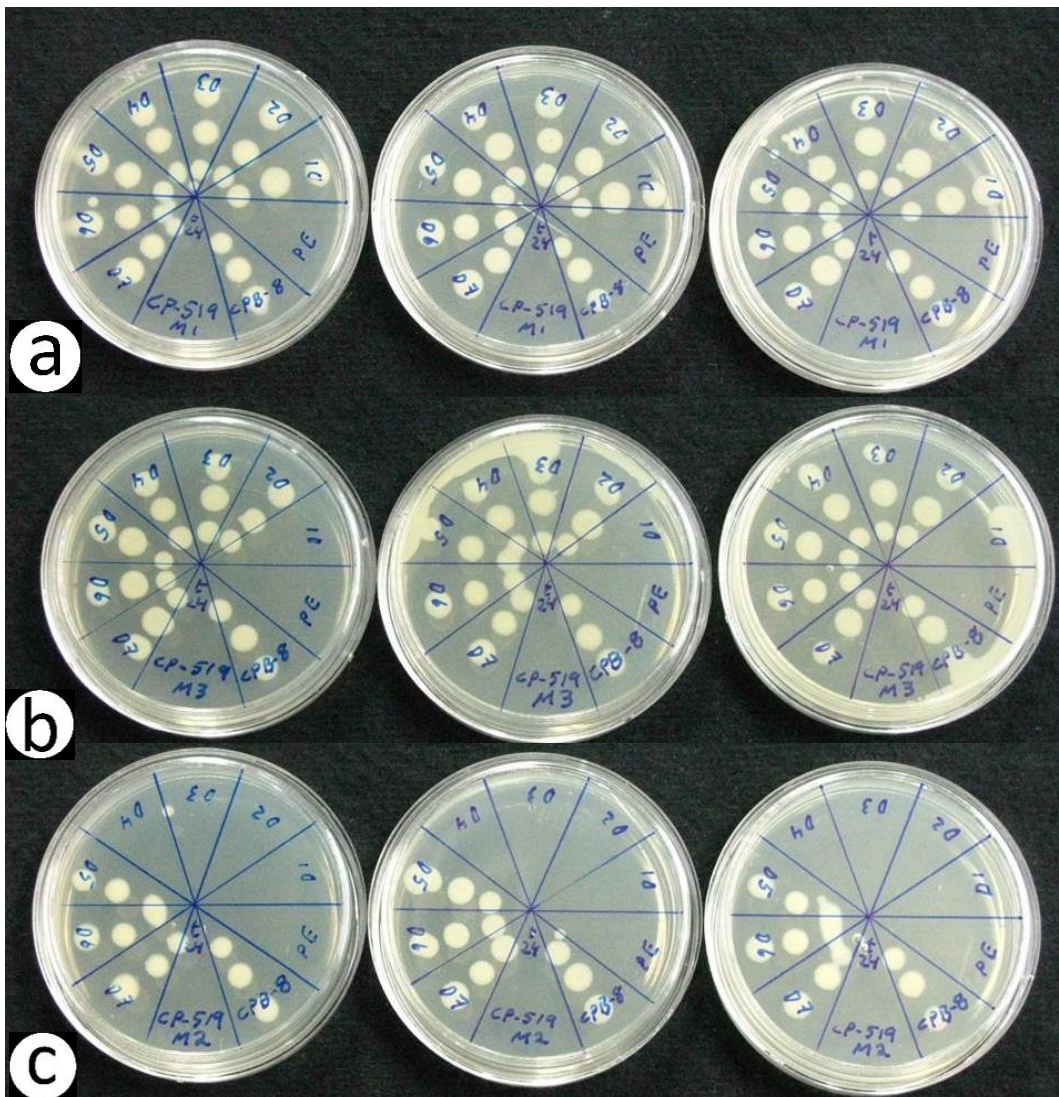
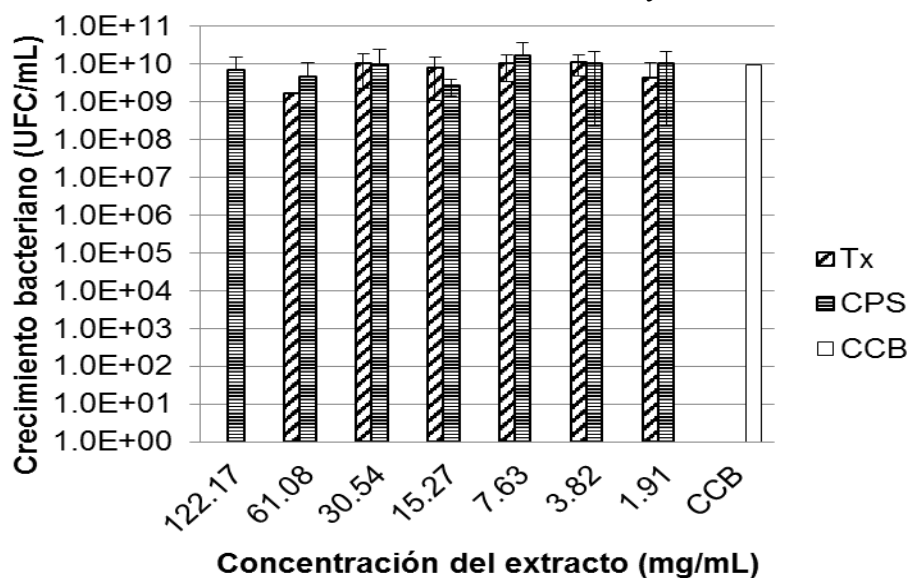


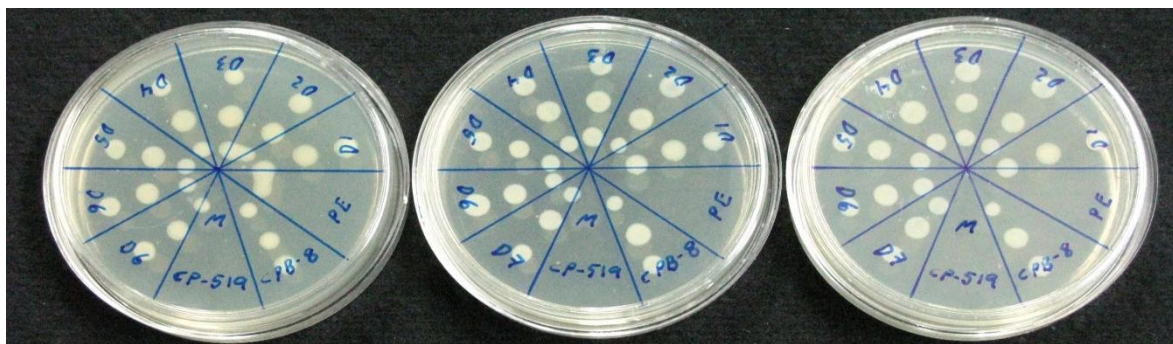
Figura 70. Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de *Escherichia coli* CPB-8 con las diferentes dosis de extracto de *Lentinula boryana* en los solventes evaluados; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%.

En la figura 70 se observan las muestras tomadas a partir de las microplacas a las 24 horas de incubación, las cajas se incubaron por otras 24 horas, el muestreo se realizó posterior a la lectura de D.O. En el caso del extracto hidroalcohólico al 35% se presentó el crecimiento de bacterias en el mismo nivel de dilución que lo que se detectó a través de la lectura de D.O. (D4, 11.07 mg/mL) en el caso de los extractos acuoso e hidroalcohólico el efecto bactericida se presentó en una concentración más alta (Concentración inicial con 252 mg/mL respectivamente). El efecto inhibitorio se mantuvo con el paso de los días.

### 8.5.6.2 Efecto de los extractos de micelio de *L. boryana* CP-519



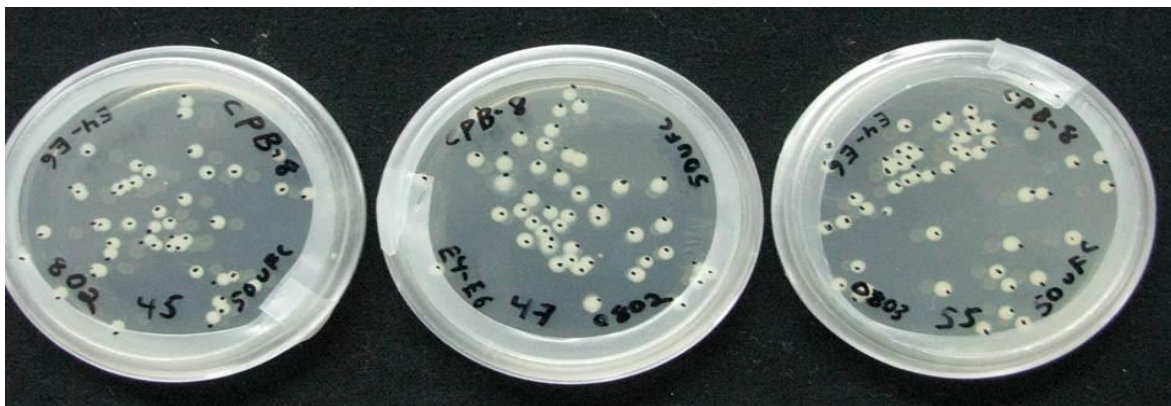
**Figura 71.** Efecto del extracto de micelio de *Lentinula boryana* sobre *Escherichia coli* CPB-8: en solvente hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.



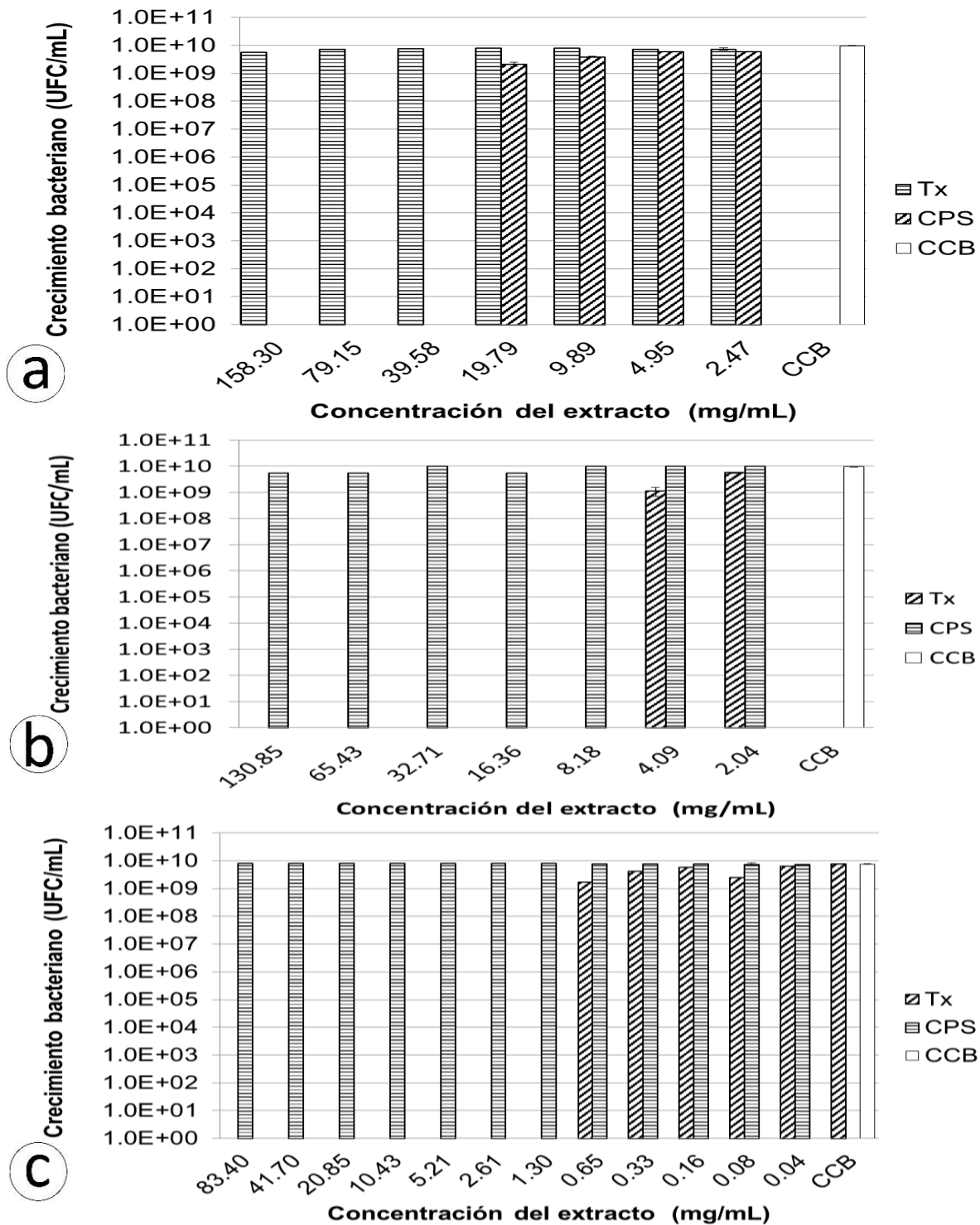
**Figura 72.** Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de *Escherichia coli* CPB-8 con las diferentes dosis de extracto de micelio de *Lentinula boryana* en solvente hidroalcohólico 35%.

### 8.5.6.3 Efecto de los extractos de *L. edodes* CP-7

El efecto del extracto de *L. edodes* CP-7 sobre la bacteria *Escherichia coli* CPB-8 a concentración constante de  $1.12 \pm 0.13 \times 10^4$  bacterias, se observa por medio de la lectura de la D.O. de cada muestra y se presenta en la figura 74. Este diseño experimental nos permitió determinar el efecto de crecimiento o inhibición de la bacteria y la concentración mínima inhibitoria (CMI), de la cual se encuentra un resumen en el Cuadro 27.



**Figura 73.** Crecimiento de *Escherichia coli* CPB-8 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas.

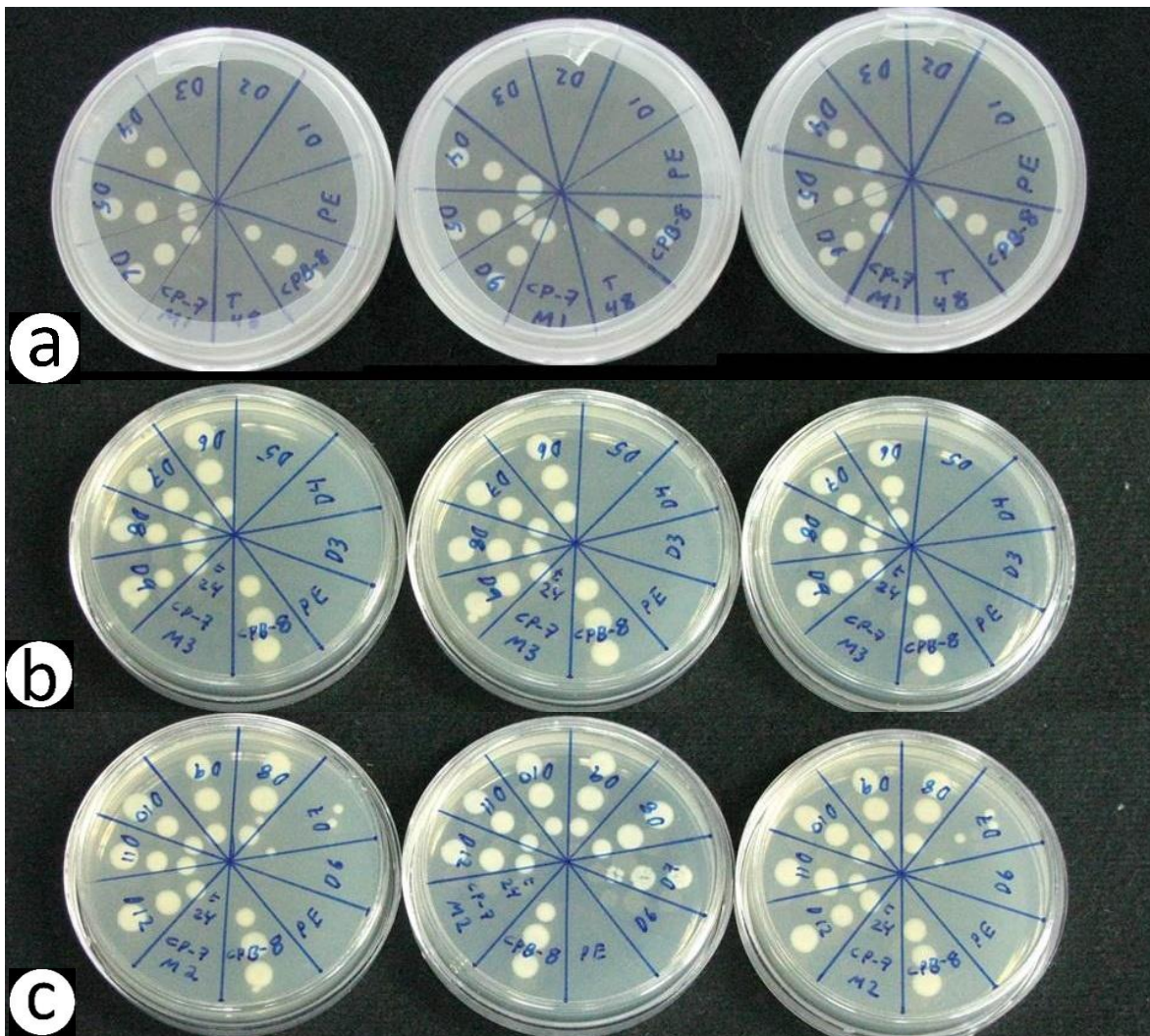


**Figura 74.** Efecto inhibitorio del extracto de *Lentinula edodes* sobre *Escherichia coli* CPB-8, a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.

En la figura 74 se observa el efecto del extracto de *Lentinula edodes* sobre *Escherichia coli* CPB-8 en una concentración de  $1.12 \times 10^4$  bacterias por pozo, a: se observa que con el



extracto acuoso existe un efecto inhibitorio a las 24 y 48 horas en D3 con una dosis de 39.58 mg/mL. El agua es el solvente que presentó menor efecto bactericida pero mayor efecto antioxidante. En la figura 74c, el extracto hidroalcohólico al 35%, tuvo un efecto bacteriostático a las 24 horas en D7 con una dosis de 1.30 mg/mL, siendo éste el solvente con el principal efecto bactericida para esta bacteria. En la figura 74b, en el extracto hidroalcohólico 20% se observó un efecto bactericida en la dilución D5 con dosis 8.18 mg/mL a las 24 y 48 horas.

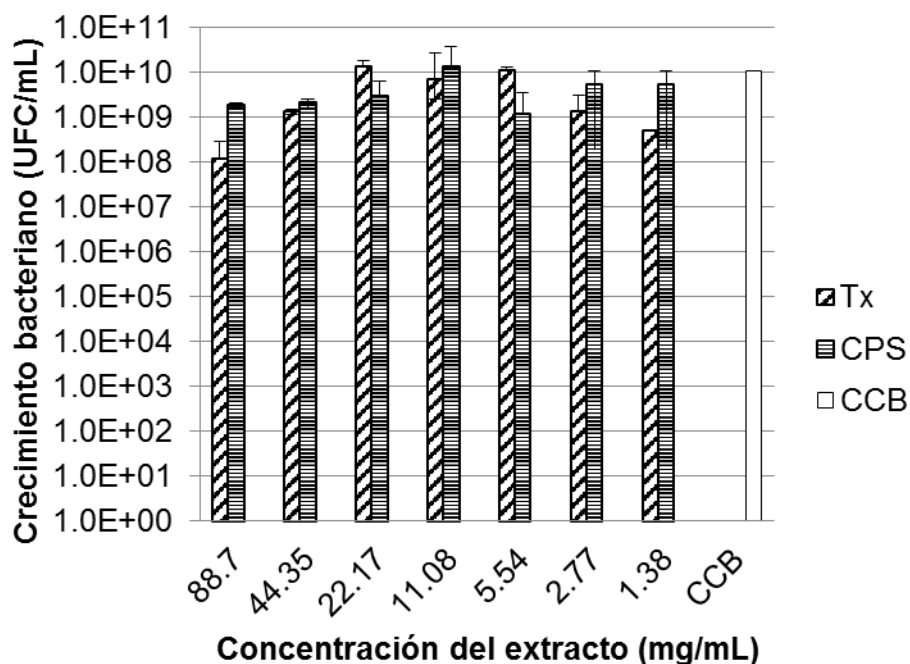


**Figura 75.** Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de *Escherichia coli* CPB-8 con las diferentes dosis de extracto de *Lentinula edodes* en los solventes evaluados; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%.

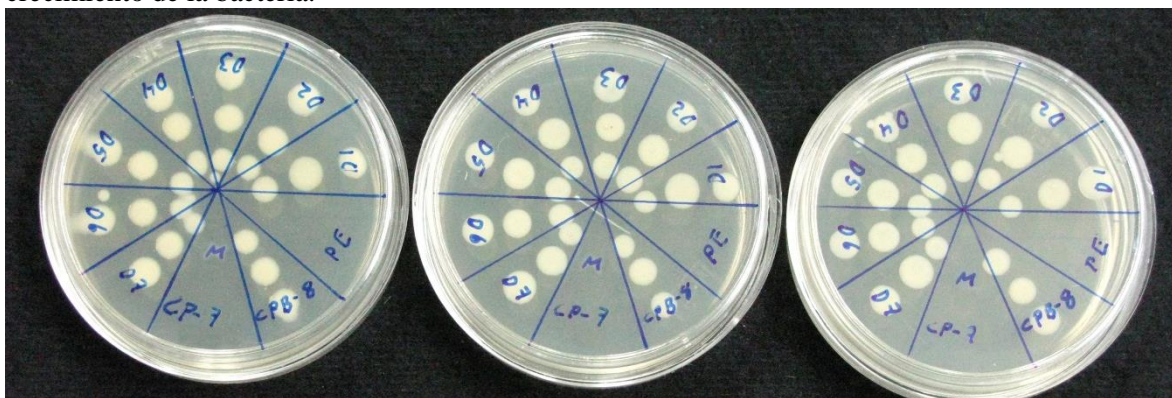
En la figura 75 se observan las muestras tomadas a partir de las microplacas a las 24 horas de incubación, las cajas se incubaron por otras 24 horas. El muestreo se realizó posterior a la

lectura de D.O., se observó un efecto bactericida en la misma concentración que en la prueba bacteriostática. El efecto inhibitorio en las concentraciones más altas, se mantuvo con el paso de los días. La determinación de la CMI de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *Escherichia coli* CPB-8 se presenta en el Cuadro 27.

#### 8.5.6.4 Efecto del extracto de micelio de *L. edodes* CP-7



**Figura 76.** Efecto del extracto de *Lentinula edodes* sobre *Escherichia coli* CPB-8, en solvente hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: control de crecimiento de la bacteria.



**Figura 77.** Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de *Escherichia coli* CPB-8 con las diferentes dosis de extracto de micelio de *Lentinula edodes* en el solvente hidroalcohólico 35%.

**Cuadro 27.** Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *Escherichia coli* CPB-8 a las 24 horas.

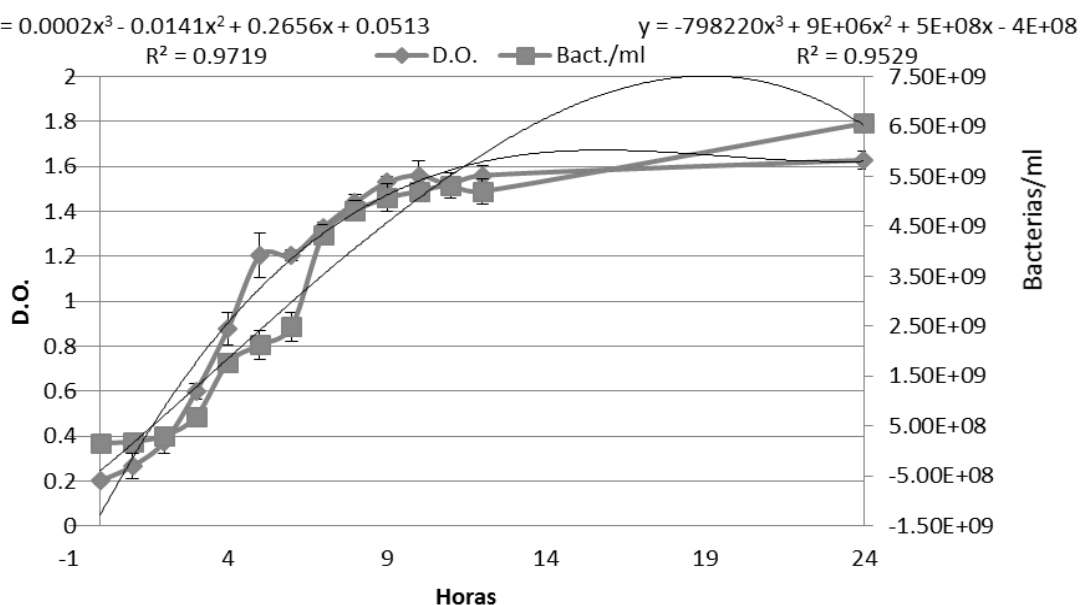
Cepa	H	Agua			Hidroalcohólico al 35%			Hidroalcohólico al 20%		
		Dilución	Extracto (µl)	Conc. (mg)	Dilución	Extracto (µl)	Conc. (mg)	Dilución	Extracto (µl)	Conc. (mg)
CP-519	24	D1	50	126.17	D4	6.25	11.07	D2	25	69.18
CP-7	24	D3	12.5	39.58	D7	0.78	1.30	D5	3.13	8.18

Conc.: Concentración.

En los tres extractos de *L. edodes* contra *E. coli* CPB-8, se observó que el mejor de los casos es el extracto de Extracto hidroalcohólico 35%M2, la CMI es de 1.30 mg/ml.

### 8.5.7 Bioensayo con la cepa CPB-9 de *Bacillus subtilis*

En la figura 78 se observa la curva de crecimiento de *Bacillus subtilis* CPB-9, determinada por densidad óptica (D.O.) y las unidades formadoras de colonias (UFC) por conteo en el microscopio. La ecuación de tercer orden de la esquina superior izquierda corresponde a la ecuación determinada por la D.O. y la ecuación del lado derecho corresponde al conteo de la bacteria por microscopio en la cámara de Neubauer. La relación entre las dos curvas tuvo una  $R^2$  final de 0.9261 al utilizar una ecuación como dependiente de la otra.

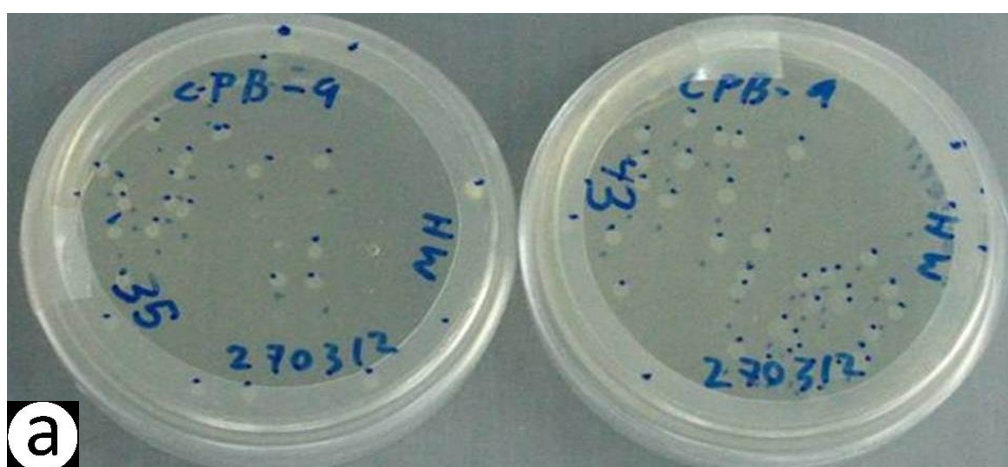


**Figura 78.** Cinética de *Bacillus subtilis* CPB-9, determinada por lectura de D.O. y UFC por conteo en el microscopio óptico a 40X en cámara de Neubauer (n=6).



En la figura 79 se muestra un ejemplo del crecimiento de colonias de *B. subtilis*. Esta prueba verificó el número de bacterias inoculadas en cada pozo del experimento, correspondientes a multiplicar el número de UFC de la caja de Petri por 200, siendo para este caso una cantidad de  $1.025 \pm 0.012 \times 10^4$  bacterias por pozo, lo cual se encuentra dentro del rango establecido en la metodología. A su vez, este procedimiento permite validar la muestra bacteriana al identificarse un solo tipo de colonia en el medio de cultivo.

Clave	Cepa	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color
CPB-9	<i>Bacillus subtilis</i>	Circular	Crenado	Elevada	Viscosa	Blanco opaco



CPB-9 aumento 1X

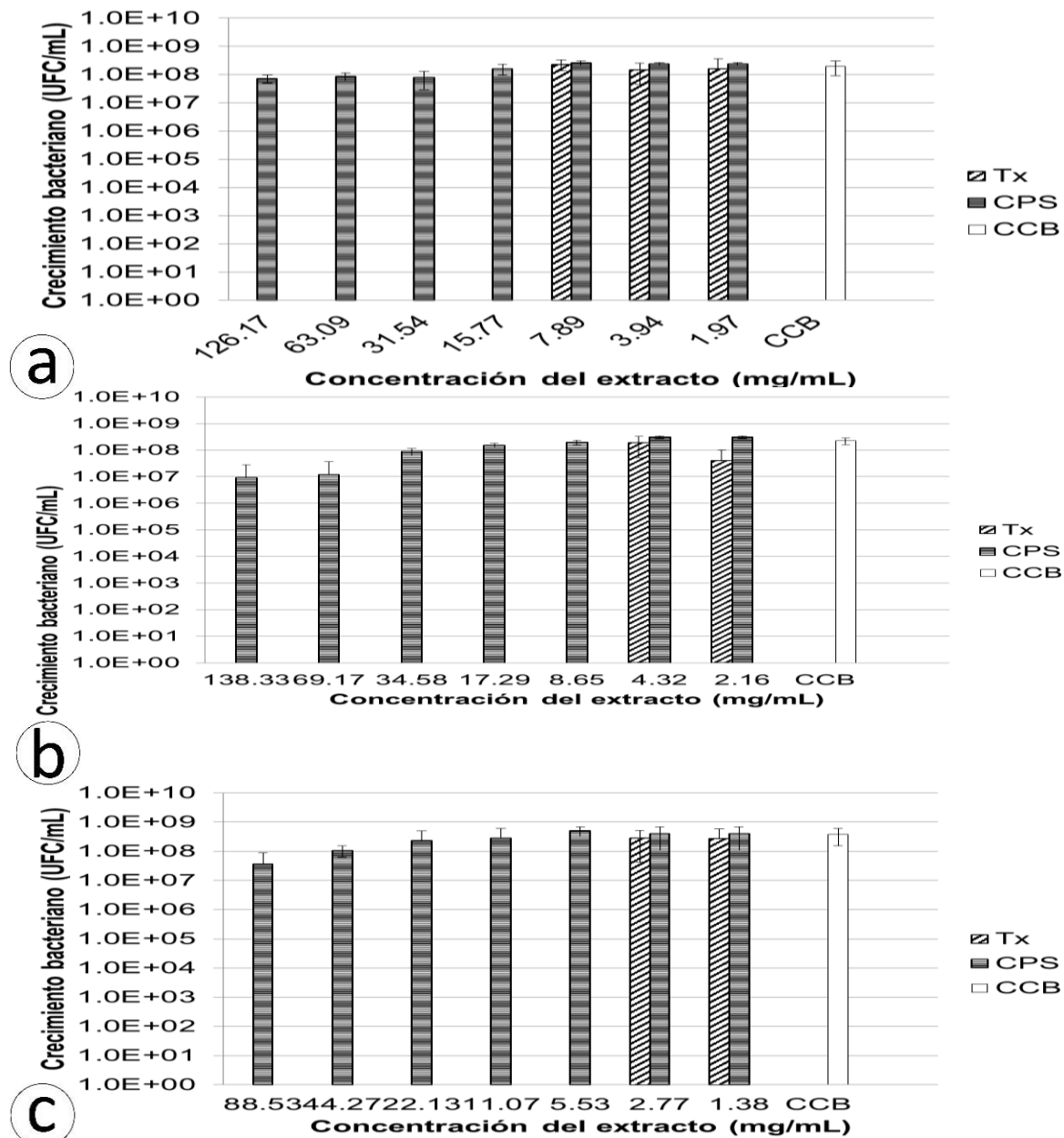


CPB-9 aumento 1.6X

**Figura 79.** Cultivo de *Bacillus subtilis* CPB-9 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas.

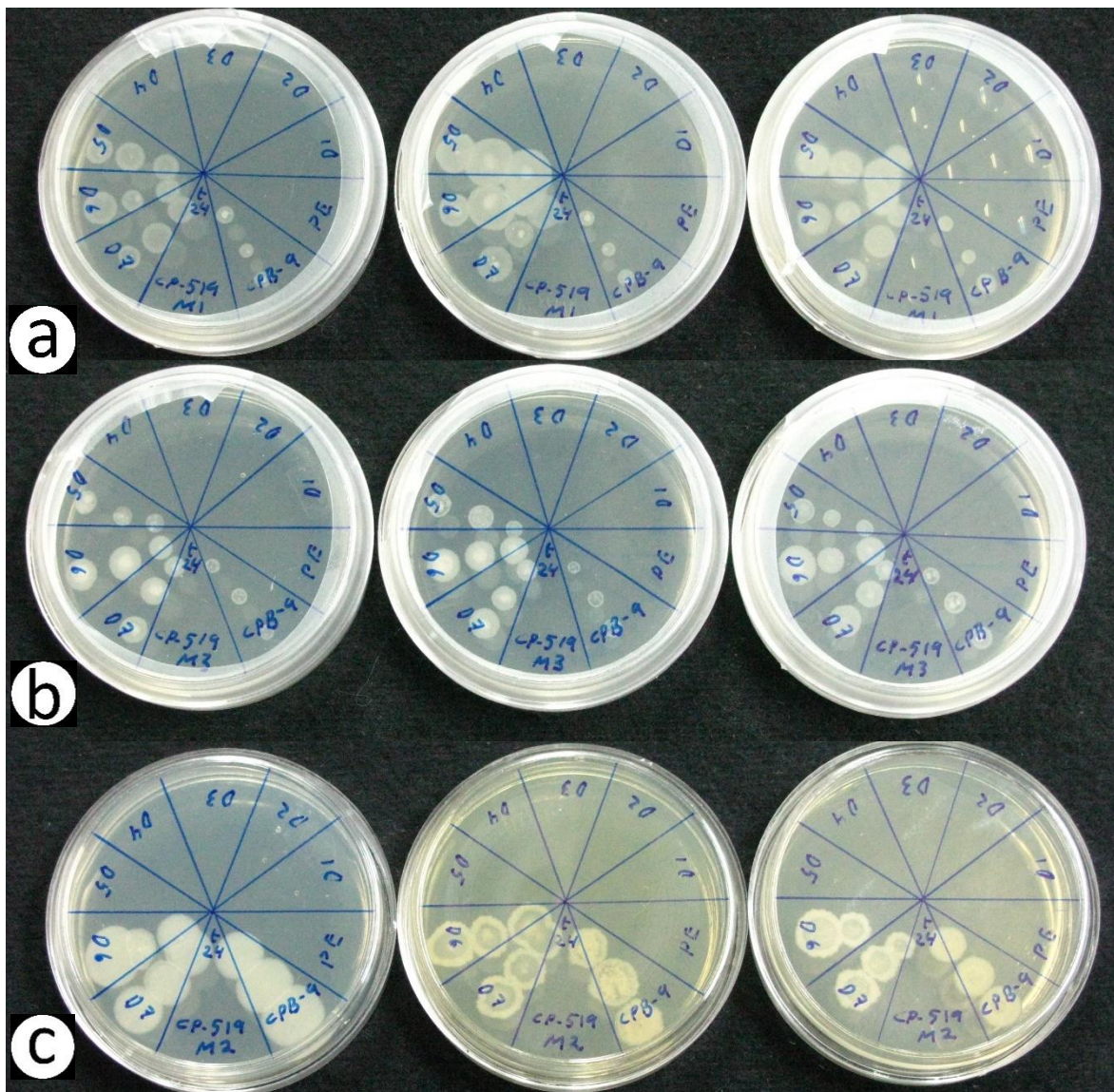
### 8.5.7.1 Efecto de los extractos de *L. boryana* CP-519

El efecto del extracto de *L. boryana* CP-519 sobre la bacteria *Bacillus subtilis* CPB-9 a concentración constante de  $1.16 \times 10^4$ , se observa por medio de la lectura de la D.O. de cada muestra y se presenta en la figura 76. Este diseño experimental nos permitió determinar el efecto de crecimiento o inhibición de la bacteria y la (CMI) la cual se encuentra un resumen en el Cuadro 28.



**Figura 80.** Efecto inhibitorio del extracto de *Lentinula boryana* sobre *Bacillus subtilis* CPB-9 a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.

En la figura 80a, se observa que con el extracto acuoso, existe un efecto inhibitorio a las 24 y 48 horas en D4 con dosis de 15.77 mg/mL. El agua fue el solvente que presentó menor efecto bactericida pero mayor efecto antioxidante. En la figura 80b, extracto hidroalcohólico al 35%, se observa que tuvo un efecto bactericida a las 24 y 48 horas en la dilución D5 con dosis de 5.53 mg. En la figura 80c, el extracto hidroalcohólico 20% tuvo un efecto bacteriostático en D5 con dosis de 8.65 mg/mL.



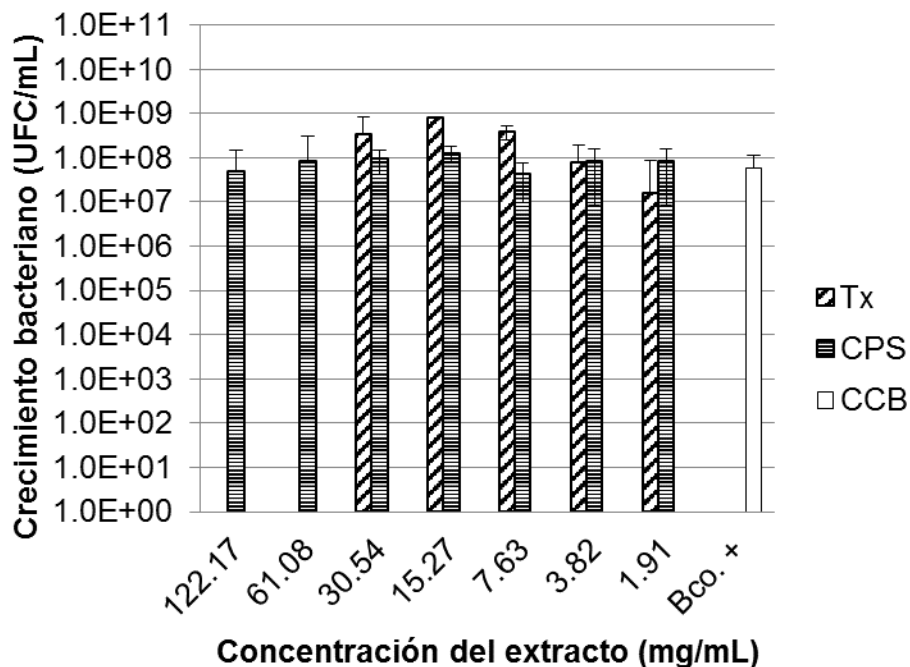
**Figura 81.** Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de *Bacillus subtilis* CPB-9 con las diferentes dosis de extracto de *Lentinula boryana* en los solventes evaluados; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%.

El efecto bactericida se determinó del cultivo en cajas de Petri en donde se observa en la figura 81 que el extracto acuoso tuvo un efecto con una concentración de 15.77 mg/mL y los



extractos hidroalcohólicos al 20% y 35% tuvieron un efecto con 17.29 y 5.53 mg/mL respectivamente.

### 8.5.7.2 Efecto de los extractos de micelio de *L. boryana* CP-519



**Figura 82.** Efecto del extracto del micelio de *Lentinula boryana* sobre *Bacillus subtilis* CPB-9 en solvente hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.

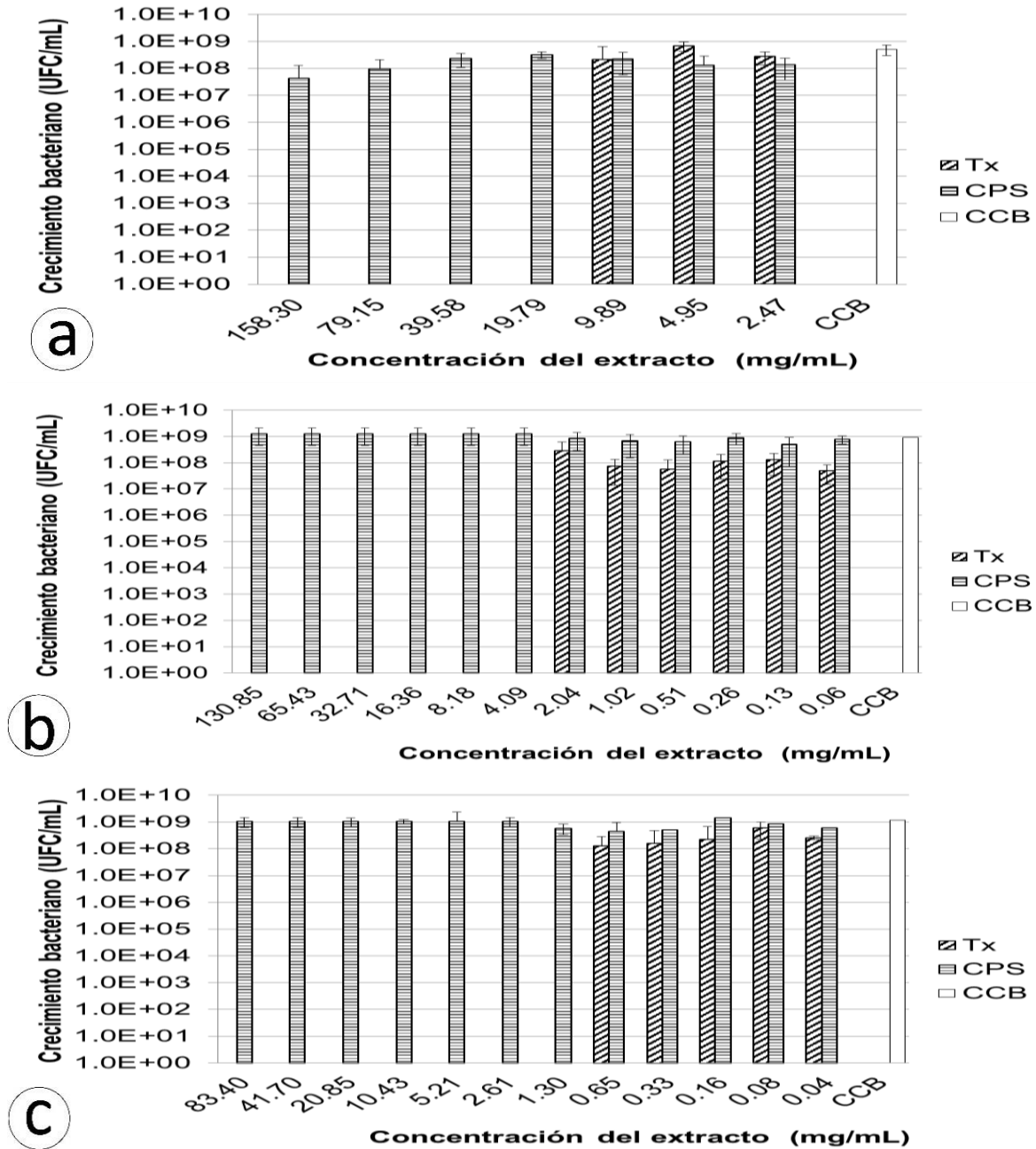


**Figura 83.** Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de *Bacillus subtilis* CPB-9 con las diferentes dosis de extracto del micelio de *Lentinula boryana* en el solvente hidroalcohólico 35%.

El extracto hidroalcohólico al 35% del micelio, tuvo un efecto inhibitorio y bactericida con una concentración de 61.08 mg/mL como se observa en las figuras 82 y 83 respectivamente.

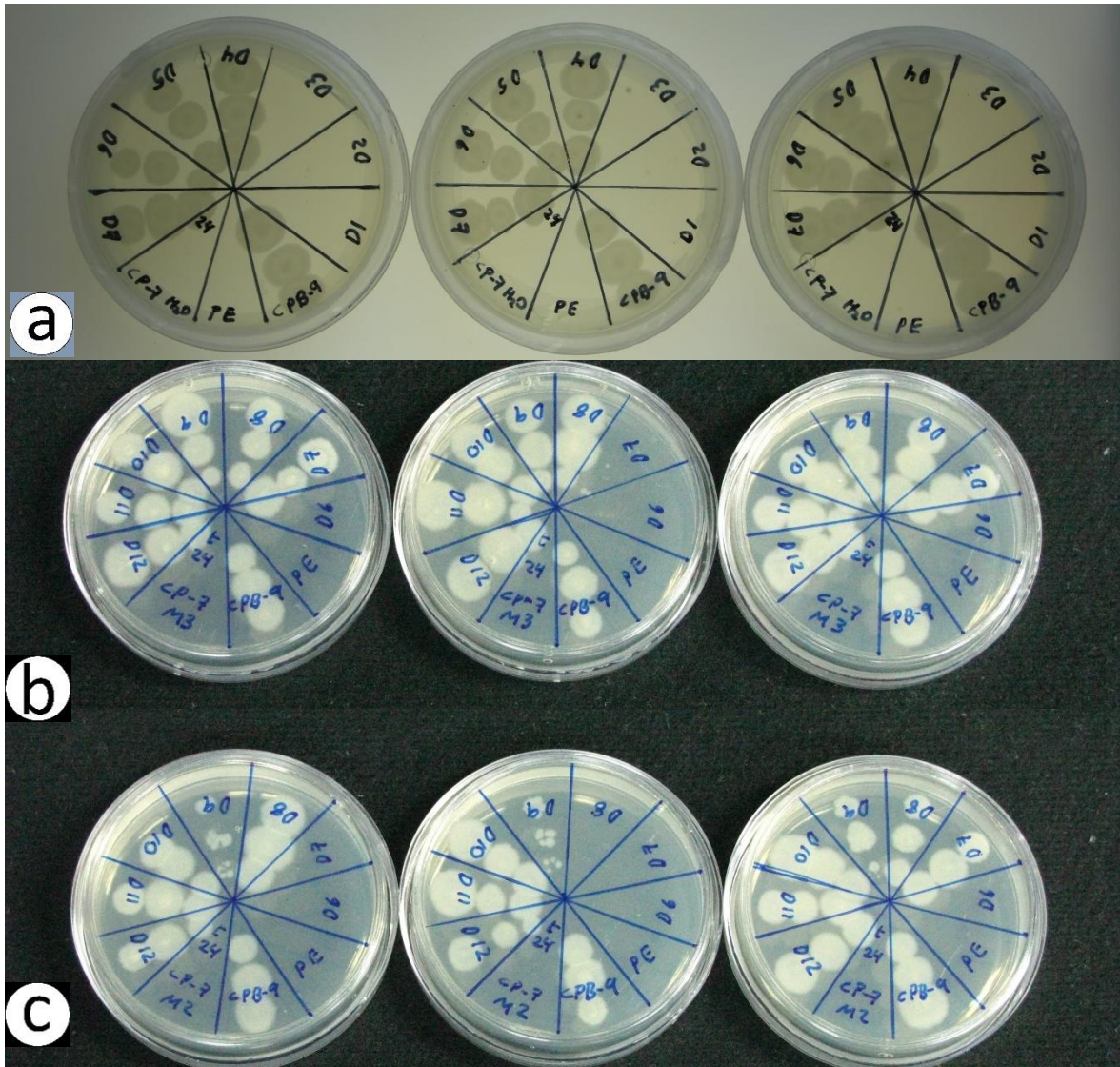
### 8.5.7.3 Efecto de los extractos de *L. edodes* CP-7

El efecto del extracto de *L. edodes* sobre la bacteria *Bacillus subtilis* CPB-9 a concentración constante de  $0.9 \times 10^4$  bacterias, se observa por medio de la lectura de la D.O. de cada muestra y se presenta en la figura 84. Este diseño experimental nos permitió determinar el efecto de crecimiento o inhibición de la bacteria y la CMI (Cuadro 28).



**Figura 84.** Efecto del extracto de *Lentinula edodes* sobre *B. subtilis* CPB-9 a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.



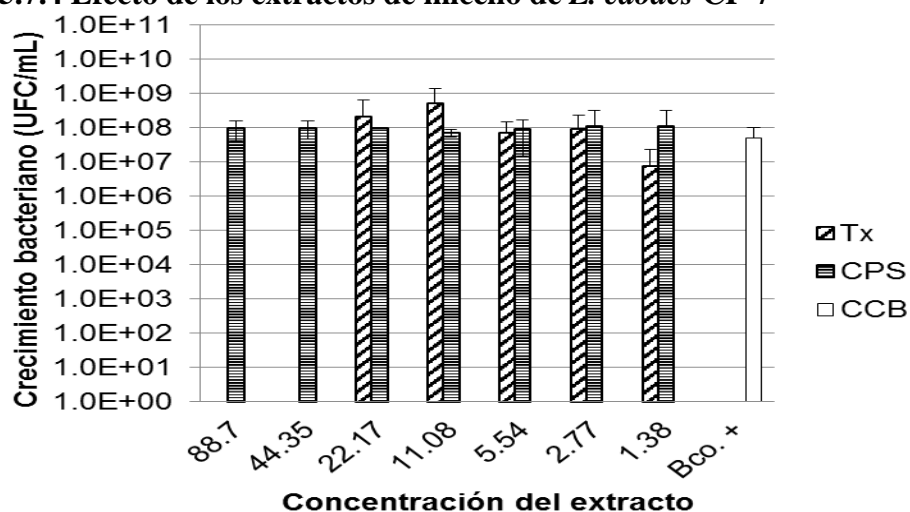


**Figura 85.** Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de *Bacillus subtilis* CPB-9 con las diferentes dosis de extracto de *Lentinula edodes* en los solventes evaluados; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%.

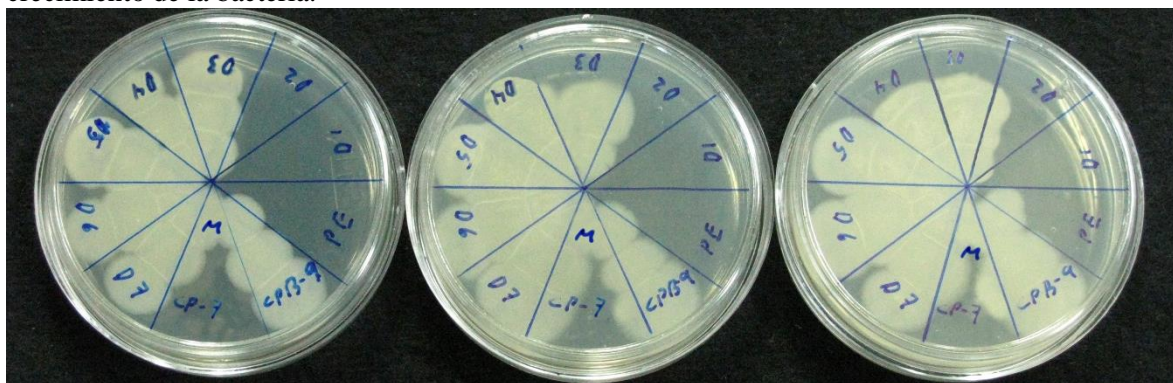
En las Figura 84 y 85 se observa el efecto del extracto de *Lentinula edodes* sobre *B. subtilis* CPB-9 en una concentración de  $0.9 \times 10^4$  bacterias por pozo. En la figura 84a, se observa que con el extracto acuoso, hubo un efecto bacteriostático a las 24 horas en D4 con dosis de 19.79 mg/mL y un efecto bactericida a las 48 horas en D3 con una dosis de 39.58 mg/ml. El agua fue el solvente que presentó menor efecto bactericida pero mayor efecto antioxidante. En la figura 84c y 85c, con el extracto hidroalcohólico al 35%, se observó el efecto inhibitorio en la dilución D7 con dosis de 1.30 mg/mL a las 24 horas y efecto bactericida a las 48 horas en

D6 con dosis de 2.6 mg/mL. En las Figura 84b y 85b, el extracto hidroalcohólico 20% tuvo un efecto bacteriostático y bactericida en D6 con dosis de 4.08 mg/mL a las 24 y 48 horas respectivamente. La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *B. subtilis* CPB-9 se presenta en el cuadro 28.

#### 8.5.7.4 Efecto de los extractos de micelio de *L. edodes* CP-7



**Figura 86.** Efecto del extracto de micelio de *Lentinula edodes* sobre *B. subtilis* CPB-9 hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.



**Figura 87.** Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de *Bacillus subtilis* CPB-9 con las diferentes dosis de extracto de micelio de *Lentinula edodes* en el solventes hidroalcohólico 35%.

El extracto hidroalcohólico al 35% del micelio, tuvo un efecto inhibitorio y bactericida con una concentración de 44.35 mg/mL como se observa en las figuras 86 y 87 respectivamente.

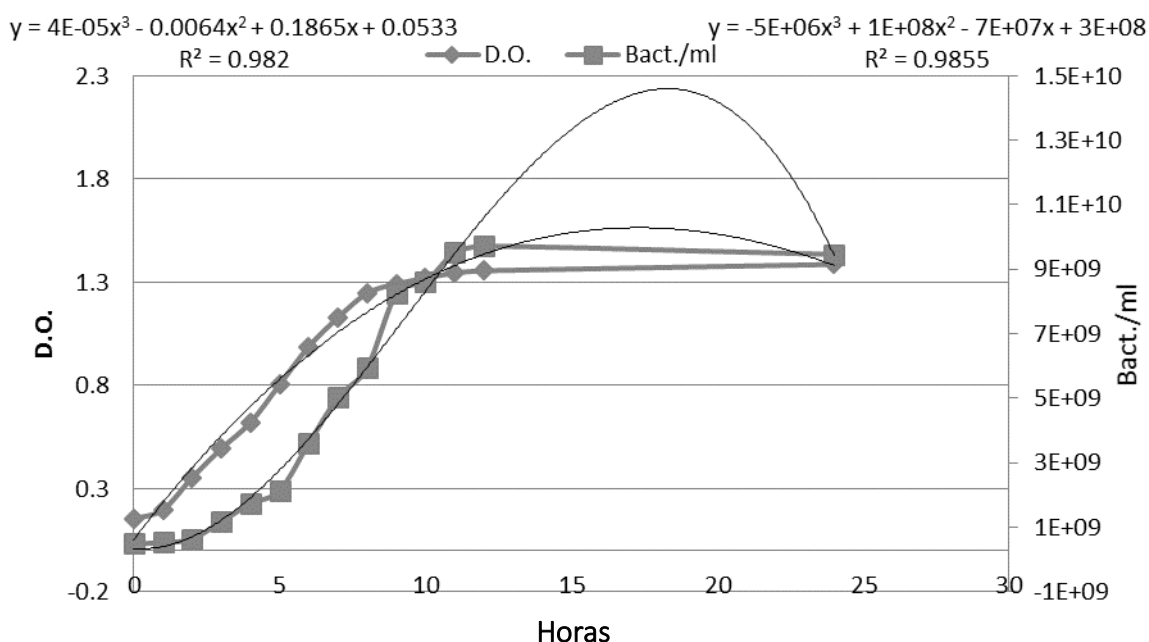
**Cuadro 28.** Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *B. subtilis* CPB-9.

Cepa	H	Agua			Solución hidroalcohólica al 20%			Solución hidroalcohólica al 35%		
		Dilución	Extracto (μL)	Conc. (mg)	Dilución	Extracto (μL)	Conc. (mg)	Dilución	Extracto (μL)	Conc. (mg)
CP-519	24	D4	6.25	15.77	D5	3.13	5.53	D5	3.13	8.65
CP-7	24	D4	6.25	19.79	D7	0.78	1.30	D6	1.56	4.08

H: Horas en incubación. Conc.: Concentración.

### 8.5.8 Bioensayo con la cepa CPB-10 de *Staphylococcus aureus*

En la figura 88 se observa la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* CPB-10, determinada por densidad óptica (D.O.) y las unidades formadoras de colonias (UFC) por conteo en el microscopio. La ecuación de tercer orden de la esquina superior izquierda corresponde a la ecuación determinada por la D.O. y la ecuación del lado derecho corresponde al conteo de las bacterias por microscopio en la cámara de Neubauer. La relación entre las dos curvas tiene una  $R^2$  final de 0.9677 al utilizar una ecuación como dependiente de la otra.

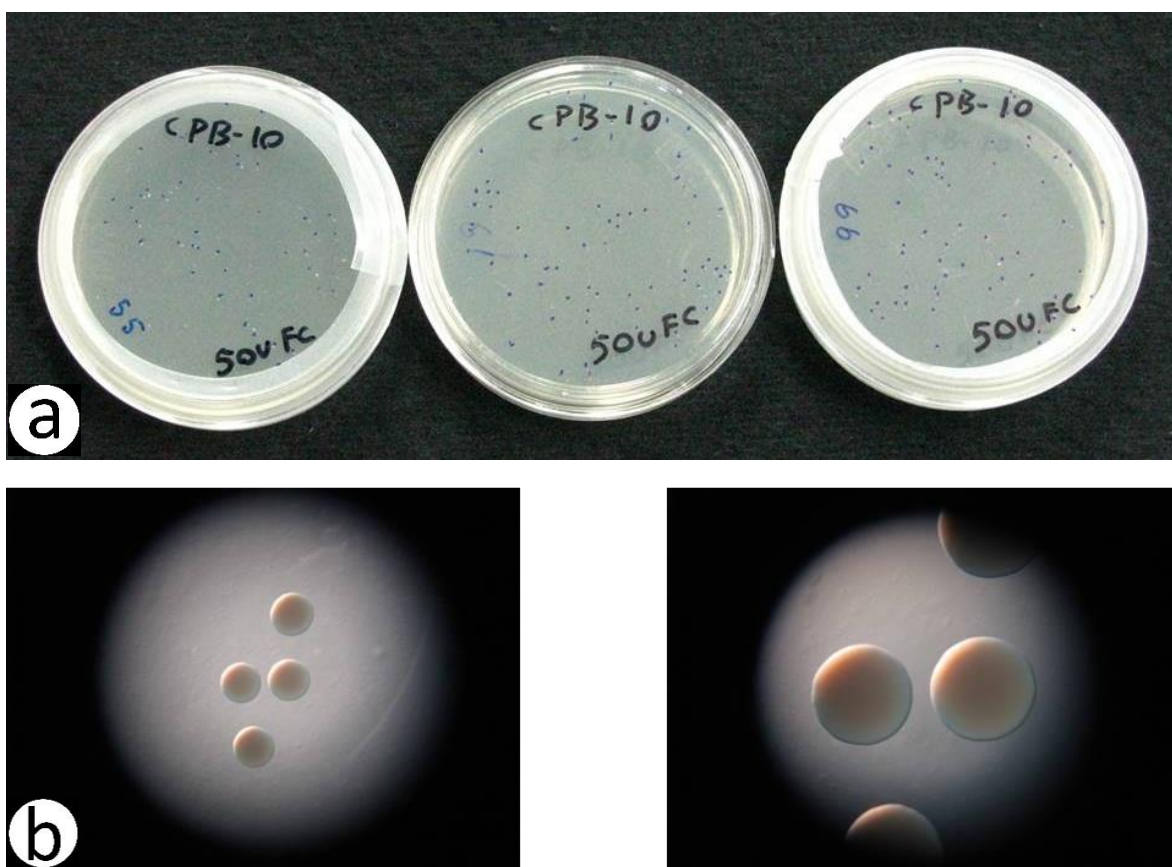


**Figura 88.** Cinética de *S. aureus* CPB-10, determinada por lectura de D.O. y UFC por conteo en el microscopio óptico a 40X en cámara de Neubauer (n=6).



En la figura 89 se muestra un ejemplo del crecimiento de colonias de *S. aureus* CPB-10, después de diluir  $2 \times 10^6$  veces el número de bacterias. Esta prueba verificó el número de bacterias inoculadas en cada pozo del experimento, correspondientes a multiplicar el número de UFC de la caja de Petri por 200. Esta prueba verificó el número de bacterias inoculadas en el experimento, en esta prueba fueron  $1.21 \pm 0.1 \times 10^4$  bacterias por caja, lo cual se encuentra dentro del rango establecido en la metodología. A su vez, este procedimiento permite validar la muestra bacteriana al identificarse un solo tipo de colonia en el medio de cultivo.

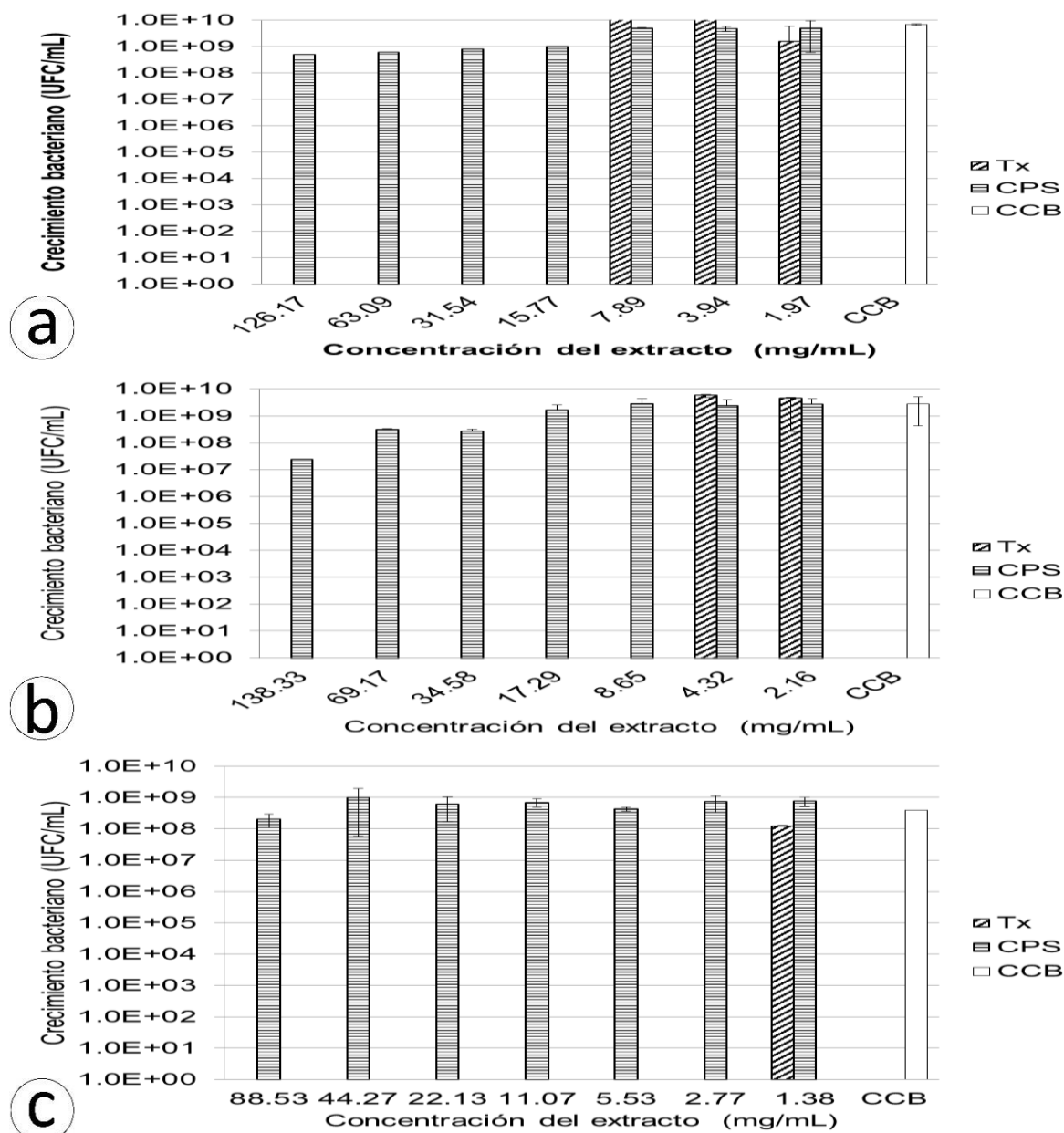
Clave	Cepa	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color
CPB-10	<i>Staphylococcus aureus</i>	Puntiforme	Entero	Convexa	Viscosa	Blanco opaco



**Figura 89.** Cultivo de *Staphylococcus aureus* CPB-10 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas.

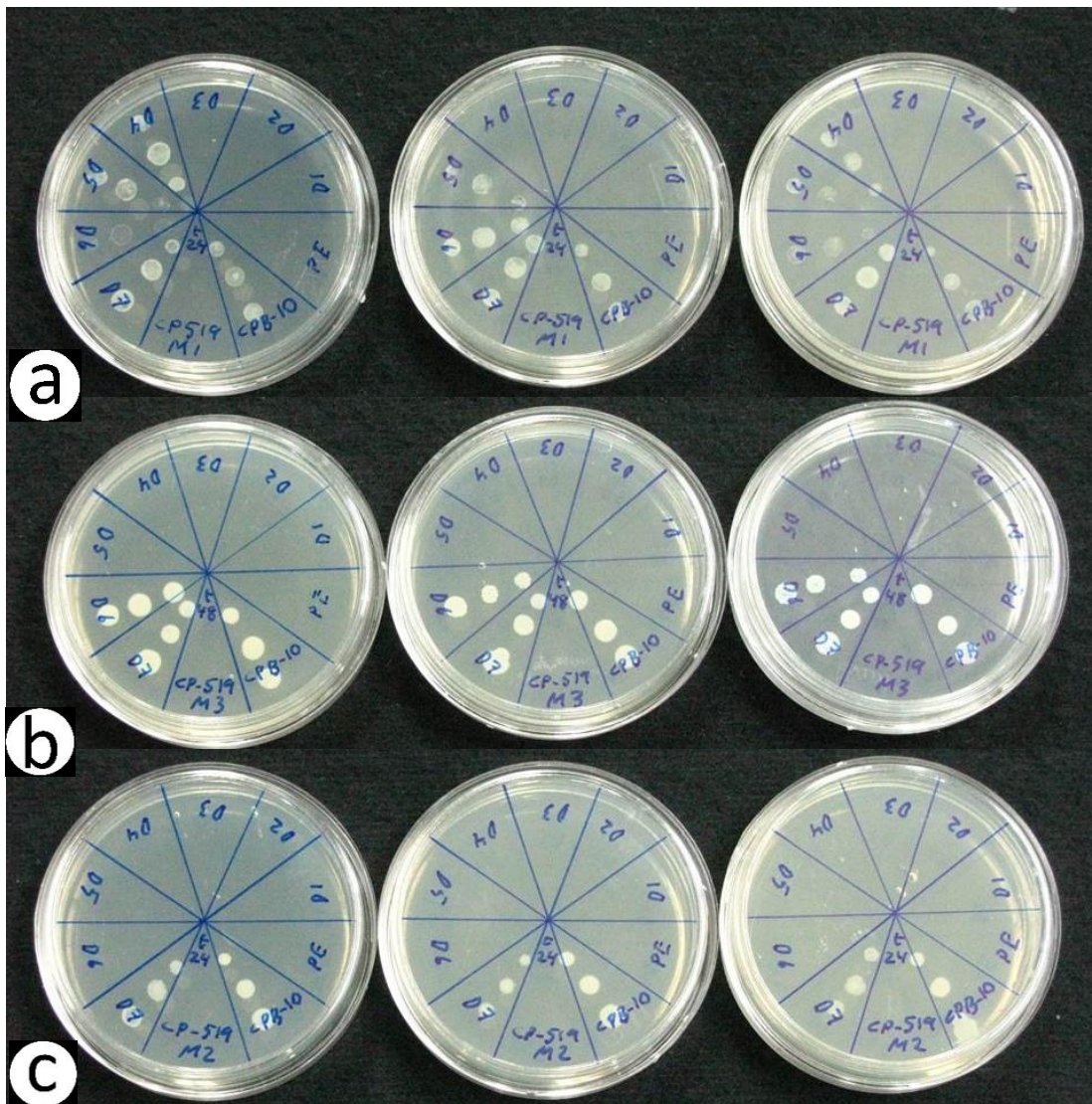
### 8.5.8.1 Efecto de los extractos de basidiocarpo de *L. boryana* CP-519

El efecto del extracto de *L. boryana* CP-519 sobre la bacteria *Staphylococcus aureus* CPB-10 a concentración constante de  $1.21 \pm 0.1 \times 10^4$ , se observa por medio de la lectura de la D.O. de cada muestra y se presenta en la figura 90; este diseño experimental nos permitió determinar el efecto de crecimiento o inhibición de la bacteria y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) la cual se encuentra un resumen en el Cuadro 29.



**Figura 90.** Efecto inhibitorio del extracto de *Lentinula boryana* sobre *Staphylococcus aureus* CPB-10, a: acuosos, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: control de crecimiento de la bacteria.

En la figura 90a se observa que cuando se extrae con agua, existe un efecto inhibitorio a las 24 y 48 horas en D4 con dosis de 15.77 mg/mL, es el solvente que presenta menor efecto bactericida pero mayor efecto antioxidante. En la figura 90b, con el extracto hidroalcohólico al 35%, se observó que tuvo un efecto inhibitorio en la dilución D6 con dosis de 2.77 mg/mL. Este solvente fue el que presentó el principal efecto contra esta bacteria. En la figura 90c, el extracto hidroalcohólico 20% tuvo efecto bactericida en D5 con dosis de 8.65 mg/mL a las 24 y 48 horas.

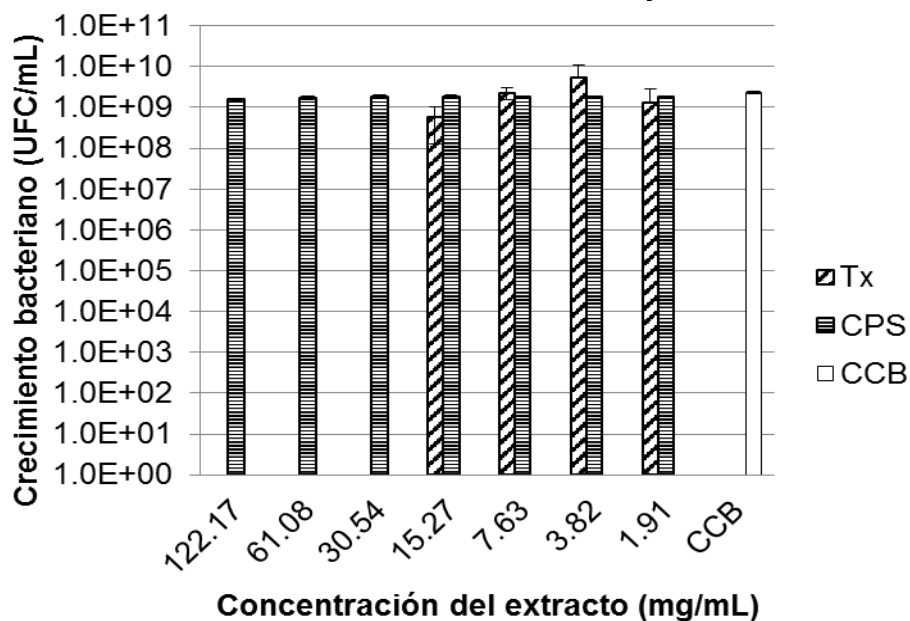


**Figura 91.** Cultivo de *Staphylococcus aureus* CPB-10 en medio Mueller Hinton a las 24 horas con diferentes dosis de extracto de *Lentinula boryana* en los solventes evaluados; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%.



En la figura 91 se observan las muestras tomadas de las microplacas a las 24 horas de incubación, y se incubaron las cajas por otras 24 horas, el muestreo se realizó posterior a la lectura de D.O. En el caso del extracto con agua se presentó el crecimiento de bacterias en un nivel de concentración mayor que lo que se detectó a través de la lectura de D.O. (D3 con 31.54 mg/mL); en los otros solventes se presentó el efecto bactericida con la misma concentración, y se mantuvo con el paso de los días.

### 8.5.8.2 Efecto de los extractos de micelio de *L. boryana* CP-519



**Figura 92.** Efecto del extracto de micelio de *Lentinula boryana* sobre *Staphylococcus aureus* CPB-10, en solvente hidroalcohólico al 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: control de crecimiento de la bacteria.



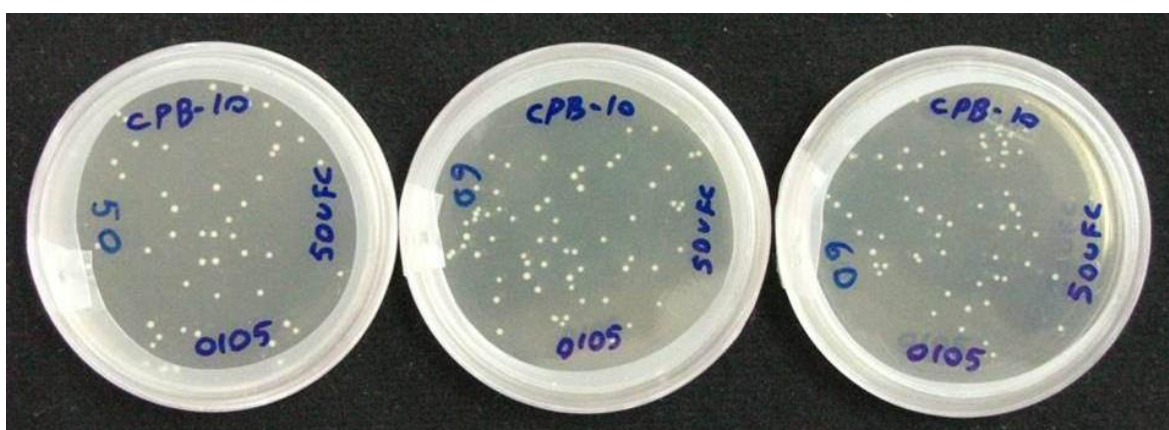
**Figura 93.** Cultivo de *Staphylococcus aureus* CPB-10 en medio Mueller Hinton a las 24 horas con diferentes dosis de extracto de micelio de *Lentinula boryana* en el solvente hidroalcohólico al 35%.



El extracto hidroalcohólico al 35% del micelio, tuvo un efecto inhibitorio y bactericida con una concentración de 30.54 y 122.17 mg/mL respectivamente, como se observa en las figuras 92 y 93.

#### 8.5.8.3 Efecto de los extractos de *L. edodes* CP-7

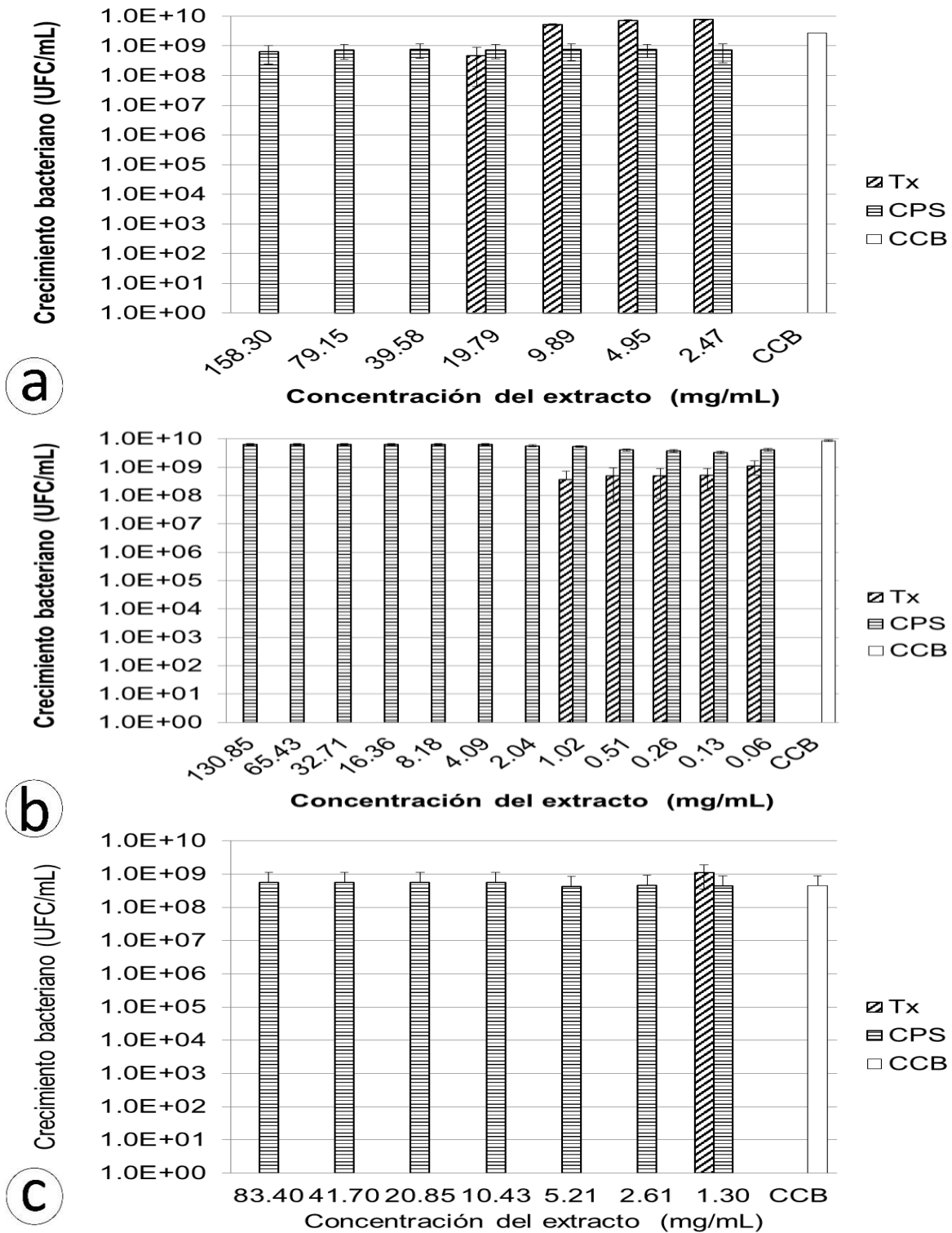
En la figura 94 se muestran las colonias de *Staphylococcus aureus* CPB-10 que crecieron de una alícuota para determinar la concentración de bacterias/mL en exposición en la evaluación del efecto bacteriostático y bactericida de los diferentes extractos de *L. edodes* en estudio. En este caso la concentración fue de  $1.21 \pm 0.1 \times 10^8$  bacterias/mL.



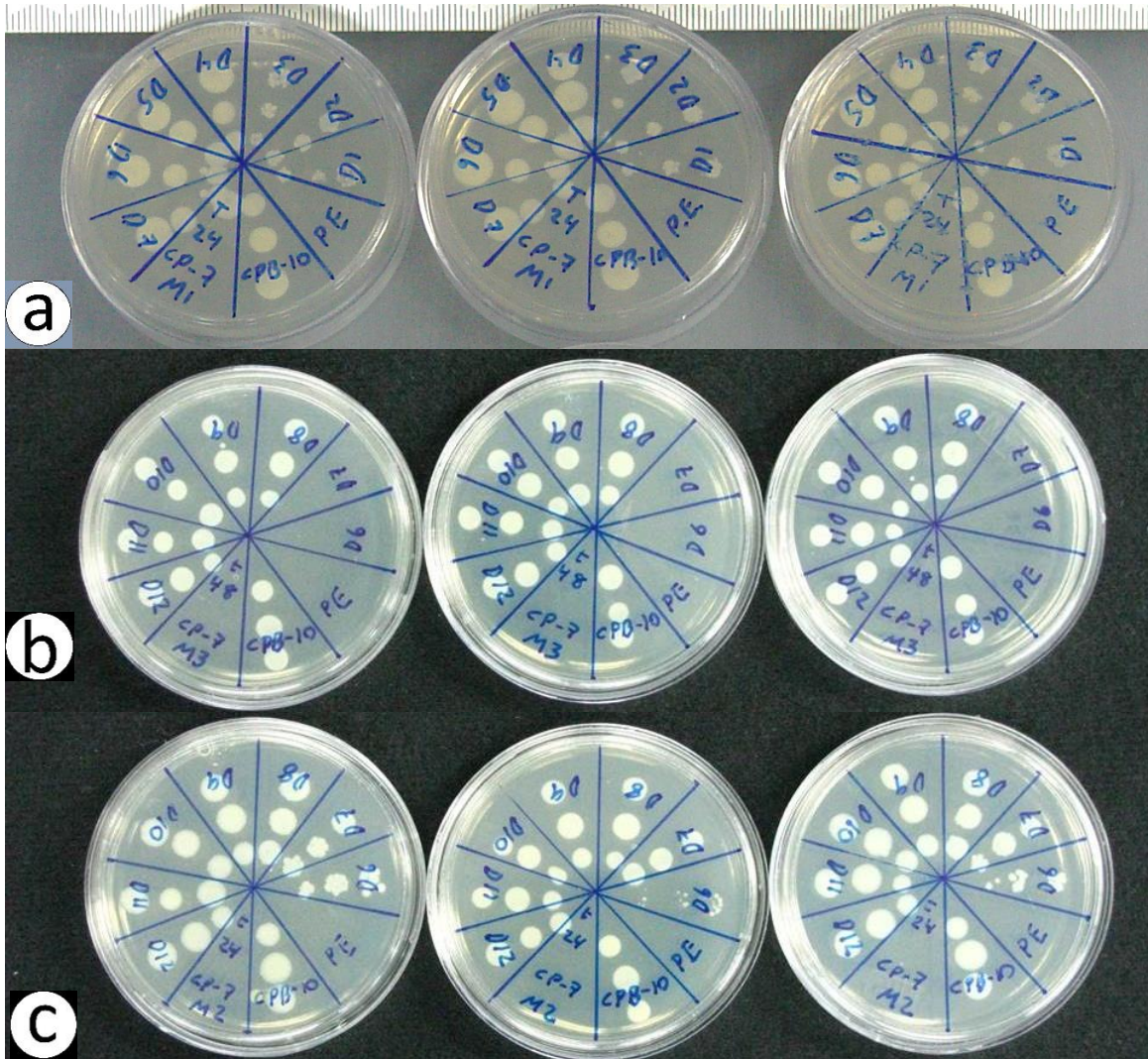
**Figura 94.** Cultivo de *Staphylococcus aureus* CPB-10 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas.

El efecto del extracto de *L. edodes* sobre la bacteria *Staphylococcus aureus* CPB-10 a concentración constante de  $1.21 \pm 0.1 \times 10^8$  bacterias/mL, se observa por medio de la lectura de la D.O. de cada muestra y se presenta en la figura 94; este diseño experimental nos permitió determinar el efecto de crecimiento o inhibición de la bacteria y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), de la cual se encuentra un resumen en el Cuadro 29.

En la figura 95 se observa el efecto del extracto de *Lentinula edodes* sobre *Staphylococcus aureus* CPB-10 en una concentración de  $1.13 \pm 0.1 \times 10^4$  bacterias por pozo: en 91a, se observa que cuando se extrae con agua, existe un efecto inhibitorio a las 24 horas en D3 con una dosis de 39.58 mg/mL; en 91c, extracto hidroalcohólico al 35%, tuvo un efecto bactericida en la dilución D6 con dosis de 2.61 mg/mL a las 24 h; en 91b, el extracto con hidroalcohólico al 20% se observa el efecto inhibitorio en la dilución D7 con dosis de 2.04 mg/mL a las 24 horas.



**Figura 95.** Efecto inhibitorio del extracto de *Lentinula edodes* sobre *Staphylococcus aureus* CPB-10, a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.

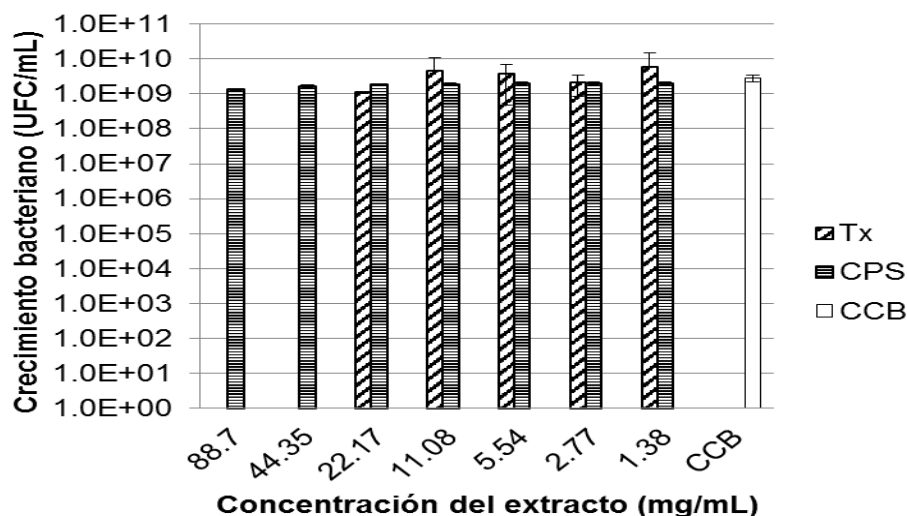


**Figura 96.** Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de *Staphylococcus aureus* CPB-10 con las diferentes dosis de extracto de *Lentinula edodes*; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%.

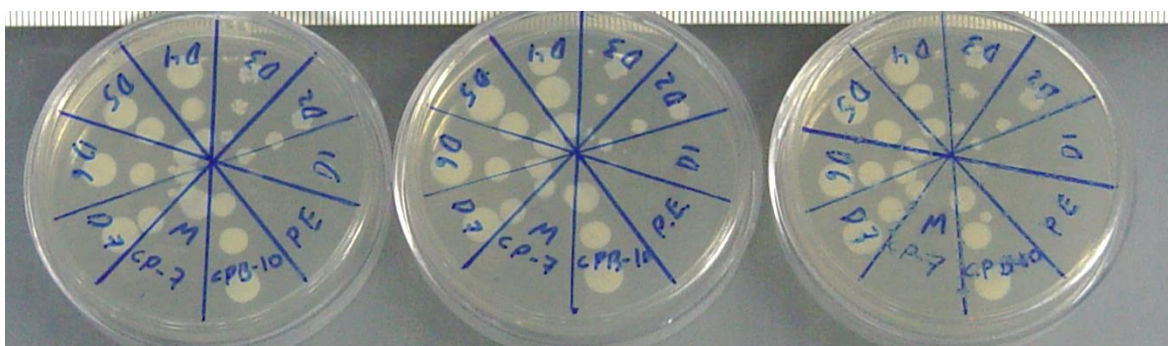
En la figura 96 se observan las muestras tomadas de la microplaca a las 24 horas de incubación, y se incubaron las cajas por otras 24 horas, el muestreo se realizó posterior a la lectura de D.O. Se observó que en la caja de Petri para el extracto en agua hubo crecimiento desde la primera dilución por lo que no se pudo determinar la CMB. En el caso del extracto hidroalcohólico (tequila) tuvo la CMB en D5 con dosis de 5.21 mg/mL.; el efecto inhibitorio en las concentraciones más altas, se mantuvo con el paso de los días. La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *Staphylococcus aureus* CPB-10 se presenta en el Cuadro 29.



### 8.5.8.4 Efecto de los extractos de micelio de *L. edodes* CP-7



**Figura 97.** Efecto del extracto del micelio de *Lentinula edodes* sobre *Staphylococcus aureus* CPB-10, en solvente hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.



**Figura 98.** Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de *Staphylococcus aureus* CPB-10 con las diferentes dosis de extracto del micelio de *Lentinula edodes* en solvente hidroalcohólico 35%.

**Cuadro 29.** Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *Staphylococcus aureus* CPB-10.

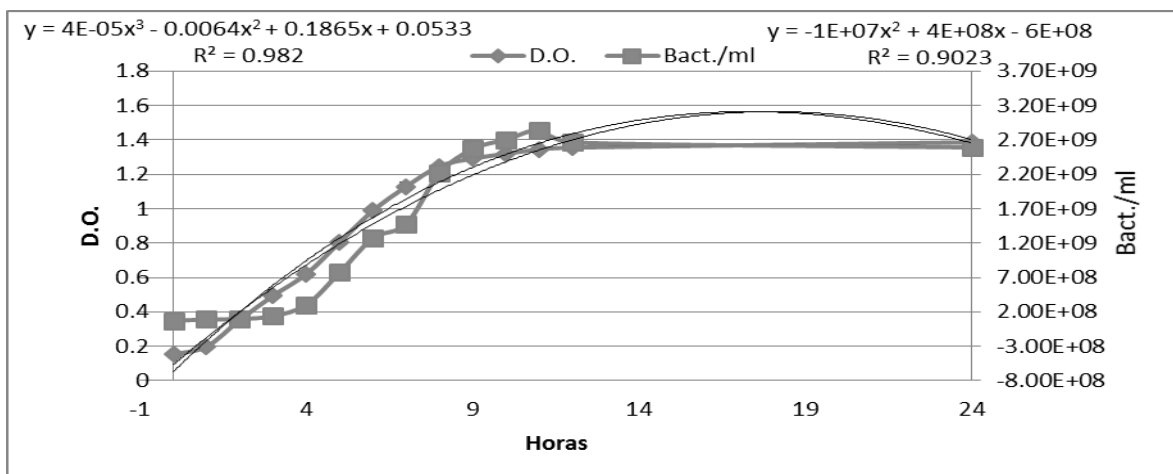
Cepa	H	Agua			Extracto hidroalcohólico 35%			Extracto hidroalcohólico 20%		
		Dilución	Extracto (µl)	Conc (mg)	Dilución	Extracto (µl)	Conc. (mg)	Dilución	Extracto (µl)	Conc. (mg)
CP-519	24	D4	6.25	15.77	D6	1.56	2.77	D5	3.13	8.65
CP-7	24	D3	12.5	39.58	D6	1.56	2.61	D7	0.78	2.04

H: Horas de incubación. Conc.: Concentración.

### 8.5.9 Bioensayo con la cepa CPB-11 de *Listeria monocytogenes*

En la figura 99 se observa la curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes* CPB-11, determinada por densidad óptica (D.O.) y las unidades formadoras de colonias (UFC) por

conteo en el microscopio. La ecuación de tercer orden de la esquina superior izquierda corresponde a la ecuación determinada por la D.O. y la ecuación del lado derecho corresponde al conteo de las bacterias por microscopio en la cámara de Neubauer. La relación entre las dos curvas tiene una  $R^2$  final de 0.886 al utilizar una ecuación como dependiente de la otra.

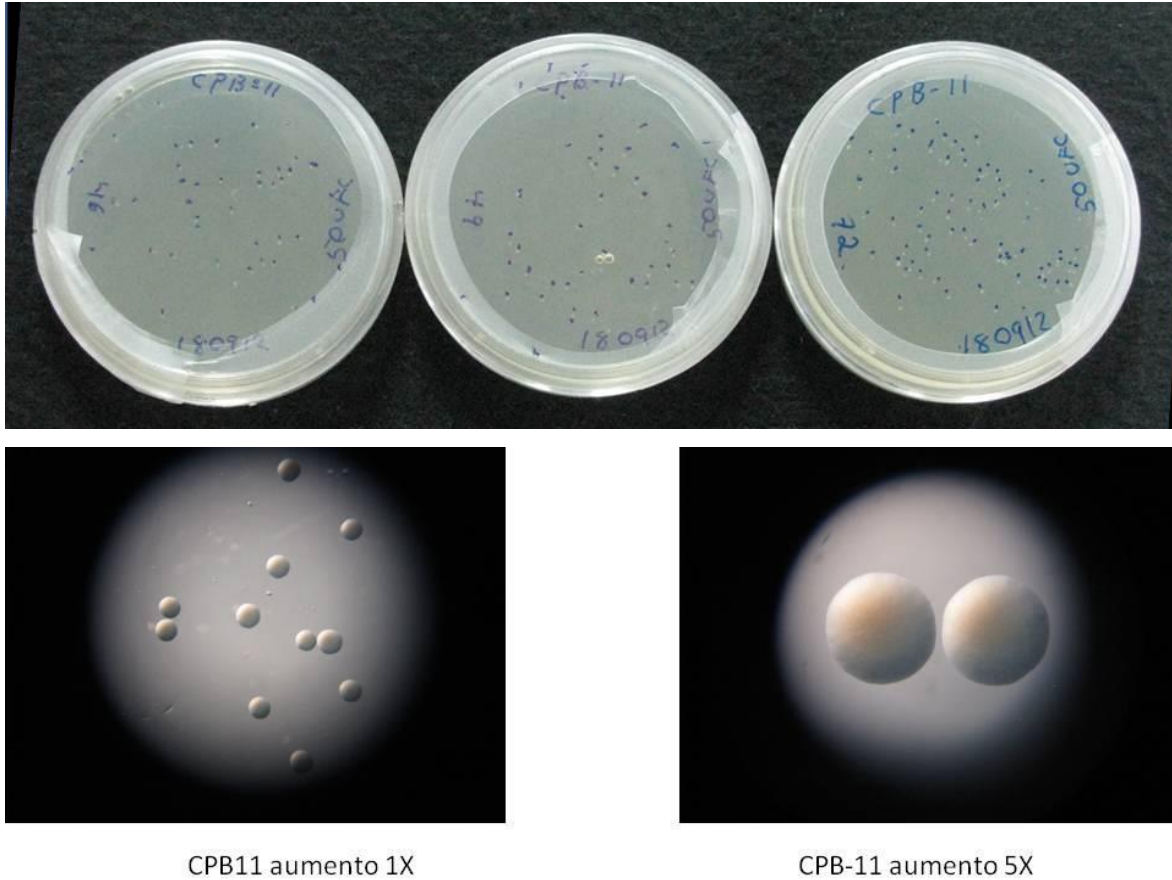


**Figura 99.** Cinética de *Listeria monocytogenes* CPB-11, determinada por lectura de D.O. y UFC por conteo en el microscopio óptico a 40X (n=6).

En la figura 100 se muestra un ejemplo del crecimiento de colonias de *Listeria monocytogenes* CPB-11, después de diluir  $2 \times 10^6$  veces el número de bacterias. Esta prueba verificó el número de bacterias inoculadas en cada pozo del experimento, correspondiente a multiplicar el número de UFC de la caja de Petri por 200, en esta prueba fueron  $1.54 \pm 0.13 \times 10^4$  bacterias por pozo, correspondiente a  $1.54 \pm 0.13 \times 10^8$  bacterias/mL, lo cual se encuentra dentro del rango establecido en la metodología. A su vez, este procedimiento permite validar la muestra bacteriana al identificarse un solo tipo de colonia en el medio de cultivo.

Caracterización de *Listeria monocytogenes*.

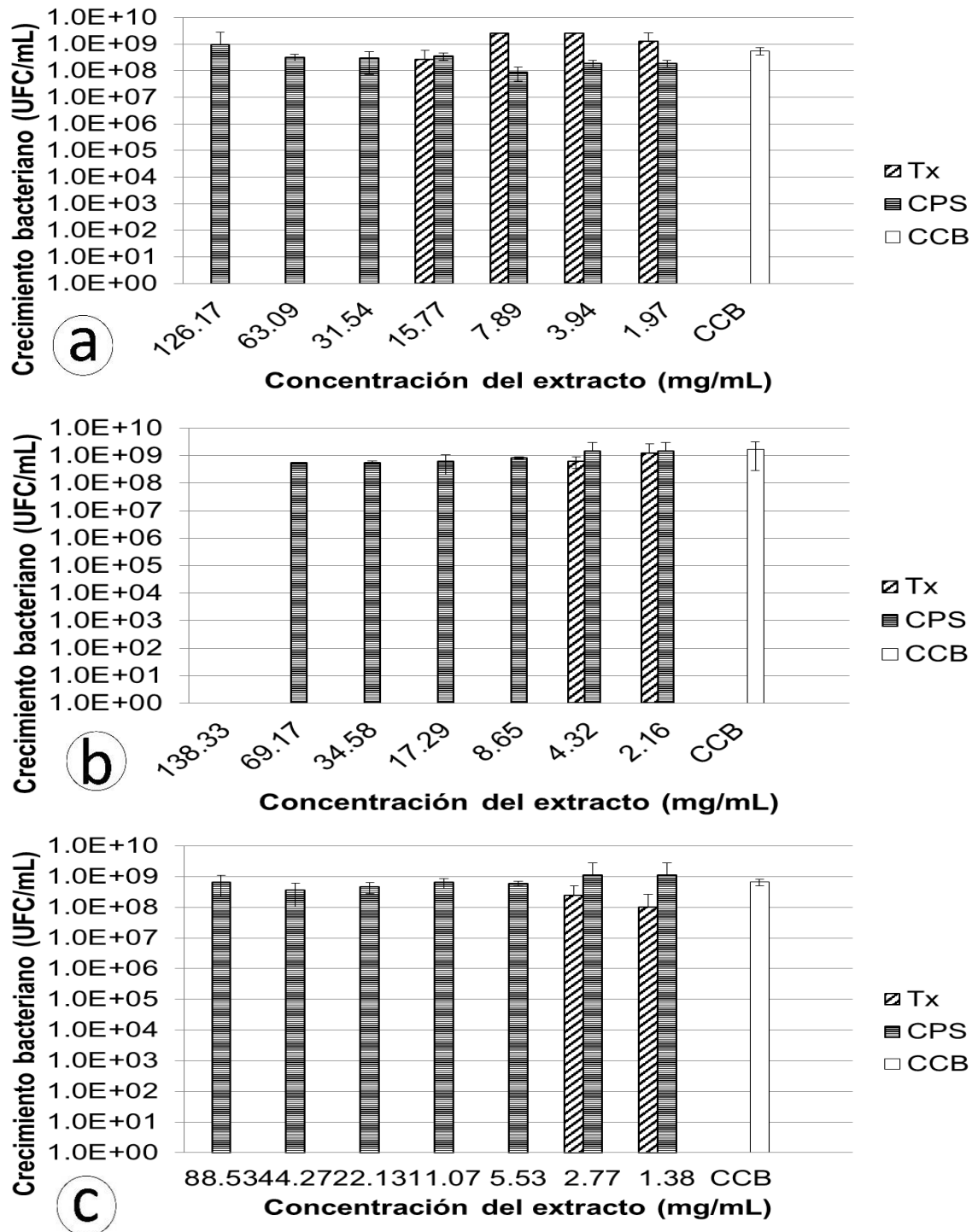
Clave	Cepa	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color
CPB-11	<i>Listeria monocytogenes</i>	Puntiforme	Entero	Convexa	Viscosa	Blanco opaco



**Figura 100.** Cultivo de *Listeria monocytogenes* CPB-11 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas.

#### 8.5.9.1 Efecto de los extractos de basidiocarpo de *L. boryana* CP-519

El efecto del extracto de *L. boryana* en el rango de concentraciones del Cuadro 30 sobre la bacteria *Listeria monocytogenes* CPB-11 a concentración constante de  $1.54 \pm 0.13 \times 10^4$ , se observa por medio de la lectura de la D.O. de cada muestra y se presenta en la figura 101; este diseño experimental nos permitió determinar el efecto de crecimiento o inhibición de la bacteria y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), de la cual se encuentra un resumen en el Cuadro 30.

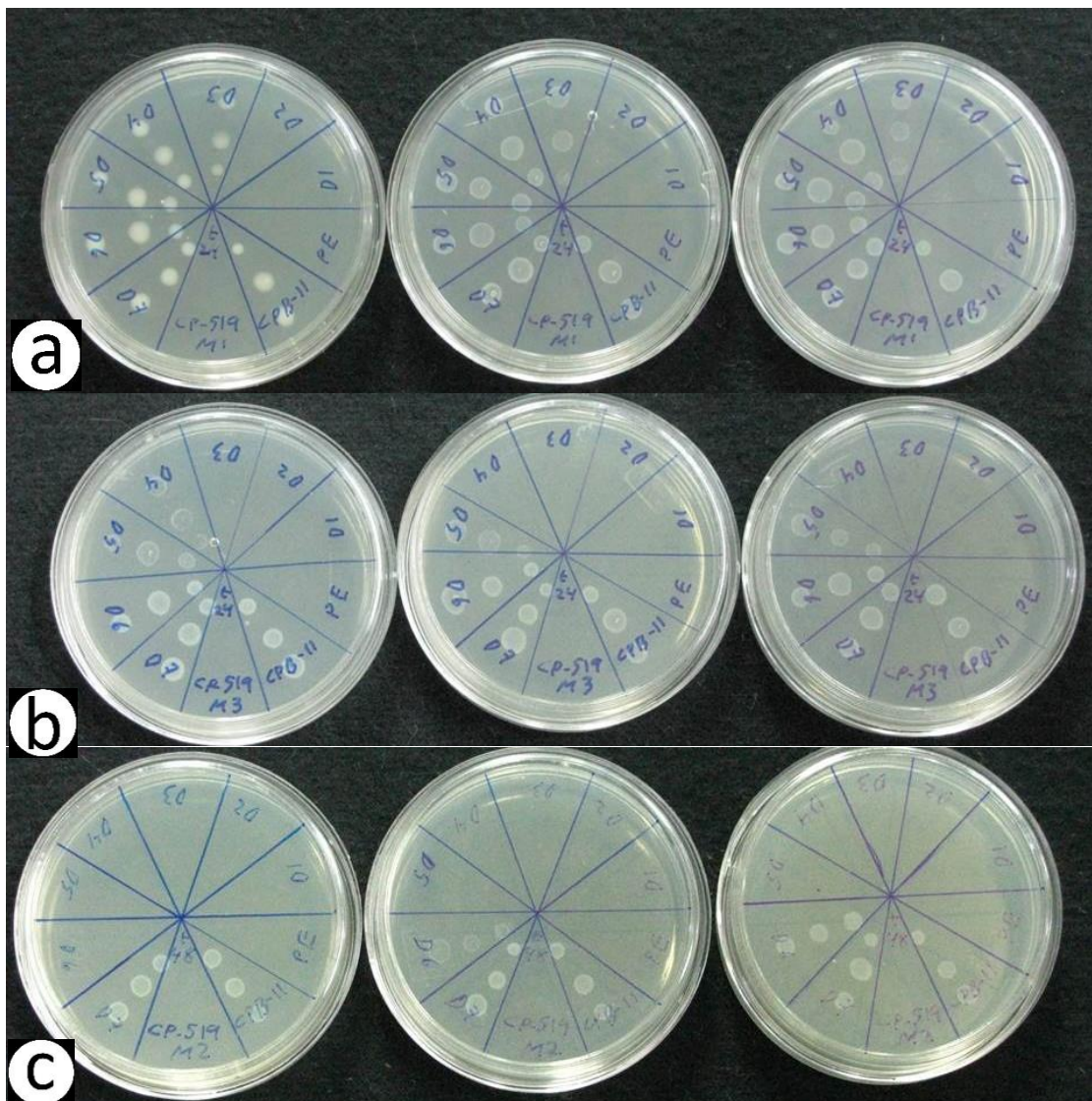


**Figura 101.** Efecto del extracto de *Lentinula boryana* sobre *Listeria monocytogenes* CPB-11, a: acuoso (M1), b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: control de crecimiento de la bacteria.

En la figura 101a: se observa que cuando se extrae con agua, existe un efecto inhibitorio a las 24 y 48 horas en D3 con dosis de 31.54 mg/mL; en 97b: extracto hidroalcohólico al 35%,



se observa que tiene un efecto bactericida en la dilución D5 con dosis de 5.53 mg/mL, este solvente es el que presentó el principal efecto contra esta bacteria; en 97c: el extracto hidroalcohólico al 20% tiene un efecto bacteriostático en D4 con dosis de 17.29 mg/mL a las 24 horas.

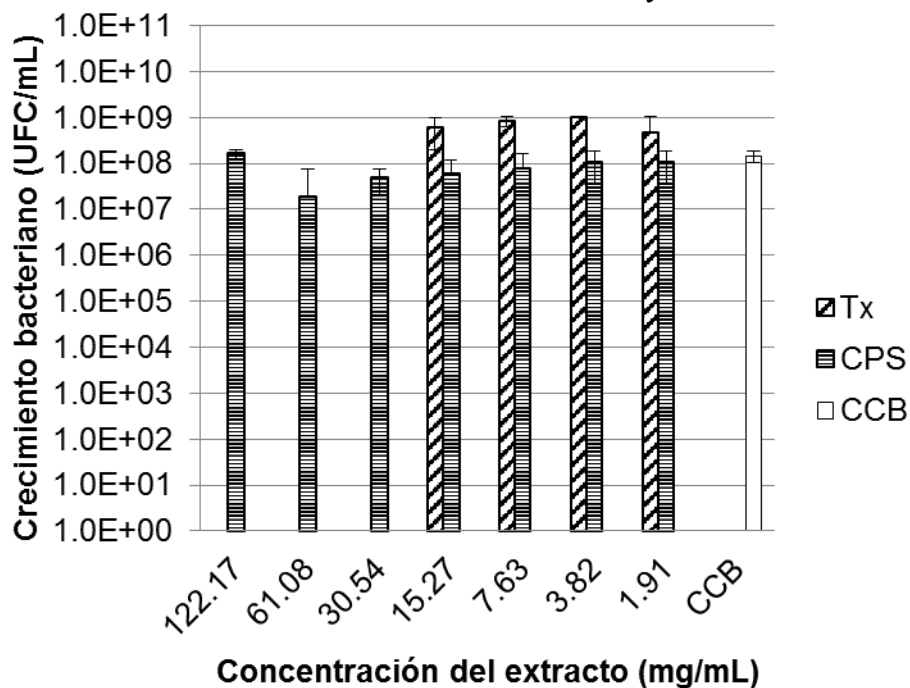


**Figura 102.** Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de *Listeria monocytogenes* CPB-11 con las diferentes dosis de extracto de *Lentinula boryana* en los solventes evaluados; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%.

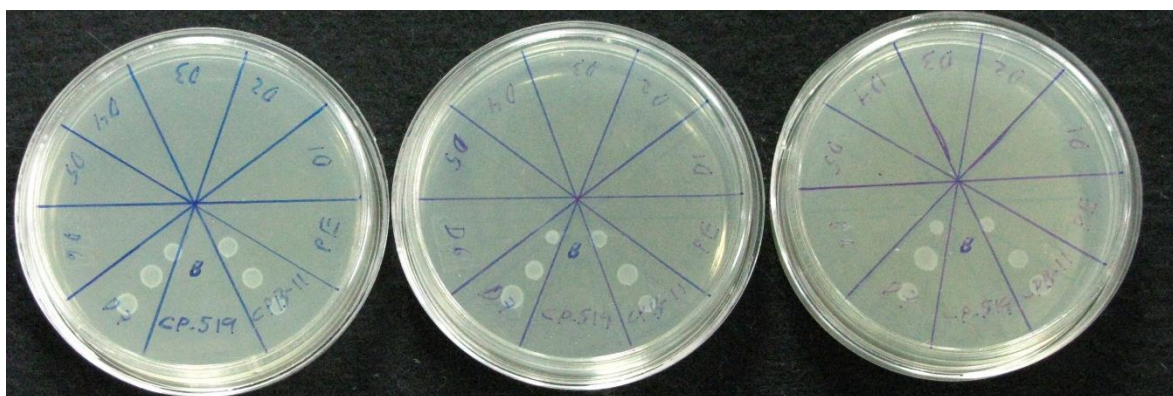
En la figura 102 se observan las muestras tomadas de las microplacas a las 24 horas de incubación, y se incubaron las cajas por otras 24 horas, el muestreo se realizó posterior a la lectura de D.O. La CMB es aquella en la que no se observa crecimiento de las bacterias en ninguna de las réplicas; en el caso del extracto acuoso, se presentó la CMB con 63.08 mg/ml

de extracto; en el extracto hidroalcohólico al 35% se presentó la inhibición de la bacteria en la misma concentración 5.53 mg/mL y en el caso del hidroalcohólico al 20%, se presentó la CMB en la concentración de 34.58 mg/mL.

### 8.5.9.2 Efecto de los extractos de micelio de *L. boryana* CP-519



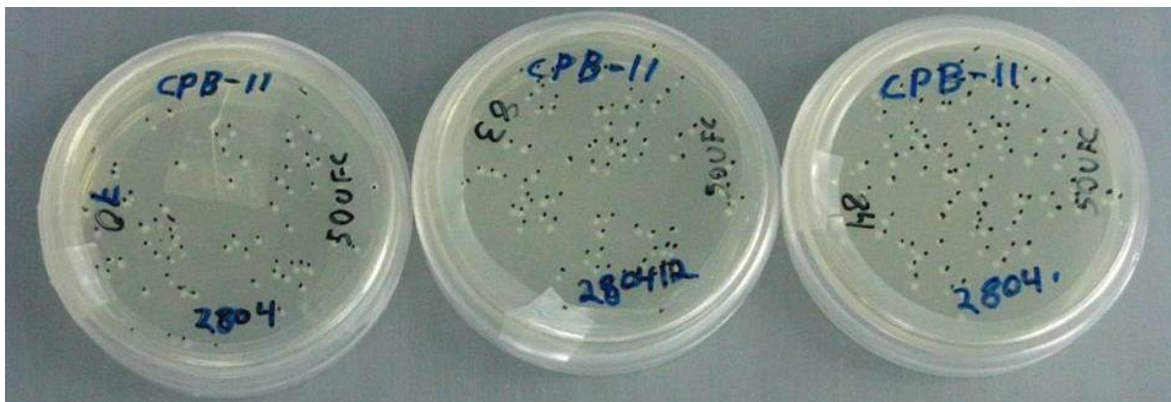
**Figura 103.** Efecto del extracto del micelio de *Lentinula boryana* sobre *Listeria monocytogenes* CPB-11, en solvente hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: control de crecimiento de la bacteria.



**Figura 104.** Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de *Listeria monocytogenes* CPB-11 con las diferentes dosis de extracto del micelio de *Lentinula boryana* en el solvente hidroalcohólico 35%.

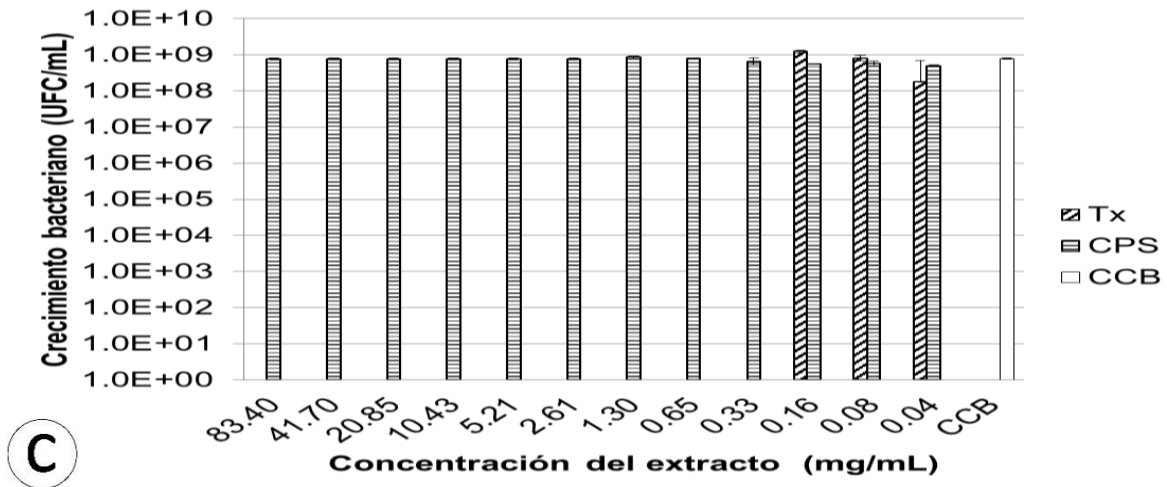
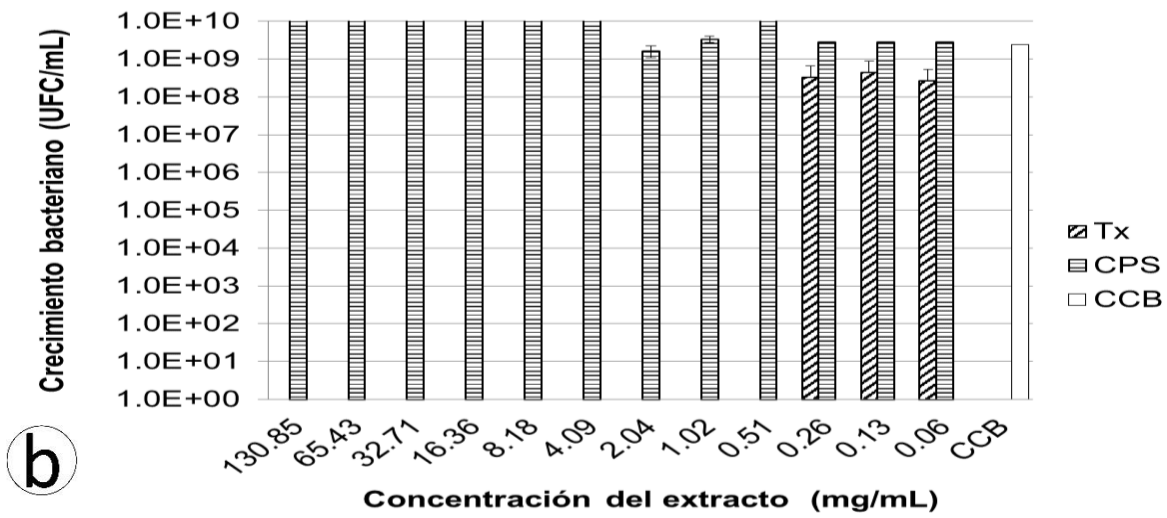
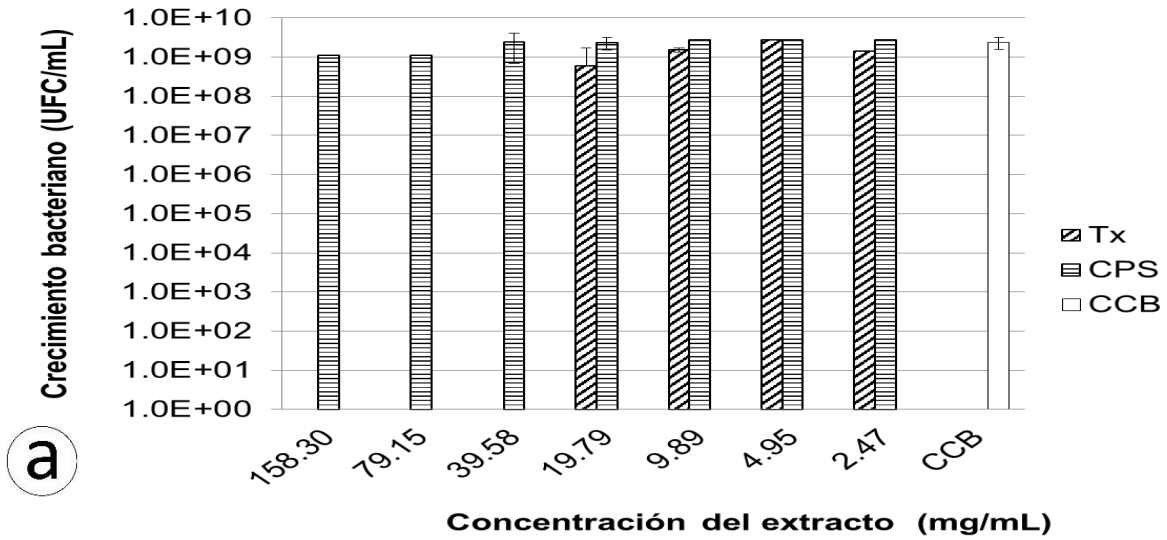
### 8.5.9.3 Efecto de los extractos de *L. edodes* CP-7

En la figura 105 se muestran las microplacas que se cultivaron después de tomar la muestra de cada micropozo en el experimento de *L. edodes* sobre *Listeria monocytogenes* CPB-11.



**Figura 105.** Cultivo de *Listeria monocytogenes* CPB-11 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas.

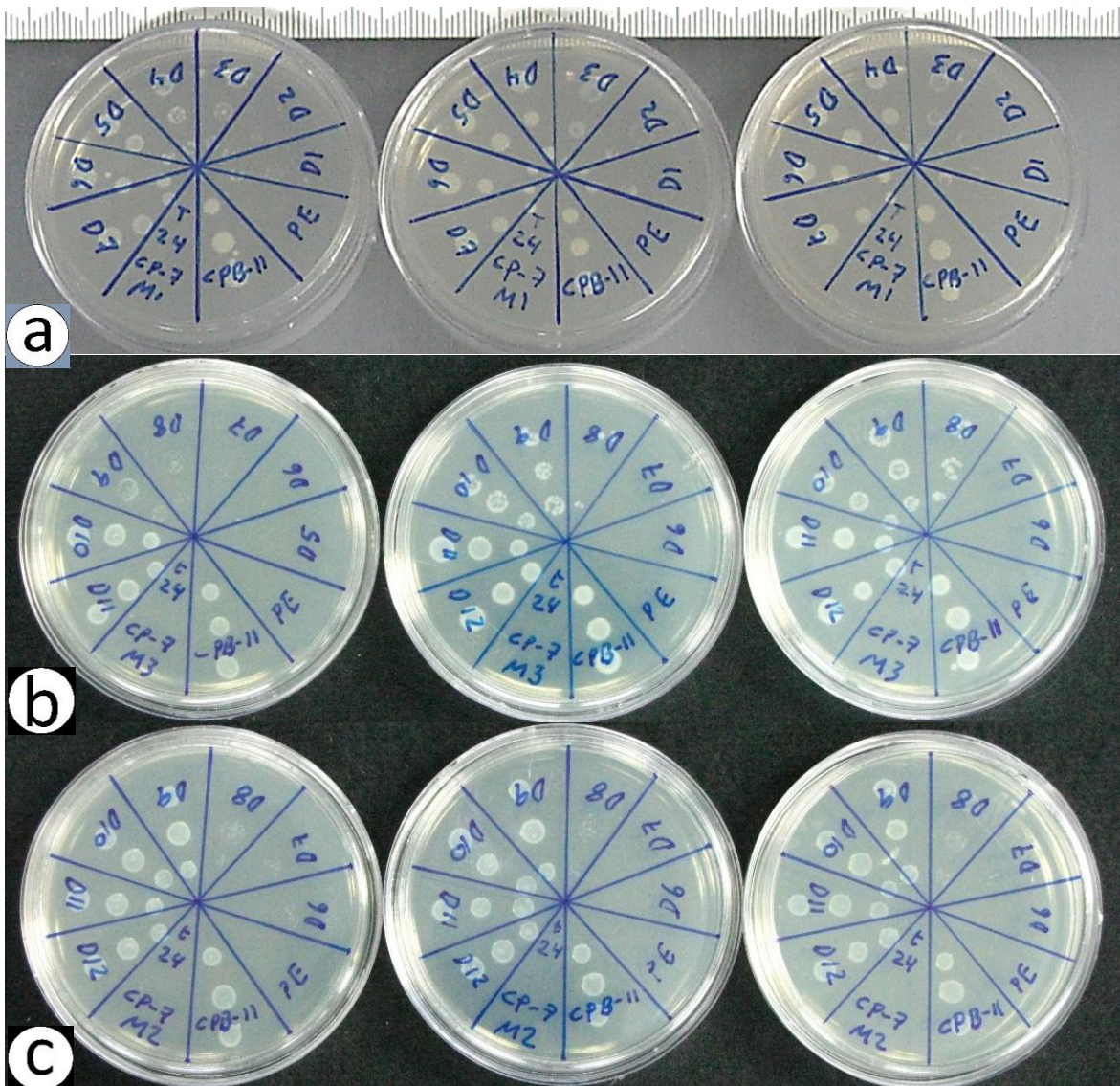
El efecto del extracto de *L. edodes* en el rango de concentraciones del Cuadro 30 sobre la bacteria *Listeria monocytogenes* CPB-11 a concentración constante de  $1.54 \pm 0.1.3 \times 10^4$  bacterias, se observa por medio de la lectura de la D.O. de cada muestra y se presenta en la figura 105; este diseño experimental nos permitió determinar el efecto de crecimiento o inhibición de la bacteria y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), de la cual se encuentra un resumen en el Cuadro 30.



**Figura 106.** Efecto del extracto de *Lentinula edodes* sobre *Listeria monocytogenes* CPB-11, a: acuoso (M1), b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.



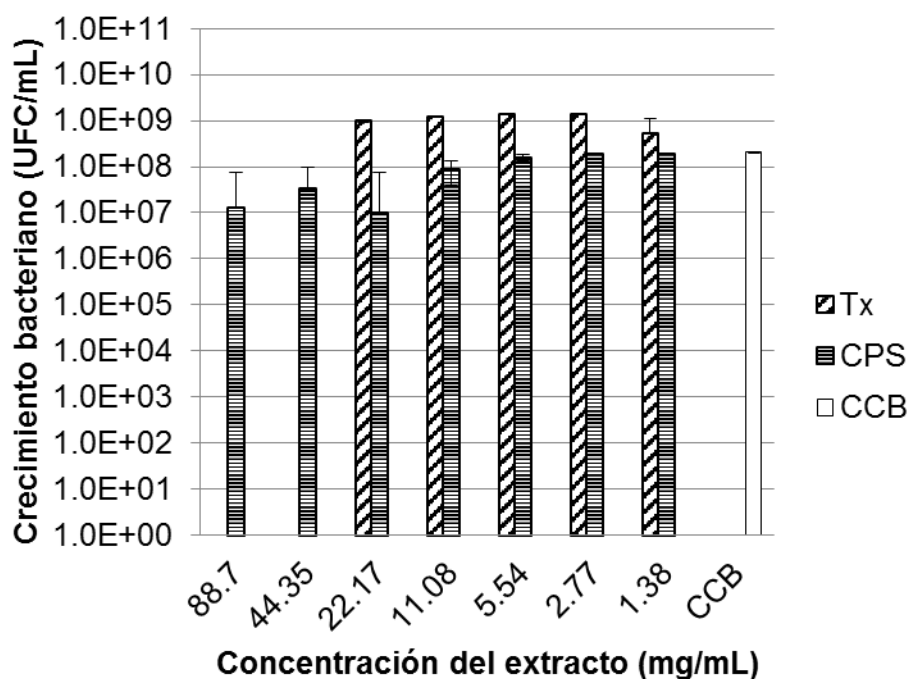
En la figura 106 se observa el efecto del extracto de *Lentinula edodes* sobre *Listeria monocytogenes* CPB-11 en una concentración de  $1.54 \pm 0.13 \times 10^8$  bacterias/mL: en 102a, se observa que cuando se extrae con agua, existe un efecto inhibitorio a las 24 y 48 horas en D3 con una dosis de 39.58 mg/mL; en 102b, extracto hidroalcohólico al 35%, tuvo un efecto bacteriostático en la dilución D9 con dosis de 0.33 mg/mL a las 24 horas; en 102c, el extracto hidroalcohólico al 20% tuvo efecto bacteriostático en la dilución D9 con dosis de 0.51 mg/mL a las 24 y 48 horas.



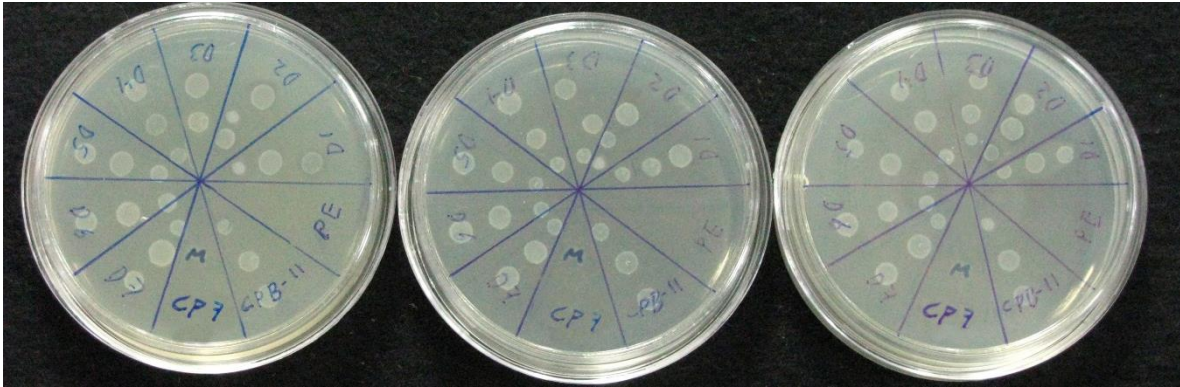
**Figura 107.** Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de *Listeria monocytogenes* CPB-11 con las diferentes dosis de extracto de *Lentinula edodes*; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%.

En la figura 107 se observan las muestras tomadas de las microplacas a las 24 horas de incubación, y se incubaron las cajas por otras 24 horas, el muestreo se realizó posterior a la lectura de D.O. La CMB es aquella en la que no se observa crecimiento de las bacterias en ninguna de las réplicas; en el caso del extracto acuoso, se presentó la CMB con 79.15 mg/mL de extracto; en el extracto hidroalcohólico al 35% se presentó la inhibición de la bacteria dos niveles de concentración más alto 1.30 mg/mL y en el caso del hidroalcohólico al 20%, se presentó la CMB en la concentración de 2.04 mg/mL. La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *Listeria monocytogenes* CPB-11 se presenta en el Cuadro 30.

#### 8.5.9.4 Efecto de los extractos de micelio de *L. edodes* CP-7



**Figura 108.** Efecto del extracto del micelio de *Lentinula edodes* sobre *Listeria monocytogenes* CPB-11, en solvente hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.



**Figura 109.** Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de *Listeria monocytogenes* CPB-11 con las diferentes dosis de extracto del micelio de *Lentinula edodes*; en solvente hidroalcohólico 35%.

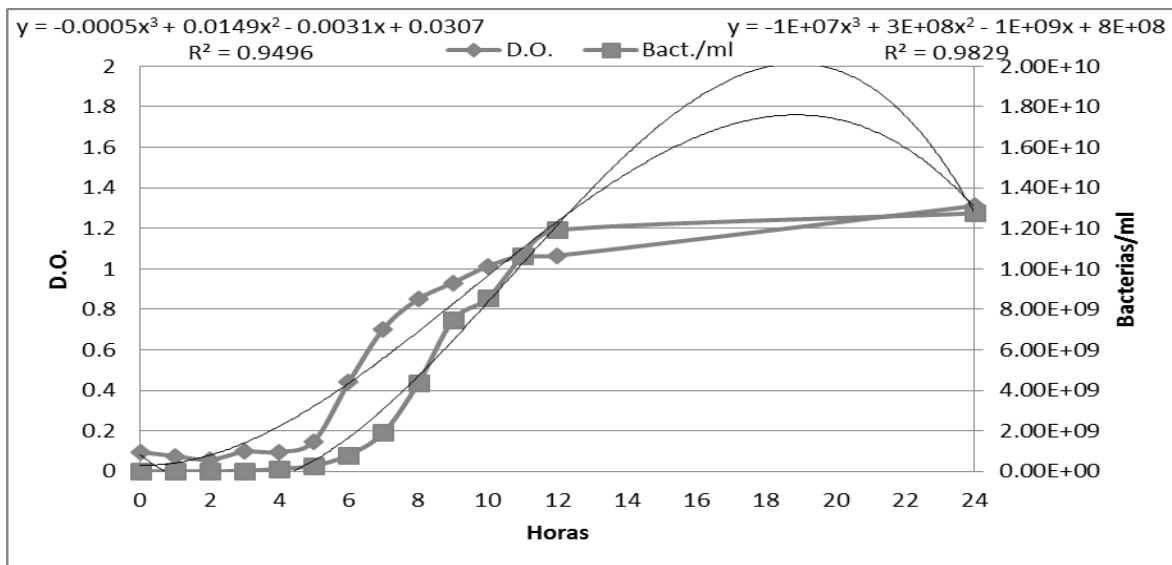
**Cuadro 30.** Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *Listeria monocytogenes* CPB-11 a las 24 hrs de incubación.

Registro	Agua			Extracto hidroalcohólico 35%			Extracto hidroalcohólico 20%		
	Dilución	Extracto (μL)	Conc. (mg)	Dilución	Extracto (μL)	Conc. (mg)	Dilución	Extracto (μL)	Conc. (mg)
CP-519	D3	12.5	31.54	D5	3.125	5.53	D4	6.25	17.29
CP-7	D3	12.5	39.58	D9	0.20	0.33	D9	0.195	0.51

#### 8.5.10 Bioensayo con la cepa CPB-13 de *Pseudomonas aeruginosa*

En la figura 110 se observa la curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13, determinada por densidad óptica (D.O.) y las unidades formadoras de colonias (UFC) por conteo en el microscopio. La ecuación de tercer orden de la esquina superior izquierda corresponde a la ecuación determinada por la D.O. y la ecuación del lado derecho corresponde al conteo de las bacterias por microscopio en la cámara de Neubauer. La relación entre las dos curvas tiene una  $R^2$  final de 0.933 al utilizar una ecuación como dependiente de la otra.





**Figura 110.** Cinética de *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13, determinada por lectura de D.O. y UFC por conteo en el microscopio óptico a 40X (n=6).

En la figura 111 se muestra un ejemplo del crecimiento de colonias de *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13, después de diluir  $2 \times 10^6$  veces el número de bacterias. Esta prueba verificó el número de bacterias inoculadas en cada pozo del experimento, correspondiente a multiplicar el número de UFC de la caja de Petri por 200, en esta prueba fueron  $1.15 \pm 0.15 \times 10^4$  bacterias por pozo, correspondiendo a  $1.15 \pm 0.15 \times 10^8$  bacterias/mL, lo cual se encuentra dentro del rango establecido en la metodología establecida por CLSI, 2012. A su vez, este procedimiento permite validar la muestra bacteriana al identificarse un solo tipo de colonia en el medio de cultivo.

Caracterización morfológica de la bacteria *Pseudomonass aeruginosa*.

Clave	Cepa	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color
CPB-13	<i>Pseudomonass aeruginosa</i>	Circular	Entero	Convexa	Muy Viscosa	Verde

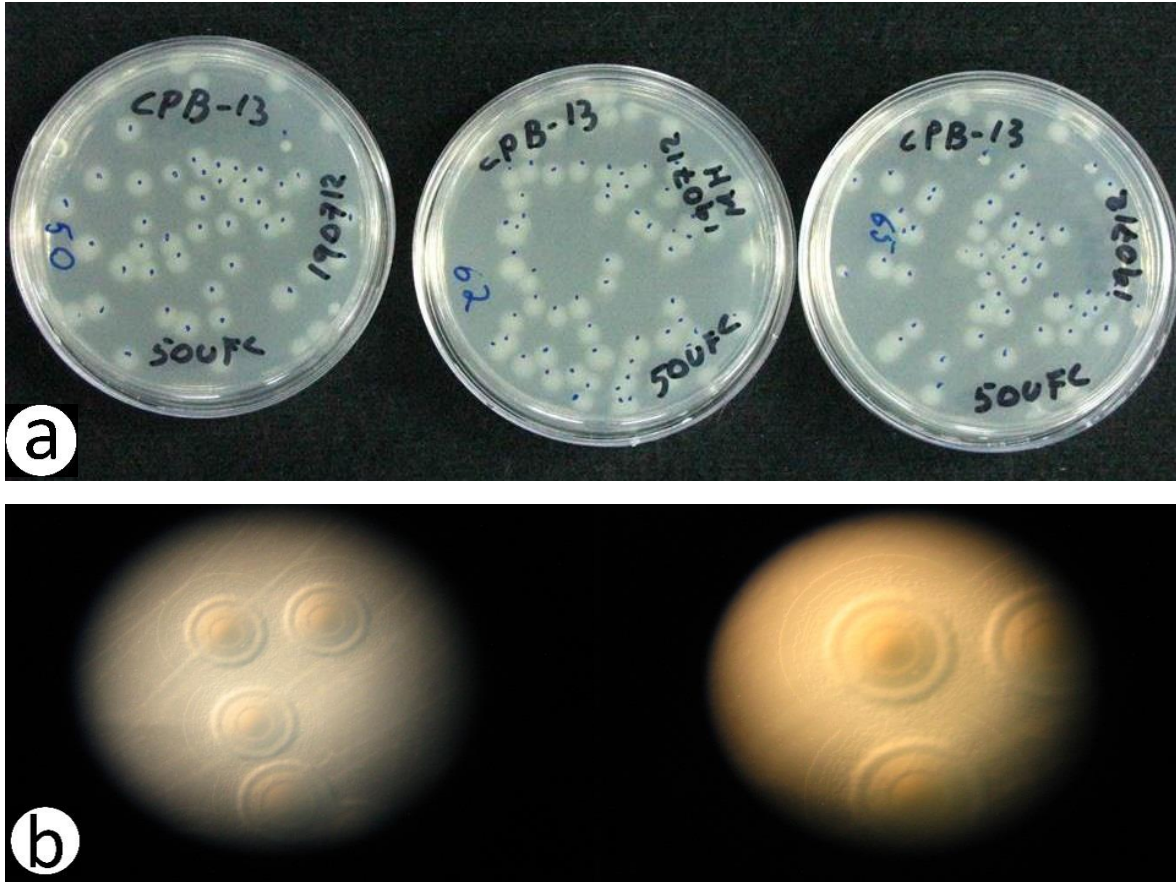
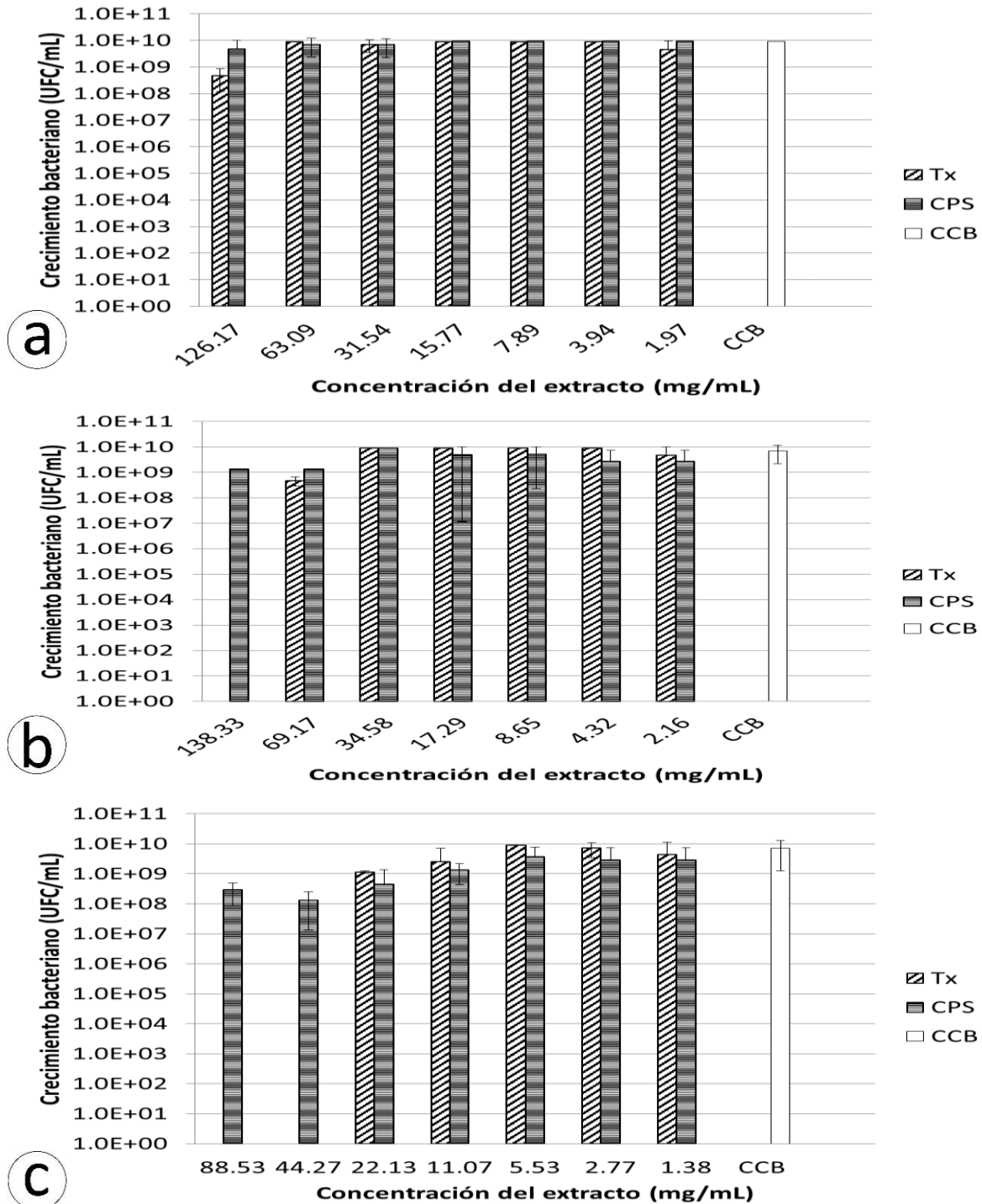


Figura 111. *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13 al microscopio a las 24 horas de incubación.

#### 8.5.10.1 Efecto de los extractos de basidiocarpo de *L. boryana* CP-519

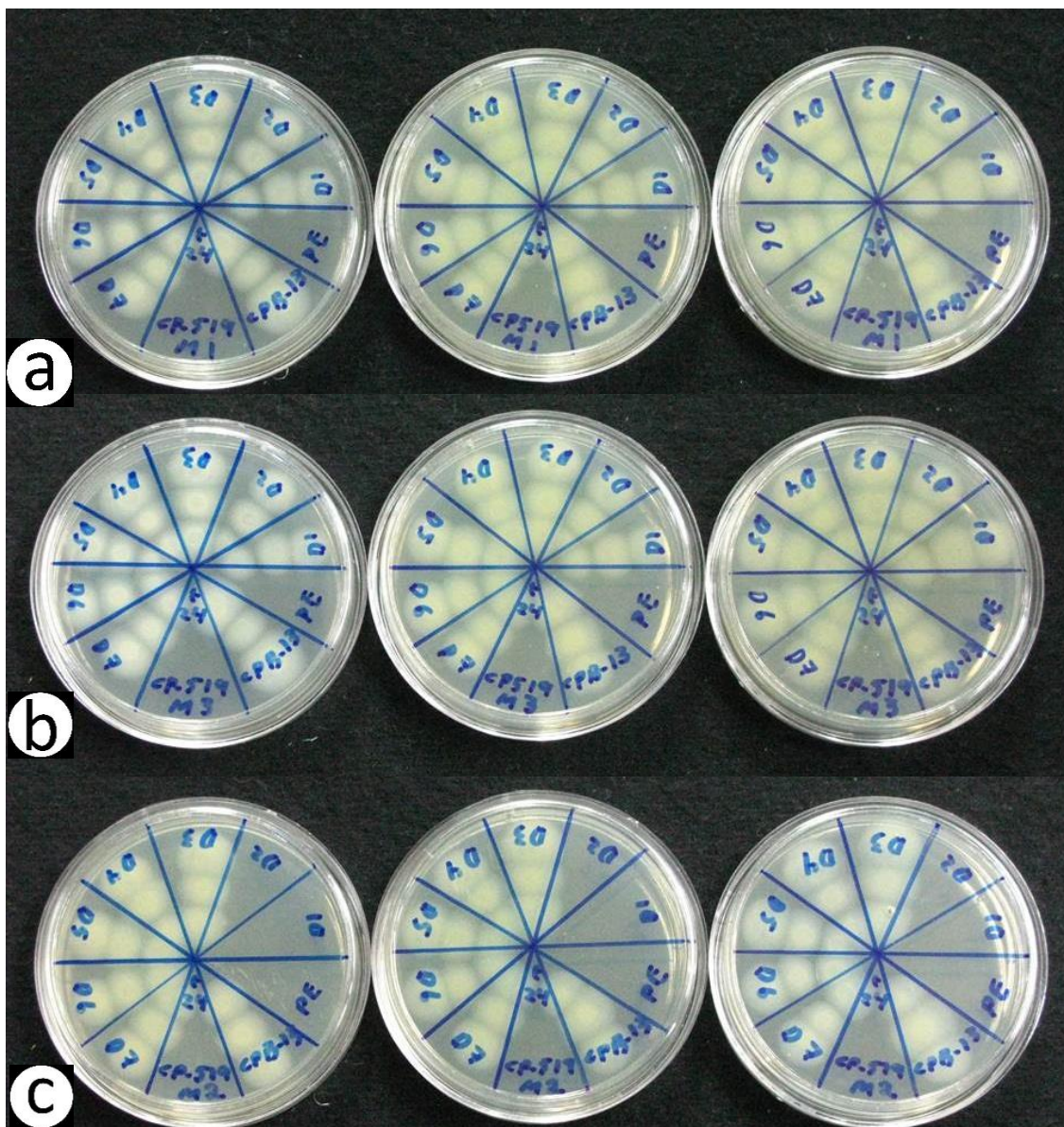
El efecto del extracto de *L. boryana* en el rango de concentraciones del Cuadro 31 sobre la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13 a concentración constante de  $1.15 \pm 0.15 \times 10^4$  bacterias por pozo, se observa por medio de la lectura de la D.O. de cada muestra y se presenta en la figura 112; este diseño experimental nos permitió determinar el efecto de crecimiento o inhibición de la bacteria y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), de la cual se encuentra un resumen en el Cuadro 31.



**Figura 112.** Efecto del extracto de *L. boryana* sobre *Pseudomonas aeruginosa* CPB13 a: acuoso (M1), b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.

En la figura 112a, se observó que el extracto con agua de 126.17 mg/mL no se presentó un efecto inhibitorio. En la figura 112b, con el extracto hidroalcohólico al 35%, se observó que

tuvo un efecto bactericida en la dilución D2 con dosis de 44.27 mg/mL, este solvente es el que presentó el principal efecto contra esta bacteria; en 108c, el solvente hidroalcohólico al 20% tiene efecto bacteriostático en D1 con dosis de 138.38 mg/mL a las 24 horas.



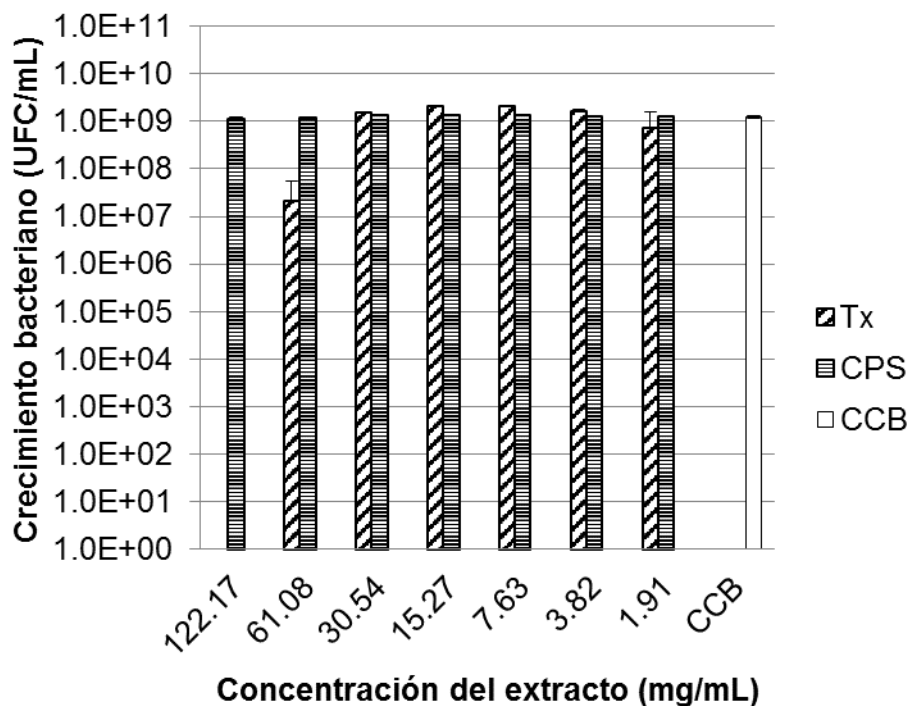
**Figura 113.** Cultivo en medio Mueller Hinton de *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13 con las diferentes dosis de extracto de *Lentinula boryana*; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%.

En la figura 113 se observan las muestras tomadas de las microplacas a las 24 horas de incubación, y se incubaron las cajas por otras 24 horas, el muestreo se realizó posterior a la lectura de D.O. Esta prueba determina un efecto bactericida en las diluciones en que no creció la bacteria. En el caso del extracto acuoso e hidroalcohólico al 20% no se determinó la CMB,



en el caso del extracto hidroalcohólico al 35% se presentó un efecto bactericida en D2 con la CMB de 44.27 mg/mL.

### 8.5.10.2 Efecto de los extractos de micelio de *L. boryana* CP-519



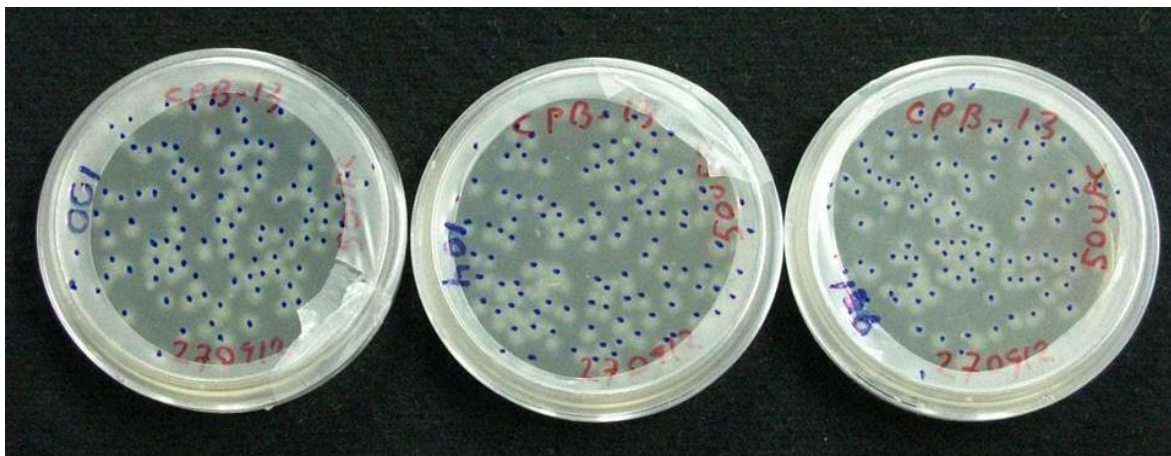
**Figura 114.** Efecto del extracto del micelio de *L. boryana* sobre *Pseudomonas aeruginosa* CPB13 en solvente hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: control de crecimiento de la bacteria.



**Figura 115.** Cultivo en medio Mueller Hinton de *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13 con las diferentes dosis de extracto del micelio de *Lentinula boryana*, en solvente hidroalcohólico 35%.

### 8.5.10.3 Efecto de los extractos de *L. edodes* CP-7

En la figura 116 se muestran las microplacas que se cultivaron después de tomar la muestra de cada micropozo en el experimento de *L. edodes* sobre *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13.

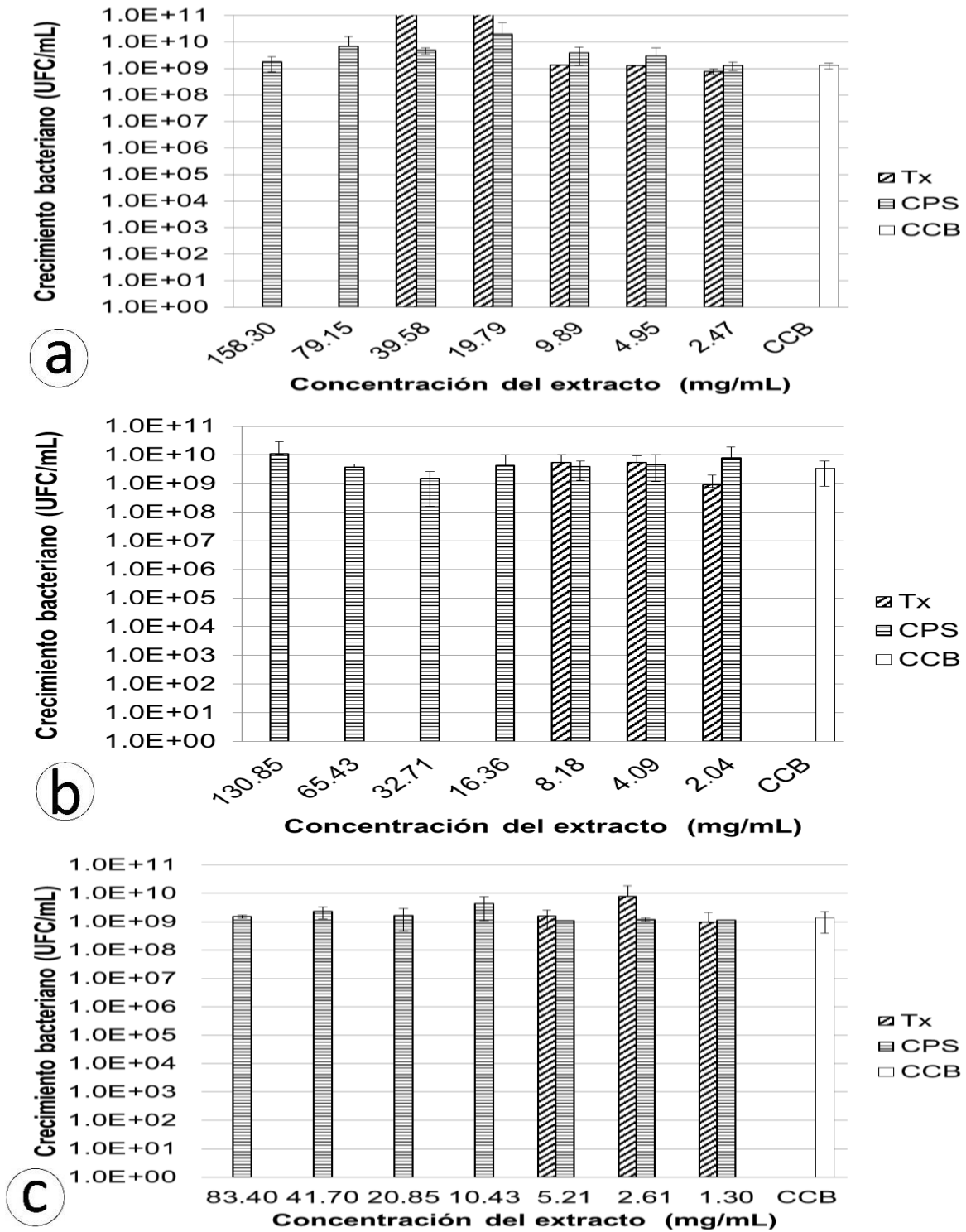


**Figura 116.** Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13 por microdilución en medio Mueller Hinton a las 24 horas de incubación.

El efecto del extracto de *L. edodes* en el rango de concentraciones del Cuadro 31 sobre la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13 a concentración constante de  $2.56 \pm 0.56 \times 10^4$  bacterias por pozo o una concentración de  $2.56 \pm 0.56 \times 10^8$  bacterias/mL, se observa por medio de la lectura de la D.O. de cada muestra y se presenta en la figura 117. Este diseño experimental permitió determinar el efecto de crecimiento o inhibición de la bacteria y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), de la cual se encuentra un resumen en el Cuadro 31.

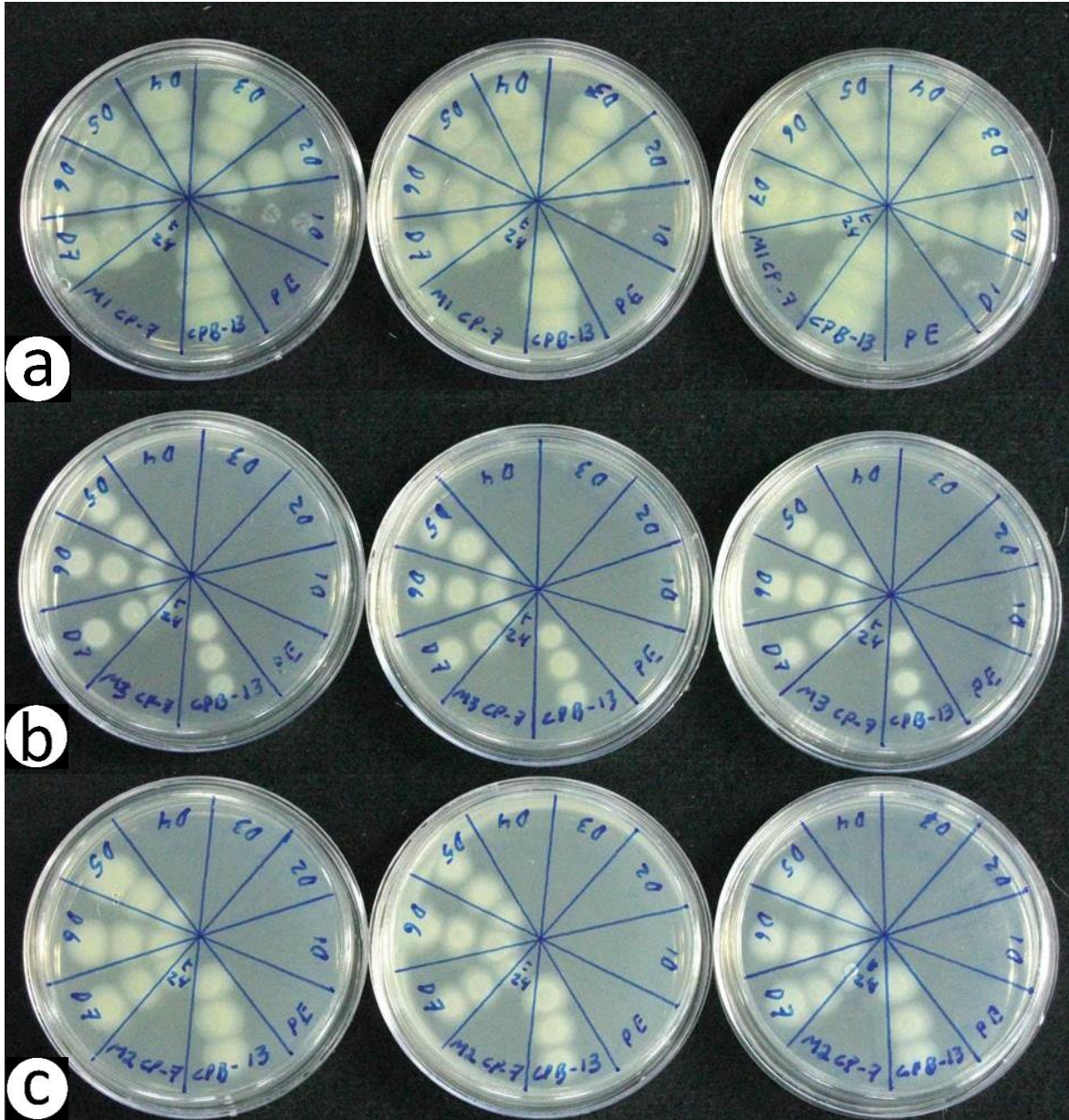
En la figura 117 se observa el efecto del extracto de *Lentinula edodes* sobre *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13 en una concentración de  $2.56 \pm 0.56 \times 10^8$  bacterias/mL: 117a, se observa que cuando se extrae con agua, existe un efecto bacteriostático a las 24 horas en D2 con una dosis de 79.15 mg/mL, es el solvente que presenta menor efecto bactericida pero mayor efecto antioxidante; en 117c, extracto hidroalcohólico al 35%, tuvo un efecto bacteriostático en la dilución D4 con dosis de 10.43 mg/ml a las 24 h; en 117b, extracto hidroalcohólico al 20%, se observa el efecto bacteriostático en la dilución D4 con dosis de 16.36 mg/ml a las 24 horas.





**Figura 117.** Efecto del extracto de *Lentinula edodes* sobre *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13, a: acuoso (M1), b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: contro de crecimiento de la bacteria.

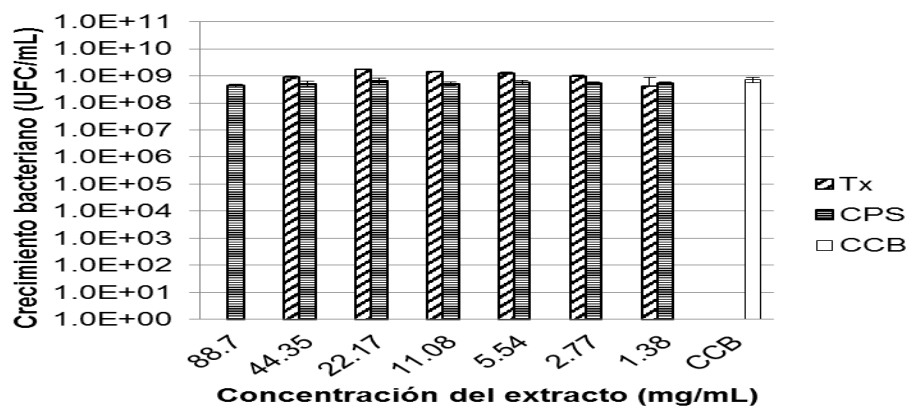
En la figura 118 se observan las muestras tomadas de las microplacas a las 24 horas de incubación, y se incubaron las cajas por otras 24 horas, el muestreo se realizó posterior a la lectura de D.O. Esta prueba determina un efecto bactericida en las diluciones en que no creció la bacteria. Se observó que en las cajas de Petri el extracto en agua tuvo crecimiento escaso en D1, por lo que no se pudo determinar la CMB; el efecto bactericida en los otros extractos alcohólico y agua-alcohol verificó la concentración determinada en el experimento por su densidad óptica correspondiendo a D4 con una concentración de 10.43 y 16.36 mg/mL respectivamente.



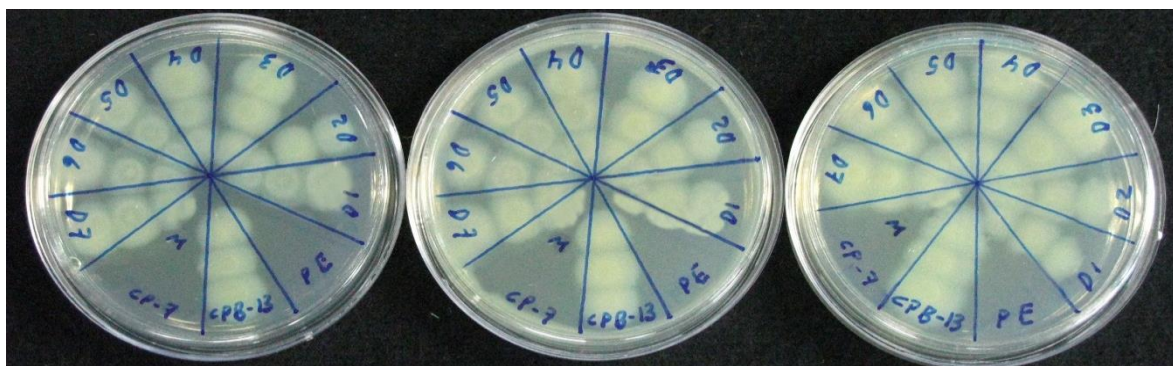
**Figura 118.** Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13 con las diferentes dosis de extracto de *Lentinula edodes*; a: acuoso, b: hidroalcohólico 20% y c: hidroalcohólico 35%.

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13 se presenta en el Cuadro 31.

#### 8.5.10.4 Efecto de los extractos de micelio de *L. edodes* CP-7



**Figura 119.** Efecto del extracto del micelio de *Lentinula edodes* sobre *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13, en solvente hidroalcohólico 35%. Tx: tratamiento, CPS: control positivo del solvente, CCB: control de crecimiento de la bacteria.



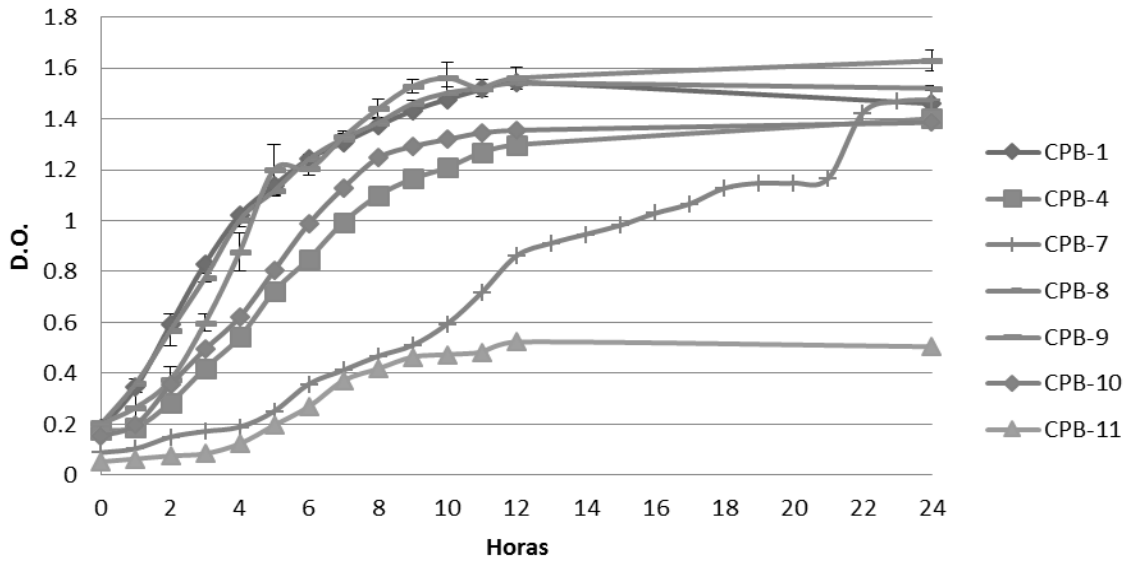
**Figura 120.** Cultivo en medio Mueller Hinton a las 24 horas de *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13 con las diferentes dosis de extracto del micelio de *Lentinula edodes*, en solvente hidroalcohólico 35%.

**Cuadro 31.** Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13 a las 24 horas.

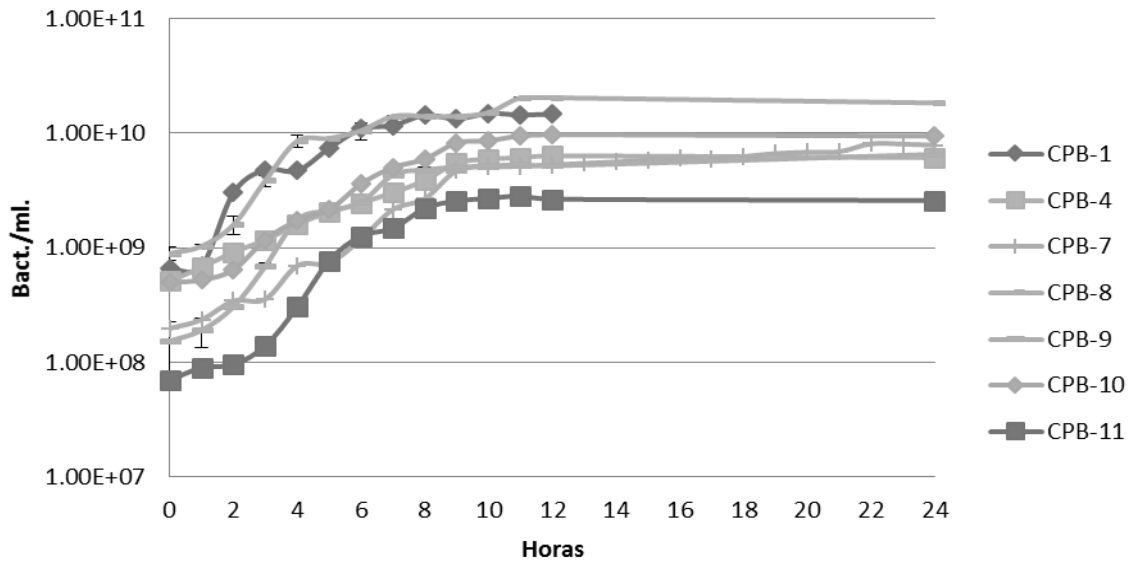
Registro	Agua			Extracto hidroalcohólico 35%			Extracto hidroalcohólico 20%		
	Dilución	Extracto (μL)	Conc. (mg)	Dilución	Extracto (μL)	Conc. (mg)	Dilución	Extracto (μL)	Conc. (mg)
CP-519	Ns	> 50	> 126.17	D2	25	44.27	D1	50	138.38
CP-7	D2	25	79.15	D4	6.25	10.43	D4	6.25	16.36

Ns: no susceptible, Conc.: concentración.

## 8.6 Análisis general de las cinéticas bacterianas

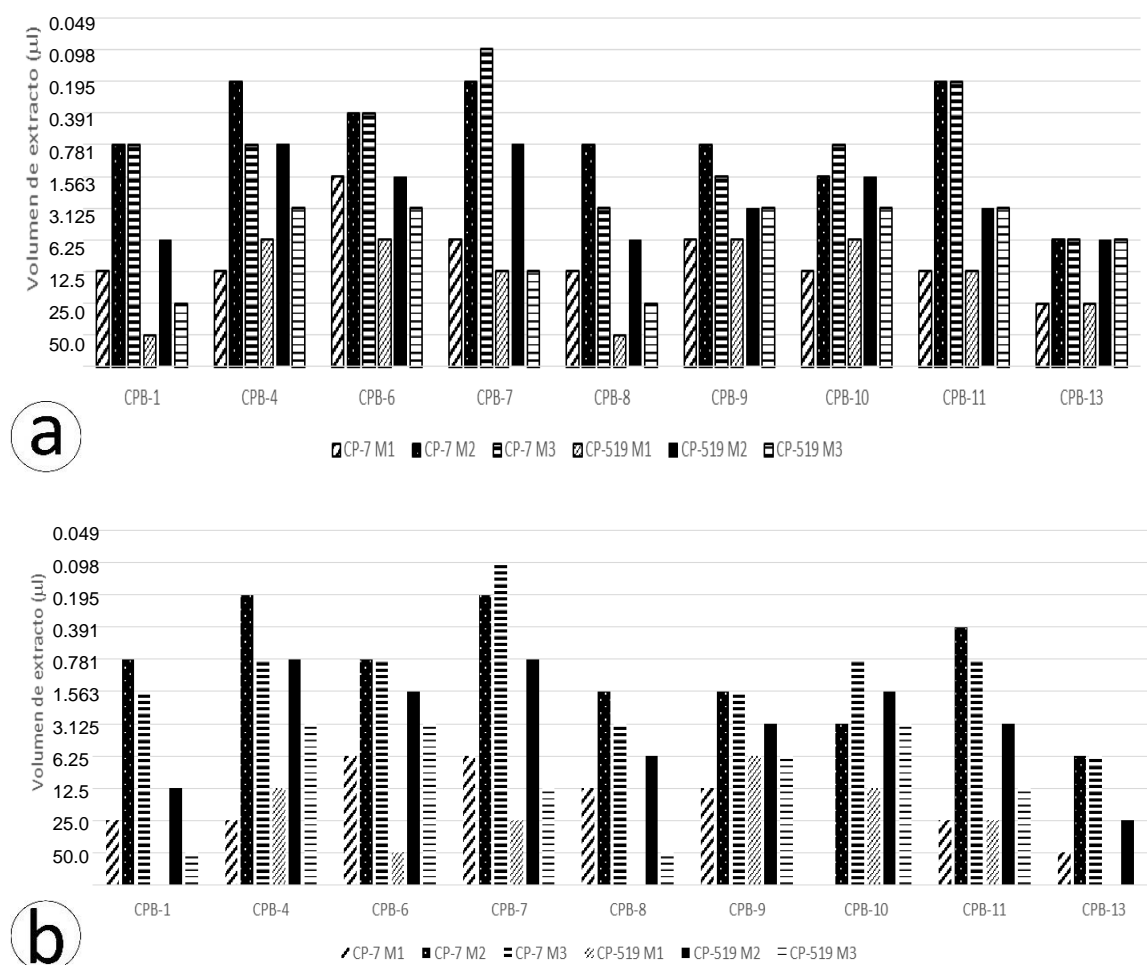


**Figura 121.** Cinéticas de crecimiento de las bacterias en estudio, por lectura de D.O. en espectrofotómetro (Epoch). CPB-1: *S. typhi*, CPB-4: *P. aeruginosa*, CPB-6: *Pseudomonas*, CPB-7: *Stenotrophomona*, CPB-8: *E. coli*, CPB-9: *B. subtilis*, CPB-10: *S. aureus*, CPB-11: *L. monocytogenes*, CPB-13: *P. aeruginosa*.



**Figura 122.** Cinéticas de crecimiento de las bacterias en estudio por lectura en la cámara de Neubauer en microscopio. CPB-1: *S. typhi*, CPB-4: *P. aeruginosa*, CPB-6: *Pseudomonas*, CPB-7: *Stenotrophomona*, CPB-8: *E. coli*, CPB-9: *B. subtilis*, CPB-10: *S. aureus*, CPB-11: *L. monocytogenes*, CPB-13: *P. aeruginosa*.

En las figuras 121 y 122 se muestra en conjunto, el crecimiento poblacional de cada una de las bacterias en estudio. La bacteria CPB-11 fue la cepa con el menor número de bacterias/ml y las cepas con mayor número de bacterias/ml fueron CPB-1 y CPB-8, habiendo una diferencia de 7.67 veces en la concentración de bacterias entre CPB-11 y CPB-8; quedando dentro de este rango la concentración de bacterias de las otras cepas. Todas las bacterias tuvieron un comportamiento muy similar en cuanto al tiempo de la fase lag, la pendiente en la fase exponencial y alcanzaron la etapa estacionaria a las 11 horas.



**Figura 123.** Efecto de los extractos de cada cepa de hongo sobre cada una de las bacterias en estudio; a: efecto bacteriostático, b: efecto bactericida. M1) acuoso, M2) hidroalcohólico 35% y M3) hidroalcohólico 20%. CP-519: *L. boryana*, CP-7: *L. edodes*.



El resumen de las concentraciones con que tuvieron efecto bacteriostático y bactericida cada uno de los extractos del basidiocarpo de *Lentinula boryana* CP-519 y *Lentinula edodes* CP-7 se presenta en los cuadros 32 y 33.

**Cuadro 32.** Efecto inhibitorio (bacteriostático) de los extractos de las cepas *Lentinula boryana* CP-519 y *Lentinula edodes* CP-7 de hongos funcionales sobre las bacterias de interés clínico a las 24 horas del bioensayo.

Registro de bacterias de interés clínico	Registro de hongos funcionales	Acuoso			Hidroalcohólico al 35%			Hidroalcohólico al 20%		
		Dilución	Extracto (µL)	Conc. (mg/mL)	Dilución	Extracto (µL)	Conc. (mg/mL)	Dilución	Extracto (µL)	Conc. (mg/mL)
CPB-1 <i>S. typhi</i>	CP-519	D1	50	126.17	D4	6.25	11.07	D2	25	69.17
	CP-7	D3	12.5	39.58	D7	0.781	1.30	D7	0.781	2.04
CPB-4 <i>S. agalactiae</i>	CP-519	D4	6.25	15.77	D7	0.78	1.38	D5	3.13	8.65
	CP-7	D3	12.5	39.58	D9	0.20	0.33	D7	0.78	2.04
CPB-6 <i>P. aeruginosa</i>	CP-519	D4	6.25	15.77	D6	1.56	2.77	D5	3.13	8.65
	CP-7	D6	1.56	4.95	D8	0.78	1.30	D8	0.78	2.04
CPB-7 <i>Stenotrophomona</i>	CP-519	D3	12.5	31.54	D7	0.78	1.38	D3	12.5	34.58
	CP-7	D4	6.25	19.79	D9	0.2	0.33	D10	0.098	0.26
CPB-8 <i>E. coli</i>	CP-519	D1	50	126.17	D4	6.25	11.07	D2	25	69.18
	CP-7	D3	12.5	39.58	D7	0.78	1.30	D5	3.13	8.18
CPB-9 <i>B. subtilis</i>	CP-519	D4	6.25	15.77	D5	3.13	5.53	D5	3.13	8.65
	CP-7	D4	6.25	19.79	D7	0.78	1.30	D6	1.56	4.09
CPB-10 <i>S. aureus</i>	CP-519	D4	6.25	15.77	D6	1.56	2.77	D5	3.13	8.65
	CP-7	D3	12.5	39.58	D6	1.56	2.61	D7	0.78	2.04
CPB-11 <i>L. monocytogenes</i>	CP-519	D3	12.5	31.54	D5	3.12	5.53	D5	3.125	8.65
	CP-7	D3	6.25	19.79	D9	0.20	0.33	D8	0.391	1.02
CPB-13 <i>P. aeruginosa</i>	CP-519	D2	25	63.08	D4	6.25	11.07	D4	6.25	17.29
	CP-7	D3	12.5	39.58	D4	6.25	10.43	D4	6.25	16.36

Ns: no susceptible, Conc.: concentración.

**Cuadro 33.** Efecto bactericida de los extractos de las cepas *Lentinula boryana* CP-519 y *Lentinula edodes* CP-7 de hongos funcionales sobre las bacterias de interés clínico a las 24 horas del bioensayo.

Registro de bacterias de interés clínico	Registro de hongos funcionales	Acuoso			Extracto hidroalcohólico 35%			Extracto hidroalcohólico 20%		
		Dilución	Extracto (μL)	Conc. (mg/mL)	Dilución	Extracto (μL)	Conc. (mg/mL)	Dilución	Extracto (μL)	Conc. (mg/mL)
CPB-1 <i>S. typhi</i>	CP-519	Ns	Ns	Ns	D3	12.5	22.13	D1	50	138.33
	CP-7	D2	25	79.15	D7	0.781	1.30	D6	1.56	4.09
CPB-4 <i>S. agalactiae</i>	CP-519	D3	12.5	31.54	D7	0.78	1.38	D5	3.13	8.65
	CP-7	D2	25	79.15	D9	0.20	0.33	D7	0.78	2.04
CPB-6 <i>P. aeruginosa</i>	CP-519	D1	50	126.17	D6	1.56	2.77	D5	3.13	8.65
	CP-7	D4	6.25	19.79	D7	0.78	1.30	D7	0.78	2.04
CPB-7 <i>Stenotrophomonas sp.</i>	CP-519	D2	25	63.08	D7	0.78	1.38	D3	12.5	34.58
	CP-7	D4	6.25	19.79	D9	0.2	0.33	D10	0.098	0.26
CPB-8 <i>E. coli</i>	CP-519	Ns	Ns	Ns	D4	6.25	11.07	D1	50	138.33
	CP-7	D3	12.5	39.58	D6	1.56	2.61	D5	3.13	8.18
CPB-9 <i>B. subtilis</i>	CP-519	D4	6.25	15.77	D5	3.13	5.53	D4	6.25	17.29
	CP-7	D3	12.5	39.58	D6	1.56	2.61	D6	1.56	4.09
CPB-10 <i>S. aureus</i>	CP-519	D3	12.5	31.54	D6	1.56	2.77	D5	3.13	8.65
	CP-7	Ns	Ns	Ns	D5	3.12	5.53	D7	0.78	2.04
CPB-11 <i>L. monocytogenes</i>	CP-519	D2	25	63.08	D5	3.12	5.53	D3	12.5	34.58
	CP-7	D2	25	79.15	D8	0.39	0.65	D7	0.78	2.04
CPB-13 <i>P. aeruginosa</i>	CP-519	Ns	Ns	Ns	D2	25	44.27	Ns	Ns	Ns
	CP-7	D1	50	158.30	D4	6.25	10.43	D4	6.25	16.36

Ns: no susceptible. CP-7, *Lentinula edodes*; CP-519, *L. boryana*.

### 8.7 Caracterización morfológica de las cepas bacterianas

Se realizó una caracterización morfológica de las colonias desarrolladas en medio de cultivo Mueller Hinton agar a las 12 horas de siembra a partir de 50 µL de inóculo en medio líquido con el objetivo de obtener 50 UFC por caja (Cuadro 34).

**Cuadro 34.** Características morfológicas de las colonias desarrolladas en cajas de Petri con medio de cultivo Mueller Hinton agar.

Registro	Especie	Gram	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color
CPB-1	<i>Salmonella typhi</i>	-	Circular	Entero	Convexa	Viscosa	Blanco opaco
CPB-4	<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	Puntiforme	Entero	Convexa	Seca	Blanco opaco
CPB-6	<i>Pseudomonass aeruginosa</i>	-	Circular	Entero	Elevada	Viscosa	Blanco opaco
CPB-7	<i>Stenotrophomonas</i>	-	Circular	Entero	Convexa	Viscosa	Blanco opaco
CPB-8	<i>Escherichia coli</i>	-	Circular	Entero	Convexa	Butirosa	Blanco opaco
CPB-9	<i>Bacillus subtilis</i>	+	Circular	Crenado	Elevada	Viscosa	Blanco opaco
CPB-10	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Puntiforme	Entero	Convexa	Viscosa	Blanco opaco
CPB-11	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	Puntiforme	Entero	Convexa	Viscosa	Blanco opaco
CPB-13	<i>Pseudomonass aeruginosa</i>	-	Circular	Entero	Convexa	Muy Viscosa	Verde

## IX. DISCUSIÓN

Se analizaron y compararon las propiedades funcionales de los hongos comestibles *Lentinula boryana* nativo de México (Veracruz), y una cepa de referencia de *Lentinula edodes*. Las cepas estudiadas se cultivaron *in vitro*, así como en substrato sólido estéril a base de aserrín de encino hasta la obtención de basidiocarpos en condiciones de módulo experimental. Se realizaron extractos acuosos e hidroalcohólicos al 20% y 35% utilizando basidiocarpos secos y molidos.

Se evaluaron las siguientes variables: producción de micelio en medio líquido, producción de basidiocarpos, rendimiento del extracto de basidiocarpos, polifenoles totales y la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra nueve cepas de bacterias de interés clínico (*Salmonella typhi* CPB-1, *Streptococcus agalactiae* CPB-4, *Pseudomonas aeruginosa* CPB-6 y CPB-13, *Stenotrophomona* spp. CPB-7, *Escherichia coli* CPB-8, *Bacillus subtilis* CPB-9, *Staphylococcus aureus* CPB-10 y *Listeria monocytogenes* CPB-11).

### Producción de micelio en medio líquido

La cepa *L. boryana* CP-519 inoculada con círculos de inóculos convencionales en CYM, se formó micelio color blanco. El micelio cubrió del 60 al 95% de la superficie con coloraciones cafés, las cuales se presentaron en todas las repeticiones. El micelio creció sobre las paredes del frasco con una densidad baja, a una altura promedio de 0.4 cm. Por debajo de la superficie, cubrieron del 50 al 95% del volumen, el micelio creció pegado al micelio de la superficie, en forma algodonosa y minoritariamente en la base del frasco, con densidad baja en forma de pelusas. El medio de cultivo tuvo color Pantone 131-c.

Para la cepa *L. edodes* CP-7 inoculada con círculos de inóculos convencionales en CYM, se formó micelio blanco con coloraciones cafés, el micelio cubrió la superficie al 100%, con una densidad variable entre las réplicas, siendo más denso en la repetición 1 y escasa en la repetición 5. Las coloraciones cafés se presentaron en 3 repeticiones y cubrieron del 15 al 35% de la superficie. El micelio creció sobre las paredes a una altura promedio de 1.5 cm con una densidad media. El micelio que creció por debajo de la superficie cubrió del 70 al 90% el volumen del medio de cultivo, en conformación algodonosa y con crecimiento de la superficie al fondo del frasco. No se observó crecimiento del fondo del frasco hacia la superficie. El medio de cultivo varió en la tonalidad, siendo un café más intenso para la repetición 1, los colores extremos variaron del Pantone 124-c al Pantone 121-c.

En el cultivo de micelio en medio líquido (PDB, EMB y CYM) con agitación se formaron pellets densos, sin cambio en la coloración del medio y en promedio la producción de biomasa de los experimentos en agitación a 120 rpm tuvieron de un 15 a un 39% más rendimiento que los experimentos cultivados en condiciones estáticas (Cuadro 35). Corroborando los resultados en comparación con investigaciones previas, se observó que a una velocidad de agitación mayor de 90 rpm la producción de biomasa se encontró proporcionalmente disminuida; de acuerdo a lo ya establecido por otros autores (Ruby, 2008; Yee y Moore, 1992, de Carbalho et al., 2007).

**Cuadro 35.** Comparación de la producción micelial a partir de 5 núcleos de 0.5 cm de diámetro en 50 mL de medio de cultivo CYM a los 22 días de tratamiento en agitación a 120 rpm y estático.

Registro	Estático (mg/50 mL)	Agitación a 120 RPM (mg/50 mL)	Agitación/estático (%)
CP-7	510	610	19.01
CP-494	400	480	20.84
CP-519	552	654.67	18.60
<i>Lentinus strigosus</i> *	286.9	413.4	44.09
Le-11 **	136.9	90.0	- 34.26
<i>L. edodes</i> ***	190	- -	- -
<i>L. boryana</i> ***	610	- -	- -

\* Ruby, 2008, micelio de *L. strigosus* cultivado en PDB a 90 rpm por 10 días.

\*\* Yee, 1992, micelio de *L. edodes* cultivado en Leatham líquido a 200 rpm por 21 días.

\*\*\* de Carbalho, 2007, 100 mL de extracto de malta con 3 g de peptona de soya líquida y 0.3 g de peptona de soya, pH de 6, incubado por 25 días en obscuridad y sin agitación.

#### Producción de basidiocarpos en substrato sólido

A partir de las unidades experimentales (UP) de 3 kg de sustrato sólido a base de mezcla de aserrines estériles con la formulación COLPOS-17, sembradas con las cepas de los hongos *Lentinula boryana* y *L. edodes* se obtuvieron los basidiocarpos. Se mantuvieron en un módulo experimental con condiciones ambientales controladas y a partir de los 142 y 180 días se cosecharon los cuerpos fructíferos de *L. edodes* y *L. boryana*, respectivamente. Este tiempo de fructificación puede deberse al tipo de extracto utilizado ya que en otro estudio con *L. edodes* cultivado en rastrojo de maíz reportó la fructificación a los 75 días (Philippoussis *et al.*, 2002).

Los basidiocarpos se caracterizaron por diámetro, grosor, forma, textura, consistencia y color. Para la cepa *Lentinula boryana* el píleo más chico fue de 2.5 x 3.0 cm, y el más grande fue de 15.0 x

15.0 cm, el promedio y moda fue de 7.2 x 7.2 cm. El píleo más chico pesó 2 g y el más grande pesó 48 g, el promedio fue de 27.6 g. El largo promedio del estípite fue de 6.5 cm.

Para la cepa *Lentinula edodes* el píleo más chico fue de 2.5 x 2.5 cm, y el más grande fue de 15.9 x 16.4 cm, el promedio fue de 8.1 x 8.5 cm. El píleo más chico pesó 2 g y el más grande pesó 67.3 g, el promedio fue de 34.65 g. El largo promedio del estípite fue de 7.8 cm. En un estudio de cultivo controlado en bolsas de 2 kg de diferentes substratos y residuos forestales, se cultivaron dos cepas de *Lentinula edodes* y se obtuvieron producciones con hongos de 50 a 90 g cada uno, con medidas de píleo de 5 a 9.9 cm y largo de estípite de hasta 11 cm. Esto pudo deberse al uso de una cepa más fibrosa o con mayor retención de agua al ser hongos más pesados, con una talla menor (Smita, 2012).

#### Rendimiento de los extractos

A partir de 10 g de cuerpos fructíferos deshidratados con una temperatura menor a los 38 °C de las cepas de *L. boryana* y *L. edodes*, se realizaron extractos alcohólicos por la técnica de maceración. A partir de los extractos obtenidos se calculó el rendimiento por tipo de solvente y por cepa de hongo comestible (Cuadro 30), se observó que los rendimientos de los extractos hidroalcohólicos al 20% y 35% de *L. boryana* fueron mayores que los obtenidos a partir de *L. edodes*. El extracto obtenido en dichas condiciones, fue del 8 al 13% mayor que los rendimientos obtenidos por otros autores para *L. edodes* por el método de extracción en condiciones súper críticas con CO<sub>2</sub> como gas acarreador y secado por liofilización; con una eficiencia de 3.81% en peso y un rendimiento de 1.25% en peso cuando el gas acarreador fue n-hexano (Sorane *et al.*, 2007).

#### Propiedades funcionales

A partir de los extractos obtenidos con agua y solvente hidroalcohólico al 20% y 35%, de los hongos CP-519 *L. boryana* y CP-7 *L. edodes*, se realizó un análisis de polifenoles totales como equivalentes de ácido gálico de cada extracto (EAG).

El contenido de polifenoles totales en *L. boryana* del solvente hidroalcohólico al 35% fue de 1.39±0.12 mg EAG/g de hongo seco y del solvente hidroalcohólico al 20% fue de 2.08±0.07 mg EAG/g de hongo seco. Esto fue mayor en comparación con *L. edodes*, en el cual se registraron 0.96±0.12 y 1.06±0.03 mg EAG/g de hongo seco extraído en los solventes hidroalcohólicos al 35 y 20%, respectivamente.



Los extractos acuosos tuvieron una concentración de polifenoles totales mayor que los extractos hidroalcohólicos. El contenido de polifenoles totales en el extracto acuoso de *L. boryana* fue de  $3.49 \pm 0.21$  EAG/mL, mientras que el de *L. edodes* fue 13.4% mayor ( $3.96 \pm 0.05$  EAG/mL). Esto también concuerda con las extracciones del hongo *Agaricus* (CP-89), se observó una relación 4 veces mayor de polifenoles totales en el extracto acuoso sobre los extractos hidroalcohólicos. El valor de polifenoles totales del extracto acuoso de *Agaricus* fue de 1.31 mg EAG/g de hongo seco y del extracto hidroalcohólico al 35% fue de 0.32 mg EAG/g de hongo seco (Cruz, 2012). Aunque es la misma relación, de los hongos analizados en la presente investigación, *L. boryana* tuvo 2.66 veces más polifenoles totales que *Agaricus* en el extracto acuoso y 4.34 veces más respecto al extracto hidroalcohólico al 35%.

En otro estudio de *L. edodes* con 0.3 g de hongo en 30 mL, en tres diferentes concentraciones de etanol (40, 60 y 80%) y cada una en tres tiempos (1, 2 y 3 horas) presentó su mejor resultado en 40% de etanol por 3 horas con  $1.74 \pm 0.30$  mg EAG/g (Zuofa *et al.*, 2009). Estos resultados al compararlos con los obtenidos a partir del extracto alcohólico al 20% de *L. edodes*, se observó un 39% más que el obtenido en este estudio. Sin embargo, la cantidad de EAG obtenida de *L. boryana* fue una concentración un 20% mayor en comparación con otros autores (Zuota *et al.*, 2009).

Según registros de extractos de *L. edodes*, se sabe que el extracto de éste tiene una relación de polifenoles totales directamente proporcional a la temperatura y el tiempo de extracción. En una prueba a temperaturas de 100 y 121°C con tiempos de 15 y 30 minutos de extracción, se obtuvo una mayor cantidad de polifenoles totales al aumentar las condiciones de tiempo y temperatura. En condiciones ideales se obtienen 546 µg EAG/g, sin embargo, Choi *et al.* (2006), sugiere hacer más estudios de polifenoles totales de *Lentinula* ya que solo evaluó una cepa y se requiere validar la tendencia del efecto.

La cantidad obtenida de EAG/g en extracto acuoso para la cepa *Lentinula edodes* fue de 3.95 mg EAG/g de hongo seco, mientras que otras investigaciones han registrado concentraciones de  $1.33 \pm 0.04$  mg EAG/g de hongo seco. Se ha registrado que en el extracto alcohólico (metanol), se obtuvo  $4.79 \pm 1.2$  mg EAG/g de hongo seco (Cheung *et al.*, 2003), lo cual es mayor que lo que se obtuvo por el solvente hidroalcohólico al 35% ( $0.96 \pm 0.12$ ). Sin embargo, el extracto elaborado puede ser ingerido sin los efectos adversos que ocasionaría la ingestión de un extracto con metanol.

Propiedades antioxidantes

Se realizaron las pruebas de Folin-Ciocalteu para polifenoles totales, DPPH, ABTS y ORAC para determinar la actividad antioxidante y la concentración por mL para tener la Concentración Inhibitoria al 50% (IC 50%) de los extractos de basidiocarpo en diferentes solventes (agua e hidroalcohólicos al 20% y 35%) y del micelio en solvente hidroalcohólico al 35% de los hongos *Lentinula boryana* y *L. edodes*.

En la determinación de polifenoles totales del extracto hidroalcohólico de *Lentinula edodes* por la prueba de Folin-Ciocalteu se obtuvo en el presente estudio una concentración de 2.08 mg/gramo de hongo seco mientras que Sreenivasan *et al.*, (2010) reportó 70.83 mg/gramo de hongo seco.

En la determinación de la actividad antioxidante por el reactivo 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) se determinó que el basidiocarpo tuvo más actividad que el micelio y *L. boryana* tuvo más actividad que *L. edodes* en un 10% y requirió de un 36% menos para tener una concentración con un efecto inhibitorio del 50% (IC 50%), el extracto hidroalcohólico al 35% tuvo un valor de 451 µg/mL. Otros autores reportaron para extractos etanólicos un mejor efecto antioxidante con concentraciones alrededor del 50% menos, con valores de 250 µg/mL (Sorane *et al.*, 2014); 198 µg/mL (Mujic *et al.*, 2010); 283 µg/mL (Sushila *et al.*, 2014). Del estudio hecho por Sreenivasan *et al.*, (2010) el extracto etanólico tiene efecto antioxidante 16 veces mayor que el extracto en metanol, requiriéndose para éste último una cantidad de 4,400 µg/mL, según Lee *et al.* (2008) sigue siendo un antioxidante efectivo. En el estudio de la actividad antioxidante con el reactivo 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS), se tiene que los extractos de basidiocarpo tienen un efecto mayor que los micelios respectivos

#### Propiedades antibacterianas

##### Ajuste de la concentración de bacterias por mililitro

En la determinación de las propiedades antibacterianas de los extractos de *L. boryana* y *L. edodes*, se desarrolló un modelo poblacional empleando el programa Excel con macros. Este programa permitió ajustar eficientemente las diluciones bacterianas a la concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL (la concentración puede ser ajustable por el operador) con un +/- 10% de error, en un paso directo de dilución. También incluyó el cálculo para una segunda dilución que al inocular un volumen específico en una caja de Petri, creció un número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) que permitió comprobar la concentración y viabilidad bacteriana. Esto a su vez, permitió confirmar la ausencia de contaminación en la muestra.

El método establecido en la presente investigación para la determinación de la concentración de las bacterias, resultó ser más eficiente cuantitativamente y en menor tiempo de ajuste de la concentración de bacterias que el método tradicionalmente usado para la estimación bacteriana establecido por McFarland. La concentración deseada de bacterias se ajustó en un tiempo menor de 5 min, en una única dilución y en forma directa. En el caso del método tradicional de McFarland, para hacer el ajuste de las bacterias a la concentración establecida se requerían de muchos intentos y lecturas en la densidad óptica de la muestra por ser un método estimativo y de rebasar la concentración deseada hay que volver a iniciar el proceso de ajuste con el uso quizá no previsto de nuevo medio de cultivo.

#### Índice de crecimiento poblacional de las bacterias

En las figuras 117 y 118 se muestra el índice de crecimiento poblacional de las bacterias por D.O. y conteo al microscopio por cámara de Neubauer. Respecto al crecimiento poblacional identificado por la D.O. se observó que la tasa de crecimiento fue de 7.4 a 9.97 veces respecto a la población inicial. Respecto al conteo en microscopio, la cepa que tuvo menor índice de crecimiento fue la *S. agalactiae* CPB-4 con 12.35 veces el crecimiento poblacional inicial. La cepa con mayor crecimiento poblacional fue *Stenotrophomona spp.* CPB-7 con una relación de 40 veces su población original. El promedio en el índice de crecimiento de bacterias contadas al microscopio fue de 28.18 veces. Si se hace una comparación entre la sensibilidad del crecimiento poblacional entre el método de D.O. y Neubauer, se observó que el conteo al microscopio fue más sensible, sin embargo el tiempo de análisis y procesamiento de la muestra para determinar la concentración bacteriana fue de 20 minutos, mientras que el análisis por D.O. fue de 4 minutos. Se destaca que por protocolo, para tener la concentración bacteriana dentro del rango especificado de  $1$  a  $2 \times 10^4$  debe de procesarse la muestra en menos de 30 min y con menor error humano, se recomienda la cuantificación de la concentración de bacterias con el método de D.O.

#### Extracto acuoso

En el caso de los extractos acuosos se observaron propiedades antibacterianas contra algunas de las cepas evaluadas, con excepción de la cepa *P. aeruginosa* CPB13. Esta cepa no mostró susceptibilidad a los extractos acuosos de *Lentinula boryana* en ninguna de las dosis evaluadas; aunque fue susceptible a los extractos acuosos obtenidos de *L. edodes* en altas concentraciones. Los extractos acuosos de *L. boryana* mostraron mayor actividad antibacteriana que los obtenidos a partir de *L. edodes* en algunos casos, ya que se requirieron menores concentraciones de extracto

para lograr un efecto bacteriostático (CMI: concentración mínima inhibitoria) y bactericida (CMB: concentración mínima bactericida). Estos efectos se observaron para las cepas CPB-4 de *S. agalactiae* (CMI: 15.77 mg/mL; CMB: 31.54 mg/mL), CPB-9 de *B. subtilis* (CMI: 15.77 mg/mL; CMB: 15.77 mg/mL), CPB-10 de *S. aureus* (CMI: 15.77 mg/mL; CMB: 31.54 mg/mL), y CPB-11 de *L. monocytogenes* (CMI: 31.54 mg/mL; CMB: 63.08 mg/mL). En el resto de las bacterias se registró un efecto mayor de actividad antibacteriana para los extractos obtenidos de *L. edodes* en comparación con el efecto observado con los extracto de *L. boryana*.

Las concentraciones obtenidas de extracto en las diluciones evaluadas, se consideraron como altas, las siguientes dosis: para el hongo *L. boryana* extracto acuoso (7.89-126.17 mg/ mL), hidroalcohólico al 35% (5.53-88.53 mg/mL), hidroalcohólico al 20% (8.65-138.33). Para el hongo *L. edodes* se consideraron como altas las dosis del extracto acuoso (9.89-158.30 mg/ mL), hidroalcohólico al 35% (5.21-83.40 mg/mL), hidroalcohólico al 20 (8.18-130.85).

Para *L. boryana* se consideraron como dosis bajas en el extracto acuoso de (0.25-3.94 mg/ mL), hidroalcohólico al 35% (0.17-2.77 mg/mL), hidroalcohólico al 20% (0.27-4.32). Para el caso de *L. edodes* con el extracto acuoso (0.31-4.95 mg/mL), hidroalcohólico al 35% (0.16-2.61 mg/mL), hidroalcohólico al 20% (0.26-4.09 mg/mL).

La mayor parte de los extractos acuosos de *L. boryana* y *L. edodes* tuvieron un efecto antibacteriano débil sobre las cepas estudiadas para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Bactericida.

Extracto hidroalcohólico al 35%

Los extractos alcohólicos de *Lentinula boryana* y de *L. edodes* si mostraron propiedades antibacterianas, con las diferentes concentraciones evaluadas y contra todas las cepas estudiadas. Con los extractos hidroalcohólico al 35% de *L. boryana* y *L. edodes* elaborados, se observó que todas las bacterias fueron susceptibles a los extractos en altas y en bajas concentraciones. Para los extractos del hongo *L. boryana*, se observó una mayor actividad bactericida en comparación con los extractos del hongo *L. edodes*, principalmente contra la cepa bacteriana CPB-10 de *S. aureus* (CMB: 2.77 mg/mL). La actividad bacteriostática de los extractos de *L. boryana* contra CPB-10 de *S. aureus*, fue equivalente a la observada con la cepa *L. edodes* contra la misma bacteria, con dosis de CMI: 2.61 mg/mL para *L. edodes*, y dosis de 2.77 mg/mL para *L. boryana*. En el resto de las bacterias se registró el efecto inverso, donde la actividad antibacteriana de *L. edodes* fue mayor que la observada en *L. boryana*.

Los extractos alcohólicos de *L. boryana* tuvieron un efecto antibacteriano (débil para algunas cepas bacterianas y fuertes para otras mientras que aquellos de *L. edodes* registraron un efecto fuerte en la mayoría de los casos. Se determinó un efecto antibacteriano fuerte de *L. boryana* sobre las cepas CPB-4 de *S. agalactiae* (CMI, CMB: 1.38 mg/mL), CPB-6 de *P. aeruginosa* (CMI, CMB: 2.77 mg/mL), CPB-7 de *Stenotrophomona spp.* (CMI, CMB: 1.38 mg/mL), y CPB-10 de *S. aureus* (CMI, CMB: 2.77 mg/mL), mientras que el efecto antibacteriano débil se observó sobre las cepas CPB-1 de *S. typhi* (CMI: 11.07 mg/mL, CMB: 22.13 mg/mL), CPB-8 de *E. coli* (CMI, CMB: 11.07 mg/mL), CPB-9 de *B. subtilis* (CMI, CMB: 5.53 mg/mL), CPB-11 de *L. monocytogenes* (CMI, CMB: 5.53 mg/mL), y CPB-13 de *P. aeruginosa* (CMI, CMB: 44.27 mg/mL). Para el caso de *L. edodes*, se obtuvo un efecto antibacteriano fuerte sobre las cepas CPB-1 de *S. typhi* (CMI, CMB: 1.30 mg/mL), CPB-4 de *S. agalactiae* (CMI, CMB: 0.33 mg/mL), CPB-6 de *P. aeruginosa* (CMI, CMB: 1.30 mg/mL), CPB-7 de *S. sp.* (CMI, CMB: 0.33 mg/mL), CPB-8 de *E. coli* (CMI, CMB: 2.61 mg/mL), CPB-9 de *B. subtilis* (CMI: 1.30 mg/mL, CMB: 2.61 mg/mL), CPB-10 de *S. aureus* (CMI: 2.61 mg/mL, CMB: 5.21 mg/mL), y CPB-11 de *L. monocytogenes* (CMI: 0.33 mg/mL, CMB: 0.65 mg/mL), mientras que el efecto antibacteriano débil sólo se observó sobre la cepa CPB-13 de *P. aeruginosa* (CMI, CMB: 10.43 mg/mL).

#### Extracto hidroalcohólico al 20%

Los extractos hidroalcohólicos al 20% de *Lentinula boryana* y *L. edodes* mostraron un efecto inhibitorio contra todas las bacterias estudiadas. Sin embargo, *L. boryana* tuvo un efecto inhibitorio débil contra todas las bacterias. En el caso de la cepa CPB-13 de *P. aeruginosa*, no se registró un efecto bactericida en ninguna de las dosis de extracto evaluadas. En contraste, *L. edodes* mostro un efecto inhibitorio y bactericida en las nueve cepas de bacterias estudiadas, con un efecto inhibitorio fuerte del extracto en la mayoría de las cepas. El efecto inhibitorio débil del extracto de *L. edodes* sólo se observó para las cepas CPB-8 de *E. coli* y CPB-13 de *P. aeruginosa* (Fig. 119). En general, pudo establecerse que los extractos hidroalcohólicos y acuosos de *L. boryana* y *L. edodes* difirieron en cuanto a rendimiento, propiedades antioxidantes y propiedades antibacterianas (bacteriostáticas y bactericidas). Las principales propiedades bacteriostáticas y bactericidas de *L. boryana* se obtuvieron con el extracto hidroalcohólico al 35% ya que el menor rango de extracto agregado fue de 1.38 a 44.27 mg/mL, seguido por el extracto hidroalcohólico al 20% (8.65-138.33 mg/mL) y el extracto acuoso (15.77-126.17 mg/mL). En cambio, las propiedades bacteriostáticas y bactericidas fueron similares en los extractos hidroalcohólicos al

20% y 35% de *L. edodes*, con un rango de 0.26-16.36 mg/mL y 0.33-10.43 mg/mL, respectivamente, seguidas por los extractos acuosos (4.95-158.30 mg/mL). Para en *L. boryana* como para *L. edodes*, se requirieron mayores cantidades de extractos acuosos para lograr un efecto bacteriostático y bactericida para todas las cepas.

Análisis de los extractos sobre bacterias estudiadas por otros autores

#### *Salmonella typhi*

En un estudio sobre la evaluación de 10 µl de extracto acuoso de *L. edodes* sobre *Salmonella poona* NCTC 4840, en una concentración de 3 g de hongo seco/mL se observó una inhibición de 9 mm a las 24 horas (Hearst, 2009). Cabe mencionar que para el presente estudio, se utilizó una dosis 3 veces menor de extracto acuoso de *L. edodes* contra *S. typhi*, y pudo observarse una inhibición de crecimiento bacteriano hasta las 48 horas.

#### *Pseudomona aeruginosa*

En un estudio sobre la evaluación de 10 µl de extracto acuoso de *L. edodes* sobre *Pseudomona aeruginosa*, en una concentración de 1 g de hongo seco/mL se observó una inhibición de 9 mm a las 24 horas (Hearst, 2009). Para el presente estudio, se utilizó una dosis de 1.38 mg/mL de extracto acuoso de *L. edodes* contra *Pseudomona aeruginosa* CPB-6 y pudo observarse una inhibición de crecimiento bacteriano a las 24 horas. Cabe mencionar que la dosis evaluada fue 724 veces menor que la dosis evaluada por Hearst. La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de *L. boryana* CP-519 y *L. edodes* CP-7 contra *Pseudomona aeruginosa* CPB-6 se presenta en la Figura 119.

#### *E. coli*

En los tres extractos de *L. edodes* contra *E. coli* CPB-8, se observó que para el mejor de los casos, el extracto hidroalcohólico al 35%, la CMI fue de 2.6 mg/mL, lo cual coincide con referencias previas donde en concentraciones menores de 2 mg/mL de extracto de *L. edodes* no hay inhibición en una población de  $5 \times 10^3$  bacterias de *E. coli* CPB-8 (Sorane *et al.*, 2007).

Un estudio del efecto de *L. edodes* sobre *E. coli* NCTC 25922 donde se utilizaron 10 µl de extracto acuoso en una concentración 1:1 peso:peso de extracto liofilizado y peptona salina al 0.1% a las 24 horas tuvo una inhibición de 12 mm (Hearst, 2009). La concentración de dicho extracto es equivalente a una concentración intermedia entre D3 y D4 con dosis aproximada de 3.2 mg del presente estudio. En este caso la CMI fue en D3 con dosis de 3.95 mg/mL.



En otro estudio un extracto de 200 g de *L. edodes* en 1600 mL de agua con una dosis de 50 mg/mL no presentó inhibición sobre *E. coli* (Hirasawa, 1999). El extracto acuoso fue tratado para extraer los compuestos activos de éste con cloroformo, se concentró nuevamente el extracto acuoso y se extrajo nuevamente de éste con acetato de etilo por triplicado. Mientras que el extracto acuoso con concentración de 50 mg/mL no inhibió a *E. coli*, el extracto con cloroformo obtenido del extracto acuoso, requirió solo de 1.5 mg/mL y el extracto de acetato de etilo requirió de 2 mg/mL; lo cual sugiere que los compuestos activos recuperados del extracto acuoso fueron más afines a los solventes cloroformo y acetato de etilo, quedando como remanente en el extracto acuoso otros compuestos con otras propiedades. En este estudio se realizó un proceso de purificación de los compuestos activos, por lo que se requirió de una concentración menor que la determinada en el presente trabajo y por Hearst (2009).

#### *Bacillus subtilis*

En el estudio sobre el micelio de *Lentinula edodes* en medio líquido hicieron un extracto acuoso y separaron los compuestos por su polaridad con cloroformo, acetona, acetato de etilo y metanol, obteniendo el principal compuesto antimicrobiano en la fase acuosa, el compuesto lentinamicin tiene un halo de inhibición de 7 a 22 mm encontrando una relación con el tiempo de incubación del micelio siendo el mejor entre los 18 a 25 días. Asimismo probaron a tempera ambiente y calentando a 100°C por 10 min. Siendo un mejor resultado a temperatura ambiente (Kazue *et al.*, 2001).

#### *Staphylococcus aureus*

En un experimento previo con *Staphylococcus aureus*, se realizó un extracto acuoso de *L. edodes* y se inhibió el crecimiento bacteriano de  $1 \times 10^8$  bacterias/mL con una dosis de 4.5 mg de extracto (Hirasawa 1999). En el presente estudio se realizó un extracto acuoso de *L. edodes* y se logró inhibir la misma población bacteriana ( $1 \times 10^8$  bacterias/mL) de *Staphylococcus aureus* con una dosis de 3.95 mg.

Otro estudio del efecto de *L. edodes* sobre *Staphylococcus aureus* donde se utilizaron 10 µl de extracto acuoso en una concentración 1:1 peso:peso de extracto liofilizado y peptona salina al 0.1% a las 24 horas, se observó una inhibición de 12 mm en el crecimiento bacteriano. Este autor reportó una dosis utilizada que correspondió aproximadamente a 3.2 mg (Hearst, *et al.* 2009). En comparación con el presente estudio, se observó que la concentración utilizada para inhibir el desarrollo de *Staphylococcus aureus* fue una dosis de 3.95 mg.

Estos resultados confirman el efecto de inhibición bacteriana del extracto acuoso de *L. edodes* sobre el crecimiento de esta bacteria; independientemente de las variables metodológicas para la obtención del extracto en los diferentes experimentos. La dosis efectiva para la inhibición utilizada en el presente estudio, es similar a la ya mencionada por autores previos (Hearst, *et al.* 2009).

#### *Listeria monocytogenes*

En otro estudio donde se evaluó del efecto del extracto acuoso de *L. edodes* sobre *Listeria monocytogenes*, se evaluaron 10 µl del extracto en una concentración 1:1 peso:peso de extracto liofilizado a las 24 horas; donde se observó una inhibición de 11 mm de diámetro en el crecimiento bacteriano. En este caso la dosis utilizada correspondió aproximadamente a una dosis de 3.2 mg (Hearst *et al.*, 2009). En relación al presente estudio, se observó que la concentración utilizada para inhibir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* fue una dosis de 3.95 mg. Cabe mencionar, que la dosis encontrada para la inhibición de *L. monocytogenes*, fue muy cercana a la ya registrada para su inhibición.

#### *Pseudomona aeruginosa*

En otra investigación, se evaluó del efecto del extracto acuoso de *L. edodes* sobre *Pseudomona aeruginosa*, donde se evaluaron 10 µl del extracto en una concentración 1:1 peso:peso de extracto liofilizado a las 24 horas; se observó una inhibición de 9 mm en el crecimiento bacteriano. En este caso la dosis utilizada correspondió aproximadamente a una dosis de 3.2 mg (Hearst, *et al.* 2009). En relación al presente estudio, se observó que la concentración utilizada para inhibir el desarrollo de *Pseudomona aeruginosa* fue con una dosis de 79.15 mg de extracto en agua. En el caso de la CMI con extracto hidroalcohólico al 35%, se observó una inhibición con dosis de 1.04 mg, y con el extracto hidroalcohólico al 20%, se observó la inhibición bacteriana con dosis de 1.63 mg. Estos valores corroboran el efecto inhibitorio de las propiedades antibacterianas de extractos acuosos y alcohólicos de *L. edodes* contra *Pseudomona aeruginosa*. Cabe mencionar, que se lograron encontrar dosis menores al 50% de la dosis ya registrada para la inhibición de *P. aeruginosa*, en el caso de los extractos hidroalcohólico al 20% y 35%.

## Contrastación de hipótesis

Los extractos del hongo comestible de la especie *Lentinula boryana* si tuvieron propiedades funcionales con diferencias cuantitativas en la determinación de antioxidantes ( $3.96 \pm 0.05$  *a* y  $3.49 \pm 0.21$  *b* mEAG/ghs, para *L. edodes* y *L. boryana* respectivamente en solvente agua) y en compuestos antibacterianos (efecto bacteriostático y bactericida con 1.38 mghs/mL de *L. boryana* y 0.33 mghs/mL de *L. edodes* contra CPB-4 y CPB-7 en solvente hidroalcohólico “tequila”) siendo mayores las concentraciones requeridas de los extractos en otros solventes para tener el mismo efecto en función del solvente utilizado. Estas propiedades funcionales de *L. boryana* fueron diferentes de aquellas presentes en *L. edodes*. En función de lo anterior, se aceptó la hipótesis planteada.

## X. CONCLUSIONES

1. El hongo comestible *Lentinula boryana* es un importante recurso genético de México con propiedades antioxidantes y antibacterianas, el cual puede ser cultivado a pequeña o gran escala.
2. Para promover la agregación de valor en el cultivo de *L. boryana*, con base en los resultados del presente estudio, se recomienda realizar extractos acuosos para la obtención de compuestos antioxidantes. En cambio, para la obtención de compuestos antibacterianos, se recomienda llevar a cabo extractos hidroalcohólicos al 35%. Asimismo, es recomendable utilizar basidiocarpos como materia prima para la obtención de los extractos, en lugar del micelio, en virtud de que se obtienen mayores rendimientos y concentración de compuestos bioactivos. Se propone profundizar en la purificación e identificación química de dichos compuestos en futuras investigaciones.
3. Se estandarizaron los métodos de elaboración de los extractos, en los cuales se determinó que los extractos acuosos de los basidiocarpos fueron los que presentaron mayor actividad antioxidante y mayor contenido de proteínas; mientras que, los extractos hidroalcohólicos al 35% de los basidiocarpos fueron los de mejor propiedad antibacteriana.
4. Se confirmó el contenido de proteínas y antioxidantes del extracto acuoso almacenado, aunque por su naturaleza tienen una vida corta de anaquel, es necesario establecer un método de conservación de las propiedades de los extractos.
5. La biomasa generada (micelio) en condiciones de agitación fue 20.5% mayor que en cultivo estático. En el medio de cultivo CYM fue 30% mayor que en PDB y 55% mayor que EMB. La mayor producción de biomasa fresca se observó en CYM, en condiciones de agitación, con 3.86 mg/mL.
6. La cepa de *Lentinula boryana* (CP-519) requirió en promedio de 180 días para su fructificación y corte, con producción promedio de 225 g por unidad de producción.
7. El mejor rendimiento de los extractos de los hongos *L. boryana* (CP-519) y *L. edodes* (CP-7) fue en agua con 252.3 mg/mL y 316.6 mg/mL, respectivamente.
8. El contenido de proteínas fue igual entre *L. boryana* (CP-519) y *L. edodes* (CP-7), existiendo diferencia entre basidiocarpos (1,900 µg/g) y micelio (950 µg/g) por gramo de muestra seca.
9. El contenido de polifenoles totales en los extractos acuosos fue mayor que en los extractos hidroalcohólicos. La concentración de alcohol tuvo un efecto inverso en la extracción de polifenoles, a mayor contenido de alcohol fue menor la extracción de los polifenoles, *L. boryana* tuvo 3.49 mgEAG/g de hongo seco.
10. En las pruebas de antioxidantes realizadas en los extractos hidroalcohólicos al 35% de los basidiocarpos se observó que en todas ellas, la de Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS, β-Carotenos y ORAC, tuvieron una concentración mayor de antioxidantes que

los extractos de los micelios respectivos. Todos los extractos de *L. boryana* tuvieron mayor concentración de antioxidantes que *L. edodes*.

11. Los extractos hidroalcohólicos de *L. boryana* y *L. edodes* del basidiocarpo tuvieron efecto bacteriostático y bactericida sobre las bacterias estudiadas. Como ejemplo de las propiedades antimicrobianas, pueden mencionarse los extractos hidroalcohólicos al 35% de basidiocarpos de *L. boryana* y *L. edodes*, requiriendo tan sólo de 1.38 mg/mL y 0.33 mg/mL, para lograr un efecto bactericida sobre *Streptococcus agalactiae* (CPB-4) y *Stenotrophomona* spp. (CPB-7), respectivamente.
12. Los extractos acuosos tuvieron el mismo efecto en las bacterias estudiadas como los extractos hidroalcohólicos, aunque requirieron mayor concentración.

## **XI. Estrategia para el aprovechamiento de los recursos genéticos de las cepas del “hongo de encino” [*Lentinula boryana* (Berk. & Mont.) Pegler] debido a sus propiedades funcionales**

Se propone un paquete tecnológico como estrategia para hacer llegar a los productores de hongos comestibles interesados en generar a partir del cultivo de hongo fresco, un producto con valor agregado. Este paquete tecnológico ayudará a los productores que quieran incursionar en el mercado de productos funcionales para explotar las propiedades intrínsecas del hongo *Lentinula boryana* y *L. edodes*, de las cuales se determinó la propiedad antibacteriana y las propiedades funcionales en base a su contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante. Este paquete tecnológico busca proporcionar a los investigadores en las áreas químico-biológicas, de medicina alternativa y expertos en otras áreas, las bases metodológicas recabadas en la presente investigación. Este paquete tecnológico brinda asesoría sobre el proceso para la implementación y elaboración de extractos de hongos comestibles con propiedades funcionales. Esta tecnología es para ser utilizada por los productores de hongos y darle un valor agregado a su producto. La presente estrategia brinda las especificaciones técnicas y científicas que avalan y permiten determinar en una etapa post cosecha otros aspectos de interés en el mercado de productos a base de hongos, como son compuestos que presentan principios activos benéficos a la salud, así como otros efectos de interés clínico o social y entre otros la posología.

Existe una **vinculación social** al presentar una forma de diversificar los productos generados por los productores de hongos comestibles. Esto contribuye a cubrir las exigencias de la sociedad mexicana de poder consumir un producto que les permita disfrutar de una mejor calidad de vida a través del consumo de productos funcionales con mayor grado de procesamiento y una presentación de ingesta más accesible y diversificada.

Es importante vincular los conocimientos obtenidos a través de la experimentación y análisis para llevarlos a la práctica y aplicarlos a través de la transferencia tecnológica para el bienestar de los productores de hongos comestibles.

Los actores de la estrategia para el procesamiento empaquetamiento y comercialización del extracto y otros productos derivados son los que se muestran en la fig. 120:

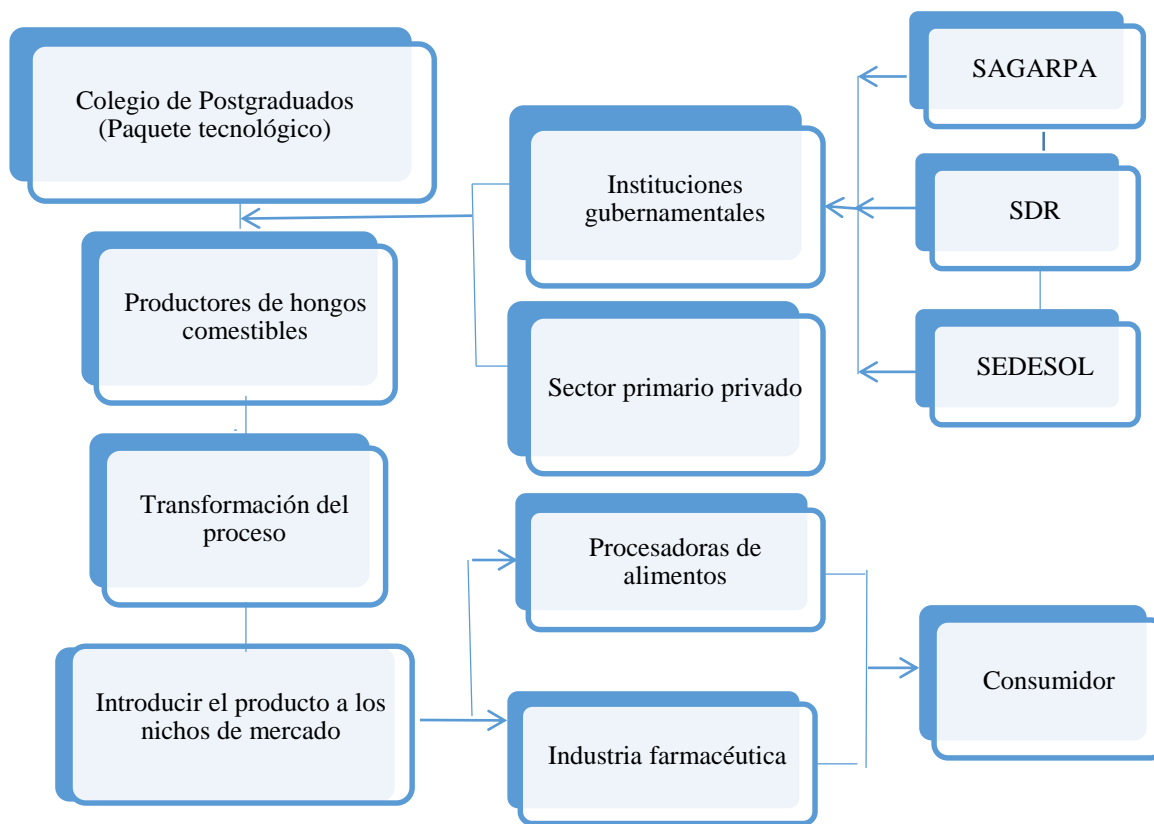
1. Productores de hongos comestibles.

2. Población en general y quienes buscan el consumo de los hongos como suplemento por las propiedades funcionales intrínsecas del mismo.
3. Instituciones académicas y de investigación que tomen este estudio como base para continuar las investigaciones en lo referente a hongos comestibles y puedan proporcionar a los productores beneficios como: especies nuevas con posibilidades de explotación comercial, micelio de calidad que garantice una producción segura y asesoramiento, una tabla nutricional que permita decidir una posología para cada persona.
4. Instituciones gubernamentales, que a través de instituciones como SEDESOL, SAGARPA, SDR, etc., aprueben a los productores proyectos dirigidos a la producción de hongos comestibles, brindando apoyos técnicos, financieros, administrativos y publicitarios, entre otros.

#### 11.1 Paquete tecnológico

El objetivo del paquete tecnológico es el poder realizar la transferencia de tecnología para la generación de uno o varios productos de hongo *Lentinula boryana* y/o *L. edodes* con valor agregado, conociendo las propiedades antioxidantes y antibacterianas del producto que ofrecen al mercado.





**Figura 124.** Actores de la estrategia para la producción y procesamiento de hongos.

Equipos requeridos para el procesamiento a partir de la cosecha de los hongos comestibles, medicinales y funcionales

- 1 Báscula granataria
- 1 Matraz Erlenmeyer o frasco de 500 ml (por muestra o solvente)
- 1 Matraz balón 250 ó 500 ml boca 24/40 (por muestra o solvente)
- 1 Matraz aforado 10, 50 ó 100 ml, dependiendo de la cantidad de muestra o concentración
- 1 Embudo filtración rápida
- 1 Papel filtro poro medio para el embudo de filtración (por muestra o solvente)
- 1 Rotavapor o destilador
- 1 bomba de vacío
- 1 trampa de vacío (para proteger la bomba de vacío)
- 1 sistema de enfriamiento de agua para el serpentín del rotavapor o destilador

Materiales

Para poder asegurar las propiedades y las concentraciones que se reportan en este trabajo, se requiere cultivar las cepas de hongo CP-7 y CP-519 en la formulación COLPOS-17 constituida por 6.43 kg de aserrín de encino, 1.23 kg de aserrín de Bursera, 1.28 kg de bagazo de caña de azúcar, 2.72 kg de olote de maíz, 2.97 kg de salvado de trigo, 450 g de Cal [Ca (OH<sub>2</sub>)] y 1800 g de yeso (CaSO<sub>4</sub>) y 26 litros de agua. La formulación presenta un pH de 6.7 y una humedad del 61.6%.

Hongo seco molido

Solvente agua y/o soluciones hidroalcohólicas

Si se produce en cantidades en el orden de 50 ml de extracto al día se puede seguir detalladamente la metodología descrita en el capítulo de mismo nombre en el presente escrito.

Si se desea procesar una cantidad mayor de extracto al día, se puede seguir la relación descrita a continuación y deberá considerar las capacidades de los equipos disponibles.

Dependiendo del compuesto que desea obtener es la metodología que debe de emplear, los compuestos se encuentran en proporción diferente según el proceso de extracción.

Procedimiento para obtener un extracto con propiedades antioxidantes:

En un recipiente de vidrio o inoxidable se pone la cantidad de hongo a procesar, se agregan 15 veces en relación peso/peso el solvente (agua destilada), se puede calentar a punto de ebullición y reposar en obscuridad por 24 horas; después de este tiempo se filtra el solvente, se exprime el bagazo de hongo y se concentra hasta que el volumen sea igual en ml que el peso inicial en gr del hongo en seco, quedando así el extracto del hongo con su propiedad antioxidante con la misma concentración que la que se trabajó en el presente estudio (1 g de hongo seco/mL).

Procedimiento para obtener un extracto con propiedades antibacterianas:

En un recipiente de vidrio o inoxidable se pone la cantidad de hongo a procesar, se agregan 15 veces en relación peso/peso Tequila (100 años blanco) y se deja reposar en un ambiente fresco < 40°C y en obscuridad por 24 horas. Después de este tiempo, se filtra el alcohol (tequila), se exprime el bagazo de hongo y se concentra hasta que el volumen sea igual en ml que el peso en gr del hongo en seco, quedando así el extracto del hongo con su propiedad antibacteriana con la misma concentración que la que se trabajó en el presente estudio (1 gr de hongo seco/mL).

Para concentrar el solvente se puede hacer según el equipo que se disponga, puede estimar 1 L para el caso de agua y 1.5 para el caso de alcohol (tequila), por rotavapor al día. Si dispone de equipos industriales como serían destiladores o tachos, debe ver las especificaciones del equipo. El envasado debe ser en frasco de vidrio color ámbar y tapa con sello que evite la evaporación del solvente.

Productos que pueden ser comercializados:

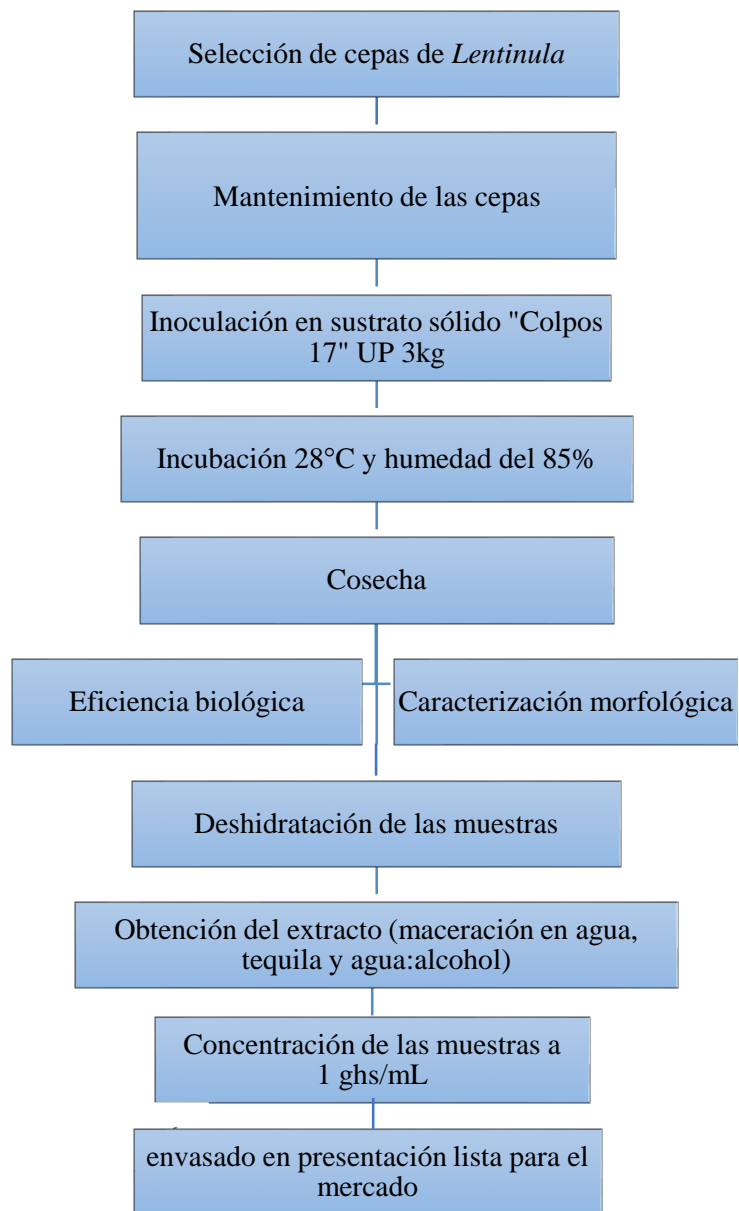
Extracto de hongo como tónico

Perlas de extracto concentrado

Extracto seco o liofilizado encapsulado.

El extracto puede hacerse concentrado pero no precisamente seco en su totalidad como sería el proceso de liofilización, se puede mezclar con un diluyente como flor de cártamo o un excipiente para agregar la posología indicada y se tenga una consistencia sólida adecuada para encapsular el extracto de hongo. Según la velocidad de disolución de un recubrimiento se puede determinar en qué lugar del tracto digestivo se presente la liberación de los compuestos activos y tenga acción el extracto.

Extractos acuosos y en tequila de los hongos comestibles y funcionales.



**Figura 125.** Principales procesos para el desarrollo de la estrategia y dar un valor agregado a los hongos comestibles, manteniendo las propiedades funcionales.

## XI. LITERATURA CITADA

- Aida, F., M. Shuhaimi, M. Yazid & A. G. Maaruf. 2009. Mushroom as a potential source of prebiotics: A review. *Trends in Food Science & Technology* 20: 567-575.
- Aminuddin, H., A. Mohd Khan, H. Abidin, K. Madzlan, R. Suri & M.K. Kamal. 2007. Optimization of submerged culture for the production of *Lentinula edodes* mycelia biomass and amino acid composition by different temperatures. *Tropical Agricultural and Food Science* 35(1): 131-138.
- Andriy, S. & N. Miroslav. 2013. Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydrates Polymers* 92: 792-809.
- Bisen, P. S., R. K. Baghel, B. S. Sanodiya, G. S. Thakur & G. B. K. S. Prasad. 2010. *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities. *Current Medicinal Chemistry* 27(22): 2419-2430.
- Brizuela, M., L. García, L. Pérez & M. Mansur. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología* 15: 69-74.
- Chang, S. T. & J. A. Buswell. 1997. Nutraceutical from mushroom. *Biotechnology* 7: 191-198.
- Chen, Y. 2008. Purification, composition analysis & antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. *Food Chemistry* 107 (1): 231-241.
- Cheung, L. M., P. C. Cheung & V. Ooi. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry* 81: 249-255.
- Cheung, L. M., C. Peter & K. Cheung. 2005. Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry* 89: 403-409.
- Choi, Y., Lee S. M., Chun J., Lee H. B. & J. Lee. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry* 99: 381-387.
- Connolly, J. D. & R. A. Hill. 1991. *Dictionary of Terpenoids*. Ed. Chapman & Hall. Vol. 1 New York. P. 2156.
- Costa de Oliveira, C. M. S. 2009. Produção de metabólitos com atividade Antimicrobiana e antioxidante de *Lentinula edodes* em cultivo submerso. Tesis. Universidade Federal do Paraná. P. 75.
- Cruz, E. 2012. Especies novedosas de champiñones (*Agaricus*) con propiedades funcionales antioxidantes y antimicrobianas, aisladas de zonas rurales de México. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. P. 93.
- De Carvalho, P. S. T., D. S. Van, E. A. Ribeiro, J. C. Germani & N. K. Ishikawa. 2007. Investigation of the antibacterial activity of basidiomycetes *Lentinula boryana* and *Lentinula edodes*. *Biociências* 15 (2): 173-179.
- Deng, J., W. Cheng & G. Yang. 2011. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*. 125:1430-1435.

- Drechsler-Santos, E. R., F. Wartchow, V. R. M. Coimbra, T. B. Gibertoni & M. A. Q. Cavalcanti. 2012. Studies on lentinoid fungi (*Lentinus* and *Panus*) from the semi-arid region of Brazil. *The Journal of the Torrey Botanical Society* 139(4):437-446.
- Environmental Protection Agency. 1996. Method 3535. Solid phase extraction (SPE). P. 13.
- Faria, R. O. & D. A. Mitchell. 2003. Cinética de crescimento micelial de *Lentinula boryana* (Berk. & Mont.) Pegler em comparação com *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. Simpósio nacional de fermentações, Florianópolis. Anais. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, P. 14.
- Faria, R. O., V. Moure, W. Balmant, M. Amazonas, N. Krieger & D. Mitchell. 2007. The Tyrosinase Produced by *Lentinula boryana* (Berk. & Mont.) Pegler Suffers Substrate Inhibition by L-DOPA. *Food Technology and Biotechnology* 45 (3): 334–340.
- Fermor, T. R. & D. A. Wood. 1981. Degradation of Bacteria by *Agaricus bisporus* and Other Fungi. *Microbiology* 126: 377-387.
- Georges, M. H. 2007. Healing mushrooms: ancient wisdom for better health. Ed. Squareone. P. 182.
- Halaouli, S., M. Asther, & K. Kruus. 2005. Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. *Journal of Applied Microbiology*. 98:332-343.
- Hardborne, J. B. 1984. *Phytochemical Methods*. 2a ed. Chapman and Hall. P.281.
- Hearst, R., D. Nelson, C. Graham, Ch. Millar, Y. Maeda, E. G. Colin, P. J. Rooney, A. Loughrey, J. R. Rao & J. E. Moore. 2009. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 15: 5–7.
- Herrmann, A. 2010. *Chemistry and Biology of Volatiles*. Chapter 3: Analysis of the Plant Volatile Fraction. John Wiley & Sons, 49-93 pp.
- Hirasawa, M., S. Naoto, T. Neta, K. Fukushima & K. Takada. 1999. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinula edodes* (Berk.) *International Journal of Antimicrobial Agents* 11: 151–157.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A. and R. L. Prior. 2002. High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:4437–4444.
- Kazue, I., M. Kasuya & D. Vanetti. 2001. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 206-210.
- Kitzberger, C., A. Smania, R. Curi & S. Ferreira. 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering* 80: 631–638.
- Lee, Y. L., Jian, S. Y., Lian, P. Y., & J. L. Mau. 2008. Antioxidant properties of extracts from a White mutant of the mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Journal of Food Composition & Analysis*, 21, 116-124.

- Sobal, M., P. Morales, M. Bonilla, W. Martínez, F. Galvan, D. Sihuana, F. Quiriz, M. Juárez, & D. Martínez-Carrera. 2010. Formulaciones para la producción intensiva de *Lentinula edodes* y *L. boryana* en México. Pp. 175-187 In: *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V. M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. 648 pp.
- Martínez-Carrera, D., N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V. M. Mora (Eds.). 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*. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. 648 pp.
- Martínez-Carrera, D., R. Leben, P. Morales, M. Sobal & A. Larqué-Saavedra. 1991. Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México. *Ciencia y Desarrollo*. Vol. XVI 96: 33-43.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla & W. Martínez. 2007. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción-consumo de los hongos comestibles. Pp. 209-224. In: *El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México*. ECOSUR-CONACYT, México, D.F.
- Martínez-Carrera, D., M. Sobal, P. Morales, W. Martínez, M. Martínez & Y. Mayett. 2004. Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales, y su contribución a la alimentación mexicana. El shiitake. Ed. Colegio de Postgraduados. P. 44.
- Mata, J. & P. H. Petersen. 2000. A new species of *Lentinula* (Agaricales) from Central America. *Mycoscience* 41: 351-355.
- Mueller, G. M. & J. P. Schmit. 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?. *Biodiversity and Conservation*. 1(16): 1-5.
- Murillo, E., O. Lombo, M. Tique & J. J. Méndez. 2007. Potencial Antioxidante de *Bauhinia Kalbreyeri* Harms (FABACEAE). *Información Tecnológica* 18: 65-74.
- Nieto-Ramírez, I. J., R. Rojas-Luna & C. Suárez. 2012. Evaluación del estípite de shiitake como aportante de fibra y bioactivos con miras a su empleo en alimentos funcionales. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. P. 333.
- Nikitina, V. E., M. Olga, Tsivileva, A. Pankratov & A. N. Bychkov. 2007. *Lentinula edodes*. Biotechnology – From Lentinan to Lectins. *Food Technolony and Biotechnology* 45(3): 230–237.
- NOM-037-FITO-1995. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones del proceso de producción y procesamiento de productos agrícolas orgánicos. Artículo 3.2.7.
- Organización de las Naciones Unidas. 1992. Convenio sobre la diversidad biológica. P. 30.
- Pal, A., Labuza T. P. & F. Diez-González. 2008. Comparison of primary predictive models to study the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures in liquid cultures and



- selection of fastest growing ribotypes in meat and turkey product slurries. *Food Microbiology* 25: 460–470.
- Pegler, D. N. 1975. The genus *Lentinula* (*Tricholomataceae* tribe *ollybieae*); *Herbarium, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey TW9 3AE, England*.
- Philippoussis, A., P. Diamantopoulou & G. Zervakis. 2002. Monitoring of mycelial growth and fructification of *Lentinula edodes* on several agricultural residues. *Mushroom Biology and Mushroom Products*. In: Sánchez *et. al.* (eds). UAEM.
- Pokorny, J., Nedyalka Y. & M. Gordon. 2003. Antioxidants in food. Ed. CRC. Press. P. 388.
- Prieto MA, Rodriguez-Amado I, Vazquez JA, Murado MA (2012).  $\beta$ -Carotene Assay Revisited. Application to Characterize and quality antioxidant and preoxidant activities in Microplate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 8983-8993.
- Ramos, A., A. Visozo, J. Piloto, A. García, C.A. Rodríguez & R. Rivero. 2003. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 87:241-246.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang & C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 1231–1237.
- Rojas, L., & I. J. Nieto. 2012. Estudio químico y de potencial antimicrobiano del estípite de shiitake (*Lentinula edodes*) y su factibilidad de empleo como ingrediente nutraceútico en la preparación de alimento aviar. Tesis Universidad Nacional de Colombia. P. 98.
- Sharapin, N. 2000. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Ed. Convenio Andrés Bello, P. 247.
- Singleton, V. L. & J. A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144–158.
- Solan, M. 2008. From reishi and maitake to the common white button, mushrooms offer an array of healing properties. *Vegetarian Times* September: 31-34.
- Solomon, P. 2005. Encyclopedia of Dietary Supplements DOI: 10.1081.
- Soriano-Santos, J., I. Guerrero-Legarreta y E. Ponce-Alquicira. 2006. Acción antioxidante de los flavonoides de frutas y verduras para la preservación de la salud. *Contactos, Revista de Educación en Ciencias e Ingeniería* 62: 46-54.
- Stamets, P. 1993. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Ed. Ten speed Press. 543 pp.
- Steinmetz, K. A. & J. D. Potter. 1991. Vegetables, fruit and cancer. 1. Epidemiology. *Cancer Causes and Control* 2: 325-357.
- Streeter, D. G., J. T. Witkowsky, G. P. Khare, R. W. Sidwell, R. J. Bauer, R. K. Robins & N. S. Lionel. 1973. Mechanism of Action of 1- $\beta$ -D-Ribofuranosyl-1,2,4-Triazole-3-Carboxamide (Virazole), A New Broad-Spectrum Antiviral Agent. *Proceedings of the National Academy of Science* 70 (4): 1174-1178.

- Sushila, D., S Ghosh, A. Das, S.K. Borthakur & N. Irabanta Singh. 2014. Antioxidative and free radical scavenging activity of ethanolic extract of *Lentinula edodes*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 7(3): 195-199.
- Synytsya, A., K. Ková, A. Synytsya, I. Jablonsky, J. Ek, V. Erban, E. Íková & J. Opíková 2009. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers* 76: 548–556.
- Talarico, L. B. 2008. La entrada del virus dengue a la célula como un potencial blanco antiviral: estudio de polisacáridos sulfatados como antivirales. *Química Viva* 2 (7): 113-133.
- Tanaka, K., Y. Matsui, S. Ishikawa and T. Kawanishi. 2012. Oral ingestion of *Lentinula edodes* mycelia extract can restore the antitumor T cell response of mice inoculated with colon-26 cells into the subserosal space of the cecum. *Oncology Reports* 27: 325-332.
- Ulrike, L. T., J. Niedermeyer & J. Wolf-Dieter. 2005. The Pharmacological Potential of Mushrooms. *eCAM* 2(3): 285–299.
- Van, C., J. Decuypere, N. Dierick and K. Molly. 2003. The influence of *Lentinula edodes* (shiitake mushroom) preparations on bacteriological and morphological aspects of the small intestine in piglets. *Archives of Animal Nutrition* 57(6): 399 – 412.
- Vaz JA, Barros L, Martins A, Santos-Buelga C, Vasconcelosb MH, Ferreira ICFR. 2011. Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. *Food Chemistry* 126: 610–616.
- Wang, D., Z. Guo, M. Xia, H. Yuanliang, H. Xiaoyan & F. Yunpeng. 2010. Effects of sulfated lentinan on cellular infectivity of avian infectious bronchitis virus. *Carbohydrate Polymers* 79: 461–465.
- Yee, H. T. & D. Moore. 1992. Convenient and effective methods for in vitro cultivation of mycelium and fruiting bodies of *Lentinus edodes*. *Mycological Research* 96 (12): 1077-1084.
- Yuichi, S., K. Naotake & S. Toshitsugu. 2012. Senescence of the *Lentinula edodes* Fruiting Body After Harvesting, Food Quality, Dr. Kostas Kapisiris (Ed.) 110 pp.
- Yukawa, H., S. Ishikawa, T. Kawanishi, M. Tamesada & T. Hironori. 2012. Direct Cytotoxicity of *Lentinula edodes* Mycelia Extract on Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 35(7): 1014–1021.
- Zhang, M., S. W. Cui, B. Cheung & Q. Wang. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology* 18: 4-19.
- Zhong, M., B. Liu, B. Liu, X. Wang, X. Li, L. Liu, A. Ning & J. Cao. 2012. The antitumor activities of *Lentinula edodes* C91-3 mycelial fermentation protein on S180 (Mouse sarcoma cell) *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Medicinal Plants Research* 6(12): P. 2488-2492.

Zuofa, Z., L. Guoying, P. Huijuan, W. Yongzhi & F. Leifa. 2009. Effects of Different Drying Methods and Extraction Condition on Antioxidant Properties of Shiitake (*Lentinus edodes*). *Food Science and Technology Research* 15(5): 547 – 552.

## Anexo I. Abreviaturas

Bact/mL	Bacterias por mililitro
Bco.	Blanco
Ctrl	Control
D.O.	Densidad Óptica
D1 – D12	Dilución 1 – Dilución 12
h	horas
mg	miligramos
MH	Mueller Hinton (medio de cultivo)
mL	mililitros
µL	microlitros
µ moles GAE/mg	micromoles de equivalente de ácido gálico / miligramo de extracto
µ mol	µg de compuesto / peso molecular (PM Ac. Gálico = 188.14g)
pe	prueba de esterilidad
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
1.0 x 10 <sup>4</sup>	10,000
1.0 x 10 <sup>8</sup>	100,000,000

## Anexo II Medios para conservación y cultivo de cepas de hongos y bacterias

La cepa de *Lentinula edodes* CP-7, se mantuvo y cultivó en medio Papa Dextrosa Agar (PDA), se preparó según las indicaciones del proveedor Bioxon. Las cepas de bacterias se mantuvieron en Mueller Hinton Agar (MHA) y para su estudio se cultivaron en Mueller Hinton Líquido (MHB), ambos medios se prepararon siguiendo las indicaciones del proveedor Bioxon. Para la fructificación del hongo *Lentinula*, se inoculó en bolsas de tres kilos con la formulación de la cuadro 37.

**Cuadro 37.** Formulaciones de sustratos suplementados para la producción intensiva de cepas del género *Lentinula*.

Ingredientes	Unidades	COLPOS-17
Bagazo de caña de azúcar <sup>a</sup>	kg	1.28
Salvado de trigo	kg	2.97
Aserrín de encino <sup>b</sup>	kg	6.43
Aserrín de <i>Bursera</i> <sup>c</sup>	kg	1.23
Olote de maíz <sup>d</sup>	kg	2.72
H <sub>2</sub> O	l	26
Cal [Ca(OH) <sub>2</sub> ]	kg	0.45
Yeso [CaSO <sub>4</sub> ]	kg	1.8
pH inicial del sustrato		6.4
humedad del sustrato estéril	%	64.49
PS	g	355.11

PS= Peso seco en 1,000 g de peso húmedo. El pH inicial corresponde al sustrato estéril. <sup>a</sup> *Saccharum officinarum* L. <sup>b</sup> *Quercus acutifolia* Neé. <sup>c</sup> *B. simaruba* (L.) Sarg. <sup>d</sup> *Zea mays* L.

Las cepas bacterianas se mantuvieron en Mueller Hinton Agar (MHA) y para su estudio se cultivaron en Mueller Hinton Líquido (MHB), ambos medios se prepararon siguiendo las indicaciones del proveedor Bioxon.

### **Metodología para el ajuste de bacterias con el archivo de excel “Cálculo de bacterias”**

1. Activar macros
2. Seleccione la bacteria a trabajar
3. Establezca las condiciones del extracto (Muestra y solvente)
4. Actualice el número de experimentos o condiciones a procesar
5. Active el botón "Actualizar condiciones"
6. En las celdas amarillas "K9" y en forma de columna escriba los nombres de los experimentos o condiciones
7. Active el botón "Crear formatos"
8. En la hoja “Distribución” se muestra la secuencia y distribución de los compuestos en la microplaca así como las celdas que se diluyen y su sentido
9. Seleccione la hoja del experimento respectivo, hacer la lectura del experimento en el espectrofotómetro "Epoch"
10. Importar los datos de lectura del "Epoch"
11. Repetir el paso 6 para todos los experimentos
12. Active el botón "Crear gráficas"
13. Seleccione la (s) hoja (s) "Gráfica . . .(nombre del experimento)" para ver su resultado