



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS PUEBLA**

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES  
Y ANTIMICROBIANAS DE DOS ESPECIES DEL HONGO  
MEDICINAL *GANODERMA* NATIVO DE MÉXICO Y SU  
CONTRIBUCIÓN AL DESARROLLO REGIONAL**

**FABIOLA ARGELIA QUIRIZ CEREZO**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PUEBLA, PUEBLA**

**2012**

---



## COLEGIO DE POSTGRADUADOS

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

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, la que suscribe **Fabiola Argelia Quiriz Cerezo** alumna 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. Porfirio Morales Almora**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Evaluación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de dos especies del hongo medicinal *Ganoderma* nativo de México y su contribución al desarrollo regional** 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 y la 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, a 05 de noviembre de 2012

Fabiola Argelia Quiriz Cerezo

Firma

Dr. Porfirio Morales Almora

Vo.Bo. Profesor Consejero

La presente tesis, titulada: **Evaluación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de dos especies del hongo medicinal *Ganoderma* nativo de México y su contribución al desarrollo regional**, realizada por la alumna: **Fabiola Argelia Quiriz Cerezo**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:

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

ASESORA:

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

ASESOR:

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

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
DR. MIGUEL SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

ASESOR:

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

Puebla, Puebla, México, a 05 de noviembre de 2012

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y  
ANTIMICROBIANAS DE DOS ESPECIES DEL HONGO MEDICINAL  
*GANODERMA* NATIVO DE MÉXICO Y SU CONTRIBUCIÓN AL  
DESARROLLO REGIONAL

Fabiola Argelia Quiriz Cerezo, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2012

Actualmente, los basidiomicetos además de ser valorados por su aportación nutrimental a la dieta humana y por su agradable sabor, son apreciados por sus propiedades funcionales. Este es el caso de *Ganoderma*, al cual se le han atribuido propiedades medicinales en el sureste de Asia. La mayoría de las investigaciones se han realizado con especies extranjeras. En México, no se han realizado trabajos acerca de la actividad biológica de especies nativas de este hongo. En el presente estudio, se evaluó la actividad bactericida y bacteriostática de extractos del basidiocarpo de dos especies del hongo medicinal *Ganoderma* sobre las cepas CPB-9 de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y CPB-8 de *Escherichia coli* (ATCC 25922). Además, se cuantificó la concentración de polifenoles totales (CPT) por el método de Folin-Ciocalteu. En todos los casos, las muestras fueron extractos del basidiocarpo de las cepas CP-145 de *G. lucidum*, CP-405 de *G. subamboinense* y CP-470 de *G. lucidum*. Para la obtención de los extractos se emplearon dos métodos de extracción: Soxhlet y maceración y tres solventes de resuspensión [agua destilada, etanol:agua [80:20] (v/v) y tequila blanco]. Se obtuvieron 12 extractos. El efecto bacteriostático en la cepa CP-145 se encontró en el extracto M2 contra *B. subtilis*, en la cepa CP-405 se encontró en el extracto A3 contra *E. coli* y en la cepa CP-470 se encontró en el extracto A3 y M3 contra *B. subtilis*. El efecto bactericida se encontró en M2 de la cepa CP-145, en A3 de la cepa CP-405 y en A3 y M3 de la cepa CP-470. La CPT más alta se encontró en la cepa CP-470 en A3 con  $291.95 \pm 14.09$  mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g basidiocarpo peso seco. El mejor solvente para obtener la mayor CPT fue el agua empleando Soxhlet. Los mejores solventes para inhibir y eliminar el crecimiento bacteriano fueron el tequila blanco y el etanol. Se registraron los parámetros de cultivo para implementar la producción de *Ganoderma* y su agregación de valor como estrategia para promover el desarrollo y fortalecimiento económico de zonas rurales.

Palabras clave: actividad antibacteriana, concentración de polifenoles totales, *G. lucidum*, *G. subamboinense*.

ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES EVALUATION OF TWO SPECIES OF *Ganoderma* NATIVE TO MÉXICO AND ITS CONTRIBUTION TO REGIONAL DEVELOPMENT

Fabiola Argelia Quiriz Cerezo, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2012

Basidiomycetes are currently being evaluated for its benefits at nutrimental diet and its great taste. They are also appreciated for their functional properties. *Ganoderma* is a mushroom with medical properties. However, the studies made with this mushroom have regularly been with foreign species. In Mexico, there aren't studies about the biological activity of native species of this mushroom. In this study the bacteriostatic and bactericidal activity from extracts basidiocarp of two species of *Ganoderma* was evaluated against two bacterial strains CPB-9 of *Bacillus subtilis* (ATCC6633) and CPB-8 of *Escherichia coli* (ATCC25922). In addition, the total poliphenolic concentration (TPC) was evaluated by Folin-Ciocalteau assay. In both cases, the extracts were obtained from basidiocarps of the strains CP-145 of *Ganoderma lucidum*, CP-405 of *G. subamboinense* and CP-470 of *G. lucidum*. Two types of extraction were used to obtain the extracts, the Soxhlet and the maceration methods and three resuspension solvents [distilled water, ethanol (80:20) and white tequila). Twelve extracts were obtained. Bacteriostatic effect in strain CP-145 was found in M2 extract against *B. subtilis*, in the strain CP-405 was observed in A3 extract against *E. coli* and in the strain CP-470 was found in A3 and M3 extracts against *B. subtilis*. Bactericidal effect was obtained in M2 for the strain CP-145, in A3 for the strain CP-405 and the A3 and M3 for the strain CP-470. The highest TPC was observed with the strain CP-470 in A3 with  $291.95 \pm 14.09$  mg EAG/g basidiocarp dry weight. The best solvent for obtaining the most important TPC was the water employed Soxhlet method. The best solvents to inhibit bacterial growth and to eliminate were ethanol and white tequila. The cultivation parameters were recorded to apply the production of *Ganoderma* and its adding value with strategy to promote the development and economic empowerment in rural areas.

Key words: antibacterial activity, *G. lucidum*, *G. subamboinense*, total poliphenolic concentration.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para poder realizar mis estudios de Postgrado.

Al Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla, por darme la oportunidad para realizar la Maestría en Ciencias en su Programa en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional.

Al grupo de investigación del área de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales del Colegio de Postgraduados integrado por el Dr. Daniel C. Martínez Carrera, el Dr. Porfirio Morales Almora, la Dra. Mercedes Sobal Cruz, la M.C. Myrna Quintero Bonilla y el Biólogo Wilfrido Martínez.

Al Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera por sus valiosas y oportunas observaciones al presente trabajo.

Al Dr. Porfirio Morales Almora por sus valiosas observaciones al presente trabajo y sobre todo por su paciencia y apoyo en todo momento.

A la Dra. Mercedes Sobal Cruz por sus valiosas observaciones y comentarios durante la revisión al presente trabajo.

Al Dr. Miguel Sánchez Hernández por su gran interés en el seguimiento y oportunas observaciones a este trabajo de investigación.

Al Dr. Hermilo Leal Lara por su participación en el Consejo Particular como asesor externo.

Al Lic. Jorge Rugerío Alvarado por su valiosa aportación en la revisión y corrección del resumen en inglés de este trabajo de investigación y por su valiosa amistad.

Al Departamento de Computación y Cuerpo Administrativo del Colegio de Postgraduados, por su valioso auxilio técnico y apoyo.

De igual forma se agradece el apoyo que brindó la Línea Prioritaria de Investigación 5 “Biotecnología Microbiana, Animal y Vegetal” proporcionando insumos del laboratorio y el bagazo de la caña de azúcar que se utilizó para elaborar la formulación COLPOS-17, la cual sirvió para cultivar los hongos comestibles estudiados.

A todas las personas con las que compartí y compartieron conmigo experiencias nuevas en mi vida, a mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles Funcionales y Medicinales, que me apoyaron en algún momento, para el desarrollo de este trabajo de investigación, en especial a la M.C. Myrna Bonilla Quintero, al Biólogo Wilfrido Martínez Sánchez, M.C. Claudia Katia Reyes Quintanar y M.C. Alan Helios Escudero Uribe. A todos ellos, gracias por su amistad y buenos consejos.

<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	3
2.1 Biotecnología y desarrollo	3
2.2 La biotecnología y los hongos	3
2.3 Generalidades de los hongos	5
2.4 <i>Ganoderma</i> spp.	6
2.4.1 <i>Ganoderma lucidum</i>	6
2.4.2 <i>Ganoderma subamboinense</i>	7
2.5 Radicales libres	7
2.5.1 Papel de los radicales libres en el organismo	8
2.5.2 Fuentes de radicales libres	8
2.5.2.1 Fuentes endógenas de radicales libres	8
2.5.2.2 Fuentes exógenas de radicales libres	9
2.5.3 Teorías sobre el envejecimiento	9
2.6 Antioxidantes	9
2.6.1 Fuentes exógenas de antioxidantes	10
2.6.2 Los polifenoles como fuente antioxidante	11
2.7 Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante	11
2.7.1 Determinación de fenoles totales por el método Folín-Ciocalteau	12
2.8 Los hongos como fuente de antioxidantes	13
2.9 Problemática de las infecciones bacterianas	13
2.10 El papel de los antibióticos en las infecciones bacterianas	14
2.11 Mecanismos de acción de los agentes antibacterianos	14
2.12 <i>Bacillus subtilis</i> como agente patógeno en la salud humana	15
2.13 <i>Escherichia coli</i> como agente patógeno en la salud humana	16
2.14 Pruebas para evaluar la sensibilidad bacteriana	16
2.15 Los hongos como fuente de compuestos antibacterianos	18
2.15.1 Terpenoides	19
2.16 <i>Ganoderma</i> como fuente de compuestos antibacterianos	19
2.17 Métodos para la extracción de compuestos bioactivos	20
2.17.1 Extracción continua o progresiva (Soxhlet)	20

2.17.2 Extracción discontinua o simultánea (macerado)	21
<b>III. MARCO DE REFERENCIA</b>	22
3.1 Producción mundial de los hongos comestibles	22
3.2 Producción nacional de los hongos comestibles	22
3.3 Importancia de los hongos comestibles	22
3.4 Importancia de los hongos medicinales	23
3.5 Evaluación de la concentración de polifenoles totales de algunos hongos	23
<b>IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b>	25
<b>V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	26
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	27
6.1 Material biológico	28
6.2 Cultivo de las especies de <i>Ganoderma</i> para la obtención de los basidiocarpos	28
6.3 Tratamiento y almacenamiento de los basidiocarpos	29
6.4 Elaboración de las muestras	29
6.5 Extracción de los principios activos	29
6.5.1 Extracción con equipo Soxhlet	29
6.5.2 Extracción por maceración	30
6.6 Proceso de concentración de los extractos	30
6.7 Resuspensión de los extractos concentrados	31
6.8 Esterilización de los extractos resuspendidos	31
6.9 Cinética de crecimiento de <i>B. subtilis</i> (ATCC6633) y <i>E. coli</i> (ATCC 25922)	32
6.10 Evaluación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las cepas de <i>Ganoderma</i>	32
6.10.1 Concentración de polifenoles totales	33
6.10.1.1 Obtención de la curva de calibración	33
6.10.1.2 Método de dilución de los extractos	34
6.10.1.3 Cuantificación de polifenoles totales en los extractos	34
6.10.2 Actividad antibacteriana	36
6.10.2.1 Medios y condiciones de cultivo para las cepas bacterianas	36
6.10.2.2 Esterilización de los solventes	37
6.10.2.3 Prueba de esterilidad de los extractos y los solventes	37

6.10.2.4 Preparación de la suspensión bacteriana	38
6.10.2.5 Ajuste del inóculo para iniciar las pruebas antibacterianas	38
6.10.2.6 Evaluación del efecto bacteriostático de los extractos contra <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Escherichia coli</i>	38
6.10.2.7 Cálculos para conocer la actividad antibacteriana de los extractos y de los solventes: resultados expresados en unidades de densidad óptica (D.O.)	41
6.10.2.8 Evaluación del efecto bactericida de los extractos contra <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Escherichia coli</i>	41
6.10.2.9 Concentración de las microdiluciones de los extractos evaluados	42
6.11 Procesamiento de los datos	44
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	45
7.1 Caracterización morfológica de los basidiocarpos de <i>Ganoderma</i>	45
7.2 Evaluación de la fase de producción a nivel de módulo experimental	47
7.3 Extractos obtenidos del basidiocarpo de dos cepas nativas de <i>Ganoderma</i>	49
7.4 Concentración de polifenoles totales en los extractos	50
7.4.1 Ensayo preliminar: concentración de polifenoles totales de extractos obtenidos de la cepa CP-405	50
7.4.2 Ensayo final: concentración de polifenoles totales de extractos obtenidos de la cepa CP-470	51
7.4.3 Ensayo final: concentración de polifenoles totales de extractos obtenidos de la cepa CP-145	52
7.4.4 Comparación de la concentración de polifenoles totales entre las cepas CP-405 y CP-470	53
7.4.5 Comparación de la concentración de polifenoles totales de los extractos macerados entre las cepas CP-145 y CP-470	54
7.5 Cinética de crecimiento de <i>B. subtilis</i> (ATCC6633) y <i>E. coli</i> (ATCC25922)	55
7.6 Evaluación del efecto bacteriostático de los extractos	56
7.6.1 Ensayo preliminar: efecto bacteriostático de los extractos de CP-405 vs <i>E. coli</i>	56
7.6.1.1 Efecto bacteriostático de extractos A1, A2 y A3 de la cepa CP-405 vs <i>E. coli</i>	56
7.6.2 Ensayo final: efecto bacteriostático de los extractos de la cepa CP-470	58

vs <i>B. subtilis</i>	
7.6.2.1 Efecto bacteriostático de los extractos A1, A2 y A3 de la cepa CP-470 vs <i>B. subtilis</i>	58
7.6.2.2 Efecto bacteriostático de los extractos M1, M2 y M3 de la cepa CP-470 vs <i>B. subtilis</i>	61
7.6.3 Ensayo final: efecto bacteriostático de los extractos de CP-145 vs <i>B. subtilis</i>	64
7.6.4 Evaluación del efecto bacteriostático de las cepas CP-145, CP-470 y CP-405	67
7.7 Evaluación del efecto bactericida	69
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	72
<b>IX. ESTRATEGIA PROPUESTA PARA EL APROVECHAMIENTO DE LOS RECURSOS GENÉTICOS DE LAS CEPAS DEL HONGO MEDICINAL <i>Ganoderma</i></b>	74
<b>X. LITERATURA CITADA</b>	79

## LISTA DE CUADROS

		Página
<b>Cuadro 1</b>	Nomenclatura de las principales especies reactivas del oxígeno (ERO) (Halliwell y Whiteman, 2004)	8
<b>Cuadro 2</b>	Métodos químicos más utilizados en trabajos de investigación con hongos comestibles para evaluar la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> .	12
<b>Cuadro 3</b>	Pruebas de sensibilidad bacteriana empleadas con frecuencia en investigaciones en condiciones <i>in vitro</i> .	17
<b>Cuadro 4</b>	Pruebas de sensibilidad bacteriana alternativas para evaluar agentes antimicrobianos en condiciones <i>in vitro</i> .	17
<b>Cuadro 5</b>	Distribución de la actividad antimicrobiana encontrada en grupos taxonómicos investigados (Aqueveque <i>et al.</i> , 2010).	23
<b>Cuadro 6</b>	Contenido de fenoles totales obtenidos de diversas especies de hongos usando el ensayo Folín-Ciocalteau.	24
<b>Cuadro 7</b>	Material biológico depositado en el CREGENHC y empleado para la cuantificación de fenoles totales y evaluación de la actividad antibacteriana.	28
<b>Cuadro 8</b>	Nomenclatura de los extractos obtenidos del basidiocarpo (peso seco) de las cepas CP-145, CP-405 y CP-470.	31
<b>Cuadro 9</b>	Diluciones realizadas para cuantificar la concentración de polifenoles totales presentes en los extractos.	34
<b>Cuadro 10</b>	Volúmenes utilizados de cada solución para evaluar el efecto bacteriostático de los extractos contra <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Escherichia coli</i> .	39
<b>Cuadro 11</b>	Concentración final de los extractos después de la resuspensión.	43
<b>Cuadro 12</b>	Concentración de la alícuota de 100 $\mu$ L para evaluar el efecto bacteriostático.	43
<b>Cuadro 13</b>	Morfología de los basidiocarpos cosechados de las cepas CP-145, CP-470 y CP-405 empleando la formulación COLPOS-17.	45
<b>Cuadro 14</b>	Eficiencia biológica (EB%), tasa de producción (TP) y períodos de tiempo registrados en la fase de producción de las cepas CP-145, CP-470 y CP-405.	48

<b>Cuadro 15</b>	Concentración de polifenoles totales presentes en los extractos obtenidos a partir del basidiocarpo de las cepas CP-405 y CP-470.	54
<b>Cuadro 16</b>	Evaluación del efecto bacteriostático de los extractos obtenidos de las cepas CP-145, CP-405 y CP-470.	68

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	<i>Ganoderma subamboinense</i> . (Springer Images, 2012).	7
<b>Figura 2</b>	Estructuras químicas de algunos polifenoles simples.	11
<b>Figura 3</b>	Metodología general de la investigación seguida en este trabajo	27
<b>Figura 4</b>	A. Extracto obtenido con equipo Soxhlet después de 10 ciclos a ebullición constante. B. Extracto obtenido con equipo Soxhlet después de 10 ciclos dividido en tres volúmenes iguales.	30
<b>Figura 5</b>	A. Macerado de la cepa CP-145 al tiempo cero (T0). B. Macerado a las 24 horas.	30
<b>Figura 6</b>	Esterilización de los extractos por método de filtración con acrodiscos.	32
<b>Figura 7</b>	Procedimiento para la obtención de la curva de calibración.	33
<b>Figura 8</b>	Disposición de la microplaca de 96 pozos para la cuantificación de la concentración de polifenoles totales.	35
<b>Figura 9</b>	Prueba de esterilidad de los extractos para descartar lecturas erróneas durante la determinación de la concentración de fenoles totales y evitar crecimiento de otros microorganismos durante la evaluación del efecto bacteriostático y el efecto bactericida.	37
<b>Figura 10</b>	Disposición de la microplaca de 96 pozos para realizar pruebas de sensibilidad antibacteriana. A1-A4: Control positivo del solvente (Mezcla inicial). A5-A8: Extracto (mezcla inicial). A9-A12: Blanco negativo del extracto (mezcla inicial). B1-F1, B2-F2, B3-F3 y B4-F4: Diluciones 1 a 5 del control positivo del solvente a partir de A1-A4. B5-F5, B6-F6, B7-F7 y B8-F8: Diluciones 1 a 5 del extracto a partir de A5-A8. B9-F9, B10-F10, B11-F11 y B12-F12: Diluciones 1 a 5 del blanco negativo del extracto a partir de A9-A12. G1-G6: Prueba de esterilidad (Caldo Mueller Hinton). H1-H6: Control de crecimiento. G7 y H7: Control negativo del solvente (mezcla inicial). G7-G12 y H7-H12: Diluciones 1 a 5 del control negativo del solvente a partir de G7 y H7.	40
<b>Figura 11</b>	Evaluación del efecto bactericida. Los alfanúmeros sombreados representan el pozo de la microplaca del cual fue tomada la muestra.	42

Los alfanúmeros no sombreados muestran la dilución a la que pertenecen los alfanúmeros sombreados.

<b>Figura 12</b>	Cuadro comparativo de cepas nativas mexicanas de <i>Ganoderma</i> con las obtenidas en otros países	46
<b>Figura 13</b>	Morfología de los basidiocarpos. A1, B1 y C1 cara anterior de las cepas CP-145, CP-405 y CP-470, respectivamente. A2, B2 y C2 cara posterior de las mismas cepas mostrando el himenio.	47
<b>Figura 14</b>	Condiciones ambientales registradas durante la fructificación de las cepas CP-145, CP-405 y CP-470 de <i>Ganoderma</i> . A. Temperaturas máximas (26°C) y mínimas (15°C). B. Humedad relativa (85%).	49
<b>Figura 15</b>	Curva de calibración utilizando ácido gálico para la cuantificación del contenido de polifenoles totales.	50
<b>Figura 16</b>	Concentración de polifenoles en extractos de <i>Ganoderma subamboinense</i> (CP-405).	51
<b>Figura 17</b>	Concentración de polifenoles en extractos de <i>Ganoderma lucidum</i> (CP-470).	52
<b>Figura 18</b>	Concentración de polifenoles en extractos de <i>Ganoderma lucidum</i> (CP-145).	53
<b>Figura 19</b>	Comparación de la concentración de polifenoles totales de los extractos macerados entre las cepas CP-145 y CP-470 de <i>Ganoderma lucidum</i> .	55
<b>Figura 20</b>	Cinética de crecimiento de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> (CPB-9) utilizada para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de las cepas CP-145 y CP-470.	55
<b>Figura 21</b>	Cinética de crecimiento de la bacteria <i>Escherichia coli</i> (CPB-8) utilizada para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de la cepa CP-405.	56
<b>Figura 22</b>	Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-8 ( <i>Escherichia coli</i> ) al contacto con los extractos A1 (Extracto acuoso resuspendido en agua) A2 (Extracto acuoso resuspendido en tequila), A3 (Extracto acuoso resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v) y M2 (Macerado en tequila blanco resuspendido en tequila blanco) obtenidos de la cepa CP-405 de <i>G.</i>	57

- subamboinense* al tiempo 0 (T0).
- Figura 23** Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-8 (*Escherichia coli*) al contacto con los extractos A1 (Extracto acuoso resuspendido en agua) A2 (Extracto acuoso resuspendido en tequila), A3 (Extracto acuoso resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v) y M2 (Macerado en tequila blanco resuspendido en tequila blanco) obtenidos de la cepa CP-405 de *G. subamboinense* a las 24 horas de incubación. 57
- Figura 24** Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-9 (*Bacillus subtilis*) al contacto con los extractos A1 (Extracto acuoso resuspendido en agua) A2 (Extracto acuoso resuspendido en tequila) y A3 (Extracto acuoso resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v) obtenidos de la cepa CP-470 de *G. lucidum* al tiempo 0 (T0). 59
- Figura 25** Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-9 (*Bacillus subtilis*) al contacto con los extractos A1 (Extracto acuoso resuspendido en agua), A2 (Extracto acuoso resuspendido en tequila) y A3 (Extracto acuoso resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v) obtenidos de la cepa CP-470 de *G. lucidum* a las 24 horas y 48 horas de incubación. 60
- Figura 26** Evaluación del efecto bacteriostático del extracto A3 (Extracto acuoso resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v) de la cepa CP-470 a las 48 horas de incubación. Los pozos enmarcados muestran nulo grado de turbidez. 61
- Figura 27** Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-9 (*Bacillus subtilis*) al contacto con los extractos M1 (Macerado acuoso resuspendido en agua), M2 (Macerado en tequila blanco resuspendido en tequila blanco) y M3 (Macerado etanólico [80:20] (v/v) resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v) obtenidos de la cepa CP-470 de *G. lucidum* al tiempo 0 (T0). 62
- Figura 28** Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-9 (*Bacillus subtilis*) al contacto con los extractos M1 (Macerado acuoso resuspendido en agua), M2 (Macerado en

tequila blanco resuspendido en tequila blanco) y M3 (Macerado etanólico [80:20] (v/v) resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v) obtenidos de la cepa CP-470 de *G. lucidum* a las 24 horas y 48 horas de incubación.

- Figura 29** Evaluación del efecto bacteriostático del extracto M3 (Macerado etanólico [80:20] (v/v) resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v) de la cepa CP-470 a las 48 h de incubación. Los pozos enmarcados muestran nulo grado de turbidez. 64
- Figura 30** Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-9 (*Bacillus subtilis*) al contacto con los extractos M1 (Macerado acuoso resuspendido en agua) y M2 (Macerado en tequila blanco resuspendido en tequila blanco) obtenidos de la cepa CP-145 de *G. lucidum* al tiempo 0 (T0). 65
- Figura 31** Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-9 (*Bacillus subtilis*) al contacto con los extractos M1 (Macerado acuoso resuspendido en agua) y M2 (Macerado en tequila blanco resuspendido en tequila blanco) obtenidos de la cepa CP-145 de *G. lucidum* a las 24 horas de incubación. 65
- Figura 32** Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-9 (*Bacillus subtilis*) al contacto con los extractos M1 (Macerado acuoso resuspendido en agua) y M2 (Macerado en tequila blanco resuspendido en tequila blanco) obtenidos de la cepa CP-145 de *G. lucidum* a las 48 horas de incubación. 66
- Figura 33** Evaluación del efecto bacteriostático del extracto M2 (Macerado en tequila blanco resuspendido en tequila blanco) de la cepa CP-145 a las 48 h de incubación. Los pozos enmarcados muestran nulo grado de turbidez. 67
- Figura 34** Evaluación del efecto bactericida para los extractos M2 (CP-145), A3 y M3 (CP-470) a las 24 horas de incubación. Ambas columnas tanto la del extracto como la del solvente (C+) muestran el efecto bactericida que se presentó contra la cepa CPB-9 de *B. subtilis*. 70
- Figura 35** Mapa conceptual de la aplicación del paquete tecnológico, intervenciones y actores participantes. 74

## I. INTRODUCCIÓN

Desde su origen, el ser humano ha procurado su bienestar y una gran parte lo ha encontrado en la naturaleza (Cortéz-Gallardo *et al.*, 2004). De esta manera, mediante su conocimiento y domesticación, los hongos han formado parte fundamental de la alimentación y salud humana. Por lo que a través del tiempo se ha generado una diversa gama cultural de alimentos a base de hongos filamentosos y levaduras tales como el queso camambert de origen francés (*Penicillium camemberti*), el koji (*Aspergillus oryzae*) bebida fermentada china, el pulque (*Sacharomyces sp.*) una bebida fermentada tradicional en México, entre otros. De la misma forma los hongos comestibles (Basidiomycetes), se han integrado a nuestra dieta en sus formas silvestres gracias al conocimiento tradicional generado. Actualmente, algunos ya son comercializados a nivel mundial. Las formas más comunes de comercialización de los hongos son la deshidratada, en salmuera, la congelada y en conserva (FAO, 1993). Los hongos también han aportado beneficios a la salud, ya que se sabe que los primeros mexicanos usaban preparaciones derivadas de hongos para acelerar la cicatrización de heridas (Goodman, 1989). Así mismo, en culturas como la china y la japonesa los hongos han sido la base de su medicina tradicional hasta la actualidad. Es a partir de este conocimiento empírico que surge el interés por generar conocimiento científico de la actividad biológica de estos organismos. De esta manera, en el transcurso de dos décadas de trabajo e investigación, se han desarrollado métodos para la extracción, fraccionamiento y purificación de diversas sustancias de los basidiocarpos y de los micelios de numerosas especies de hongos (Piqueras, 2004). Entre los hongos comestibles que destacan en estudios de sustancias bioactivas se encuentran los del género *Pleurotus* con propiedades antioxidantes (Elmastas *et al.*, 2007), antibacterianas (Karaman *et al.*, 2010); *Lentinus* con actividad antioxidante (Thetsrimuang, *et al.*, 2011) antitumoral (Wu *et al.*, 2007) entre otras y *Agaricus* con actividad antioxidante (Soares *et al.*, 2009). Por otro lado, un hongo con gran potencial de aprovechamiento medicinal y comercial es *Ganoderma*, el cual posee propiedades inmunomoduladoras (Liao *et al.*, 2008), antimicrobianas (Bhosle *et al.*, 2010; Quereshi *et al.*, 2010; Nayak *et al.*, 2010), capacidad hepatoprotectora (Li *et al.*, 2007b), antioxidante (Jia *et al.*, 2009). Este hongo aunque es comestible, la biodisponibilidad de sus compuestos bioactivos sería poca o nulumamente aprovechada por consumo directo del basidiocarpo, debido a sus características organolépticas (textura leñosa, poco masticable y sabor amargo).

El grupo de hongos comestibles es representativo de los alimentos denominados como “funcionales”, es decir, aquellos que poseen un efecto saludable más allá de su efecto puramente nutricional mostrando ventajas específicas médicas o sanitarias que incluyen la prevención y el tratamiento de enfermedades (Zaid *et al.*, 2004). Mientras que los hongos como los del género *Ganoderma* pertenecen a los “nutricéuticos” que se definen como la biomasa seca o el extracto refinado total o parcialmente del micelio y/o basidiocarpo de un hongo (no considerado tradicionalmente comestible), el cual es consumido en forma de cápsulas o tabletas, no como comida sino como un complemento alimenticio con posibles aplicaciones terapéuticas y preventivas (Wasser *et al.*, 2000). Aunque en América Latina se ha incrementado la producción y consumo de los hongos comestibles, este aumento se debe principalmente a los hongos *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* (Martínez-Carrera, 2002), por lo que es también de gran relevancia desarrollar investigaciones que den soporte científico al conocimiento generado tradicionalmente en nuestro país sobre otros hongos comestibles nativos tales como el hongo medicinal *Ganoderma*, esto con la finalidad de lograr incluirlo en la lista de los hongos de mayor producción ya sea para su uso de forma fresca o a través de productos de valor agregado. El interés por conservar la salud a través del consumo de alimentos funcionales o de “nutricéuticos” ha creado un sector demandante de productos alimenticios de origen natural (frescos o procesados) en el cual el productor y/o recolector de hongos comestibles a través de la capacitación, transferencia de conocimientos generados por instituciones de investigación en el área y de financiamientos adecuados por parte de las instituciones gubernamentales, juega un papel muy importante al colocarse como proveedor de un nuevo mercado al cual puede acceder y situar su producto obteniendo un incremento en sus ingresos mejorando no sólo su calidad de vida sino también la de sus comunidades al impulsar el desarrollo regional.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Biotecnología y desarrollo

Desde su origen, el ser humano ha procurado su bienestar y una gran parte lo ha encontrado en la naturaleza (Cortéz-Gallardo *et al.*, 2004), esto puede constatarse al realizar una revisión de como diversos procesos biológicos han sido utilizados desde la antigüedad para la transformación de materias primas desde la obtención de alimentos como producto de fermentaciones tales como bebidas y pan hasta su aplicación para el desarrollo de medicamentos de origen biológico, entre otros (Bisang *et al.*, 2009). Es así como ha surgido el concepto de biotecnología, la cual se define como la aplicación científica y tecnológica a organismos vivos, sus partes, productos y modelos destinados a la producción de conocimientos, bienes y servicios. Es una plataforma tecnológica que sirve de base para tecnologías específicas de uso concreto en actividades productivas. Existen al menos tres vías donde se producen avances sustantivos (más allá de desarrollos tan prometedores pero aún experimentales que los hace poco previsible en términos de su aplicación productiva) (OECD, 2006):

- a) El uso de técnicas de biotecnología moderna para mejorar costos y desarrollar productos tradicionales.
- b) El “diseño de nuevas especies” a partir de incorporar, con procedimientos de cierta rigurosidad (ingeniería genética), genes determinados en organismos preexistentes a fin de dotarlos de estructuras estables y/o funciones particulares.
- c) La profundización científica del funcionamiento molecular, que opera como plataforma para nuevas aplicaciones.

La biotecnología no se trata sólo de la producción de alimentos; su carácter genérico tiene aplicabilidad en una amplia gama de sectores como el agrícola, farmacéutica y medioambiental (Scranton y Schrepfer, 2003). Su marcha a otros campos de la actividad humana parece ser imparable (Winston, 2002).

### 2.2 La biotecnología y los hongos

Los hongos representan un enorme potencial como materia prima para la actividad biotecnológica. Han formado parte fundamental de la alimentación y salud humana. En general, a los hongos se les han investigado y se han usado como fuente de material

genético, moléculas y procesos metabólicos importantes que han sido aprovechados y aplicados en distintas áreas del quehacer humano, tales como la biorremediación ambiental, la farmacéutica, en el mejoramiento genético (incremento de la productividad, generación de organismos resistentes a patógenos), lo cual se traduce en beneficio para la sociedad a través de nuevos productos y procesos de producción. Tal es el caso de los hongos comestibles y medicinales los cuales presentan estrecha relación con la biotecnología a través de las técnicas de criopreservación, de la implementación de cultivos sobre substratos artificiales, de la investigación de sus propiedades funcionales, etcétera. México es considerado un país donde converge una notable diversidad biológica, ecológica y cultural. Sin embargo, los recursos humanos, económicos y de infraestructura que actualmente se dedican a la preservación de los recursos genéticos de hongos comestibles y medicinales son mínimos (Morales *et al.*, 2010). Por ello es relevante el desarrollo del Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC), en el Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla* (Sobal *et al.*, 2007).

Otro aspecto de interés es cambiar la percepción de la sociedad hacia los hongos comestibles y medicinales, ya que sólo así se logrará canalizar mayores recursos humanos, económicos y materiales para su conservación, estudio y utilización. Simultáneamente a los esfuerzos de conservación de los recursos genéticos de hongos comestibles y medicinales, es indispensable fortalecer la investigación científica básica y aplicada para resolver no tan sólo problemas de carácter cognoscitivo, sino también aquellos de posible interés social. Con el conocimiento así generado, será posible desarrollar las innovaciones que el sector y la sociedad demandan, a través de diversos procesos, técnicas, cepas comerciales, y modelos de utilidad inmediata, en los cuales el conocimiento no es un fin, sino sólo un medio. Se trata de impulsar un círculo virtuoso donde la generación de conocimiento e innovaciones promuevan el desarrollo del sector y la sociedad, y esta a su vez estimule la conservación y el estudio de los recursos genéticos de hongos comestibles y medicinales (Morales *et al.*, 2010). Las especies nuevas o novedosas identificadas representan una fuente potencial de valoración real del conocimiento tradicional, así como de nuevos genes y propiedades funcionales para la salud humana (Pérez Armendáriz *et al.*, 2010).

### 2.3 Generalidades de los hongos

Los hongos son organismos diferentes a los del reino vegetal y animal. Los hongos son organismos con núcleo que se reproducen por esporas, carecen de clorofila (por lo tanto no son fotosintéticos), se reproducen sexual o asexualmente y tienen estructuras somáticas filamentosas y ramificadas rodeadas por una pared celular hecha de celulosa, quitina o ambas (Alexopoulos, 1962).

Los hongos juegan un papel muy importante en la vida del ser humano, han estado involucrados en su alimentación y su salud (de forma benéfica o generando enfermedades). También participan substancialmente en los procesos de conservación de los ecosistemas debido a la maquinaria y composición celular que poseen. Algunos de los componentes que constituyen la pared celular de los hongos son: las glicoproteínas las cuales tienen diversas funciones como el mantenimiento de la estructura y comunicación celular, el autoreconocimiento por el sistema inmunológico protegiendo a la célula de sustancias extrañas, participando en la absorción de moléculas, transmitiendo señales al citoplasma y sintetizando y remodelando los componentes de la pared (Pontón, 2008). La alteración en la superficie celular de glicoproteínas puede por lo tanto producir profundos efectos fisiológicos. Además se han realizado diferentes estudios relacionando a las glicoproteínas con la actividad inmunomoduladora y anticancerígena. Otro componente característico de la pared celular de los hongos es la quitina la cual varía en contenido según la fase morfológica del hongo (Pontón, 2008). Se sabe que los primeros mexicanos usaban preparaciones derivadas de hongos para acelerar la cicatrización de heridas (Goodman, 1989). Recientemente, además de cicatrizante se ha demostrado que los oligómeros de la quitina y el quitosano tienen también actividades antitumorales, inmunoreguladoras, antibacterianas y antifúngicas (Shang-Hsin *et al.*, 2004). En la industria alimentaria los derivados de quitina tienen un inmenso campo de aplicación para aditivos en los alimentos como espesantes, gelificantes y emulsionantes, agentes que previenen la precipitación del vinagre, aditivos con características nutricionales, aditivos para la alimentación animal, como envoltura y recubrimiento protector de alimentos, además retrasa el envejecimiento, disminuye la oxidación, reduce las pérdidas por transpiración y protege frente al ataque de otros hongos, entre otros usos (García y Roca, 2008). Otro componente elemental es el polisacárido glucano, la mayoría de los polímeros de glucano están compuestos de unidades de glucosa con uniones  $\beta$ -1,3 (65-90%), aunque también hay glucanos con enlaces  $\beta$ -1,6,  $\beta$ -1,4,  $\alpha$ -1,3 y  $\alpha$ -1,4. El  $\beta$ -1,3-D-glucano es el componente estructural más

importante de la pared celular. Además los  $\beta$ -glucanos de basidomicetos de acuerdo a Synstya *et al.*, 2009 tienen efectos prebióticos, es decir, mejoran el crecimiento *in vitro* de ciertas bacterias presentes de forma natural en el colon tales como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*.

## **2.4 *Ganoderma* spp.**

Las especies de *Ganoderma* pertenecen al reino Fungi, división Basidiomycota, clase Homobasidiomycetes, orden Aphylloporales, familia Ganodermataceae y género *Ganoderma* (Chang, 1995; Wasser y Weis, 1999a). *Ganoderma* se caracteriza por tener basidiomas bi o perianuales, pileados, sésiles o estipitados central o lateralmente con la superficie del basidiocarpo lisa, opaca o brillante con una cutícula distintiva de color café claro a púrpura oscuro. Además, presenta poros pequeños a medianos, los tubos generalmente, son estratificados, ocráceos y a veces blanquecinos, y el contexto es blanco a color café. Su sistema hifal es di o trimítico. Generalmente, no presenta cistidios y sus basidiosporas son ovoides a elipsoides, truncadas, de grandes a muy grandes (7-25  $\mu\text{m}$  de longitud), amarillentas o de color café, con doble pared muy distintiva, la externa hialina con un exosporio cubierto de ornamentaciones y un endosporio de color café (Furtado, 1965; Básalo y Wright, 1982; Corner, 1983; Ryvarden, 2000). Éste género ha sido ampliamente estudiado debido a que algunas de sus especies poseen propiedades medicinales (Tang *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2008) y gran potencial ligninolítico (Maganhotto *et al.*, 2005). Adicionalmente, se han encontrado efectos terapéuticos acompañados de una alta capacidad antioxidante en los géneros *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma tsugae* (Mau *et al.*, 2005 a y b; Mau *et al.*, 2002b). También en este género se han encontrado metabolitos secundarios tales como los triterpenoides los cuales se han usado por la medicina tradicional china para el tratamiento del cáncer, la hepatitis, la bronquitis crónica, el asma, la hemorroides y los síntomas de fatiga (Zhong, 2004).

### **2.4.1 *Ganoderma lucidum***

El hongo *Ganoderma lucidum* es de gran tamaño, satinado al exterior y con textura leñosa. La estructura microscópica de su micelio se caracteriza por ser trimítica. *Ganoderma lucidum* es conocido con el nombre de Lingzhi en China y Reishi en Japón. Ha mostrado notable actividad farmacológica debido a su compleja composición química y a sus efectos terapéuticos contra un gran número de enfermedades humanas por lo que es una fuente importante para el desarrollo de nuevas medicinas (Shi *et al.*, 2010). Entre los compuestos

bioactivos presentes en esta especie se encuentran los ergosteroles, los triterpenoides (alcoholes y ácidos ganodéricos) y los polisacáridos ( $\beta$ -D-glucanos) (Ríos-Cañavate, 2008).

#### 2.4.2 *Ganoderma subamboinense*

El hongo *Ganoderma subamboinense* se caracteriza por presentar una superficie rugosa, con surcos concéntricos de color rojo oscuro brillante. Esta especie presenta estípites y el color de su contexto varía de marron muy pálido, marrón amarillento brillante, marrón amarillento a amarillo pálido (Loguercio-Leite *et al.*, 2005) (**Figura 1**).



**Figura 1.** *Ganoderma subamboinense* (Springer Images, 2012).

#### 2.5 Radicales libres

El concepto de radical libre ya se conocía en el área de la química orgánica en los años 50 (Boveris, 2005). Inicialmente, el término se usó para describir compuestos químicos intermediarios tanto orgánicos como inorgánicos. Fue hasta 1954 cuando Daniel Gilbert y Rebecca (Gilbert, 1981a) sugirieron que éstos radicales jugaban un papel muy importante en el ambiente biológico siendo responsables de los procesos de deterioro celular. Los radicales libres son aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una elevada inestabilidad. Esto los hace extraordinariamente reactivos y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, así como con la diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Halliwell y Gutteridge, 1989), al buscar su equilibrio electroquímico mediante reacciones de óxido-reducción (Daglia *et al.*, 2000).

### 2.5.1 Papel de los radicales libres en el organismo

Los radicales libres a concentraciones moderadas juegan un papel importante como reguladores en los procesos de comunicación y señalización intra y extracelular y proporcionan un ambiente oxidativo a las células para poder existir y desarrollarse. Las especies reactivas del oxígeno son mediadoras de funciones celulares esenciales como la expresión de genes, la fosforilación de proteínas, la activación de los factores de transcripción, la síntesis de ADN o la proliferación celular (Kamata y Hirata, 1999; Drogue, 2002; Haddad, 2002).

### 2.5.2 Fuentes de radicales libres

Los radicales libres resultan de procesos fisiológicos propios del organismo (fuentes endógenas) como el metabolismo de nutrientes, la respiración y el ejercicio, o bien son generados por factores ambientales o fuentes exógenas tales como la contaminación industrial, el tabaquismo, la radiación, los aditivos químicos en alimentos procesados y los pesticidas (Bennati *et al.*, 2008). Dentro de las Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) o ROS por sus siglas en inglés, se encuentran radicales libres y ciertas especies no radicales las cuales son oxidantes y/o se convierten fácilmente en radicales libres (**Cuadro 1**). Las ERO desempeñan un papel bivalente, ya que sobrepasados los límites oxidativos permitidos, éstas moléculas se convierten en potentes destructores celulares (Vaquero-Raya y Molero-Richard, 2005).

**Cuadro 1.** Nomenclatura de las principales especies reactivas del oxígeno (ERO) (Halliwell y Whiteman, 2004).

Radicales		No radicales	
Hidroxilo	$\text{OH}^\bullet$	Peróxidos orgánicos	ROOH
Alcoxilo	$\text{RO}^\bullet$	Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$
Hidroperoxilo	$\text{HOO}^\bullet$	Peróxido de hidrógeno	$\text{H}_2\text{O}_2$
Superóxido	$\text{O}_2^\bullet$	Ozono	$\text{O}_3$
Peroxilo	$\text{ROO}^\bullet$		

#### 2.5.2.1 Fuentes endógenas de radicales libres

Los radicales libres producidos por fuentes endógenas son el resultado de procesos fisiológicos tales como la respiración, el metabolismo de nutrientes y del ejercicio (Bennati *et al.*, 2008). También algunas ERO se generan en el proceso metabólico aerobio en la cadena de transporte de electrones formando principalmente  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ya sea como resultado de la enzima superóxido dismutasa o bien de forma espontánea. Los radicales superóxido

(O<sub>2</sub><sup>•</sup>) e hidroxilo (OH<sup>•</sup>) pueden formarse como resultado de las reacciones redox en la ubiquinona y en el complejo III (citocromo b) mitocondriales (Cardellach y Miró, 2004). Se calcula que entre el 1% y el 4% del oxígeno que se utiliza en la cadena respiratoria mitocondrial sufre una reducción incompleta y deriva en radicales libres del oxígeno.

### **2.5.2.2 Fuentes exógenas de radicales libres**

Existe una diversidad de vías por las cuales podemos adquirir o generar radicales libres. Fuentes como contaminantes (CO, solventes, hipocloritos, paraquat), drogas (antidepresivos tricíclicos, antidiabéticos), iones metálicos (hierro, cobre, cadmio, níquel, cromo, mercurio), radiaciones (UV, gamma, rayos X) el consumo de alimentos (ácidos grasos polinsaturados, glucosa), el tabaquismo (óxidos de nitrógeno [NO<sub>x</sub>]) (Elsayed y Bendich, 2001), entre otros son algunas de las vías por las que se podría suministrar al cuerpo de radicales libres.

### **2.5.3 Teorías sobre el envejecimiento**

Para poder abordar el mecanismo de acción de los radicales libres a continuación se presentan dos teorías sobre su origen y efecto, las teorías estocásticas, las cuales engloban fenómenos que integran variables aleatorias e involucran a factores exógenos como agentes perjudiciales, incluye la teoría de los radicales libres por Harman en 1956, que plantea la idea de que los radicales libres juegan un papel importante en eventos fisiológicos y particularmente, en el proceso de envejecimiento; ésta teoría se fundamentaba en que la acumulación de dichos radicales daría lugar a una lesión de las macromoléculas que, en definitiva, conduciría a los cambios propios de la edad. La teoría de los radicales libres está relacionada con la teoría del estrés oxidativo la cual describe que cuando la generación de especies reactivas supera a los mecanismos antioxidantes de regulación, se presenta el estado metabólico de estrés oxidante (Sierra-Vargas *et al.*, 2004) resultando en la alteración oxidativa de macromoléculas biológicas; y las teorías deterministas en las que se consideran variables conocidas que evolucionan de la misma manera en cada reproducción del fenómeno estudiado sin recurrir a ningún cálculo probabilístico (Toussaint, 1993).

## **2.6 Antioxidantes**

Para prevenir y proteger a los componentes celulares del daño por los radicales libres, los organismos aerobios han desarrollado un elaborado mecanismo de defensa llamado

sistema de defensa antioxidante (Diplock *et al.*, 1998; Kohen y Nyska, 2002). Existen diversas defensas a nivel celular contra los niveles elevados de radicales libres tales como las enzimas superóxido dismutasa, catalasa o glutatión peroxidasa que protegen al organismo contra las ERO (Alvarez-Parrilla *et al.*, 2007). Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, cuando está presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de este sustrato (Halliwell y Gutteridge, 1995). Como sustrato oxidable se pueden entender a la mayoría de las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas (proteínas, lípidos, carbohidratos y moléculas de ADN) (Beristain *et al.*, 2003). Los antioxidantes pueden ser clasificados de acuerdo a su mecanismo de acción en:

- Primarios: los cuales previenen la formación de nuevos radicales libres a través de su conversión a moléculas menos perjudiciales, es decir, antes de que puedan reaccionar. En este grupo se encuentran los antioxidantes endógenos enzimáticos.
- Secundarios: capturan los radicales libres evitando las reacciones en cadena. Algunos ejemplos son la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), vitamina C (ascorbato),  $\beta$ -caroteno, ácido úrico, bilirrubina, albúmina, los cuales pertenecen al grupo de los antioxidantes endógenos no enzimáticos.
- Terciarios: reparan moléculas dañadas por los radicales libres. Ejemplo de estas moléculas son la enzimas reparadoras del ADN y la metionina sulfóxido reductasa.

### **2.6.1 Fuentes exógenas de antioxidantes**

Aquellas que adquirimos a través de la dieta mediante el consumo de:

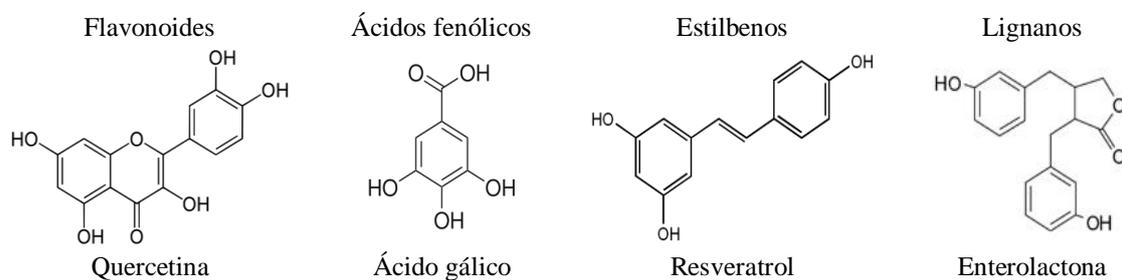
- Minerales, actúan como cofactores de enzimas que participan en la eliminación de radicales libres. Así, un déficit en cobre o zinc, disminuye la actividad de la superóxido dismutasa y aumenta la del citocromo P-450 estimulando la presencia de ERO (Powell, 2000). Un aumento de hierro intra o extracelular estimula la producción de ERO y aumenta la peroxidación lipídica y síntesis de NO.
- Lípidos, incluir ácidos grasos  $\omega$ -3 parece inhibir la producción de radicales libres aumentando la expresión de genes antioxidantes (Vertuani *et al.*, 2004).
- Proteínas, su déficit provoca la disminución en el aporte de aminoácidos como glutamina, cisteína y arginina, constituyentes de las enzimas antioxidantes.

- Vitaminas, inhiben la producción de NO<sup>\*</sup> (óxido nítrico) y otras, tienen la función de atrapar a las ERO. Las vitaminas E y C destacan por su participación al inhibir la formación de ERO y secuestrarlas.

### 2.6.2 Los polifenoles como fuente antioxidante

Hay una multitud de enfermedades que se han relacionado con el estrés oxidativo y la generación de radicales libres. Por esto, terapias antioxidantes y dietas ricas o enriquecidas con antioxidantes parecen prevenir o al menos, disminuir el deterioro funcional orgánico originado por un exceso de estrés oxidativo (Elejalde-Guerra, 2001). Así, ha surgido el interés por obtener moléculas con potencial actividad antioxidante. Los polifenoles representan un grupo de metabolitos secundarios que se encuentran abundantemente en frutas, verduras, vinos, té, aceite de oliva extra virgen, chocolate y otros productos de cocoa (Han *et al.*, 2007) así como en hongos comestibles (Soares *et al.*, 2009; Dubost *et al.*, 2007; Tseng *et al.*, 2008; Wong y Chye, 2009). Los compuestos fenólicos, química y estructuralmente, se constituyen de un anillo aromático, teniendo uno o más sustituyentes hidroxilo y van desde moléculas simples hasta compuestos fenólicos altamente polimerizados (Bravo, 1998).

Los polifenoles a su vez se subdividen en 4 grupos en función del número de anillos fenólicos y de los elementos estructurales unidos a esos anillos (Carratú y Sanzini, 2005): flavonoides (que incluyen las flavanonas, isoflavonas, flavonas, antocianidinas, flavanoles y flavonoles) los ácidos fenólicos (representados por ácido caféico, felúrico, cumárico, gálico e hidroxicinámico), estilbenos y lignanos (**Figura 2**).



**Figura 2.** Estructuras químicas de algunos polifenoles simples

### 2.7 Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante

Caracterizar la capacidad antioxidante permite conocer si el compuesto antioxidante puede atrapar, inhibir o regular la presencia de ERO. Si el compuesto resulta poco antioxidante *in*

*in vitro*, se espera que *in vivo* tenga mucho menor efecto sobre los radicales libres (Halliwell, 1994). Los métodos *in vitro* más empleados para evaluar la capacidad antioxidante de una sustancia se muestran en el **cuadro 2**.

**Cuadro 2.** Métodos químicos más utilizados en trabajos de investigación con hongos comestibles para evaluar la capacidad antioxidante *in vitro*.

Método	Autor
Contenido de fenoles totales	Arboleda-Echavarría y Mejía-Gallón, 2010; Elmastas <i>et al.</i> , 2007; Fu y Shieh, 2002; Good-Kitzberger <i>et al.</i> , 2007; Lee <i>et al.</i> , 2007; De Bruijn <i>et al.</i> , 2010; Soares <i>et al.</i> , 2009; Vaz <i>et al.</i> , 2011; Wong <i>et al.</i> , 2009; Yang <i>et al.</i> , 2002.
Actividad inhibidora del radical DPPH*	Arboleda-Echavarría y Mejía-Gallón, 2010; Elmastas <i>et al.</i> , 2007; Fu y Shieh, 2002; Good-Kitzberger <i>et al.</i> , 2007; Lee <i>et al.</i> , 2007; Liu <i>et al.</i> , 2010; De Bruijn <i>et al.</i> , 2010; Soares <i>et al.</i> , 2009; Tseng <i>et al.</i> , 2008; Vaz <i>et al.</i> , 2011; Wong <i>et al.</i> , 2009.
Actividad inhibidora del radical ABTS*	Arboleda-Echavarría y Mejía Gallón, 2010; De Bruijn <i>et al.</i> , 2010; Soares <i>et al.</i> , 2009.
Determinación de la reducción de poder	Elmastas <i>et al.</i> , 2007; Wong <i>et al.</i> , 2009; Vaz <i>et al.</i> , 2011; Tseng <i>et al.</i> , 2008; Yang <i>et al.</i> , 2002.
Efecto quelante del ion fierro	Elmastas <i>et al.</i> , 2007; Lee <i>et al.</i> , 2007; Soares <i>et al.</i> , 2009; Tseng <i>et al.</i> , 2008; Wong <i>et al.</i> , 2009; Yang <i>et al.</i> , 2002.
Actividad de captura del ion superóxido	Elmastas <i>et al.</i> , 2007; Liu <i>et al.</i> , 2010.

\*1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), ácido 2,2'azino-bis 3etilbenzotiasol 6 sinfónico (ABTS).

### 2.7.1 Determinación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu

El ensayo colorimétrico Folin-Ciocalteu ha sido utilizado durante muchos años como una medida del contenido de compuestos fenólicos totales en productos naturales y el cual puede considerarse como un método de medida de actividad antioxidante total (Prior *et al.*, 2005). El método Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. Los compuestos fenólicos oxidan al reactivo de Folin-Ciocalteu. Este reactivo contiene una mezcla de ácido fosfowolfrámico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) y de ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) en medio básico, que se reducen por oxidación de los fenoles originando óxidos de wolframio ( $W_8O_{23}$ ) y de molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ) los cuales pueden observarse a través de la coloración azul generada por la oxidación, dicha coloración es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes (Kuskoski *et al.*, 2005).

## 2.8 Los hongos como fuente de antioxidantes

Algunos compuestos antioxidantes que se pueden encontrar en los hongos son:

- Ergotioneína, es un compuesto tiol hidrosoluble (2-tioimidazol betaína) que ha despertado mucho interés por su habilidad *in vivo* para capturar el oxígeno singlete, radicales hidróxilos y peróxilos, actuando como agente protector contra el estrés oxidativo (Franzoni *et al.*, 2006). Existen muchos estudios que señalan la potencialidad de este compuesto para tratar patologías inducidas por el estrés oxidativo (Deiana *et al.*, 2004; Colognato *et al.*, 2006). Este compuesto se puede extraer con agua y concentrar fácilmente (Bao *et al.*, 2008).
- Polisacáridos, son compuestos de composición especial (carbohidratos normalmente unidos a proteínas formando complejos específicos). Se ha puesto de manifiesto que poseen propiedades antioxidantes. Aparentemente, la actividad de captación de radicales superóxidos de las fracciones de polisacáridos depende de la cantidad de proteína o péptido que tienen en sus complejos polisacárido-proteína (Liu *et al.*, 1997). Además, los polisacáridos de los hongos pueden potenciar los sistemas de defensa *in vivo* contra el daño oxidativo (Li *et al.*, 2007 a y b; Yu *et al.*, 2009).
- Fenoles, su presencia se ha correlacionado con la actividad antioxidante de los hongos (Mau *et al.*, 2002 a y b; Cheung y Cheung, 2005; Elmastas *et al.*, 2007; Jayakumar *et al.*, 2009). Sin embargo, esto no se ajusta a todas las especies debido a que los hongos presentan una gama tan amplia de colores, texturas, sabores y formas en sus cuerpos fructíferos, que resulta difícil asegurar que todos posean las mismas propiedades antioxidantes, es decir, que se generalicen los compuestos antioxidantes presentes en uno o un par de grupos para todas las especies.
- El ergosterol y sus derivados (vitamina. D<sub>2</sub>, el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-22E-ergosta-6, 22-dien-3 $\beta$ -ol, etc.) se ha demostrado que estos compuestos biológicamente activos son capaces de disminuir la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos de rata (Kobori *et al.*, 2007).

## 2.9 Problemática de las infecciones bacterianas

Las infecciones bacterianas son sumamente frecuentes y producen una gran mortalidad y morbilidad. Los fármacos antibacterianos se encuentran entre los descubrimientos más importantes ya que han cambiado de forma espectacular el curso de muchas enfermedades

reduciendo la mortalidad y morbilidad. Los antibióticos se encuentran entre los fármacos prescritos con mayor frecuencia, en parte al excelente perfil de seguridad de muchos de ellos. En consecuencia, el uso excesivo de éstos es un factor que contribuye en forma significativa al aumento de las resistencias a los antibióticos generando un problema de orden mundial (Page *et al.*, 1998). Es la aparición de cepas resistentes, lo que ha determinado el interés de la industria farmacéutica por encontrar nuevos antibióticos obtenidos de fuentes naturales que presenten una acción igual o mejor que la de los empleados actualmente y con menos efectos secundarios.

## **2.10 El papel de los antibióticos en las infecciones bacterianas**

Con el nacimiento de la farmacoterapia para tratar las enfermedades surgen los antibióticos (sustancias químicas producidas de forma natural por microorganismos) y los fármacos sintéticos (preparados en laboratorio a partir de sustancias químicas). Los antibióticos se definen como sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) como producto de su metabolismo que inhiben el crecimiento de otros microorganismos y pueden eventualmente destruirlos. Estos compuestos difieren marcadamente, entre otras cosas, en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano (Jawetz, 1989; Calderwood y Moellering, 1988; Bowman y Raud, 1987). De acuerdo al efecto que ejerzan sobre la bacteria se clasifican en:

- a) Bacteriostáticos: aquellos que inhiben la multiplicación bacteriana y su acción es reversible una vez que se suspende el tratamiento, debido a que cesa la acción del agente. Los agentes bacteriostáticos prolongan la fase estacionaria de los microorganismos, ya que es durante esta fase cuando los microorganismos buscan las condiciones que resulten óptimas para su crecimiento.
- b) Bactericida: aquellos que tienen un efecto letal sobre las bacterias, es decir, su acción terapéutica es irreversible por lo que el microorganismo “muerto” no puede reproducirse más aún cuando sea retirado del contacto del agente (Goodman y Gilman, 1998).

## **2.11 Mecanismos de acción de los agentes antibacterianos**

Para comprender en qué forma los microorganismos manifiestan resistencia a los diversos antibióticos, es importante conocer las propiedades de dichos compuestos, cómo son transportados al interior de la célula, qué alteraciones provocan en la célula bacteriana, qué

características les confieren propiedades antibacterianas y, en general, cuál es su mecanismo de acción (Fuchs *et al.*, 1994). Tres son los mecanismos básicos mediante los cuales las bacterias generan resistencia a los antibióticos: a) por inactivación del antibiótico; b) por alteración del sitio blanco del antibiótico; y c) por disminución del transporte del antibiótico al interior de la célula (Fuchs *et al.*, 1994). Los antibióticos presentan toxicidad selectiva por que interfieren con las funciones vitales de las bacterias sin afectar a las células del huésped. Para que el antibiótico ejerza su acción, es necesario que llegue al foco infeccioso, penetre en las bacterias ya sea por difusión o por transporte activo y alcance intracelularmente la concentración necesaria. De acuerdo a lo anterior, los antibióticos pueden ejercer su acción en las siguientes estructuras o funciones de las células bacterianas (Cordiés-Jackson *et al.*, 1998):

- a. Inhibición de la síntesis de la pared celular.
- b. Alteración sobre la membrana citoplásmica y afectación a su permeabilidad.
- c. Inhibición de la síntesis proteica (inhibición de la traducción y transcripción del material genético).
- d. Bloqueo en la síntesis de ácidos nucleicos.

## **2.12 *Bacillus subtilis* como agente patógeno en la salud humana**

En años recientes, la causa de las enfermedades por microorganismos ha cambiando. Han surgido patógenos nuevos o cepas más agresivas y resistentes a los antibióticos, por lo que existen microorganismos que son capaces de producir perturbaciones a la salud. Especies de *Bacillus*, han sido reconocidos como patógenos oportunistas desde finales del siglo XIX (Logan, 1988). Desde 1970, han habido varios informes de infecciones causadas por *B. subtilis* en los que la identificación de la especie ha sido confiable. Los casos que se describen incluyen: endocarditis, manifestándose después del abuso de drogas; neumonía fatal y bacteriemia en tres pacientes con leucemia (Pennington *et al.*, 1976); septicemia, en un paciente con carcinoma de mama con metástasis; en la infección de un tumor necrótico axilar en otro paciente de cáncer de mama; de los aislamientos de un derrame pleural contiguo a un absceso subfrénico de una prótesis de pecho; de varias heridas quirúrgicas (Ihde y Armstrong, 1973). Además, *Bacillus subtilis* es una bacteria que presenta relevancia clínica (OPS, 2004). También, el uso de productos de lavandería derivados de *B. subtilis* que contengan enzimas proteolíticas, ha generado casos de dermatitis y enfermedades respiratorias (Norris *et al.*, 1981). Varios episodios de intoxicaciones

alimentarias se han atribuido a *B. subtilis*, a menudo ha sido encontrado en grandes cantidades (cultivos puros >10<sup>6</sup> cfu/g) en alimentos, generalmente en platillos de carne como salchichas, empanadas de carne y pollo relleno, también se ha encontrado en pizzas y pan integral. Los síntomas de vómitos con diarrea en más de la mitad de los incidentes se produjeron después de periodos de incubación de entre 15 minutos a 10 horas (Gilbert *et al.*, 1981b; Kramer *et al.*, 1982).

### **2.13 *Escherichia coli* como agente patógeno en la salud humana**

*Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu *Escherichia* (Rodríguez-Ángeles, 2002). En años recientes, la etiología de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) ha cambiado a la vez que han surgido patógenos nuevos o cepas más agresivas y resistentes a los antibióticos. Actualmente, la industria de alimentos ha reenfocado su atención sobre éste microorganismo como una causa de morbilidad y mortalidad significativa y reconoce su valor como un indicador del estado higiénico de muchos tipos de alimentos. Por esa razón *E. coli* es uno de los patógenos que mayor atención han recibido y hacia las cuales se ha dirigido la mayor parte de las investigaciones (Rojas-Herrera y González-Flores, 2006). *E. coli* coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera parte de la flora normal, pero hay seis grupos descritos de *E. coli* productores de diarrea, los cuales se clasifican en base a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico en: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez-Ángeles, 2002).

### **2.14 Pruebas para evaluar la sensibilidad bacteriana**

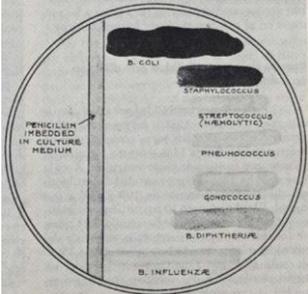
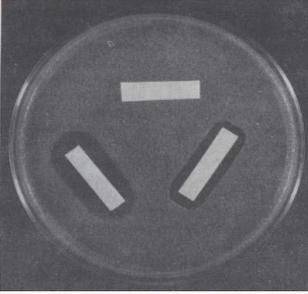
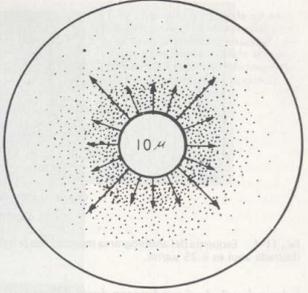
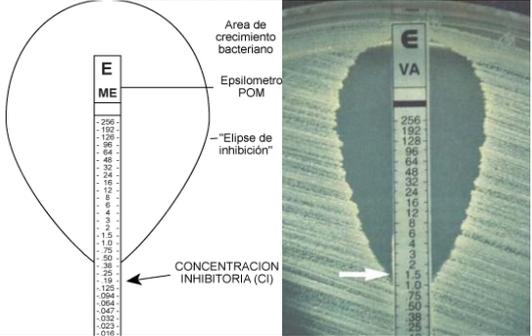
El éxito de la terapia antimicrobiana dependerá de factores bacterianos como la susceptibilidad *in vitro*, la tolerancia al antimicrobiano (bacterias susceptibles, pero con alta resistencia a la lisis) y el efecto de acuerdo a la concentración del inóculo (número de bacterias que causan la infección) (Beltrán, 2004). Estos factores pueden ser evaluados mediante ensayos que permitan conocer la sensibilidad de la bacteria al estar en contacto con el agente antibacteriano. En el **cuadro 3** se pueden ver algunos de los métodos empleados con mayor frecuencia en investigaciones para conocer el efecto antibacteriano de extractos en condiciones *in vitro*.

**Cuadro 3.** Pruebas de sensibilidad bacteriana empleadas con frecuencia en investigaciones en condiciones *in vitro*.

Método	Autor
Concentración mínima inhibitoria	Karaman <i>et al.</i> , 2010; Hayet <i>et al.</i> , 2009.
Concentración mínima bactericida	Karaman <i>et al.</i> , 2010
Difusión en agar	Zuluaga <i>et al.</i> , 2007; Good-Kitzberger <i>et al.</i> , 2007; Hayet <i>et al.</i> , 2009

En el **cuadro 4** se pueden observar otros métodos para determinar la sensibilidad de un microorganismo ante un agente antimicrobiano.

**Cuadro 4.** Pruebas de sensibilidad bacteriana alternativas para evaluar agentes antimicrobianos en condiciones *in vitro*.

Método	
En surco	
Con tiras de papel	
Prueba de Bauer-Kirby	
Test Épsilon	

## 2.15 Los hongos como fuente de compuestos antibacterianos

Los antibióticos constituyen un grupo importante de sustancias con aplicación farmacéutica. Examinando la evolución de la industria farmacéutica en la década pasada, la búsqueda de antibióticos en fuentes naturales vegetales ha decaído debido, entre otros factores, a los largos procesos de purificación y a que la estructura de los compuestos es tan compleja que dificulta el empleo de la química combinatoria para la síntesis de nuevos compuestos (Peláez, 2006). En contraste con las plantas, los hongos por sus requerimientos mínimos de nutrientes, su facilidad de crecer en cualquier sustrato, el corto tiempo (3-5 meses) en la producción tradicional para la obtención de basidiocarpos y por ser sintetizadores de compuestos con actividad antimicrobiana son una fuente atractiva para la industria. Así mismo, el auge que ha presentado últimamente el consumo de los hongos como nutra y nutriceuticos ha llevado a implementar métodos modernos de cultivo (fermentaciones en fase sólida y en medio sumergido) que permitan optimizar los resultados en un menor tiempo y con calidad superior a través de la manipulación de las variables del proceso biotecnológico, lo que representa un gran atractivo para la industria farmacéutica (Jaramillo, 2009).

Los hongos comestibles no sólo poseen propiedades nutricionales sino también medicinales (Bonatti *et al.*, 2004; Cheung y Cheung., 2005). Se han aislado compuestos antimicrobianos de diversos hongos basidiomicetos (Imtiaj y Lee, 2007) que abarcan desde componentes estructurales con actividad antitumoral e inmunológicamente activos hasta agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, reguladores del crecimiento y productores de aromas (Brizuela *et al.*, 1998). En 1941, en un estudio realizado por Anchel, Hervey y Wilkins se detectó actividad antibiótica en basidiocarpos y micelio en más de 2000 especies de hongos (Rosa *et al.*, 2003). Dentro de estos metabolitos se encuentran: diterpenos, compuestos fenólicos, polisacáridos, sesquiterpenos, p-terfenilos, fenilacetoxilados, glucanos acetilados, sales de diazonio, terpenoides, alcaloides y compuestos nitrogenados, ácidos fenilglicosídicos sustituidos, quinonas, entre otros (Brizuela *et al.*, 1998). El metabolismo secundario de los basidiomicetos es rico en terpenoides, muchos de los cuales poseen estructuras que hasta ahora sólo han sido detectadas en estos organismos y que han demostrado tener actividad antibiótica, especialmente sesquiterpenos, diterpenos y triterpenoides (Lindequist *et al.*, 2005; Zjawiony, 2009).

### 2.15.1 Terpenoides

Los terpenoides forman una gran familia estructuralmente diversa de productos naturales derivados a partir de unidades de isopreno C5 unidos cabeza-cola. La estructura típica contiene un esqueleto carbonado de (C5)<sub>n</sub>, y se clasifican como hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40) (Dewick, 2002). Los triterpenos son compuestos ampliamente difundidos en el reino vegetal y en el reino fungi y se pueden encontrar como glicósidos, ésteres o en forma libre. Por definición los triterpenos se consideran “productos naturales que tienen esqueleto de 30 átomos de carbono y que derivan del escualeno (6 unidades de isopreno) por ciclaciones y/o modificaciones de este” (Silva *et al.*, 1992). Los compuestos de tipo triterpenoidal de origen fúngico presentan interesantes propiedades biológicas de las cuales algunas ya se aplican en la farmacoterapia. Estos metabolitos secundarios forman parte de los componentes grasos, generalmente derivados del ergosterol, los cuales han recibido considerable atención por los excelentes resultados que han presentado en las pruebas farmacológicas evaluadas (Ko *et al.*, 2008).

### 2.16 *Ganoderma* como fuente de compuestos antibacterianos

Diversos estudios han demostrado que *Ganoderma lucidum* contiene componentes antibacterianos capaces de inhibir bacterias Gram positivas y Gram negativas (Wasser y Weis, 1997; Hobbs, 1995; McKenna *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2002; Suay *et al.*, 2000; Quereshi *et al.*, 2010; Karaman *et al.*, 2010). Se ha encontrado que *Ganoderma lucidum* posee enzimas bacteriolíticas como la lisozima y la proteasa ácida (Klaus y Miomir, 2007) y que extractos acuosos de cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum* pueden inhibir 15 tipos de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Parece ser que algunos componentes como la ganomicina, los triterpenoides y los extractos acuosos de especies de *Ganoderma* tienen amplio espectro de actividad antibacteriana *in vitro* contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Sanodiya *et al.*, 2009). En sólo el género *Ganoderma* se ha reportado el aislamiento de más de 130 triterpenoides oxigenados (específicamente lanostanos) obtenidos principalmente del basidiocarpo, esporas y biomasa micelial (Huie y Di, 2004). También se ha reportado la presencia de triterpenoides con esqueleto de Ergostano altamente oxidados tales como ácidos ganodéricos, ácidos ganoderénicos, ácidos ganolucídicos, ácidos lucidenicos, ganoderioles, ganoderales, entre otros (Wasser y Weis, 1999b), indicando que especies de este tipo de hongos contienen constituyentes antibacteriales (triterpenos) que inhiben bacterias Gram positivas y/o Gram

negativas (Gao *et al.*, 2005). El hongo *Ganoderma lucidum* es considerado como una vasta fuente de triterpenoides (Zhong y Xiao, 2009). Recientes investigaciones han demostrado que el sitio de acción de los terpenoides es la membrana celular, debido a su naturaleza hidrofóbica. Varios estudios han demostrado que algunos terpenoides irrumpen en la membrana celular en bacterias, alterando su fluidez al aumentar la permeabilidad, causando así un efecto bactericida.

## **2.17 Métodos para la extracción de compuestos bioactivos**

Dentro de los métodos de extracción para aislar principios activos los más importantes son:

- 1) Extracción mecánica, la cual permite obtener los principios activos disueltos en los fluidos propios del material biológico, resultando un “jugo”. Las formas por las que se obtiene este “jugo” son: exprimiendo el material vegetal, aplicando calor y por incisión;
- 2) Destilación, es una técnica que se basa en la diferente polaridad de los principios activos de la planta, permitiendo la separación de los componentes volátiles de otros no volátiles y
- 3) Extracción con solventes, consiste en separar los principios activos al ponerlos en contacto con un solvente o una mezcla de ellos capaz de solubilizar dichos principios, éstos deben pasar al disolvente obteniéndose un extracto líquido y un residuo. La extracción con solventes puede dividirse en dos grupos: la continua (Soxhlet) y la discontinua (macerados), los solventes utilizados comúnmente son agua, alcoholes, acetona y éter petróleo (Kuklinski, 2003).

### **2.17.1 Extracción continua o progresiva (Soxhlet)**

Se caracteriza porque el solvente se va renovando o recirculando y actúa sobre el material biológico en una sola dirección. Mediante estos procedimientos se puede obtener prácticamente la extracción completa de los principios activos (Sharapin *et al.*, 2000). Ejemplo de este tipo de extracción es el uso de Soxhlet:

- Soxhlet: el equipo consta de tres partes fundamentales: un refrigerante, un cuerpo extractor y un balón. En el balón se lleva a cabo la ebullición del solvente, sus vapores ascienden hasta el refrigerante donde se condensan. El condensado cae sobre la muestra, contenida en un cartucho y colocada previamente en el cuerpo extractor, y la macera hasta que el cuerpo extractor se llena y el extracto sifonea por el tubo lateral, para desembocar en el balón evaporador. Esta operación se

repite sucesivamente. El solvente se va reciclando y los principios activos se van concentrando en el balón inferior (Kuklinski, 2003).

### **2.17.2 Extracción discontinua o simultánea (macerado)**

En esta extracción, la totalidad del material biológico se sumerge en el solvente, por lo que la difusión de los principios activos se producirá en todas las direcciones hasta alcanzar el equilibrio entre la concentración del solvente y del residuo (Kuklinski, 2003). Ejemplos de este tipo de extracción son maceración, digestión, infusión y decocción.

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretende extraer. Este proceso genera dos productos, el sólido ausente de esencias y el extracto. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como del líquido de extracción (Fernaroli's, 1975). Existen dos métodos de maceración de acuerdo a la temperatura:

- Maceración en frío: consiste en sumergir el producto a macerar en un recipiente con la cantidad suficiente de solvente para cubrir totalmente lo que se desea macerar en un lapso de tiempo determinado, dependiendo de la materia prima que se vaya a macerar. Las ventajas consisten en la utilización de equipos simples que requieren mínimas cantidades de energía y la capacidad de extraer la mayoría de los compuestos (dependiendo del solvente) prácticamente en su totalidad sin alterarlos por efectos de temperatura (Fernaroli's, 1975).
- Maceración con calor: consisten en el contacto entre las fases, el producto a macerar y el solvente, sometiéndolos a temperaturas diversas. El tiempo de maceración varía mucho, ya que al utilizar calor se acelera el proceso. La desventaja es que no logra extraer totalmente pura la esencia del producto, ya que muchas veces se trata de compuestos termolábiles que se ven afectados por la temperatura, sin mencionar el consumo energético que dicho proceso implica (Fernaroli's, 1975).

### III. MARCO DE REFERENCIA

#### 3.1 Producción mundial de los hongos comestibles

Hay cerca de 80 especies de hongos comestibles que se han logrado cultivar en forma experimental, 22 de manera comercial y 10 a escala industrial. Actualmente, aunque el champiñón (*Agaricus*) ocupa el primer lugar, tanto *Pleurotus* como el *shiitake* (*Lentinula edodes*) compiten por el segundo y tercer lugar en la producción comercial de hongos comestibles a nivel mundial (Martínez-Carrera *et al.*, 2007). La mayor producción mundial de hongos comestibles esta encabezada por China, el segundo lugar lo ocupa los Estados Unidos de Norteamérica y el tercero, por Países Bajos (FAOSTAT, 2012). En América Latina los países líderes en la producción de hongos comestibles son México (58.6%), Chile (17.6%) y Brasil (10.6%) (Martínez-Carrera, 2002).

#### 3.2 Producción nacional de los hongos comestibles

La producción nacional estimada de hongos comestibles en nuestro país en el año 2009 fue de 46,533.2 toneladas de producto fresco, cifra menor a la obtenida en el año 2004. Los principales hongos en el mercado son en orden de producción el champiñón (43,595 toneladas), las “setas” (2,920 toneladas) y el *shiitake* (18.2 toneladas) (Martínez-Carrera y López Martínez, 2010).

#### 3.3 Importancia de los hongos comestibles

Los hongos comestibles representan una excelente fuente alimenticia y de compuestos bioactivos. Es debido a estas características que han adquirido gran interés económico a nivel internacional, nacional y local. En nuestro país, a nivel local, el cultivo de hongos comestibles en comunidades rurales es una actividad importante con múltiples beneficios (Garibay-Origel *et al.*, 2010). Una ventaja destacable es la socioeconómica, ya que a partir de la venta de este tipo de alimentos el productor y/o recolector obtiene una mayor participación en el precio final siendo ésta del 53.4-59.7% comparada con la obtenida por la venta de productos agrícolas del sector primario que es del 12-54% (Martínez-Carrera y López-Martínez, 2010). En este aspecto, el conocimiento micológico tradicional también juega un papel muy importante, ya que a partir de éste se conocen los usos destinados a cada hongo, aprovechándose los recursos naturales nativos de nuestro país (Garibay-Origel, *et al.*, 2010).

### 3.4 Importancia de los hongos medicinales

Dentro de los microorganismos reportados como productores de metabolitos biológicamente activos, los basidiomicetos constituyen una clase de hongos representada por más de 30,000 especies cuyo metabolismo y capacidad de producción ha sido apenas investigada (Anke, 1989). Los primeros trabajos en los que se emplearon basidiomicetos fueron los realizados por Anchel, Hervey y Wilkins en 1941, quienes examinaron extractos de basidiocarpos y cultivos miceliales de más de 2,000 especies de hongos (Florey, 1949). Desde entonces, los basidiomicetos han sido considerados una fuente de nuevos antibióticos o metabolitos secundarios no explotada (Rosa *et al.*, 2003). Dentro de los metabolitos encontrados en los hongos se encuentran los terpenos, especialmente, diterpenoides, triterpenoides y sesquiterpenoides, los cuales pueden presentar actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y antitumoral (Silva, 1992) y los poliketidos (propiedades antibióticas, anticancerígenas, antifúngicas e inmunosupresivas). En el **cuadro 5** se pueden observar los grupos taxónomicos más investigados con respecto a su actividad antimicrobiana.

**Cuadro 5.** Distribución de la actividad antimicrobiana encontrada en grupos taxónomicos investigados (Aqueveque *et al.*, 2010).

Orden	No. de especies	No de cepas activas	No. de cepas con actividad antibacteriana	No. de cepas con actividad antifúngica
<i>Agaricales</i>	45	27	20	21
<i>Boletales</i>	14	10	10	6
<i>Cortinariales</i>	13	8	7	7
<i>Ganodermatales</i>	5	0	0	0
<i>Hymenochaetales</i>	3	3	0	3
<i>Polyporales</i>	31	18	15	15
<i>Russulales</i>	4	1	1	0
<i>Schizophyllales</i>	6	2	1	1
<i>Sterales</i>	23	16	12	15
<i>Thelephorales</i>	2	0	0	0
<i>Tremellales</i>	3	2	1	2
<b>Total</b>	149	87 (58.3 %)	67 (44.9 %)	70 (46.9 %)

### 3.5 Evaluación de la concentración de polifenoles totales de algunos hongos

Varios autores han reportado diferentes valores en el contenido de fenoles totales presentes entre especies diferentes o iguales de hongos, lo que demuestra que existen diversos factores involucrados que influyen en la variabilidad de los resultados obtenidos. A continuación se citan algunos resultados en donde se uso agua, etanol o metanol como solvente extractante y se empleó el método de Folín-Ciocalteau para la cuantificación de polifenoles totales (**Cuadro 6**).

**Cuadro 6.** Contenido de fenoles totales obtenidos de diversas especies de hongos usando el ensayo Folín-Ciocalteau.

Solvente	Muestra	Género y especie	mg Ác. gálico/g de extracto	Rendimiento de extracción (%w/w)	Referencia
Agua		<i>Hypsizigus marmoreus</i>	30.08 ± 0.45 : frío	41.3 ± 0.22	Lee <i>et al.</i> , 2007
			19.2 ± 0.26: caliente	48.2 ± 0.13	
		<i>Ganoderma tsugae</i>	40.86 ± 0.04: maduro	6.22	Mau <i>et al.</i> , 2005b
42.34 ± 0.03: joven	9.91				
Metanol	Basidiocarpo	<i>Agaricus bisporus</i>	13.1 ± 0.1	---	Elmastas <i>et al.</i> , 2007
		<i>Agaricus braziliensis</i>	28.82 ± 2.04: maduro	31.65 ± 3.67	Soares <i>et al.</i> , 2009
			29.64 ± 0.91: joven	28.14 ± 1.97	
		<i>Boletus badius</i>	17.5 ± 0.1	---	Elmastas <i>et al.</i> , 2007
		<i>Dictyophora indusiata</i>	16.28 ± 0.43	30.90	Mau <i>et al.</i> , 2002a
		<i>Flammulina velutipes</i> (blanca)	8.38 ± 0.22	38.1	Yang <i>et al.</i> , 2002
		<i>Flammulina velutipes</i> (amarilla)	9.26 ± 0.04	43.9	Yang <i>et al.</i> , 2002
		<i>Ganoderma tsugae</i>	24.0 ± 0.15: maduro	8.46	Mau <i>et al.</i> , 2005a
			30.5 ± 0.5: joven	9.79	
		<i>Grifola frondosa</i>	12.31 ± 0.10	20.86	Mau <i>et al.</i> , 2002a
		<i>Hericium erinaceus</i>	12.05 ± 0.07	25.49	Mau <i>et al.</i> , 2002a
		<i>Hygrocybe conica</i>	42.21 ± 4.57	8.08 ± 2.07	Wong y Chye, 2009
		<i>Lentinula edodes</i> (271)	6.27 ± 0.02	18.8	Yang <i>et al.</i> , 2002
		<i>Lentinula edodes</i> (Tainung 1)	9.11 ± 0.07	15.9	Yang <i>et al.</i> , 2002
		<i>Lepista nuda</i>	7.7 ± 0.1	---	Elmastas <i>et al.</i> , 2007
		<i>Pleurotus cystidiosus</i>	10.24 ± 0.04	19.5	Yang <i>et al.</i> , 2002
		<i>Pleurotus "florida"</i>	23.84 ± 0.50	10.32 ± 1.98	Wong y Chye, 2009
		<i>Pleurotus ostreatus</i>	12.1 ± 0.1	---	Elmastas <i>et al.</i> , 2007
		<i>Pleurotus ostreatus</i>	1.57 ± 0.10	16.9	Yang <i>et al.</i> , 2002
		<i>Pleurotus porrigens</i>	0.83 ± 0.05	3.09 ± 1.76	Wong y Chye, 2009
		<i>Polyporus squamosus</i>	13.9 ± 0.1	---	Elmastas <i>et al.</i> , 2007
		<i>Polyporus tenuiculus</i>	16.85 ± 2.39	15.40 ± 1.56	Wong y Chye, 2009
		<i>Russula delica</i>	26.0 ± 0.3	---	Elmastas <i>et al.</i> , 2007
		<i>Schizophyllum commune</i>	25.03 ± 2.53	7.89 ± 0.89	Wong y Chye, 2009
		<i>Tricholoma giganteum</i>	7.61 ± 0.02	27.78	Mau <i>et al.</i> , 2002a
		<i>Verpa cónica</i>	17.2 ± 0.3	---	Elmastas <i>et al.</i> , 2007
<i>Xerula furfurácea</i>	27.15 ± 3.79	16.98 ± 0.88	Wong y Chye, 2009		
Etanol		<i>Agaricus bisporus</i>	0.63 ± 0.22	---	Fu y Shieh, 2002
		<i>Flammulina velutipes</i>	0.75 ± 0.13	---	Fu y Shieh, 2002
		<i>Hericium erinaceus</i>	0.46 ± 0.11	---	Fu y Shieh, 2002
		<i>Hypsizigus marmoreus</i>	0.67 ± 0.14	---	Fu y Shieh, 2002
		<i>Hypsizigus marmoreus</i>	12.9 ± 0.95	17.1 ± 0.32	Lee <i>et al.</i> , 2007
		<i>Lentinula edodes</i>	0.49 ± 0.11	---	Fu y Shieh, 2002
		<i>Pleurotus eryngii</i>	0.44 ± 0.11	---	Fu y Shieh, 2002
		<i>Pleurotus ostreatus</i>	0.39 ± 0.12	---	Fu y Shieh, 2002
		<i>Volvariella volvacea</i>	0.73 ± 0.11	---	Fu y Shieh, 2002
		Acuoso	Micelio	<i>Ganoderma tsugae</i>	41.03 ± 0.12
Metanol	Micelio	<i>Ganoderma tsugae</i>	35.6 ± 0.34	40.64	Mau <i>et al.</i> , 2005a
Agua	Medio fermentado	<i>Ganoderma tsugae</i>	41.30 ± 0.05	83.57	Mau <i>et al.</i> , 2005b
Metanol	Medio fermentado	<i>Ganoderma tsugae</i>	30.7 ± 0.40	79.30	Mau <i>et al.</i> , 2005a

#### IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Los hongos representan un enorme potencial como materia prima para la actividad biotecnológica, la cual se traduce en beneficio para la sociedad. Además, son uno de los recursos biológicos poco explorados en el país. A nivel internacional se les han investigado y se han usado como fuente de material genético, moléculas y procesos metabólicos importantes que han sido aprovechados. En México, las investigaciones sobre el hongo medicinal *Ganoderma* se han desarrollado en torno a su caracterización fenotípica, etnomicológica y geográfica. Por ello es nulo el conocimiento generado sobre sus potencialidades como poseedores de moléculas bioactivas. Además de que su cultivo todavía no tiene producción consistente y sólo se tienen registradas pruebas a escala precomercial (Martínez-Carrera, 2007). Las especies nuevas o novedosas identificadas representan una fuente potencial de valoración real del conocimiento tradicional, así como de nuevos genes y propiedades funcionales para la salud humana (Pérez Armendáriz *et al.*, 2010). Finalmente, aunque a mediano y largo plazo, la aplicación de la biotecnología moderna y las ciencias genómicas (transformación genética, genómica, metabolómica, proteómica, secretoma) a los recursos genéticos nativos tendrá un notable impacto sobre los hongos comestibles y medicinales al convertirlos en auténticas fábricas microbianas para la producción de medicinas (proteínas) recombinantes, así como en sistemas microbianos para la biorremediación *in situ* y la biodegradación/bioconversión de subproductos lignocelulósicos (Morales *et al.*, 2010). Es por esto que a través de este trabajo de investigación se desarrollaron aplicaciones biotecnológicas (cultivo, actividad antibacteriana y contenido de fenoles totales) de las especies de *Ganoderma subamboinense* y *G. lucidum* nativas de nuestro país, con la finalidad a largo plazo, de poder aplicarlas a la generación de nuevos productos con valor agregado para el beneficio de la sociedad mexicana y, particularmente, para el beneficio de los productores de hongos comestibles de la región de Puebla, al tener una opción más para incrementar sus ingresos, ya sea como proveedores de materia prima (basidiocarpos) o como generadores de estos productos.

## V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

- Existen diferencias en las propiedades antioxidantes y antimicrobianas entre las cepas y las especies estudiadas del hongo medicinal *Ganoderma* nativo de México.

### Objetivo general

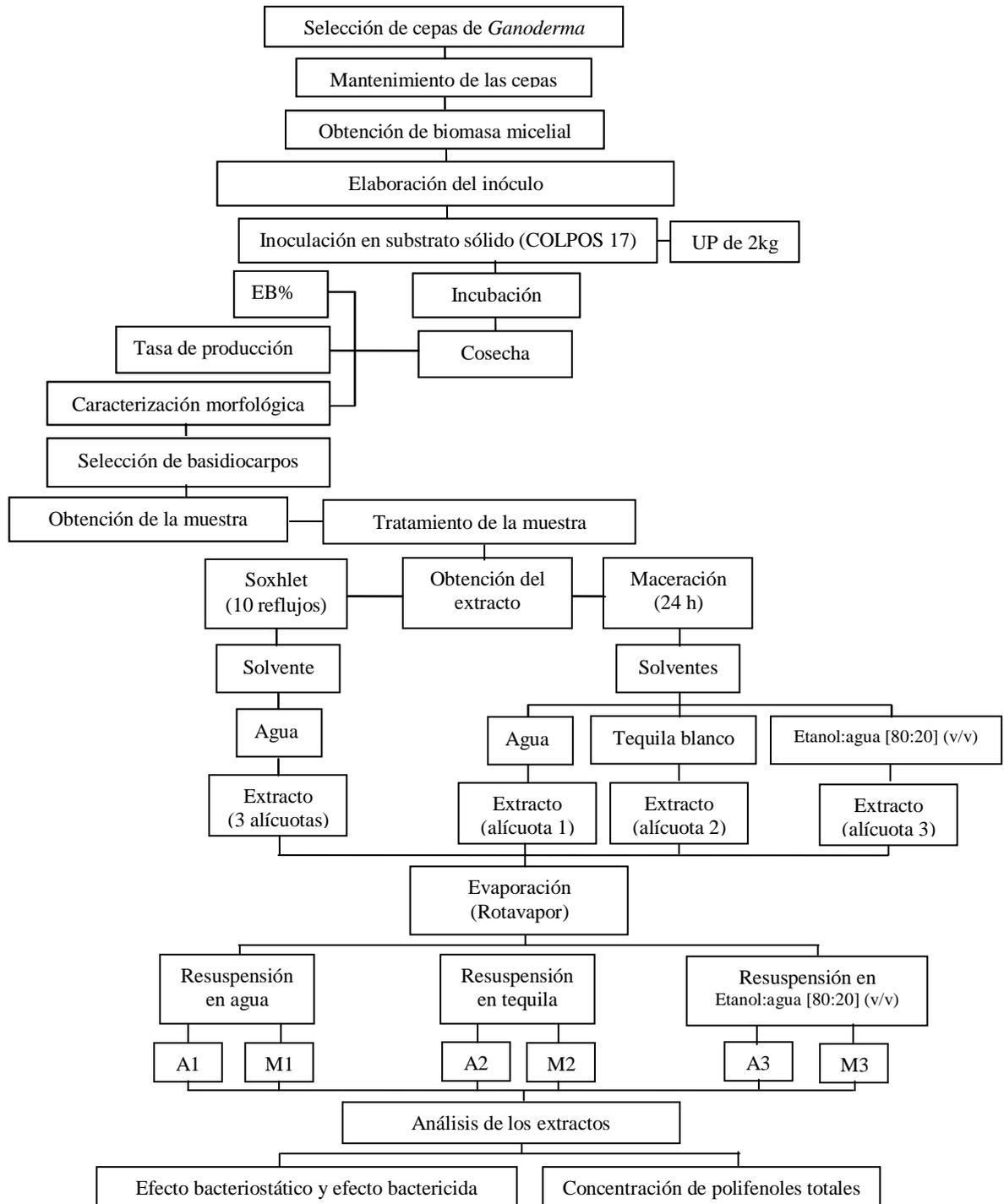
- Determinar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de dos especies nativas de México correspondientes a las cepas CP-145 de *Ganoderma. lucidum*, CP-405 de *G. subamboinense* y CP-470 de *G. lucidum*.

### Objetivos particulares

- Obtener los basidiocarpos de las cepas seleccionadas de *Ganoderma* .
- Evaluar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las cepas.
- Desarrollar una estrategia para promover la producción del hongo medicinal *Ganoderma* en el sector rural mexicano, incluyendo mecanismos de agregación de valor.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Medicinales y Funcionales y módulo experimental, del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. El diagrama general de trabajo se muestra en la **figura 3**.



**Figura 3.** Metodología general de la investigación seguida en este trabajo.

## 6.1 Material biológico

El material biológico usado en este trabajo de investigación fue obtenido del Centro de Recursos Genéticos del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. En el **cuadro 7** se menciona el material biológico utilizado.

**Cuadro 7.** Material biológico depositado en el CREGENHC y empleado para la cuantificación de polifenoles totales y evaluación de la actividad antibacteriana.

Cepa	Clave	Procedencia	Tinción
<b>I. Hongos comestibles</b>			
<i>Ganoderma lucidum</i>	CP-145	Morelos	
<i>Ganoderma subamboinense</i>	CP-405	México	
<i>Ganoderma lucidum</i>	CP-470	México	
<b>II. Bacterias</b>			
<i>Escherichia coli</i> (Migula) Castellani y Chalmers ATCC 25922	CPB-8	ATCC	Gram -
<i>Bacillus subtilis</i> (Nakamura) ATCC 6633	CPB-9	ATCC	Gram +

CPB= Colegio de Postgraduados, sección bacterias. ATCC= American Type Culture Collection.

## 6.2 Cultivo de las especies de *Ganoderma* para la obtención de los basidiocarpos

Las cepas estudiadas se conservaron y resembraron cada 3 meses en medio de cultivo EMA (Agar Extracto de Malta). La obtención de los basidiocarpos se realizó con la finalidad de determinar la concentración de los polifenoles totales y conocer la actividad antibacteriana de las cepas de estudio. Además, a partir de las cosechas realizadas se evaluó la producción y la eficiencia biológica (EB%) de dichas cepas. El inóculo se preparó de acuerdo a la metodología propuesta por Martínez-Carrera *et al.* (1988) y la elaboración del sustrato (formulación COLPOS-17) de acuerdo a Sobal *et al.* (2010). Se obtuvieron finalmente 10 réplicas por cepa estudiada. La incubación de las unidades de producción de 2 Kg cada una se mantuvo a una temperatura máxima de 25°C y una mínima de 15°C hasta observar la aparición de primordios (12-48 días) y posteriormente, se trasladaron al módulo experimental bajo condiciones óptimas de humedad (85%), temperatura (máxima 26°C y mínima de 15°C), luz y aireación hasta que los basidiocarpos estuvieran listos para la cosecha. El peso seco y pH del sustrato se determinaron de acuerdo a las metodologías utilizadas en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles Medicinales y Funcionales del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. Se describieron las características cualitativas y cuantitativas tales como tipo de crecimiento del basidiocarpo, color, largo y ancho, forma, textura, presencia de laca, color del himenio, largo y ancho del estípite y la presencia de contaminación. Se usaron las cartas de color

Pantone 2011 para referir el color de los hongos producidos. La eficiencia biológica (EB) y tasa de producción (TP) se calcularon de acuerdo a Royse (1985), en donde, la eficiencia biológica fue el resultado del peso fresco de basidiocarpos producidos entre el peso seco del substrato utilizado al momento de la inoculación, multiplicado por 100 y, la tasa de producción es el resultado de dividir la eficiencia biológica entre el ciclo total de producción (días).

### **6.3 Tratamiento y almacenamiento de los basidiocarpos**

Una vez caracterizados los basidiocarpos se procedió cortarlos en tiras y después colocarlos en charolas dentro de un horno (Felisa, México) por un periodo de 48 a 72 h a 40°C (Mau *et al.*, 2005b). Posteriormente, los basidiocarpos secos se pesaron en una balanza analítica (OHAUS, E.U.A). Finalmente, fueron almacenados en bolsas de plástico etiquetadas con los siguientes datos: fecha de siembra, fecha de cosecha, substrato utilizado y número de la réplica de la unidad de producción (UP) cosechada hasta su uso.

### **6.4 Elaboración de las muestras**

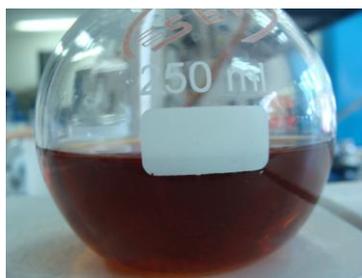
Se pesaron 10 g de basidiocarpo seco de cada una de las cepas y se molieron en minivasos (ROSAN ®) de 200 mL para licuadora (Osterizer ®) hasta obtener un tamaño de partícula lo más fina posible. La muestra molida se colocó en sobres de papel filtro de 6.0 cm de ancho x 9.5 cm de largo que posteriormente fueron sellados perfectamente.

### **6.5 Extracción de los principios activos**

Se emplearon dos métodos de extracción, el primero con equipo Soxhlet (Prendo, PC1500 6x6) y el segundo por maceración. Los solventes utilizados para la extracción fueron: agua destilada estéril, tequila blanco (100 años ®) y etanol (Fermont) etanol:agua [80:20] (v/v).

#### **6.5.1 Extracción con equipo Soxhlet**

La muestra de 10 g basidiocarpo peso seco contenida en el papel filtro se colocó dentro de la cámara de extracción del equipo Soxhlet (Prendo, PC1500 6x6). Posteriormente, se agregaron 150 mL de agua destilada estéril en el matraz bola de fondo plano y se inició el funcionamiento del equipo, realizando 10 ciclos a temperatura de ebullición. Al final de los ciclos, el extracto se dividió en tres volúmenes iguales, los cuales se distribuyeron en matraces bola de fondo plano para su posterior concentración (**Figura 4**). De esta forma, se extrajeron los principios activos del basidiocarpo de las cepas CP-405 y CP-470.



**A**



**B**

**Figura 4.** A. Extracto obtenido con equipo Soxhlet después de 10 ciclos a ebullición constante. B. Extracto obtenido con equipo Soxhlet después de 10 ciclos dividido en tres volúmenes iguales.

### 6.5.2 Extracción por maceración

Para obtener el extracto por maceración, las muestras de 10 g basidiocarpo peso seco contenidas en los sobres de papel filtro se colocaron en un frasco estéril de vidrio con tapa de rosca de 200 mL y en seguida a cada frasco se le agregó 150 mL de solvente, al primero se le agregó agua destilada estéril, al segundo se le adicionó tequila blanco y al último, se le agregó etanol:agua [80:20] (v/v) (**Figura 5**).



**A**



**B**

**Figura 5.** A. Macerado de la cepa CP-145 al tiempo cero (T0). B. Macerado a las 24 horas.

El tiempo de maceración fue de 24 horas en condiciones de obscuridad y a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se procedió a la concentración del extracto. Por este método se extrajeron los principios activos del basidiocarpo de la cepa CP-145 por maceración con tequila y agua, CP-405 por maceración con tequila y la cepa CP-470 por maceración con agua destilada estéril, tequila blanco y etanol:agua [80:20] (v/v).

### 6.6 Proceso de concentración de los extractos

Los extractos obtenidos tanto por maceración como por Soxhlet fueron concentrados utilizando un rotavapor (HAHNVAPOR, modelo HS: 2000NS) a 40°C y 90 rpm hasta obtener un concentrado de aproximadamente 1mL. Los concentrados obtenidos fueron resuspendidos en diferentes solventes.

## 6.7 Resuspensión de los extractos concentrados

Una vez concentrados los extractos, estos fueron resuspendidos en diferentes solventes. El volumen de resuspensión varió de acuerdo a la cepa debido a que se pretendió conocer el comportamiento de los extractos empleando dos diferentes concentraciones. Los concentrados obtenidos a partir de la cepa CP-405 fueron resuspendidos en 100 mL del solvente y los concentrados de las cepas CP-145 y CP-470 se resuspendieron en 10 mL del solvente. Como solventes se emplearon agua destilada estéril, tequila blanco y etanol:agua [80:20] (v/v). Se obtuvieron 12 resuspensiones, de las cuales dos pertenecieron a la cepa CP-145, cuatro a la cepa CP-405 y seis a la cepa CP-470. Para facilitar el manejo de los datos se estableció una nomenclatura para identificar a las resuspensiones de acuerdo a su método de extracción y el solvente con el que fueron resuspendidas (**Cuadro 8**). Las resuspensiones se prepararon al momento de llevar a cabo las pruebas de sensibilidad bacteriana, sin que transcurriera para esto más de 24 horas.

**Cuadro 8.** Nomenclatura de los extractos obtenidos del basidiocarpo (peso seco) de las cepas CP-145, CP-405 y CP-470.

Clave	Descripción de la resuspensión
A1	Extracto acuoso resuspendido en agua
A2	Extracto acuoso resuspendido en tequila blanco
A3	Extracto acuoso resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v)
M1	Macerado acuoso resuspendido en agua
M2	Macerado en tequila blanco resuspendido en tequila blanco
M3	Macerado etanólico [80:20] (v/v) resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v)

De la cepa CP-145 se evaluaron las resuspensiones M1 y M2, de la cepa CP-405 las resuspensiones evaluadas fueron la A1, A2, A3 y M2. Finalmente, se obtuvieron las resuspensiones A1, A2, A3, M1, M2 y M3 para la cepa CP-470.

## 6.8 Esterilización de los extractos resuspendidos

Los extractos fueron esterilizados por filtración empleando acrodiscos (Acrodisc® Syringe Filter 0.45µm HT Tuffryn® Membrane Low Protein Binding Non-Pyrogenic PN 4184). Esto se realizó pasando a través de un filtro el extracto con ayuda de una jeringa estéril (**Figura 6**). El extracto estéril obtenido se colocó en un tubo falcon de 14 mL y se almacenó a 4°C hasta su uso. Para todos los extractos se realizó el mismo procedimiento.



**Figura 6.** Esterilización de los extractos por método de filtración con acrodiscos.

### **6.9 Cinética de crecimiento de *B. subtilis* (ATCC 6633) y *E. coli* (25922)**

Para realizar las cinéticas de crecimiento de *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* se preparó el inóculo de cada una de las cepas. Dicho inóculo se obtuvo tomando una azada de la bacteria crecida previamente en agar Muller Hinton (Bioxon) con 24 horas de incubación e inoculandola en 20 mL de caldo Muller Hinton (DIFCO). Las condiciones de incubación del inóculo se mantuvieron a 4°C y a 230 rpm en un incubador orbital MaxQ4000 (Thermo Scientific) por 14 horas. Posteriormente, de éste inóculo se tomó 1 ml y se sembró en un nuevo matraz con 20 mL del mismo medio estéril y se incubó bajo las mismas condiciones. A continuación, se tomaron dos muestras de 100 µL a partir del tiempo 0 hasta las 48 horas de incubación y fueron depositadas en tubos eppendorff. Una de las muestras se utilizó para medir la concentración bacteriana mediante la lectura de la densidad óptica (D.O.) con el espectrofotómetro EPOCH (Biotek, USA) y la otra para realizar el conteo bacteriano (UFC) en la cámara de Neubauer. Ambas muestras fueron medidas y contadas al instante para observar la verdadera concentración bacteriana.

### **6.10 Evaluación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las cepas de *Ganoderma***

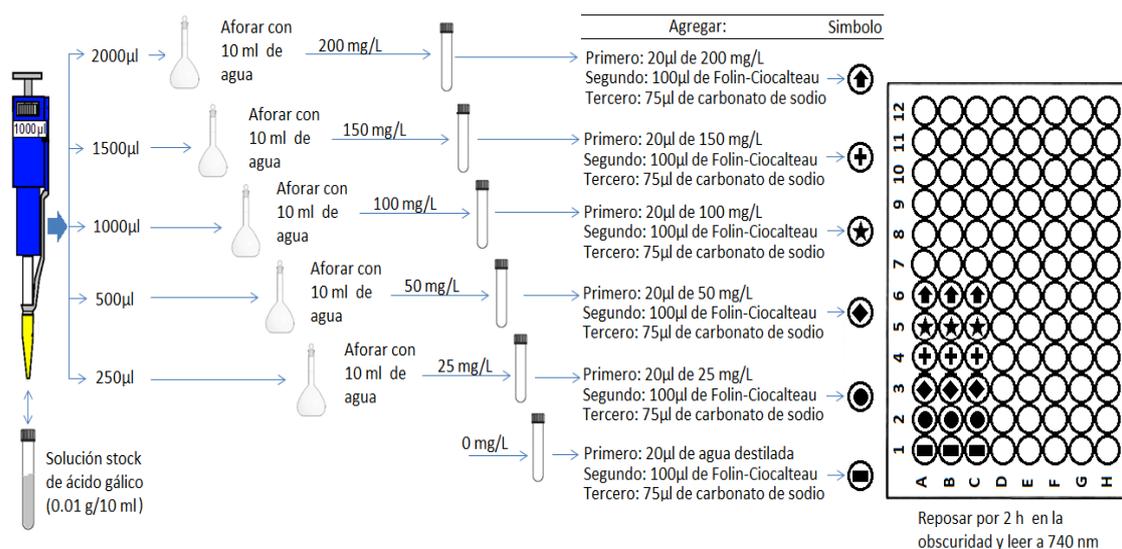
Las cepas evaluadas fueron CP-145 y CP-470 de *G. lucidum* y CP-405 de *G. subamboinense*. La evaluación consistió en la cuantificación de la concentración de polifenoles totales y en la evaluación del efecto bacteriostático y el efecto bactericida de los extractos de basidiocarpo (peso seco) de las cepas. Es importante destacar que se realizaron ensayos preliminares con la cepa CP-405 para estandarizar los protocolos y posteriormente, se iniciaron los ensayos finales con la cepa CP-470 y CP-145, de esta última cepa únicamente se evaluaron dos extractos tomando en cuenta el tiempo limitado debido a que se presentó una huelga laboral que afectó al Colegio de Postgraduados.

### 6.10.1 Concentración de polifenoles totales

Para la determinación de polifenoles totales en los extractos se usó el método colorimétrico-espectrofotométrico Folin-Ciocalteu (Müller *et al.*, 2010), con algunas modificaciones.

#### 6.10.1.1 Obtención de la curva de calibración

Para realizar la curva de calibración se prepararon 10 mL de una solución stock de ácido gálico monohidratado (Meyer) que se obtuvo pesando 0.01 g de ácido gálico los cuales fueron predisueltos en 1 mL de etanol para ayudar a su disolución. Posteriormente, éste volumen se aforó a 10 mL con agua destilada. Las soluciones estándar de ácido gálico se prepararon a concentraciones de 25, 50, 100, 150 y 200 mg/L. Estas soluciones estándar se realizaron tomando 250, 500, 1000, 1500 y 2000  $\mu\text{L}$  de la solución stock de ácido gálico y fueron transferidos a matraces aforados de 10 mL, perfectamente etiquetados, y se aforaron a 10 mL con agua destilada. Para preparar la concentración 0 mg/L se empleó agua destilada estéril en lugar del ácido gálico. La reacción colorimétrica se realizó en una microplaca de 96 pozos (Vacutest, Kima), colocando 20  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones estándar (en orden ascendente respecto a su concentración) para las concentraciones de 25 a 200 mg/L y agua destilada para la concentración 0 mg/L, más 100  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma, Aldrich) (diluido 1:10), e inmediatamente se adicionaron 75  $\mu\text{L}$  de una solución de carbonato de sodio (Baker) (7.5 g/100 mL) (Müller *et al.*, 2010) (**Figura 7**).



**Figura 7.** Procedimiento para la obtención de la curva de calibración.

La reacción se incubó 2 horas en condiciones de obscuridad a temperatura ambiente.. Finalmente, se procedió a tomar las lecturas en el espectrofotómetro EPOCH para microplaca (Biotek, USA) a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 740 nm. El promedio de la absorbancia (cuadruplicado) se graficó en el programa Excel 2007 para generar una línea de tendencia y obtener la ecuación de la recta y valor de  $R^2$ . Los valores de la ecuación se utilizaron para conocer la concentración de ácido gálico presente en los extractos.

### 6.10.1.2 Método de dilución de los extractos

Debido a la naturaleza de los extractos de presentar una intensidad de color ya sea clara u oscura fue necesario realizar diluciones adecuadas para cada extracto para poder cuantificar la concentración de polifenoles totales presentes y para evitar que los valores de la absorbancia no sobrepasen el valor de 1. Las diluciones que se utilizaron en cada extracto fueron las que se muestran en el **cuadro 9**.

**Cuadro 9.** Diluciones realizadas para cuantificar la concentración de polifenoles totales presentes en los extractos.

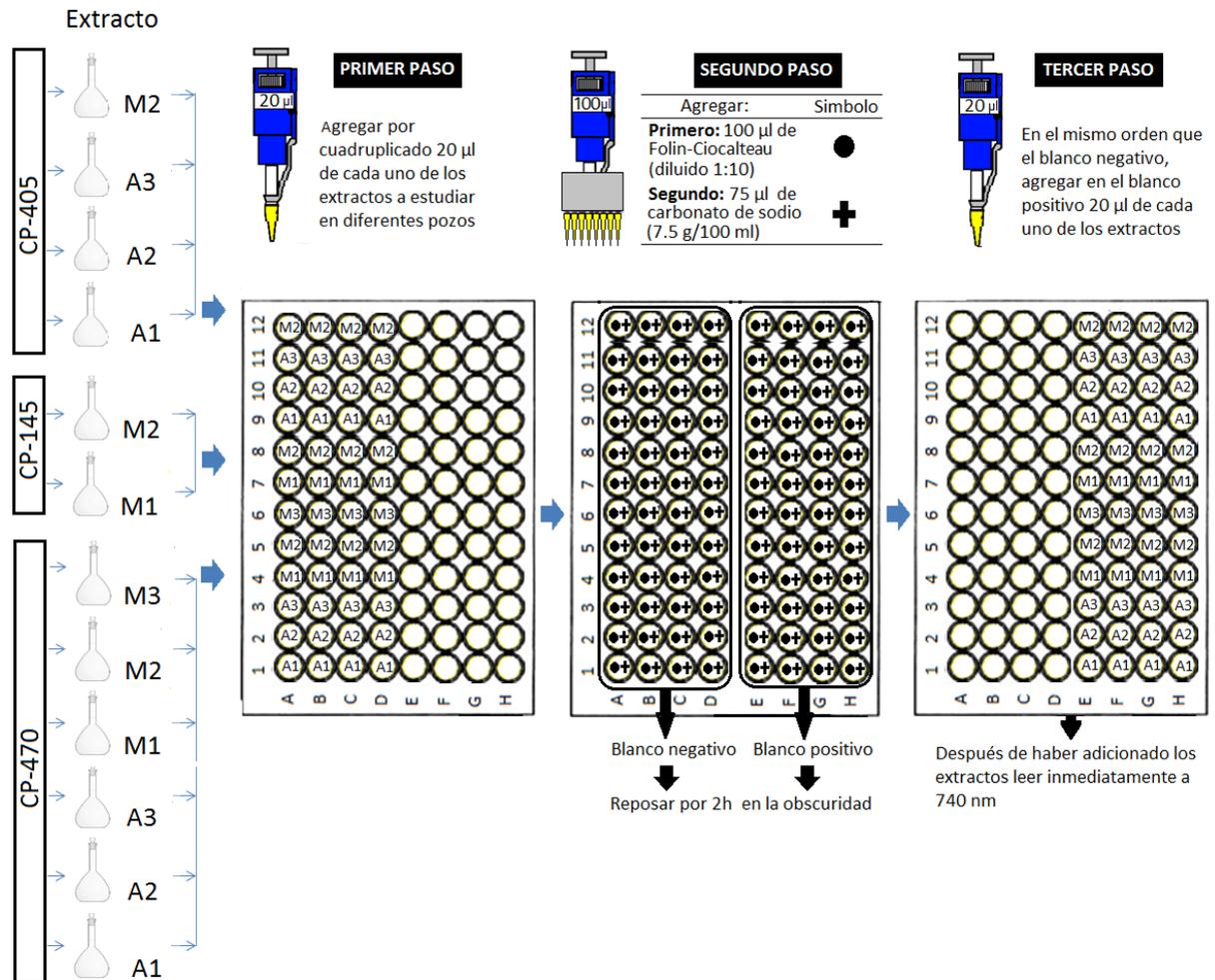
CEPA	EXTRACTO	DILUCIÓN	FACTOR DE DILUCIÓN	VOLUMEN DE DILUCIÓN		VOLUMEN TOTAL DE DILUCIÓN	AJUSTE A 1000 $\mu$ L	
				EXTRACTO	SOLVENTE		EXTRACTO	SOLVENTE
		S/D		250 $\mu$ L	-----	-----	-----	-----
		1:1	x1	250 $\mu$ L	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L	-----	-----
CP-145	M1	1:20	x21	250 $\mu$ L	5000 $\mu$ L	5250 $\mu$ L	47.61 $\mu$ L	952.38 $\mu$ L
	M2	1:10	x11	250 $\mu$ L	2500 $\mu$ L	2750 $\mu$ L	90.90 $\mu$ L	909.09 $\mu$ L
CP-405	A1	1:1	x2	250 $\mu$ L	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L	-----	-----
	A2	1:1	x2	250 $\mu$ L	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L	-----	-----
	A3	1:1	x2	250 $\mu$ L	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L	-----	-----
	M2	1:1	x2	250 $\mu$ L	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L	-----	-----
CP-470	A1	1:20	x21	250 $\mu$ L	5000 $\mu$ L	5250 $\mu$ L	47.61 $\mu$ L	952.38 $\mu$ L
	A2	1:20	x21	250 $\mu$ L	5000 $\mu$ L	5250 $\mu$ L	47.61 $\mu$ L	952.38 $\mu$ L
	A3	1:20	x21	250 $\mu$ L	5000 $\mu$ L	5250 $\mu$ L	47.61 $\mu$ L	952.38 $\mu$ L
	M1	1:20	x21	250 $\mu$ L	5000 $\mu$ L	5250 $\mu$ L	47.61 $\mu$ L	952.38 $\mu$ L
	M2	1:10	x11	250 $\mu$ L	2500 $\mu$ L	2750 $\mu$ L	90.90 $\mu$ L	909.09 $\mu$ L
	M3	1:10	x11	250 $\mu$ L	2500 $\mu$ L	2750 $\mu$ L	90.90 $\mu$ L	909.09 $\mu$ L

S/D: Sin Dilución.

### 6.10.1.3 Cuantificación de polifenoles totales en los extractos

Para llevar a cabo la reacción colorimétrica se utilizaron dos microplacas de 96 pozos debido a la cantidad de extractos a evaluar. Por cada extracto se hicieron réplicas por cuadruplicado de un blanco negativo (BLK-) y un blanco positivo (BLK+). En la primera microplaca, se mezclaron 20  $\mu$ L de cada uno de los extractos a estudiar de los pozos A1, B1, C1, D1 hasta A12, B12, C12, D12. Posteriormente se adicionó en los pozos de A1, B1, C1 D1, E1, F1, G1, H1 hasta A12, B12, C12 D12, E12, F12, G12, H12 100  $\mu$ L del

reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma, Aldrich) (diluido 1:10) e inmediatamente 75  $\mu\text{L}$  de una solución de carbonato de sodio (7.5 g/100 ml). En la segunda microplaca, se mezclaron 20  $\mu\text{L}$  de cada uno de los extractos a estudiar de los pozos A1, B1, C1 hasta A3, B3, C3 (Figura 8).



**Figura 8.** Disposición de la microplaca de 96 pozos para la cuantificación de la concentración de polifenoles totales.

Posteriormente, se adicionó en los pozos de A1, B1, C1 D1, E1, F1, G1, H1 hasta A3, B3, C3 D3, E3, F3, G3, H3 100  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin-Ciocalteu e inmediatamente 75  $\mu\text{L}$  de una solución de carbonato de sodio (7.5 g/100 ml). La reacción permaneció 2 horas en incubación en obscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de cada uno de los extractos sólo a los blancos positivos y se midió la D.O. a una longitud de onda de 740 nm en un espectrofotómetro EPOCH (Biotek, USA).

Una vez obtenidos los valores de la densidad óptica de los extractos analizados, se despejó la ecuación de la recta de la siguiente manera:

$$y = mx + b$$

Donde: y= Absorbancia (valor que proporciona el espectrofotómetro). m= pendiente (valor que da la ecuación de Excel). x= concentración de ácido gálico (mg/mL) (valor buscado). b= Intersección con “y” (valor que da la ecuación de Excel).

Así, al despejar x, se obtuvo:

$$x = \frac{y-b}{m}$$

Finalmente, los valores dados en la ecuación y los obtenidos del espectrofotómetro fueron substituidos en la nueva ecuación y el resultado fue multiplicado por el factor de dilución.

$$x = \frac{y-b}{m} \text{ (factor de dilución)}$$

La concentración de polifenoles totales presentes en los extractos fue reportada en mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g de basidiocarpo peso seco).

## **6.10.2 Actividad antibacteriana**

### **6.10.2.1 Medios y condiciones de cultivo para las cepas bacterianas**

**Gelosa especial.** Se utilizó como medio de conservación de las cepas stock. Se preparó de la siguiente forma: 1.5 g/L extracto de carne (Bioxon) suplementado con 40.0 g/L base de agar sangre (Bioxon) y 2.5g/L de peptona de caseína (Bioxon). Se esterilizó el medio a 121°C durante 15 min y posteriormente, se vertió en tubos de ensayo de 30 mL (colocados de forma inclinada) y en cajas Petri de 5 cm de diámetro. Los tubos y las cajas fueron sometidos a una prueba de esterilidad, incubándolas a 35°C por 24 horas. Finalmente, la bacteria se sembró por estría cruzada en el caso de las cajas y en el caso de los tubos solo por estría. Se inocularon cajas y tubos por triplicado y se incubaron a 35°C. Las cepas obtenidas fueron almacenadas a 4°C. La resiembra de las cepas stock se realizó cada 6 meses.

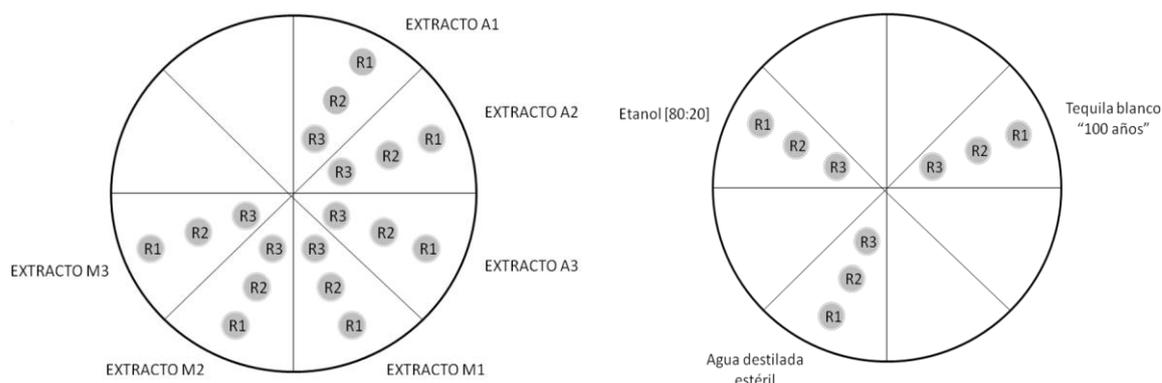
**Agar Mueller Hinton.** Se utilizó como medio de crecimiento para cepas de uso continuo y se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante Bioxon (38 g/L). Posteriormente, se vertió en cajas Petri. Las cajas fueron sometidas a una prueba de esterilidad, incubándose a 35°C por 24 horas. Finalmente, la bacteria se sembró en las cajas por triplicado a temperatura de incubación de 35°C. Las cepas fueron almacenadas a 4°C. La resiembra de las cepas se realizó cada 2 semanas.

### 6.10.2.2 Esterilización de los solventes

Los solventes utilizados fueron agua destilada estéril, tequila blanco y etanol:agua [80:20] (v/v), de los cuales únicamente el tequila y el etanol fueron esterilizados por filtración empleando acrodiscos (Acrodisc® Syringe Filter 0.45µm HT Tuffryn® Membrane Low Protein Binding Non-Pyrogenic PN 4184). El procedimiento consistió en hacer pasar a través de un acrodisco con ayuda de una jeringa, 10 mL del solvente los cuales se contuvieron en un tubo falcon estéril de 14 mL. El tubo Falcon se almacenó en refrigeración a 4°C hasta su uso.

### 6.10.2.3 Prueba de esterilidad de los extractos y los solventes

Una vez esterilizados los extractos y los solventes se les realizó una prueba de esterilidad, la cual consistió en tomar con una micropipeta tres alícuotas de 10 µL del extracto o solvente para inocularlo en una caja Petri con agar Mueller Hinton (**Figura 9**).



**Figura 9.** Prueba de esterilidad de los extractos para descartar lecturas erróneas durante la determinación de la concentración de fenoles totales y evitar crecimiento de otros microorganismos durante la evaluación del efecto bacteriostático y el efecto bactericida.

Posteriormente, las cajas Petri fueron incubadas a 35°C por 24 horas. El mismo procedimiento se llevó a cabo para determinar la esterilidad de los solventes.

#### **6.10.2.4 Preparación de la suspensión bacteriana**

Se preparó Caldo Mueller Hinton (DIFCO) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (21 g/L). Posteriormente, con un asa bacteriológica se tomó una colonia de la cepa de interés sembrada con 24 horas de anterioridad, y se inoculó en 40 mL de Caldo Mueller Hinton estéril en un matraz Erlenmeyer estéril con tapa de rosca de 125 mL. Finalmente, el matraz se incubó en una incubadora orbital (New Brunswick Scientific, E.U.A.) a 230 rpm a 35°C durante aproximadamente 2 horas.

#### **6.10.2.5 Ajuste del inóculo para iniciar las pruebas antibacterianas**

Para iniciar la prueba de sensibilidad bacteriana se requirió ajustar el inóculo a una densidad óptica (D.O.) de 0.05 para el caso de las cepas CP-145 y CP-470 y una D.O. de 0.04 para la cepa CP-405. Esto se consiguió inoculando un matraz Erlenmeyer con 10 mL de Caldo Mueller Hinton (DIFCO) estéril con 5 mL de inóculo tomado de la suspensión bacteriana preparada previamente, homogenizando con micropipeta de 5 mL y un vortex. Posteriormente, la D.O. inicial se midió a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 600 nm en el espectrofotómetro EPOCH (Biotek, USA). Tanto el medio de cultivo como la resuspensión bacteriana fueron agregados hasta obtener las densidades ópticas (D.O.) de 0.05 (CP-145 y CP-470) y 0.04 (CP-405). Para cuantificar la D.O., se restó el valor de la D.O. del blanco (Caldo Mueller Hinton ) a la D.O. de la resuspensión bacteriana.

$$\text{(D.O. BLK MH)} - \text{(D.O. RB)} = \text{D.O. real RB}$$

Donde: D.O.: Densidad Óptica; BLK: Blanco; MH: Mueller Hinton; RB: Resuspensión bacteriana.

Una vez registrada la D.O. 0.05 y 0.04 dependiendo de la cepa de estudio, se procedió a evaluar el efecto bacteriostático de los extractos.

#### **6.10.2.6 Evaluación del efecto bacteriostático de los extractos contra *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli***

Para realizar esta prueba, se consideró incluir un control positivo (C+) el cual indicó el efecto del solvente sobre el crecimiento bacteriano, un control negativo (C-) que sirvió para conocer la concentración bacteriana real (expresada en D.O.) presente en el control positivo, un control o prueba de esterilidad (PE) el cual mostró la presencia o ausencia de contaminación por agentes biológicos distintos de la cepa bacteriana de estudio, un blanco positivo (BLK +) que indicó la concentración bacteriana sin interferencia de algún factor

bacteriostático o bactericida y un blanco negativo (BLK -) que indicó la concentración bacteriana real (expresada en D.O.) presente en el extracto evaluado. Los extractos evaluados fueron las resuspensiones M1 y M2 obtenidas a partir de la cepa CP-145, las resuspensiones A1, A2, A3 y M2 de la cepa CP-405 y las resuspensiones A1, A2, A3, M1, M2 y M3 de la cepa CP-470. Esta prueba se inició al obtener en la resuspensión bacteriana el valor de D.O. de 0.05 para el caso de las cepas CP-145 y CP-470 y una D.O. de 0.04 para la cepa CP-405. Inmediatamente, se procedió a adicionar los reactivos en condiciones de esterilidad dentro una campana de flujo laminar en el siguiente orden: primero se agregaron 100 µL de Caldo Mueller Hinton en los pozos de A1 a A8 hasta los pozos F1 a F8 y de H1 a H6. Después se agregaron 130 µL de Caldo Mueller Hinton en los pozos de G1 a G12, de H7 a H12 y de A9 a A12 hasta los pozos F9 a F12. En seguida, se agregaron 30 µL de resuspensión bacteriana de los pozos A1 a A8 hasta los pozos F1 a F8 y de H1 a H6. Inmediatamente, 100 µL del solvente [agua, tequila blanco o etanol:agua [80:20] (v/v)] se agregaron en los pozos A1 a A4 y de G7 a H7. Por último, se agregaron 100 µL del extracto en los pozos A5 a A12 (**Cuadro 10**). Por cada muestra, control y blanco se realizaron 4 réplicas.

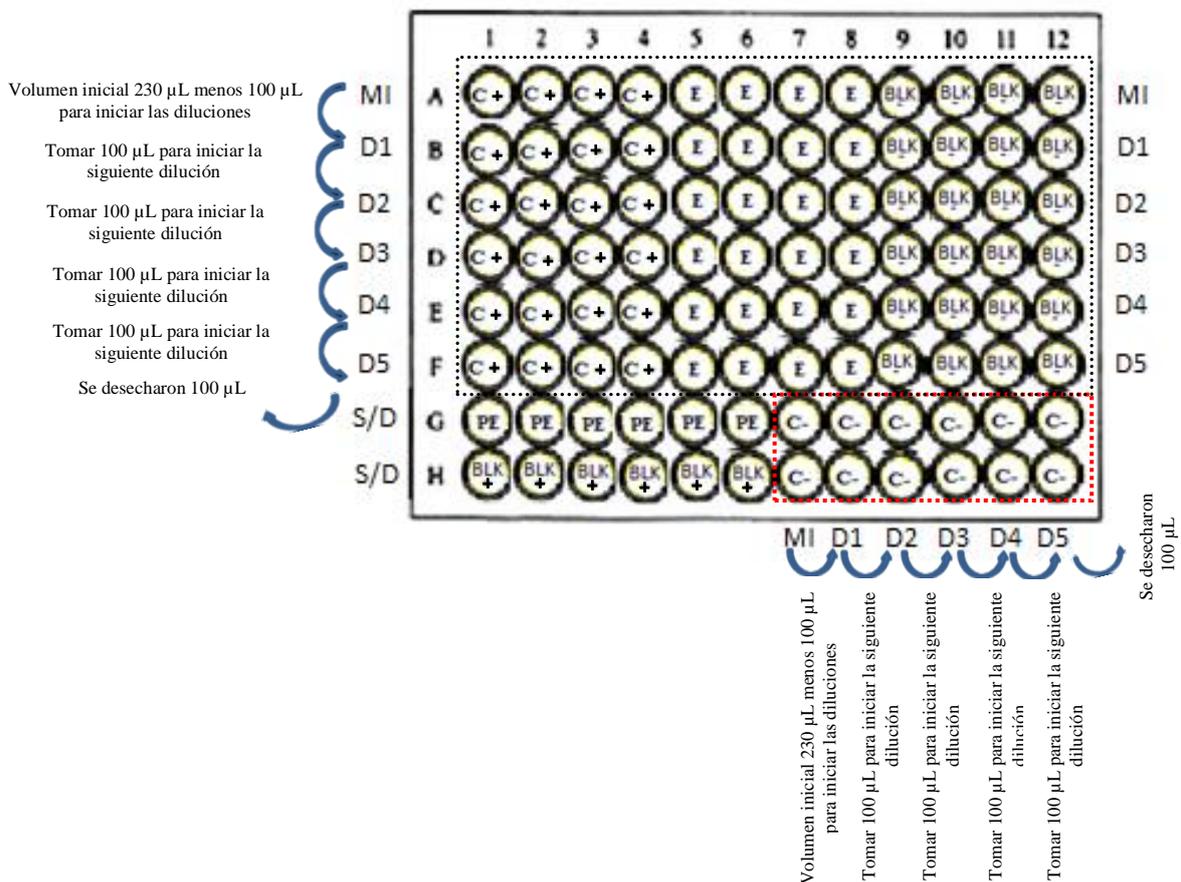
**Cuadro 10.** Volúmenes utilizados de cada solución para evaluar el efecto bacteriostático de los extractos contra *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*.

Soluciones control	Caldo Mueller Hinton	Resuspensión bacteriana ajustada (D.O)*	Extracto	Solvente	Volumen final
	(µL)	(µL)	(µL)	(µL)	(µL)
Control positivo del disolvente (C+)	100	30	-----	100	230
Control negativo del disolvente (C-)	130	-----	-----	100	230
Blanco negativo del extracto (BLK-)	130	-----	100	-----	230
Extracto (E)	100	30	100	-----	230
Prueba de Esterilidad (PE)	130	-----	-----	-----	130
Blanco positivo (BLK+)	100	30	-----	-----	130

\*D.O. ajustada a 0.05 (CP-145 y CP-470) y 0.04 (CP-405).

Una vez adicionados los reactivos, los pozos A1 a A12 de la microplaca quedaron con un volumen de 230 µL y el resto de los pozos con un volumen de 130 µL. En seguida, se realizaron las diluciones como se indica a continuación: partiendo de los pozos A1 a A8 (mezcla inicial o MI) se tomaron 100 µL los cuales se mezclaron tres veces con la ayuda de una micropipeta multicanal (aspirando y regresando el volumen de la mezcla de reacción) y fueron transferidos a los pozos B1-B8 (Dilución 1 ó D1), se realizó el mismo

procedimiento hasta los pozos F1-F8, los últimos 100  $\mu\text{L}$  de los últimos pozos se desecharon. De la misma forma se inició la dilución para los pozos A9-A12 hasta llegar a los pozos F9-F12. La última serie de diluciones se realizó a partir de los pozos G7-H7 hasta los pozos G12-H12, donde los 100  $\mu\text{L}$  de estos últimos pozos se tomaron y se desecharon. Una vez finalizadas las diluciones el volumen final en cada uno de los pozos de toda la microplaca fue de 130  $\mu\text{L}$ . Por cada serie de diluciones se realizó un cambio de set de puntas. A cada extracto se le evaluó el efecto bacteriostático contra las bacterias de *B. subtilis* (CP-145 y CP-470) y *E. coli* (CP-405) y fue necesario utilizar una microplaca de 96 pozos para cada una de estas pruebas, en total se realizaron 12 pruebas. La distribución de los reactivos en la microplaca de 96 pozos se muestra en la **figura 10**.



**Figura 10.** Disposición de la microplaca de 96 pozos para evaluar el efecto bacteriostático de los extractos. A1-A4: Control positivo del solvente, mezcla inicial (MI). A5-A8: Extracto (mezcla inicial). A9-A12: Blanco negativo del extracto (mezcla inicial). B1-F1, B2-F2, B3-F3 y B4-F4: Diluciones 1 a 5 del control positivo del solvente a partir de A1-A4. B5-F5, B6-F6, B7-F7 y B8-F8: Diluciones 1 a 5 del extracto a partir de A5-A8. B9-F9, B10-F10, B11-F11 y B12-F12: Diluciones 1 a 5 del blanco negativo del extracto a partir de A9-A12. G1-G6: Prueba de esterilidad (Caldo Mueller Hinton). H1-H6: Control de crecimiento. G7 y H7: Control negativo del solvente (mezcla inicial). G7-G12 y H7-H12: Diluciones 1 a 5 del control negativo del solvente a partir de G7 y H7.

Hechas las diluciones, en condiciones de asepsia, la microplaca se colocó en una cámara húmeda (recipiente plástico con tapa el cual se limpió con etanol). La cámara húmeda se armó de la siguiente manera: a un recipiente plástico se le agregaron 30 mL de agua destilada estéril, para mantener constante la humedad de los pozos de la microplaca. Después, se colocó una tapa de una caja Petri de vidrio sobre la que se sobrepuso la envoltura plástica en la que venía empaquetada la microplaca, después se colocó la microplaca y se tapó el recipiente. La cámara húmeda se incubó a 35°C. En condiciones de asepsia y esterilidad se monitoreó el comportamiento bacteriano a las 24 horas y 48 horas de incubación para el caso de la cepa CP-145 y CP-470 y sólo a las 24 horas para el caso de la cepa CP-405. El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la D.O. en un espectrofotómetro EPOCH (Biotek, USA) a 600 nm (Imtiaj y Lee, 2007).

#### **6.10.2.7 Cálculos para conocer la actividad antibacteriana de los extractos y de los solventes: resultados expresados en unidades de densidad óptica (D.O.)**

Las operaciones realizadas para obtener la concentración real de los extractos de prueba y de los solventes se muestran a continuación:

$$\text{Concentración bacteriana real en el extracto} = (\text{D.O. E}) - (\text{D.O. BLK -})$$

Donde (D.O. E) es el valor de densidad óptica obtenido del extracto de prueba y (D.O. BLK -) es el valor de densidad óptica obtenido del blanco negativo.

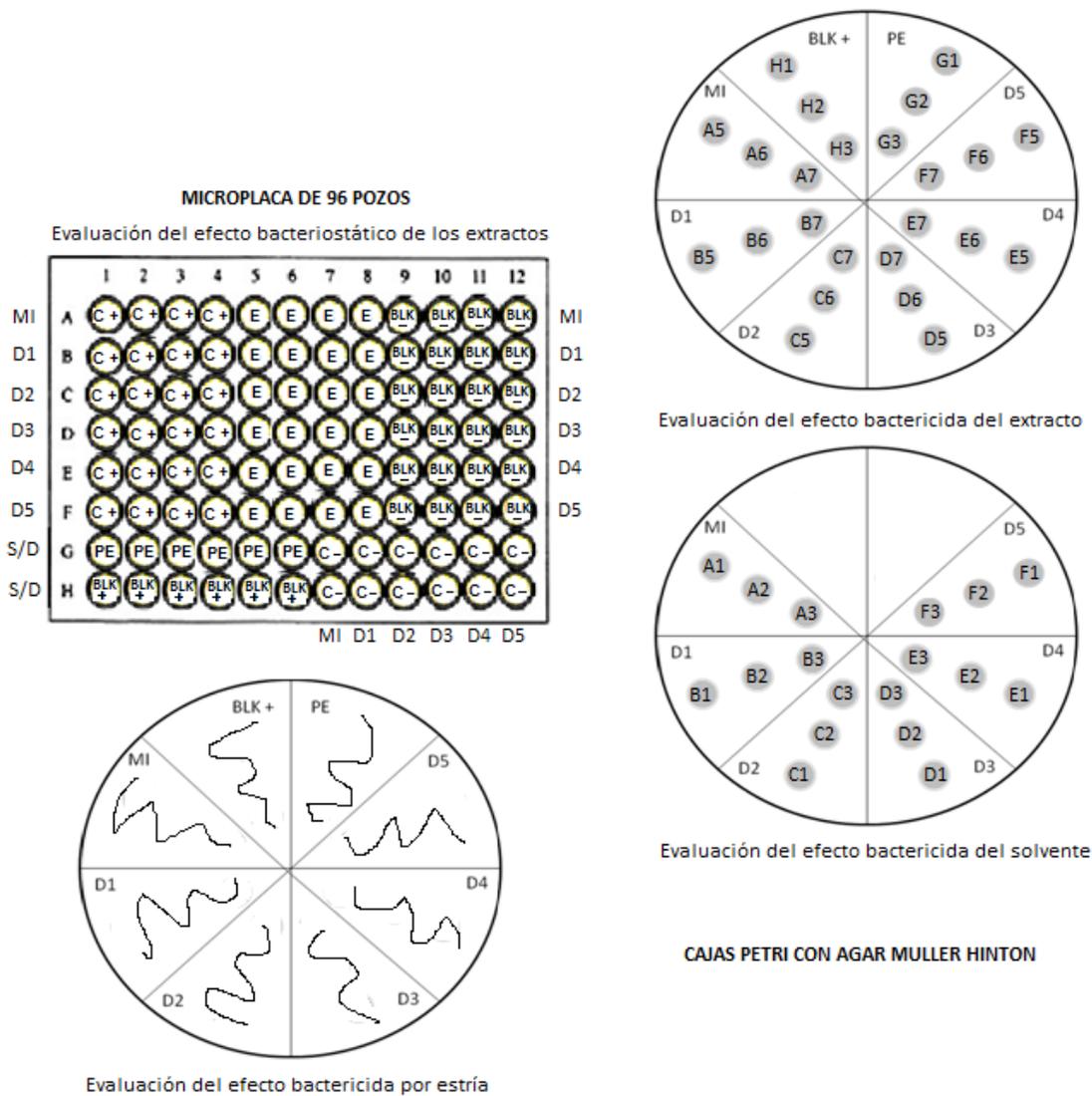
$$\text{Concentración bacteriana real presente en el solvente} = (\text{D.O. C+}) - (\text{D.O. C-})$$

Donde (D.O. C+) es el valor de densidad óptica obtenido en el control positivo y (C-) es el valor de densidad óptica obtenido en el control negativo.

#### **6.10.2.8 Evaluación del efecto bactericida de los extractos contra *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli***

Se prepararon dos cajas Petri con medio de cultivo agar Mueller Hinton para observar por separado el efecto del extracto y el efecto del solvente. En la primera, se inocularon tres de las cuatro réplicas de las diluciones MI, D1, D2, D3, D4 y D5 del extracto y también tres de las seis réplicas de la prueba de esterilidad (PE) así como tres muestras de las seis réplicas del blanco positivo (BLK+). En la segunda caja Petri se sembraron tres de las cuatro réplicas de las diluciones MI, D1, D2, D3, D4 y D5 del control positivo del solvente

(C+). Para evaluar el efecto bactericida, el tamaño de la muestra tomada de cada uno de los pozos para las cepas CP-145 y CP-470 fue de 10  $\mu$ L los cuales se tomaron y se depositaron en forma de gota con la ayuda de una micropipeta. En el caso de la cepa CP-405 se inoculó por estría el medio (**Figura 11**). En ambos casos, las cajas fueron incubadas durante 24 horas a 35°C.



**Figura 11.** Evaluación del efecto bactericida. Los alfanúmeros sombreados representan el pozo de la microplaca del cual fue tomada la muestra. Los alfanúmeros no sombreados muestran la dilución a la que pertenecen los alfanúmeros sombreados.

### 6.10.2.9 Concentración de las microdiluciones los extractos evaluados

Para determinar la concentración de los extractos obtenidos, por maceración y mediante equipo Soxhlet, se definió el tamaño de muestra (basidicarpo peso seco) inicial en gramos (10 g). En ambos casos fue el mismo tamaño de muestra inicial. Para la obtención de los extractos con equipo Soxhlet se cuantificó el volumen final de la extracción y fue dividido

en tres partes iguales las cuales fueron concentradas en un rotavapor (HAHNVAPOR, modelo HS: 2000NS). Una vez concentrados los extractos se resuspendieron en diferentes solventes. El volumen de resuspensión varió de acuerdo a la cepa, para las cepas CP-145 y CP-470 fue de 10 mL y para la cepa CP-405 fue de 100 mL. De cada extracto se tomaron 100 µL iniciales para iniciar la serie de microdiluciones y evaluar el efecto bacteriostático de los extractos en una microplaca de 96 pozos (**Cuadro 11**). Los cálculos para determinar la concentración del extracto en cada pozo se muestran a continuación. Los resultados se expresaron en µg/mL.

**Cuadro 11.** Concentración final de los extractos después de la resuspensión.

Cepa	Extracto	Concentración del extracto después	Concentración del extracto después de
		de la resuspensión	la resuspensión
CP-145	M1	10 g/10 mL	10,000,000 µg/10,000 µL
	M2	10 g/10 mL	10,000,000 µg/10,000 µL
CP-405	M2	9.206 g/ 100 mL	9,206,350 µg/100,000 µL
	A1	3.024 g/ 100 mL	3,024,691.6 µg/100,000 µL
	A2	3.024 g/ 100 mL	3,024,691.6 µg/100,000 µL
CP-470	A3	3.024 g/ 100 mL	3,024,691.6 µg/100,000 µL
	M1	10 g/10 mL	10,000,000 µg/10,000 µL
	M2	10 g/10 mL	10,000,000 µg/10,000 µL
	M3	10 g/10 mL	10,000,000 µg/10,000 µL
	A1	2.993 g/10 mL	2,993,197.3 µg/10,000 µL
	A2	2.993 g/10 mL	2,993,197.3 µg/10,000 µL
	A3	2.993 g/10 mL	2,993,197.3 µg/10,000 µL

Para conocer la concentración de cada una de las diluciones realizadas a partir del extracto, se partió de la concentración del extracto ya esterilizado a 10 mL (**Cuadro 11**). De cada extracto se tomaron 100 µL para evaluar el efecto bacteriostático (**Cuadro 12**).

**Cuadro 12.** Concentración de la alícuota de 100 µL para evaluar el efecto bacteriostático.

Cepa	Extracto	Concentración	
		Extracto	Alícuota de 100 µL*
CP-145	M1 y M2	10,000,000 µg/10,000 µL	100,000 µg
CP-405	M2	9,206,350 µg/100,000 µL	9,206.35 µg
	A1, A2 y A3	3,024,691.6 µg/100,000 µL	3,024.691 µg
CP-470	M1, M2 y M3	10,000,000 µg/10,000 µL	100,000 µg
	A1, A2 y A3	2,993,197.3 µg/10,000 µL	29,931.973 µg

\*La alícuota de 100 µL fue la primera que se depositó en los pozos designados para MI.

Una vez conocida la concentración depositada en la MI (Mezcla Inicial) se inicia la secuencia de operaciones para conocer la concentración de las siguientes diluciones D1,

D2, D3, D4 y D5. A continuación, se ejemplifica el procedimiento utilizando la concentración conocida en 100 µL del extracto A1,A2 y A3 de la cepa CP-470:

$\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$		$\mu\text{g}/\text{mL}$	
230 µL	→	29,931.973 µg	
100 µL	←	x	
13,013.901 µg/100 µL		16,918.072 µg	→
		X	←
		130 µL	
		1000 µL	
		130,139 µg/ mL MI	

29,931.973 µg que hay en 230 µL menos 13,013.901 µg /100 µL (lo que se transfirió al pozo 2) = **16,918.072 µg (lo que quedó en el pozo 1)**

230 µL	→	13,013.901 µg	
100 µL	←	x	
5,658.2178 µg/100 µL		7,355.684 µg	→
		x	←
		130 µL	
		1000 µL	
		56,582.184 µg/ mL D1	

13,013.901 µg que hay en 230 µL menos 5,658.2178 µg /100 µL (lo que se transfirió al pozo 3) = **7,355.684 µg (lo que quedó en el pozo 2)**

230 µL	→	5,658.2178 µg	
100 µL	←	x	
2,460.0946 µg/100 µL		3,198.1232 µg	→
		x	←
		130 µL	
		1000 µL	
		24,600.947 µg/ mL D2	

5,658.2178 µg que hay en 230 µL menos 2,460.0946 µg /100 µL (lo que se transfirió al pozo 4) = **3,198.1232 µg (lo que quedó en el pozo 3)**

230 µL	→	2,460.0946 µg	
100 µL	←	x	
1,069.6063 µg/100 µL		1,390.4883 µg	→
		x	←
		130 µL	
		1000 µL	
		10,696.063 µg/ mL D3	

2,460.0946 µg que hay en 230 µL menos 1,069.6063 µg /100 µL (lo que se transfirió al pozo 5) = **1,390.4883 µg (lo que quedó en el pozo 4)**

230 µL	→	1,069.6063 µg	
100 µL	←	x	
465.04621 µg/100 µL		604.5601 µg	→
		x	←
		130 µL	
		1000 µL	
		4,650.4623 µg/ mL D4	

1,069.6063 µg que hay en 230 µL menos 465.04621 µg /100 µL (lo que se transfirió al pozo 6) = **604.5601 µg (lo que quedó en el pozo 5)**

230 µL	→	465.04621 µg	
100 µL	←	x	
202.194 µg/100 µL		262.85221 µg	→
		x	←
		130 µL	
		1000 µL	
		2,021.94 µg/ mL D5	

465.04621 µg que hay en 230 µL menos 202.194 µg /100 µL (lo que se desechó) = **262.85221 µg (lo que quedó en el pozo 6)**.

## 6.11 Procesamiento de los datos

Los resultados obtenidos fueron procesados en el programa Office Excel 2007 para la obtención de desviaciones estándar y medias.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Caracterización morfológica de los basidiocarpos de *Ganoderma*

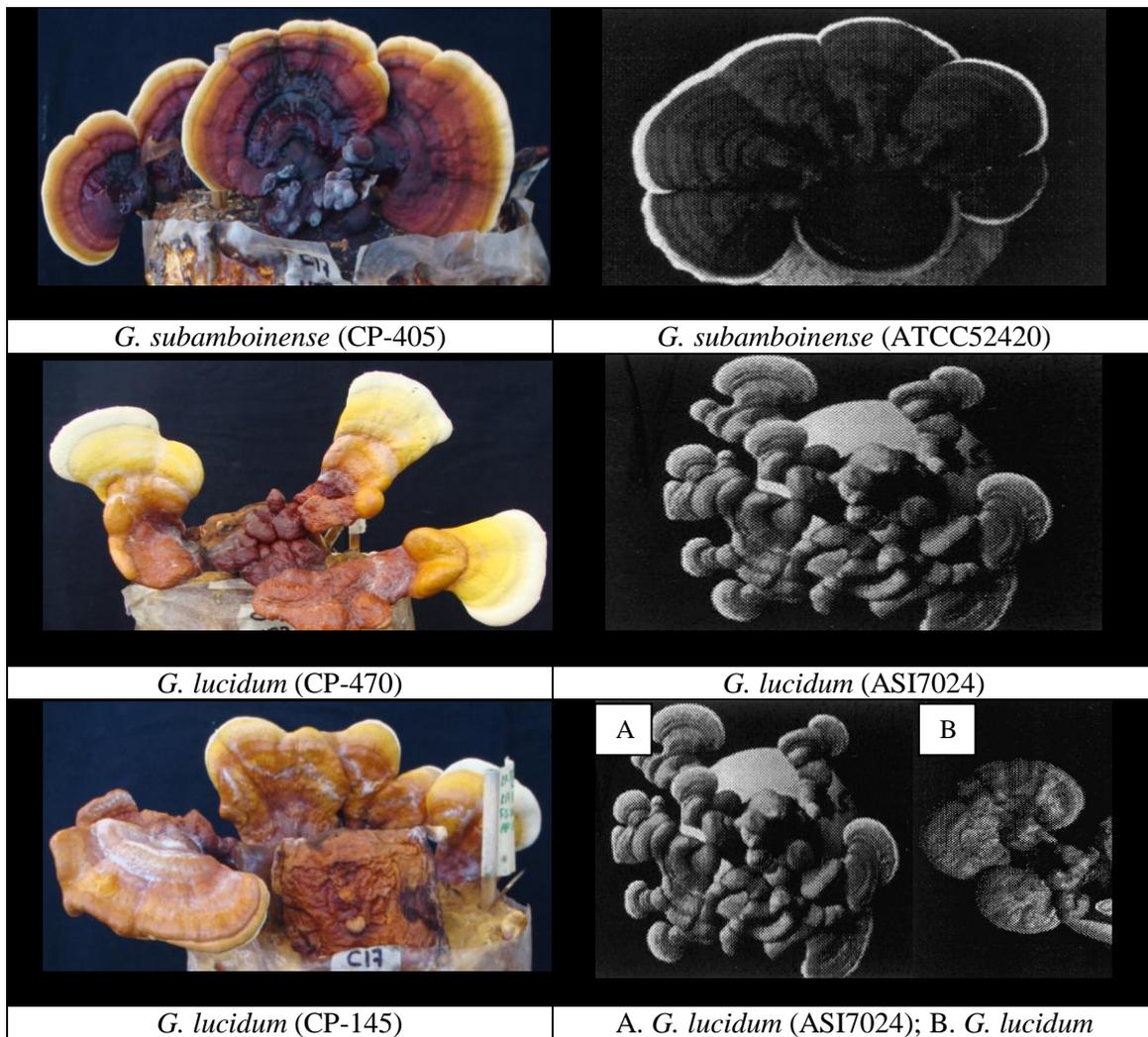
Las características de los basidiocarpos de las cepas nativas de *G. lucidum* (CP-145), *G. subamboinense* (CP-405) y *G. lucidum* (CP-470), cultivadas sobre substrato artificial (formulación COLPOS-17) se muestran en el **cuadro 13**. Dentro de las características morfológicas se pudo apreciar que el color del píleo difirió en las tres cepas, el color del himenio fue constante siendo blanquecino en todos los casos, el diámetro del píleo varió de 7.3 cm a 5.2 cm y el largo del estípite osciló de 3.4 cm a 1.8 cm. El estípite en la cepa CP-145 en algunos casos se presentó largo y de forma circular y en otros casos corto y aplanado, en la cepa CP-405 el estípite fue demasiado corto y con diámetro circular definido y en el caso de la cepa CP-470 el estípite también fue muy corto y de forma aplanada.

**Cuadro 13.** Morfología de los basidiocarpos cosechados de las cepas CP-405, CP-470 y CP-145 empleando la formulación COLPOS-17.

Cepa	Tipo de crecimiento	Píleo						Estípite		
		Forma	Presencia de laca	Color	Textura	Himenio	Tamaño (cm)	Diámetro (cm)		Largo (cm)
CP-405	Agregados	Reniforme	No	Marrón degradándose a color crema hasta el margen del píleo	Surcada con zonas concéntricas definidas	Blanquecino	7.3 x 4.9	1.3 x 1.0	1.8	
CP-470	Agregados	Cornamenta	Sí	Amarillento degradándose a color crema hasta el margen del píleo	Surcada	Blanquecino	5.2 x 7.0	2.4 x 1.2	3.4	
CP-145	Agregados	Cornamenta y reniforme	Si	Anaranjado	Surcada con zonas concéntricas poco definidas	Blanquecino	7.1 x 5.4	1.8 x 1.7	2.1	

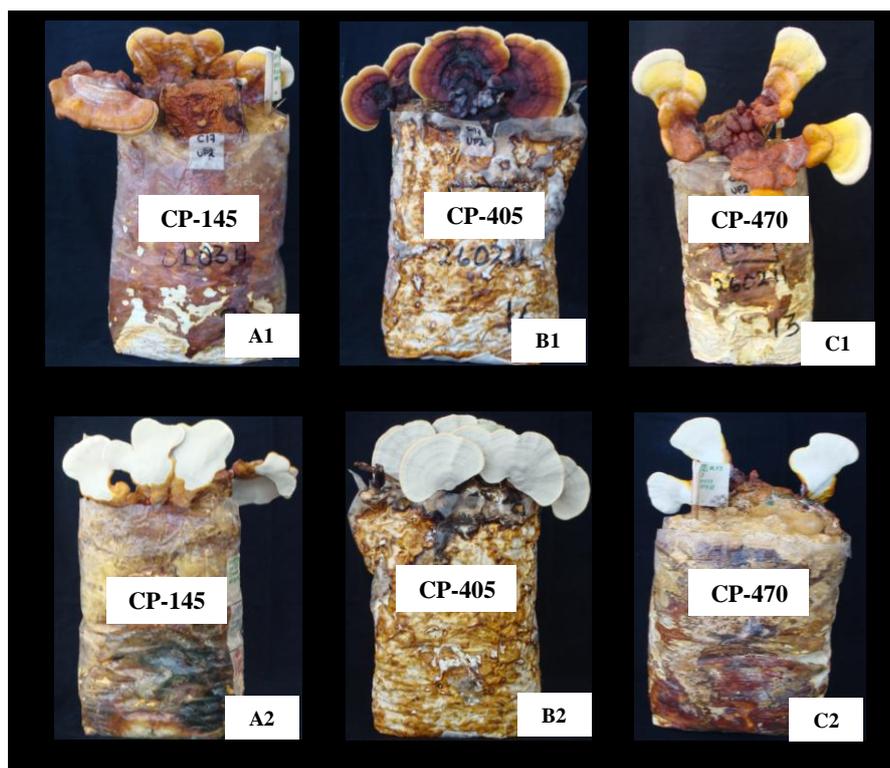
La forma del píleo varió en cada cepa, la cepa CP-145 presentó dos morfologías distintas, la primera mostró píleos en forma de cornamenta (cuerno de ciervo) y la segunda fueron píleos con forma reniforme (en forma de riñón). El píleo de la cepa CP-405 fue consistente ya que siempre desarrolló píleos reniformes y la cepa CP-470 desarrolló píleos con forma tipo cornamenta. Las cepas CP-145 y CP-470 presentaron características muy similares a la cepa ASI7024 de *G. lucidum* cultivada por el método de cultivo en botella sobre aserrín y reportada por Seo y Kirk (2000), la cual presentó píleos tipo cornamenta. Este tipo de píleos de acuerdo a (Hemmi y Tanaka, 1936; Shin y La Seo, 1988; Stamets, 1993) se desarrollan cuando se cultiva bajo condiciones de obscuridad o luz tenue y existe poca

ventilación. Las características morfológicas del píleo de la cepa CP-405 de *G. subamboinense* presentaron morfología reniforme y zonas concéntricas en sus superficie, estas características también fueron observadas por Seo y Kirk (2000) en la cepa de *G. subamboinense* (ATCC52420). La cepa CP-405 difiere con la cepa reportada por Loguercio-Leite *et al.*, 2009 quienes describen una cepa de *G. subamboinense* aislada en Brasil de color rojo oscuro brillante mientras que la cepa CP-405 presentó un color marrón opaco. También Loguercio-Leite *et al.*, 2009 reportaron la presencia de surcos concéntricos los cuales se observaron en la cepa CP-405 (**Figura 12**).



**Figura 12.** Cuadro comparativo de cepas nativas mexicanas de *Ganoderma* con las obtenidas en otros países.

En la **figura 13** se muestra la morfología de los basidiocarpos cosechados así como el color del himenio que presentaron.



**Figura 13.** Morfología de los basidiocarpos. A1, B1 y C1 cara anterior de las cepas CP-145, CP-405 y CP-470, respectivamente. A2, B2 y C2 cara posterior mostrando el himenio.

Otra característica importante que se pudo observar y que no se ha reportado en otros trabajos de investigación fue la presencia de una biopelícula formada sobre el micelio en las unidades de producción durante el proceso de fructificación, la cual en las cepas CP-145 y CP-470 fue color rojiza y se presentó de forma heterogénea abarcando áreas grandes recubriendo aproximadamente el 50% y 70%, respectivamente. La biopelícula formada en las unidades de producción de la cepa CP-405 fue de color anaranjada y también se distribuyó de forma heterogénea sobre toda la unidad de producción dejando zonas expuestas del micelio (**Figura 13**). Es de gran relevancia profundizar en el conocimiento de estas biopelículas, ya que la presencia de color, tipo de color y de su intensidad sugiere la presencia de compuestos bioactivos con posibles aplicaciones biotecnológicas.

## 7.2 Evaluación de la fase de producción a nivel de módulo experimental

Es importante señalar que los resultados de esta etapa de la investigación fueron afectados por la huelga laboral que afectó al Colegio de Postgraduados a principios del mes de marzo hasta mediados del mes de abril de 2011, razón por la cual se presentan a continuación los datos más relevantes.

Las eficiencias biológicas que se obtuvieron en las tres cepas no fueron mayores a 9%. La cepa que obtuvo la mayor eficiencia biológica (EB%) fue la cepa CP-405 y la que obtuvo la menor EB% fue la cepa CP-145 (**Cuadro 14**). Estos resultados son similares a los reportados por Tello-Salgado (2010) usando la misma formulación (COLPOS 17) al obtener eficiencias biológicas de entre 3.96% a 8.11% para cepas de *Ganoderma*. Asimismo, en varias investigaciones en donde se usaron formulaciones distintas, se han alcanzado eficiencias biológicas de entre 5.75% a 20.85%, como en los casos de González-Matute *et al* (2002) quienes reportaron eficiencias biológicas de 7.6% a 10.0%; Hossain *et al* (2009) quienes obtuvieron eficiencias biológicas de 5.75% a 11.0%; Kakon *et al* (2009) quienes reportaron eficiencias biológicas de 5.75% a 13.0% y Erkel (2009) quien logró eficiencias biológicas de 8.33% como mínima y de 20.85% como el valor más grande, cultivando sobre aserrín de álamo suplementado con salvado de maíz y aserrín de álamo suplementado con salvado de trigo, respectivamente. Por otra parte, Montiel-Arcos *et al* (2002) obtuvieron valores de eficiencias biológicas superiores a los obtenidos en este trabajo de investigación siendo estos de 40.3% a 52.6%.

**Cuadro 14.** Eficiencia biológica, tasa de producción y periodos de tiempo registrados en la fase de producción de las cepas CP-145, CP-470 y CP-405.

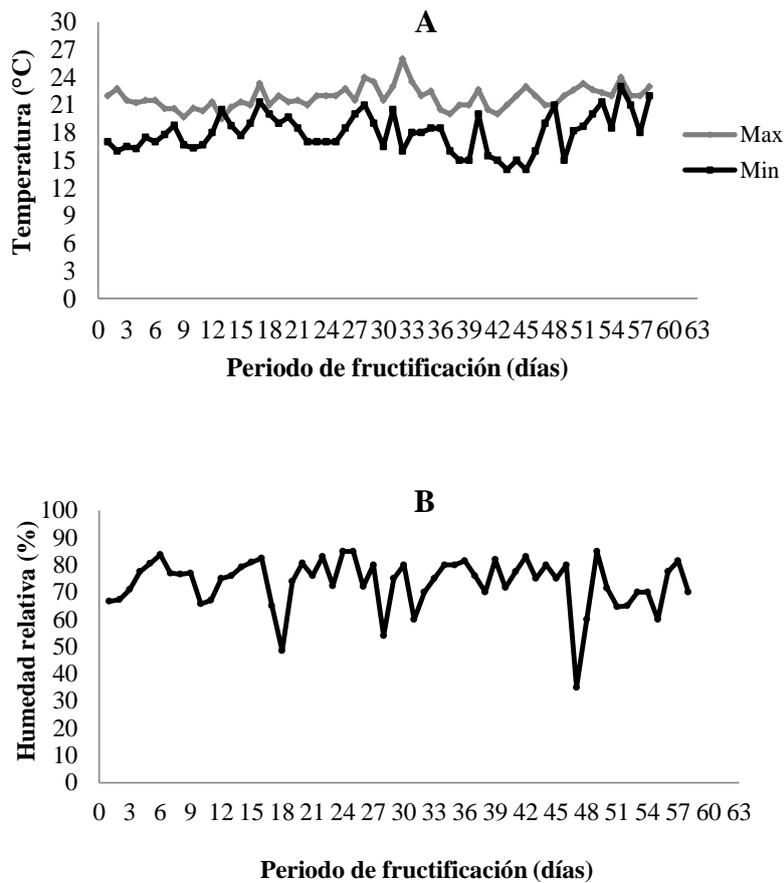
Cepa	TUC* (Días)	Producción g/ 677.287g Ps s	Producción g/ Kg Ps s	EB*%	TP*
CP-145	87	54	79.139	5.747	0.066
CP-405	100	83	122.252	8.758	0.087
CP-470	75	80	118.709	8.363	0.111

TUC= Periodo transcurrido desde la inoculación de las UP's hasta la primera cosecha. Ps s=Peso seco del substrato. EB= Eficiencia biológica (%). TP= Tasa de producción.

El tiempo que requirieron las tres cepas para la obtención de la primera cosecha osciló entre los 75 días a los 100 días (2.5 meses a casi los 3 meses), siendo la cepa CP-470 en la que menor tiempo se tuvo que esperar para obtener la primera cosecha. Mientras que la cepa CP-145 tardó 12 días más, en el caso de la cepa CP-405 fue en la que mayor tiempo se requirió para obtener la primera cosecha. Kakon *et al.* (2009) reportó 37.25-49.25 días para la obtención de la primera cosecha empleando formulaciones distintas a las empleadas en este trabajo de investigación. En cuanto a la tasa de producción, se obtuvo un valor de 0.066 para la cepa CP-145 siendo este el más bajo, mientras que la tasa de producción más alta se logró con la cepa CP-405 en la que se obtuvo un valor de 0.111

Estos valores están por debajo de los obtenidos por González-Matute *et al* (2002) quienes reportaron valores superiores obteniendo 0.35-0.50 en las tasas de producción.

Las condiciones de fructificación que se presentaron en el módulo de producción fueron temperaturas máximas de 26°C y mínimas de 15°C, con una humedad relativa promedio de 85% (**Figura 14**).



**Figura14.** Condiciones ambientales registradas durante la fructificación de las cepas CP-145, CP-405 y CP-470 de *Ganoderma*. A. Temperaturas máximas (26°C) y mínimas (15°C). B. Humedad relativa (85%).

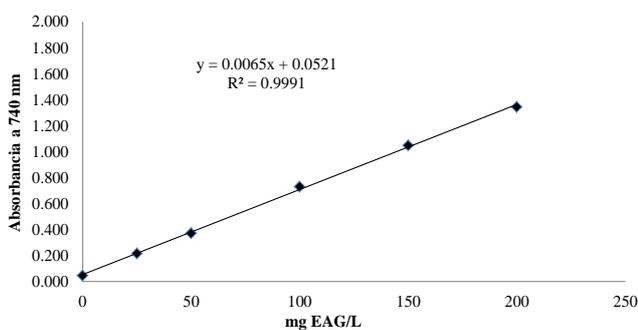
### 7.3 Extractos obtenidos del basidiocarpo de dos cepas nativas de *Ganoderma*

Se obtuvieron 12 extractos a partir del basidiocarpo (peso seco) de las cepas CP-145, CP-405 y CP-470, de los cuales dos pertenecieron a la cepa CP-145 (M1 y M2), cuatro correspondieron a la cepa CP-405 (A1, A2, A3 y M2) y seis a la cepa CP-470 (A1, A2, A3, M1, M2 y M3). Como se mencionó en el apartado 6.10.5.6, primero se realizaron ensayos preliminares con la cepa CP-405 para estandarizar los protocolos y

posteriormente, se iniciaron los ensayos finales con la cepa CP-470 y finalmente, con la cepa CP-145, en esta última cepa tomando en cuenta el tiempo únicamente se consideró la evaluación de dos extractos debido a que se presentó una huelga laboral que afectó al Colegio de Postgraduados.

#### 7.4 Concentración de polifenoles totales en los extractos

En el presente estudio la concentración de polifenoles totales fue expresada en mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG) (**Figura 15**). Como se mencionó en el apartado 6.7, los extractos fueron resuspendidos en diferentes solventes (agua destilada estéril, tequila blanco y etanol:agua [80:20] (v/v)). El volumen de resuspensión fue de 100 mL para los extractos obtenidos de la cepa CP-405 y de 10 mL para los extractos obtenidos de las cepas CP-145 y CP-470.



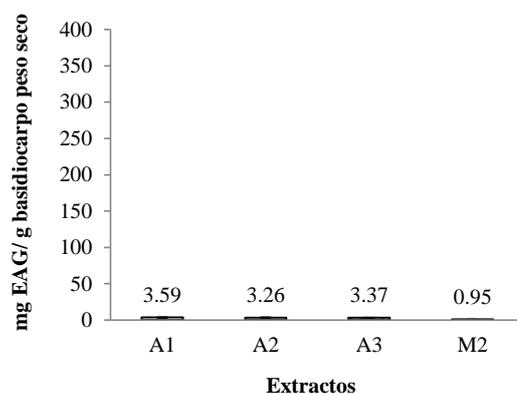
**Figura 15.** Curva de calibración con ácido gálico para cuantificar la concentración de polifenoles totales.

La concentración de polifenoles totales presente en los extractos resuspendidos en 10 mL fue mayor a los 70 mg EAG/g de basidiocarpo peso seco y menor a los 292 mg EAG/g de basidiocarpo peso seco, mientras que en los extractos resuspendidos en 100 mL fue mayor a los 0.90 mg EAG/g de basidiocarpo peso seco y menor a los 4 mg EAG/g de basidiocarpo peso seco.

##### 7.4.1 Ensayo preliminar: concentración de polifenoles totales de extractos obtenidos de la cepa CP-405

Con respecto a los extractos resuspendidos en 100 mL todos presentaron concentraciones por debajo de los 4 mg EAG/g basidiocarpo peso seco. El extracto M2 presentó una

concentración de  $0.95 \pm 0.06$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco. Para el caso de los extractos A1, A2 y A3 obtenidos empleando equipo Soxhlet el contenido de polifenoles totales fue de  $3.59 \pm 0.38$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco,  $3.26 \pm 0.42$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco y de  $3.37 \pm 0.16$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco, respectivamente (**Figura 16**). Resultados similares fueron obtenidos por Mau *et al.*, 2005 a y b quienes reportaron que los extractos acuosos obtenidos de *Ganoderma tsugae* con respecto a los extractos metanólicos de la misma especie fueron superiores en concentración. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se observó que los extractos A1, A2 y A3, fueron los que mayor concentración de polifenoles totales presentaron en comparación con el extracto M2. Esto puede deberse a la polaridad del disolvente (Chirinang e Intarapichet, 2009).

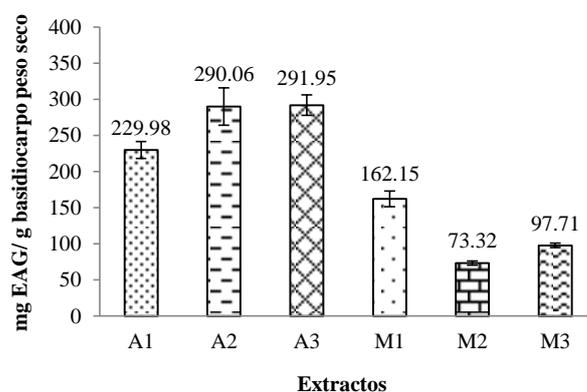


**Figura 16.** Concentración de polifenoles en extractos de *Ganoderma subamboinense* (CP-405).

#### 7.4.2 Ensayo final: concentración de polifenoles totales de extractos obtenidos de la cepa CP-470

De los extractos M1 y M2, obtenidos por maceración del basidiocarpo de la cepa CP-470, el extracto M1 presentó la mayor concentración de polifenoles con  $162.15 \pm 10.81$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco y el extracto M2 la menor concentración con  $73.32 \pm 2.74$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco, mientras que el extracto M3 registró una concentración de  $97.71 \pm 3.05$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco. De los extractos obtenidos empleando equipo Soxhlet se obtuvo para el extracto A1 una concentración de polifenoles totales de  $229.98 \pm 11.73$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco, para el extracto A2 fue de  $290.06 \pm 25.74$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco y para el extracto A3 de  $291.95 \pm 14.09$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco (**Figura 17**). De lo anterior, se puede decir que de igual manera que en la cepa CP-145, el extracto M1 de la cepa CP-470

fue en el que se encontró la mayor concentración de polifenoles totales. En el caso de los extractos A1, A2 y A3 aumentó considerablemente la concentración con respecto a los extractos M1, M2 y M3, esto pudo deberse a: a) el método de extracción, b) la temperatura de tratamiento y c) solvente de extracción inicial, es decir, los extractos obtenidos por maceración se resuspendieron en el mismo solvente en el que fueron extraídos inicialmente los principios activos, mientras que en el caso de los extractos obtenidos por soxhlet, provienen de una extracción acuosa inicial y posteriormente, fueron resuspendidos en agua, tequila blanco y etanol:agua [80:20] (v/v). Aunque los extractos A2 y A3 fueron resuspensiones de tequila blanco y etanol:agua [80:20] (v/v) respectivamente, provienen de una extracción acuosa previa con equipo Soxhlet, por lo que se puede atribuir a esto que se haya encontrado una mayor concentración de polifenoles totales en estos extractos. Con lo que respecta a los extractos M2 y M3 registraron las concentraciones más bajas, por lo que puede suponerse que fue debido a la polaridad del solvente empleado (Chirinang e Intarapichet, 2009).

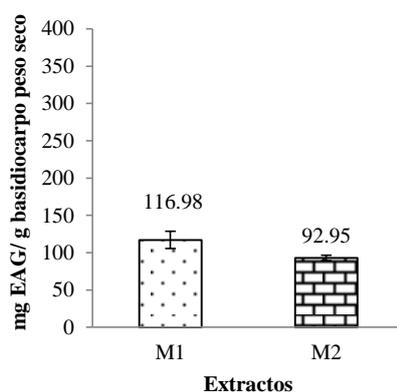


**Figura 17.** Concentración de polifenoles en extractos de *Ganoderma lucidum* (CP-470).

#### 7.4.3 Ensayo final: concentración de polifenoles totales de extractos obtenidos de la cepa CP-145

Las concentraciones encontradas en los extractos M1 y M2 obtenidos por maceración de la cepa CP-145 fueron de  $116.98 \pm 11.59$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco y de  $92.95 \pm 3.73$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco, respectivamente (**Figura 18**). Los resultados mostraron que el extracto M1 (macerado acuoso resuspendido en agua) fue el que presentó una mayor concentración de polifenoles totales con respecto al extracto M2, teniendo un rango de diferencia de 24.03 mg EAG/g de basidiocarpo peso seco, lo cual indica que el

solvente con mayor capacidad de extracción fue el agua destilada estéril. Puttaraju *et al.*, 2006 obtuvieron resultados similares con 23 especies diferentes de hongos usando como solventes agua y metanol, reportando que 21 extractos acuosos presentaron las mayores concentraciones de polifenoles con respecto a los metanólicos. También Lee *et al.*, 2007 observaron un comportamiento similar al comparar los extractos etanólicos y acuosos de *Hypsizigus marmoreus*, resultando los extractos acuosos con una mayor concentración de polifenoles totales.



**Figura 18.** Concentración de polifenoles en extractos de *Ganoderma lucidum* (CP-145).

#### 7.4.4 Comparación de la concentración de polifenoles totales entre las cepas CP-405 y CP-470

Las concentraciones más altas de polifenoles totales en las cepas CP-405 y CP-470 se encontraron en los extractos obtenidos por Soxhlet (A1, A2 y A3). Para la cepa CP-405 fueron de  $3.59 \pm 0.38$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco,  $3.26 \pm 0.42$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco y de  $3.37 \pm 0.16$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco, para los extractos A1, A2 y A3, respectivamente. Y para la cepa CP-470 las concentraciones fueron de  $229.98 \pm 11.73$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco,  $290.06 \pm 25.74$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco y  $291.95 \pm 14.09$  mg EAG/g de basidiocarpo peso seco, para los extractos A1, A2 y A3, respectivamente (**Cuadro 15**). De los extractos A1, A2 y A3 se pudo observar un aumento considerable en la concentración de polifenoles totales con respecto a los extractos M1, M2 y M3, esto pudo deberse a: a) el método de extracción, b) la temperatura de tratamiento y c) solvente de extracción de origen, es decir, los extractos obtenidos por maceración se resuspendieron en el mismo solvente en el que fueron extraídos inicialmente los principios activos, mientras que en el caso de los extractos

obtenidos por soxhlet, provienen de una extracción acuosa inicial y posteriormente, fueron resuspendidos en agua, tequila blanco y etanol:agua [80:20] (v/v). Estos resultados son similares a los obtenidos por De Bruijn *et al.*, (2010) quienes obtuvieron la mayor concentración de polifenoles totales empleando agua como solvente extractante comparándolo con etanol, acetona, acetato de etilo y hexano; Puttaraju *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Mau *et al.*, 2005 a y b, quienes trabajaron con extractos acuosos y metanólicos, obtuvieron mejores resultados con los primeros. Estos resultados pueden sugerir, que los extractos acuosos en este caso son mejores para la extracción de polifenoles totales con respecto a los etanólicos debido a la polaridad del solvente (Chirinang y Intarapichet, 2009) y afinidad de los extractos por el solvente. También es importante considerar el volumen de resuspensión, ya que al diluir el extracto en un volumen mayor, la concentración del mismo baja y por lo tanto, se obtiene una menor concentración de polifenoles totales tal como se pudo observar al comparar los extractos A1, A2 y A3 de las cepas CP-470 y CP-405.

**Cuadro 15.** Concentración de polifenoles totales presentes en los extractos obtenidos a partir del basidiocarpo de las cepas CP-405 y CP-470.

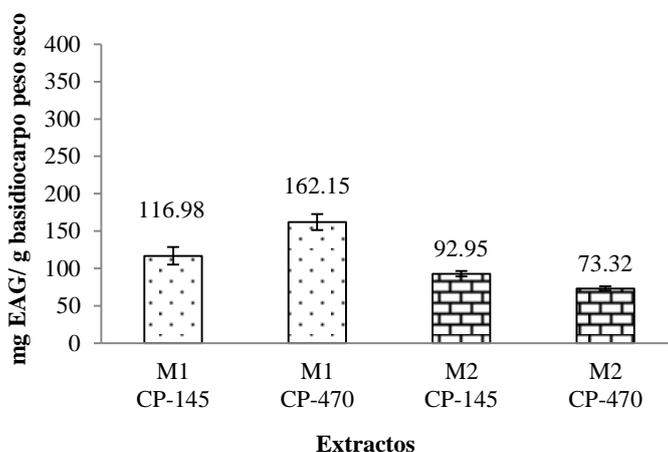
Extracto	Resuspensión en 10 mL de solvente	Resuspensión en 100 mL de solvente
	CP-470	CP-405
mg EAG/g basidiocarpo peso seco		
A1	229.98 ± 11.73	3.59 ± 0.38
A2	290.06 ± 25.74	3.26 ± 0.42
A3	291.95 ± 14.09	3.37 ± 0.16
M1	162.15 ± 10.81	N/D
M2	73.32 ± 2.74	0.95 ± 0.06
M3	97.71 ± 3.05	N/D

N/D = no se determinó.

#### 7.4.5 Comparación de la concentración de polifenoles totales de los extractos macerados entre las cepas CP-145 y CP-470

De los extractos M1 y M2 obtenidos por maceración de la cepa CP-145 (*G. lucidum*) y M1, M2 y M3 de la cepa CP-470 (*G. lucidum*), el extracto M1 de la cepa CP-470 presentó una mayor concentración de polifenoles totales en comparación con el mismo extracto en la cepa CP-145, lo cual puede ser atribuido a la especie o a la afinidad que los compuestos de la especie de la cepa CP-470 tienen por el agua. Para el caso del extracto M2, la cepa de *G. lucidum* (CP-145) fue la que mayor concentración presentó con respecto al mismo

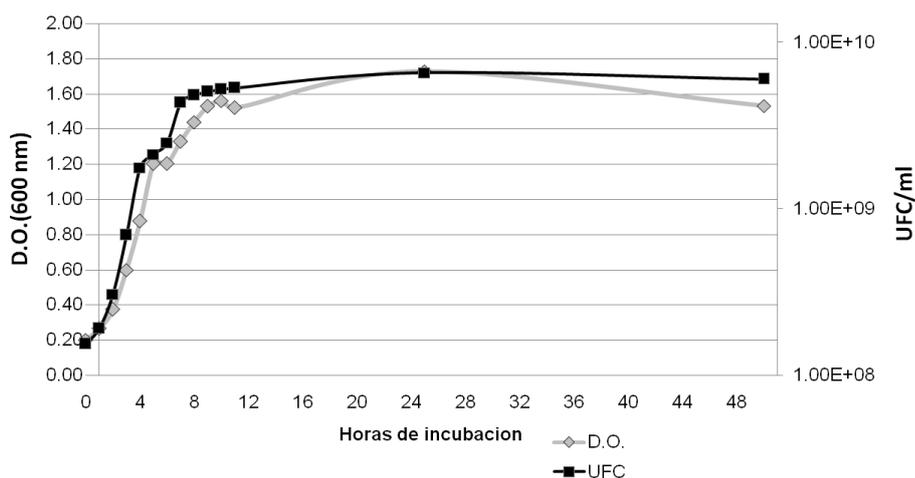
extracto de la cepa CP-470 de lo cual se puede sugerir el mismo comportamiento que se explicó para el extracto M1 de las mismas cepas (**Figura 19**).



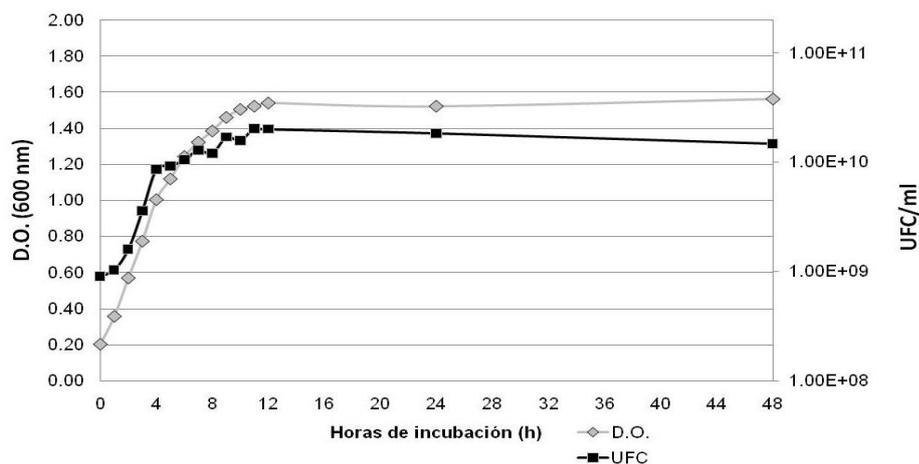
**Figura 19.** Comparación de la concentración de polifenoles totales de los extractos macerados extraídos de las cepas CP-145 y CP-470 de *Ganoderma lucidum*.

### 7.5 Cinética de crecimiento de *B. subtilis* (ATCC6633) y *E. coli* (ATCC25922)

En la **figura 20** y **figura 21** se muestran las curvas de crecimiento de las bacterias de *Bacillus subtilis* y de *Escherichia coli*, respectivamente. En éstas se muestra la relación entre la densidad óptica (D.O.) y las unidades formadoras de colonias (UFC) con respecto al tiempo de incubación.



**Figura 20.** Cinética de crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis* ATCC6633 (CPB-9) utilizada para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de las cepas CP-145 y CP-470.



**Figura 21.** Cinética de crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* ATCC25922 (CPB-8) utilizada para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de la cepa CP-405.

## 7.6 Evaluación del efecto bacteriostático de los extractos

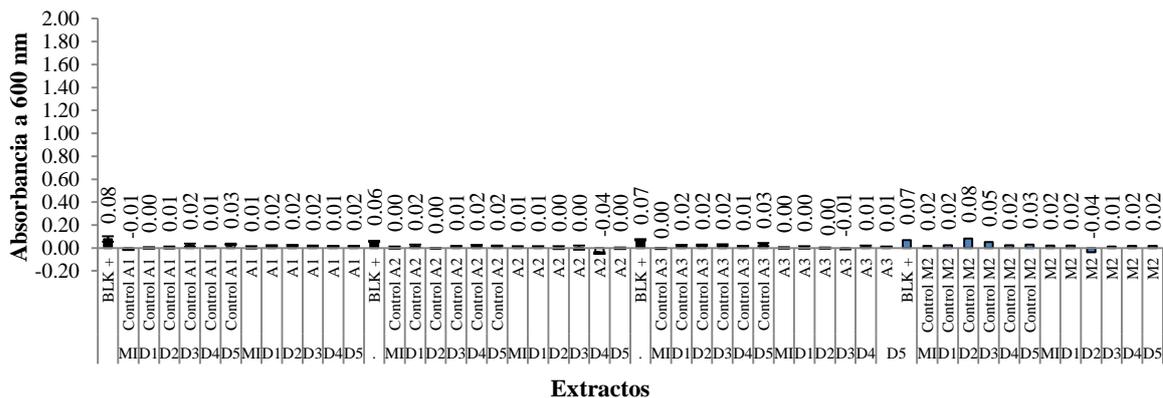
Para realizar este ensayo se efectuó una prueba preliminar utilizando los extractos obtenidos a partir del basidiocarpo de la cepa CP-405 contra la cepa bacteriana CPB-8 (*Escherichia coli* ATCC25922), esto con la finalidad de estandarizar el protocolo para la evaluación del efecto bacteriostático. Posteriormente, se realizaron las pruebas finales con los extractos obtenidos a partir del basidiocarpo de las cepas CP-145 y CP-470 contra la cepa bacteriana CPB-9 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633). Para esta prueba se emplearon tres solventes: agua destilada estéril, tequila blanco y etanol:agua [80:20] (v/v). El monitoreo del efecto bacteriostático de los extractos se realizó a las 24 horas y a las 48 horas en incubación, en el caso de la cepa CP-145 y CP-470; y a las 24 horas de incubación en el caso de la cepa CP-405.

### 7.6.1 Ensayo preliminar: efecto bacteriostático de los extractos de CP-405 vs *E. coli*

La prueba para la cepa CP-405 se monitoreó únicamente a las 24 horas. Se evaluó el efecto bacteriostático de los extractos A1, A2, A3 y M2 sobre la cepa CPB-8 de *Escherichia coli*.

#### 7.6.1.1 Efecto bacteriostático de extractos A1, A2 y A3 de la cepa CP-405 vs *E. coli*

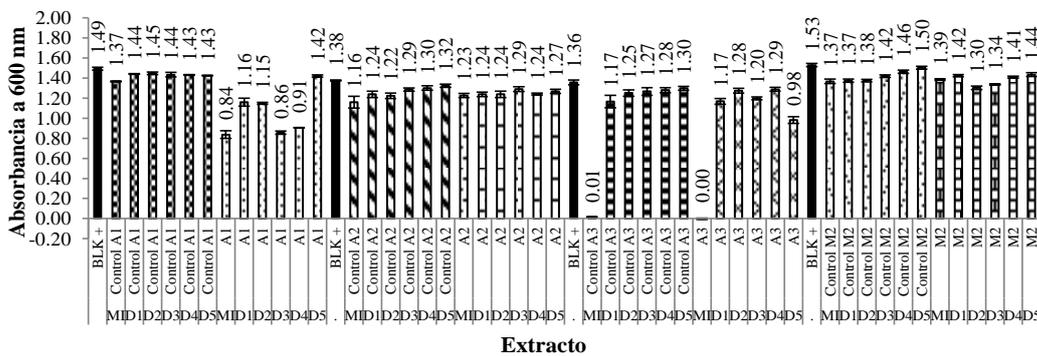
Los valores de D.O. obtenidos al tiempo 0 (T0) en los extractos A1, A2, A3 y M2 presentaron en todas sus diluciones valores inferiores a 0.1 (**Figura 22**).



**Extractos**

**Figura 22.** Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-8 (*Escherichia coli*) al contacto con los extractos A1 (Extracto acuoso resuspendido en agua) A2 (Extracto acuoso resuspendido en tequila), A3 (Extracto acuoso resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v) y M2 (Macerado en tequila blanco resuspendido en tequila blanco) obtenidos de la cepa CP-405 de *G. subamboinense* al tiempo 0 (T0).

A las 24 horas, en todos los extractos A1, A2 y A3 presentaron los valores más bajos en las diluciones MI ( $0.84 \pm 0.04$ ), MI ( $1.23 \pm 0.02$ ) y en la dilución MI ( $0.00 \pm 0.01$ ), respectivamente. El valor de D.O. del blanco positivo (BLK+) a las 24 horas para el extracto A1 fue de  $1.49 \pm 0.01$  (valor de D.O. superior a los obtenidos usando el extracto en todas las diluciones), de  $1.38 \pm 0.01$  (valor de D.O. superior a los obtenidos usando el extracto en todas las diluciones) y de  $1.36 \pm 0.02$  para el extracto A3 (valor de D.O. superior a los obtenidos usando el extracto en todas las diluciones). Finalmente, se observó en las microplacas correspondientes a los extractos A1 y A2, que en todas las diluciones hubo un elevado grado de turbidez mientras que en la microplaca correspondiente al extracto A3 no se presentó el mismo efecto en la dilución MI (**Figura 23**).



**Figura 23.** Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-8 (*Escherichia coli*) al contacto con los extractos A1 (Extracto acuoso resuspendido en agua) A2 (Extracto acuoso resuspendido en tequila), A3 (Extracto acuoso resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v) y M2 (Macerado en tequila blanco resuspendido en tequila blanco) obtenidos de la cepa CP-405 de *G. subamboinense* a las 24 horas de incubación.

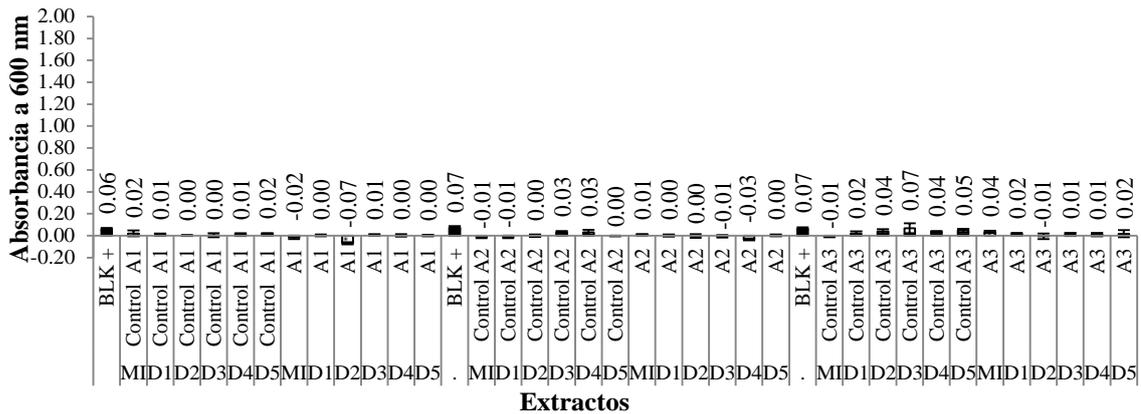
Por lo anterior, se pudo confirmar que el extracto A3 en la dilución MI tuvo efecto bacteriostático sobre la cepa bacteriana CPB-8 de *Escherichia coli*. El extracto M2 presentó el valor más bajo en la dilución D2 ( $1.30 \pm 0.02$ ) y el valor de D.O. del blanco positivo (BLK+) fue de  $1.53 \pm 0.01$  (valor de D.O. superior a los obtenidos usando el extracto en todas las diluciones). Finalmente, en la microplaca correspondiente al extracto M2, se observó que en todas las diluciones que en todas las diluciones hubo un elevado grado de turbidez. Los agentes antibacterianos presentes en los extractos son presumiblemente terpenoides, específicamente triterpenos tales como el Ergostano y el Lanostano, de los cuales se ha reportado el aislamiento de más de 130 en especies de hongos Ganodermatales y a los cuales se les confiere acción inhibitoria sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Gao *et al.*, 2005). La inhibición incluso pudo deberse a constituyentes tales como la ganomicina, de la cual también se ha demostrado en estudios *in vitro*, que poseé actividad antibacterial de amplio espectro contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Sanodiya *et al.*, 2009). Se puede sugerir que el etanol:agua [80:20] (v/v) influyó en la actividad bacteriostática ya que en el control del extracto A3 se observó el mismo efecto inhibitorio. Por lo tanto se puede atribuir al etanol un efecto potencializador de la actividad bacteriostática del extracto.

#### **7.6.2 Ensayo final: efecto bacteriostático de los extractos de la cepa CP-470 vs *B. subtilis***

Se probaron los extractos M1, M2, M3, A1, A2 y A3 para evaluar el efecto bacteriostático contra la cepa bacteriana CPB-9 de *Bacillus subtilis*.

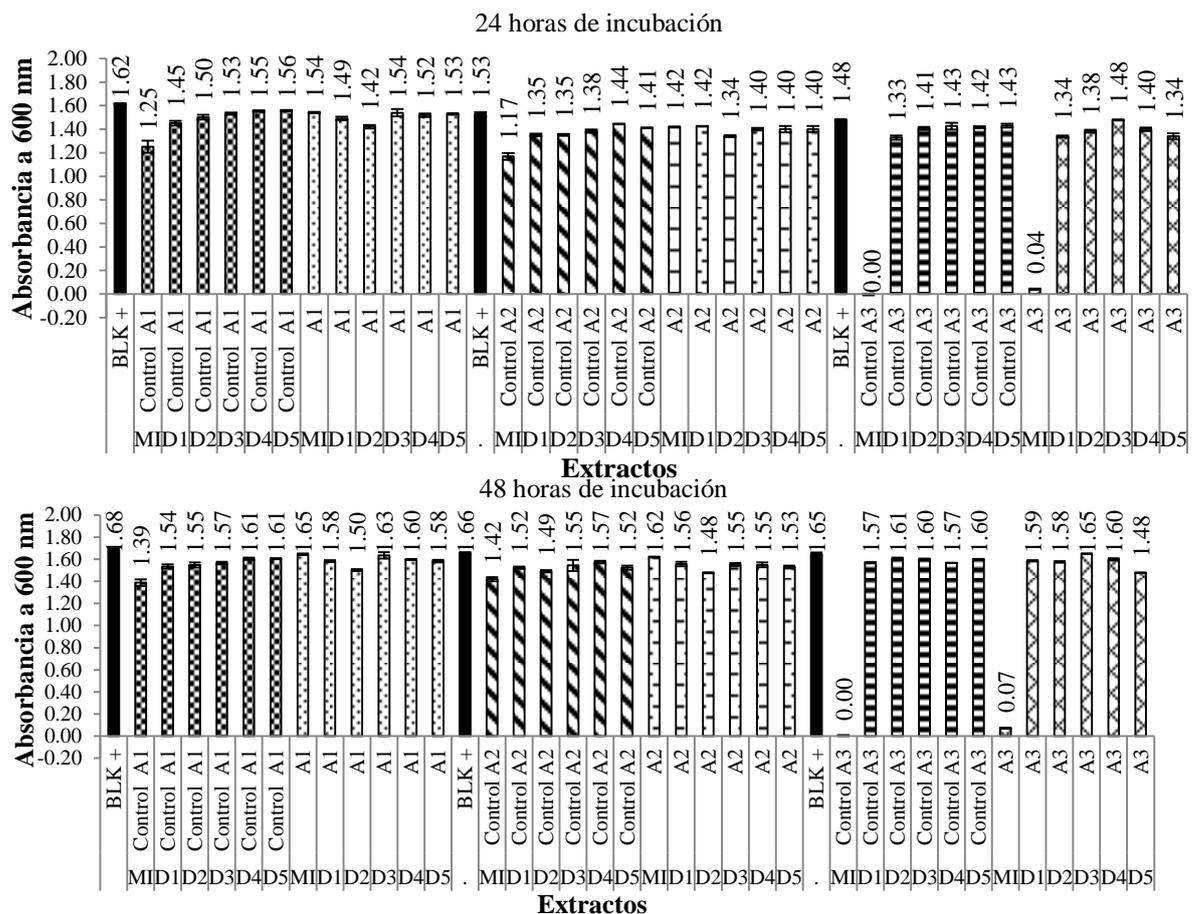
##### **7.6.2.1 Efecto bacteriostático de los extractos A1, A2 y A3 de la cepa CP-470 vs *B. subtilis***

Todos los valores de densidad óptica (D.O.) obtenidos al tiempo 0 (T0) fueron inferiores a 0.1 (**Figura 24**).



**Figura 24.** Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-9 (*Bacillus subtilis*) al contacto con los extractos A1 (Extracto acuoso resuspendido en agua) A2 (Extracto acuoso resuspendido en tequila) y A3 (Extracto acuoso resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v) obtenidos de la cepa CP-470 de *G. lucidum* al tiempo 0 (T0).

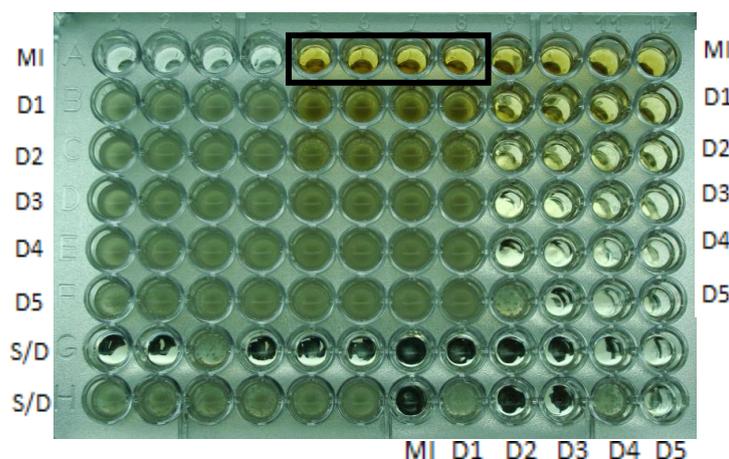
La prueba a las 24 horas mostró que los extractos A1 y A2 presentaron valores de D.O. superiores a 1.00 en todas las diluciones, siendo los valores más bajos de  $1.42 \pm 0.01$  en la dilución D2 (extracto A1) y de  $1.34 \pm 0.01$  en la misma dilución (extracto A2). El mismo comportamiento se observó en el extracto A3 en donde los valores de D.O. de las diluciones fueron superiores a 1.00 a excepción de la dilución MI, la cual presentó una D.O. de  $0.04 \pm 0.01$ . Los valores de D.O. del blanco positivo (BLK+) fueron para los extractos A1 de  $1.62 \pm 0.00$  (valor de D.O. superior al obtenido en todas las diluciones usando el extracto), de  $1.53 \pm 0.02$  para el extracto A2 (valor de D.O. superior a los obtenidos en todas las diluciones usando el extracto) y de  $1.48 \pm 0.01$  para el extracto A3 (valor de D.O. igual al obtenido usando el extracto en la dilución D3 e inferior a los obtenidos en las diluciones restantes). A las 48 horas, en los tres extractos se incrementaron los valores de D.O. en todas las diluciones. Sin embargo, el extracto A3 en la dilución MI continuó con un valor muy bajo con respecto al resto de las diluciones de los extractos A1 y A2 y de las diluciones D1 a D5 del extracto A3, registrándose  $0.07 \pm 0.01$ . Los valores de D.O. del blanco positivo (BLK+) fueron para los extractos A1 de  $1.68 \pm 0.01$  (valor de D.O. superior a los obtenidos en todas las diluciones usando el extracto), de  $1.66 \pm 0.01$  para el extracto A2 (valor de D.O. superior a los obtenidos en todas las diluciones usando el extracto) y de  $1.65 \pm 0.01$  para el extracto A3 (valor de D.O. igual al obtenido en la dilución D3 y superior al resto de las diluciones) (**Figura 25**).



**Figura 25.** Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-9 (*Bacillus subtilis*) al contacto con los extractos A1 (Extracto acuoso resuspendido en agua), A2 (Extracto acuoso resuspendido en tequila) y A3 (Extracto acuoso resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v) obtenidos de la cepa CP-470 de *G. lucidum* a las 24 horas y 48 horas de incubación.

Finalmente, se pudo observar en los pozos de la microplaca correspondientes a los extractos A1 y A2, que en todas las diluciones de ambos extractos se presentó un elevado grado de turbidez mientras que en el extracto A3 no se observó turbidez en la dilución MI (**Figura 26**). Por lo que se puede decir que el extracto A3 en la dilución MI tuvo actividad bacteriostática sobre la cepa bacteriana CPB-9 de *Bacillus subtilis*. La ausencia de actividad bacteriostática en los extractos A1 y A2 pudo deberse a la poca afinidad en términos de polaridad entre los compuestos antibacterianos y el solvente o a la hidrofobicidad de los compuestos como sugiere Quereshi *et al* (2010) al reportar que la mayoría de los compuestos activos antimicrobianos generalmente son insolubles en agua, por lo tanto es de esperarse que con solventes orgánicos de baja polaridad se puedan obtener extractos con mayor actividad antimicrobiana. El efecto bacteriostático en el extracto A3 pudo deberse a que el etanol y la concentración a la que se administró potencializó el efecto bacteriostático, ya que el etanol es usado como agente desinfectante en laboratorios y hospitales debido a su capacidad para degradar la capa lipídica que

compone de la pared celular de la bacteria permitiendo que la bacteria pierda su permeabilidad habilitando el acceso de los compuestos antibacterianos y permitiéndoles realizar su acción sobre los diferentes componentes celulares. El efecto inhibitorio también pudo deberse a constituyentes tales como la ganomicina, la cual ha demostrado poseer actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Sanodiya *et al.*, 2009) o a esteroides tales como el 5 $\alpha$ -ergosta-7, 22-dien-3 $\beta$ -ol, 5,8-epidioxi-5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -ergosta-6, 22-dien-3 $\beta$ -ol aislados del basidiocarpo de *Ganoderma*, los cuales inhiben el crecimiento de una gran cantidad de bacterias (Kuznetsov *et al.*, 2005).

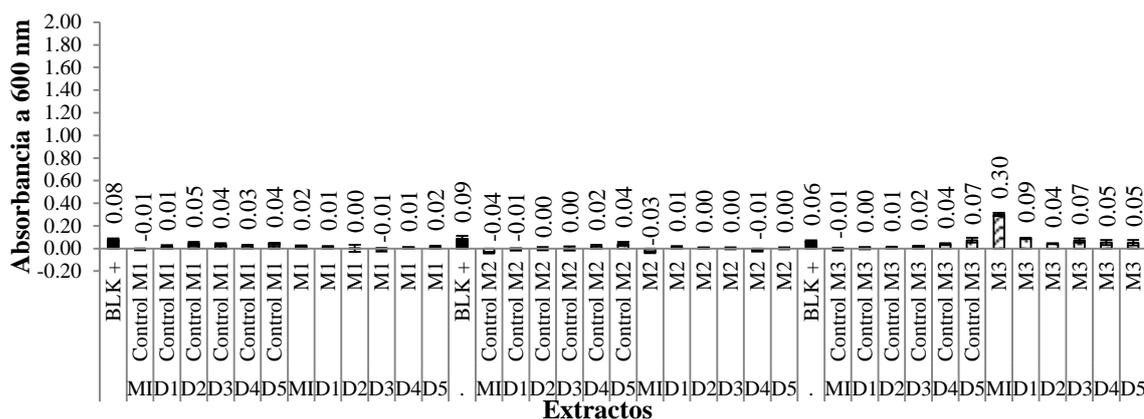


**Figura 26.** Evaluación del efecto bacteriostático del extracto A3 (Extracto acuoso resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v) de la cepa CP-470 a las 48 horas de incubación. Los pozos enmarcados muestran nulo grado de turbidez.

El control del extracto A3, que fue etanol:agua [80:20] (v/v), pudo influir en la actividad bacteriostática. Esto se pudo determinar cualitativamente al observar la ausencia de turbidez en la dilución MI del control positivo (C+) del extracto A3 en la microplaca. Por lo cual se puede sugerir que el etanol potencializó el efecto bacteriostático del extracto. Quereshi *et al.* (2010), indicaron la misma tendencia al observar que la mejor actividad antimicrobiana se obtuvo utilizando como solvente al etanol.

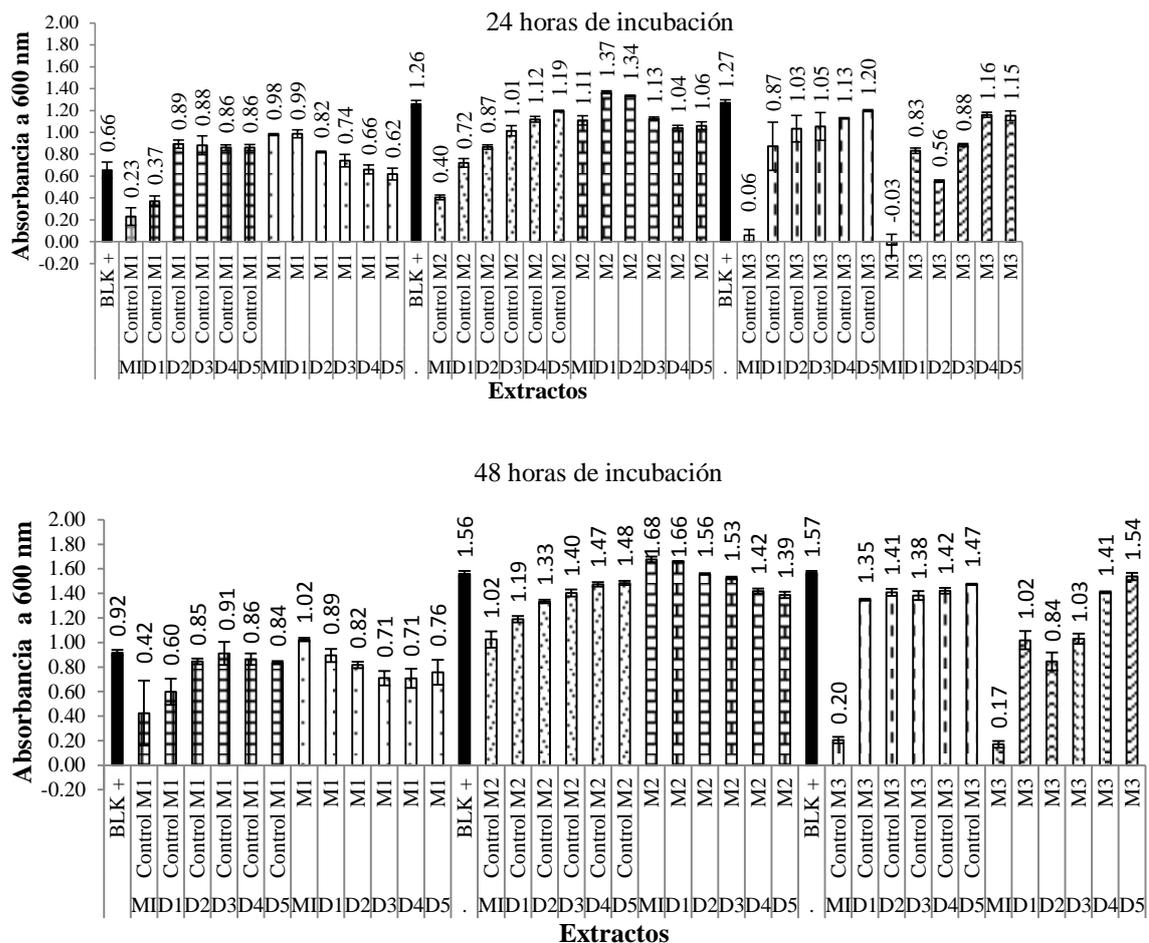
#### 7.6.2.2 Efecto bacteriostático de los extractos M1, M2 y M3 de la cepa CP-470 vs *B. subtilis*

Todos los valores de densidad óptica (D.O.) obtenidos al tiempo 0 (T0), es decir, antes de la incubación fueron inferiores a 0.1 a excepción del extracto M3 en la dilución MI en donde se observó un valor de densidad óptica de 0.30 (**Figura 27**).



**Figura 27.** Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-9 (*Bacillus subtilis*) al contacto con los extractos M1 (Macerado acuoso resuspendido en agua), M2 (Macerado en tequila blanco resuspendido en tequila blanco) y M3 (Macerado etanólico [80:20] (v/v) resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v) obtenidos de la cepa CP-470 de *G. lucidum* al tiempo 0 (T0).

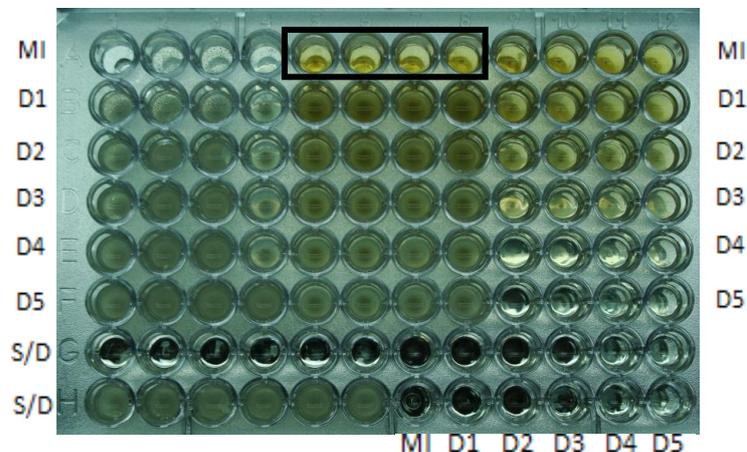
Los valores de D.O. más bajos obtenidos a las 24 horas para los extractos M1, M2 y M3 fueron de  $0.62 \pm 0.05$  en la dilución D5, de  $1.04 \pm 0.02$  en la dilución D4 y de  $-0.03 \pm 0.10$  en la dilución MI, respectivamente. Los valores de D.O. del blanco positivo (BLK +) fueron para los extractos M1 de  $0.66 \pm 0.07$  (valor de D.O. inferior a los obtenidos usando el extracto, a excepción de la dilución D5), de  $1.26 \pm 0.03$  para el extracto M2 (valor de D.O. superior a los obtenidos empleando el extracto, a excepción de las diluciones D1 y D2) y de  $1.27 \pm 0.03$  para el extracto M3 (valor de D.O. superior a los obtenidos usando el extracto en todas las diluciones). A las 48 horas, se observó que los valores de D.O. aumentaron en los tres extractos a  $0.76 \pm 0.10$  en la dilución D5 para el extracto M1, a  $1.42 \pm 0.02$  en la dilución D4 para el extracto M2 y a  $0.17 \pm 0.03$  para el extracto M3 en la dilución MI. Los valores de densidad óptica del blanco positivo (BLK +) a las 48 horas fueron para los extractos M1 de  $0.92 \pm 0.02$  (valor de densidad óptica superior a los obtenidos empleando el extracto), de  $1.56 \pm 0.02$  para el extracto M2 (valor de densidad óptica igual al obtenido en la dilución D2, superior a los obtenidos en las diluciones D3, D4 y D5 e inferior a los valores de D.O. obtenidos a las diluciones MI y D1 empleando el extracto) y de  $1.57 \pm 0.01$  para el extracto M3 (valor de densidad óptica superior a los obtenidos empleando el extracto en todas las diluciones) (**Figura 28**).



**Figura 28.** Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-9 (*Bacillus subtilis*) al contacto con los extractos M1 (Macerado acuoso resuspendido en agua), M2 (Macerado en tequila blanco resuspendido en tequila blanco) y M3 (Macerado etanólico [80:20] (v/v) resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v) obtenidos de la cepa CP-470 de *G. lucidum* a las 24 horas y 48 horas de incubación.

Finalmente, se observó que en los pozos de la microplaca correspondientes a los extractos M1 y M2 en las diluciones D5 y D4 respectivamente, un elevado grado de turbidez a pesar de que registraron valores de D.O. relativamente bajos, mientras que en el extracto M3 no se observó turbidez en la dilución MI (**Figura 29**), lo que demostró que el extracto M3 en la dilución MI tuvo actividad bacteriostática sobre la cepa bacteriana CPB-9 de *Bacillus subtilis*. Del mismo modo Russell y Paterson (2006) reportaron que extractos metanólicos de micelio inhibieron el crecimiento de *Bacillus subtilis*, confirmando que los extractos alcohólicos presentan mayor actividad bacteriostática. La ausencia de actividad bacteriostática del extracto M1 puede deberse a la poca afinidad de polaridad entre los compuestos antibacterianos y el solvente como sugiere Quereshi *et al* (2010) al reportar que la mayoría de los compuestos activos antimicrobianos generalmente son insolubles en agua, por lo tanto es de esperarse que se puedan obtener extractos con mayor actividad

antimicrobiana a partir de solventes orgánicos de menor polaridad. La capacidad inhibitoria en el caso del extracto M3 pudo deberse a que el etanol y la concentración a la que se administró potencializó el efecto bacteriostático, ya que el etanol es usado como agente desinfectante en laboratorios y hospitales debido a su capacidad para degradar la capa lipídica que compone de la pared celular de la bacteria permitiendo que la bacteria pierda su permeabilidad habilitando el acceso de los compuestos antibacterianos y permitiéndoles realizar su acción sobre los diferentes componentes celulares. El efecto inhibitorio igualmente pudo deberse a constituyentes tales como la ganomicina, de la cual también se ha demostrado en estudios *in vitro*, que posee actividad antibacterial de amplio espectro contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Sanodiya *et al.*, 2009).

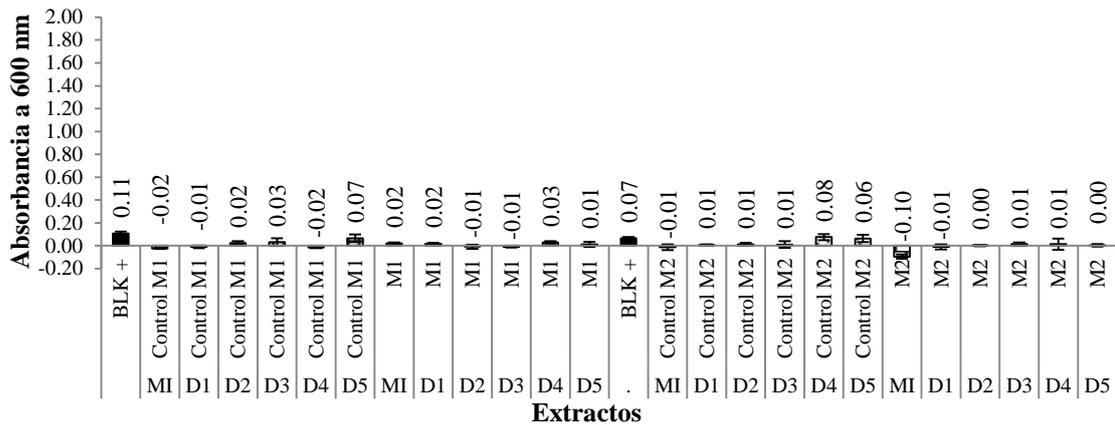


**Figura 29.** Evaluación del efecto bacteriostático del extracto M3 (Macerado etanólico [80:20] (v/v) resuspendido en etanol:agua [80:20] (v/v) de la cepa CP-470 a las 48 h de incubación. Los pozos enmarcados muestran nulo grado de turbidez.

De acuerdo al comportamiento del control positivo (C+) del extracto M3, se puede sugerir que el etanol:agua [80:20] (v/v) influyó en la actividad bacteriostática. Esto se pudo determinar cualitativamente al observar la ausencia de turbidez en la dilución MI del control positivo (C+). Por lo cual se puede aludir que el etanol potencializó el efecto bacteriostático del extracto.

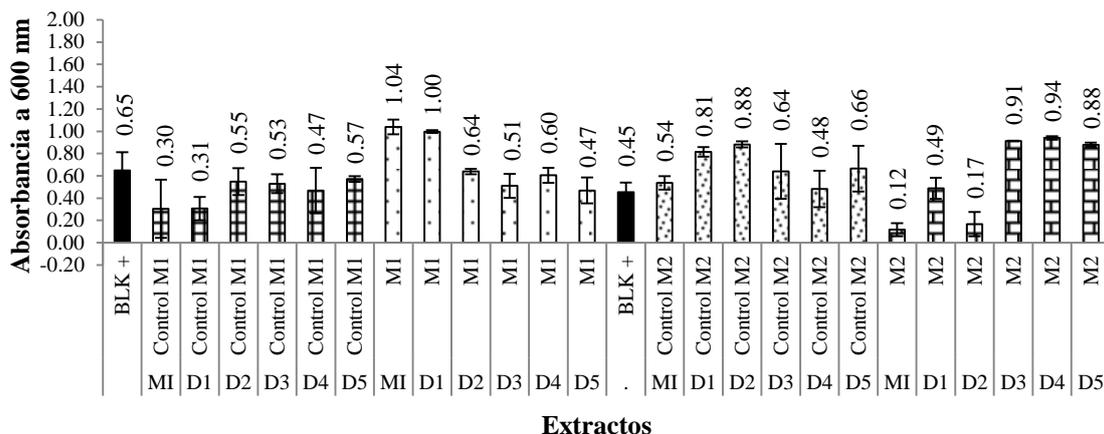
### 7.6.3 Ensayo final: efecto bacteriostático de los extractos de CP-145 vs *B. subtilis*

La prueba para la cepa CP-145 se realizó con los extractos M1 y M2. Los valores de densidad óptica (D.O.) obtenidos al tiempo 0 (T0), es decir, antes de la incubación fueron inferiores a 0.1 (**Figura 30**).



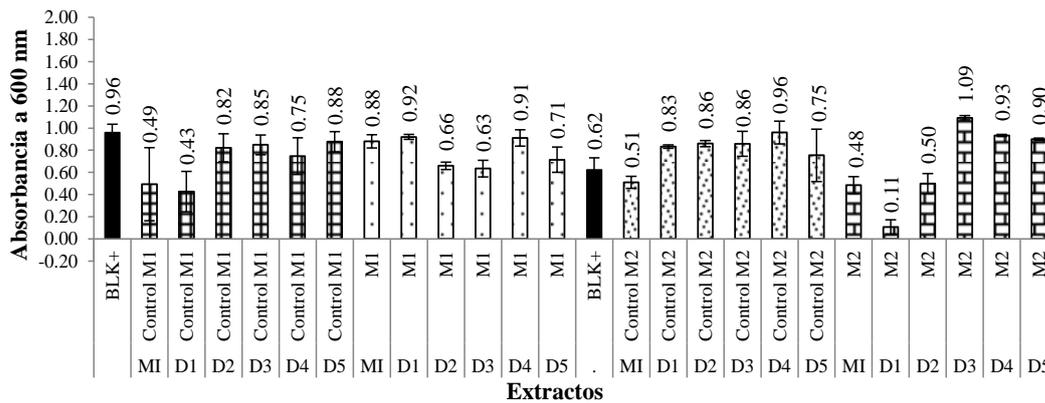
**Figura 30** Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-9 (*Bacillus subtilis*) al contacto con los extractos M1 (Macerado acuoso resuspendido en agua) y M2 (Macerado en tequila blanco resuspendido en tequila blanco) obtenidos de la cepa CP-145 de *G. lucidum* al tiempo 0 (T0).

A las 24 horas los resultados de D.O. mostraron que el extracto M2 presentó los valores más bajos en las diluciones MI (mezcla inicial) con  $0.12 \pm 0.06$  y D2 con un valor de  $0.17 \pm 0.11$ . En el extracto M1, los valores de D.O. más bajos fueron de  $0.47 \pm 0.12$  correspondiente a la dilución D5 y de  $0.51 \pm 0.11$  en la dilución D3. En ambos casos, los valores de D.O. fueron superiores a los obtenidos en el blanco positivo (BLK +) en donde se obtuvieron valores de  $0.45 \pm 0.09$  para el extracto M2 y de  $0.65 \pm 0.16$  para el extracto M1. En el segundo monitoreo realizado a las 48 horas, el extracto M2 en las diluciones MI y D2 elevó sus valores de D.O. a  $0.48 \pm 0.08$  y  $0.50 \pm 0.09$ , respectivamente. Sin embargo, se pudo observar una considerable disminución en el valor de la D.O. en la dilución D1 de este mismo extracto siendo de  $0.11 \pm 0.07$  (Figura 31).



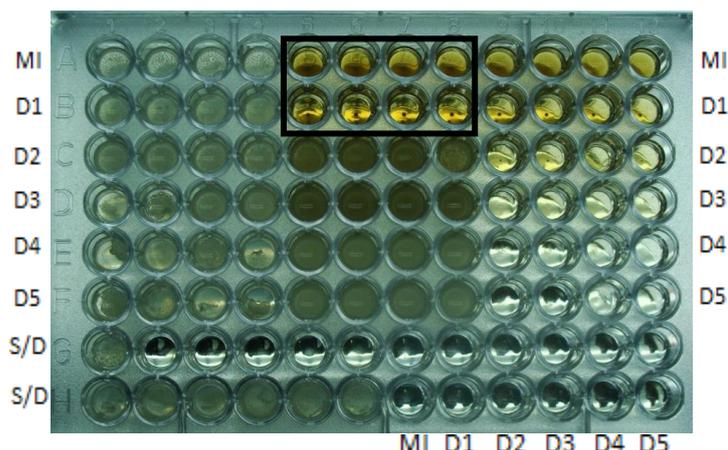
**Figura 31.** Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-9 (*Bacillus subtilis*) al contacto con los extractos M1 (Macerado acuoso resuspendido en agua) y M2 (Macerado en tequila blanco resuspendido en tequila blanco) obtenidos de la cepa CP-145 de *G. lucidum* a las 24 horas de incubación.

En el caso del extracto M1, a las 48 horas también hubo un incremento en el valor de D.O. en ambas diluciones siendo de  $0.71 \pm 0.11$  para la dilución D5 y de  $0.63 \pm 0.07$  para la dilución D3. Los valores de D.O. obtenidos a partir del extracto M1 en las diferentes diluciones fueron inferiores al valor obtenido en su blanco positivo (BLK +), mientras que el valor de la D.O del blanco positivo (BLK +) del extracto M2 fue de  $0.62 \pm 0.11$  cuyo valor fue inferior con respecto a los valores de D.O obtenidos a partir del extracto M2 en sus diferentes diluciones (**Figura 32**).



**Figura 32.** Variación de la densidad poblacional (expresada en D.O) de la cepa bacteriana CPB-9 (*Bacillus subtilis*) al contacto con los extractos M1 (Macerado acuoso resuspendido en agua) y M2 (Macerado en tequila blanco resuspendido en tequila blanco) obtenidos de la cepa CP-145 de *G. lucidum* a las 48 horas de incubación.

Finalmente, se pudo observar en los pozos correspondientes al extracto M2 que las diluciones MI y D1 no presentaron turbidez (**Figura 33**) mientras que la dilución D3 del extracto M1 a pesar de registrar el valor más bajo de densidad óptica, si generó un alto grado de turbidez, por lo que se puede sugerir que el extracto M2 en las diluciones MI y D1 tuvo actividad bacteriostática sobre la cepa bacteriana CPB-9 de *Bacillus subtilis*. Los controles de los extractos M1 y M2 que fueron agua destilada estéril y tequila blanco, respectivamente, no influyeron en la actividad bacteriostática. Esto se pudo determinar cualitativamente al observar el alto grado de turbidez generado en todas las diluciones correspondientes al control positivo (C+) en la microplaca. Lo que demostró que el tequila junto con el extracto potencializó el efecto bacteriostático. Éstos resultados son similares a los obtenidos por Russell y Paterson (2006) quienes observaron en siete hongos Indonesios de la especie *Ganoderma*, actividad inhibitoria sobre crecimiento de *Bacillus subtilis*.



**Figura 33.** Evaluación del efecto bacteriostático del extracto M2 (Macerado en tequila blanco resuspendido en tequila blanco) de la cepa CP-145 a las 48 h de incubación. Los pozos enmarcados muestran nulo grado de turbidez.

La baja actividad bacteriostática del extracto M1 pudo deberse a la poca afinidad de polaridad entre los compuestos antibacterianos y el solvente como sugiere Quereshi *et al* (2010) al reportar que la mayoría de los compuestos activos antimicrobianos generalmente son insolubles en agua, por lo tanto es de esperarse que se puedan obtener extractos con mayor actividad antimicrobiana a partir de solventes orgánicos de menor polaridad . También es posible que el grado de alcohol presente en el tequila haya potencializado el efecto bacteriostático, ya que el alcohol por sí mismo es un agente que degrada la capa lipídica que compone la pared celular de la bacteria, permitiendo que la bacteria pierda su permeabilidad habilitando el acceso de los compuestos antibacterianos y permitiéndoles realizar su acción sobre los diferentes componentes celulares. Los agentes antibacterianos presentes en los extractos son presumiblemente terpenoides, específicamente triterpenos tales como el Ergostano y el Lanostano, de los cuales se ha reportado el aislamiento de más de 130 en especies de hongos Ganodermatales y a los cuales se les confiere la efectiva acción inhibitoria sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Gao *et al.*, 2005), se especula que su mecanismo de acción involucra la ruptura de la membrana por los compuestos lipofílicos (Cowan, 1999). En otros hongos basidiomicetos se han reportado a los sesquiterpenos y diterpenoides con actividad antimicrobiana y antibacteriana (Brizuela *et al.*, 1998).

#### **7.6.4 Evaluación del efecto bacteriostático de las cepas CP-145, CP-470 y CP-405**

Los resultados de la D.O. para el extracto M2 de la cepa CP-145 mostraron que las diluciones MI y D1 inhibieron el crecimiento de *B. subtilis* (ATCC 6633). El mismo comportamiento se observó en el extracto M3 y A3 de la cepa CP-470 contra *B. subtilis* en

las diluciones de MI. Estos resultados son similares a los obtenidos por Barros *et al.*, (2007) quienes observaron actividad bacteriostática contra *B. subtilis* en extractos metanólicos a partir de hongos nativos. Por último, el extracto A3 de la cepa 405 presentó actividad bacteriostática contra *E. coli* (ATCC 25922) en la dilución MI (**Cuadro 16**), estos resultados fueron similares a los reportados por Ayodele e Idoko (2011) quienes reportaron la inhibición de *E. coli* con extractos de cuatro hongos comestibles.

**Cuadro 16.** Evaluación del efecto bacteriostático de los extractos obtenidos de las cepas CP-145, CP-405 y CP-470.

Cepa	Procedencia de extracto	Extracto	Dilución	Concentración final de los extractos en $\mu\text{g}/\text{mL}^*$	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia. Coli</i>
CP-405	Macerado	M2	MI	40,027.609	ND	NPAB
			D1	17,403.308	ND	NPAB
			D2	7,566.6553	ND	NPAB
			D3	3,289.8501	ND	NPAB
			D4	1,430.3696	ND	NPAB
CP-405	Soxhlet	A1	D5	621.899984	ND	NPAB
			MI	13,150.833	ND	NPAB
			D1	5,717.7538	ND	NPAB
			D2	2,485.9797	ND	NPAB
			D3	1,080.8607	ND	NPAB
CP-405	Soxhlet	A2	D4	469.93946	ND	NPAB
			D5	204.32149	ND	NPAB
			MI	13,150.833	ND	NPAB
			D1	5,717.7538	ND	NPAB
			D2	2,485.9797	ND	NPAB
CP-405	Soxhlet	A3	D3	1,080.8607	ND	NPAB
			D4	469.93946	ND	NPAB
			D5	204.32149	ND	NPAB
			MI	13,150.833	ND	<b>PAB</b>
			D1	5,717.7538	ND	NPAB
CP-470	Macerado	M1	D2	2,485.9797	ND	NPAB
			D3	1,080.8607	ND	NPAB
			D4	469.93946	ND	NPAB
			D5	204.32149	ND	NPAB
			MI	434,782.61	NPAB	ND
CP-470	Macerado	M2	D1	189,035.92	NPAB	ND
			D2	82,189.53	NPAB	ND
			D3	36,035.58	NPAB	ND
			D4	15,366.64	NPAB	ND
			D5	6,681.1484	NPAB	ND
CP-470	Macerado	M2	MI	434,782.61	NPAB	ND
			D1	189,035.92	NPAB	ND
			D2	82,189.53	NPAB	ND
			D3	36,035.58	NPAB	ND
			D4	15,366.64	NPAB	ND
			D5	6,681.1484	NPAB	ND

ND= no se determinó; PAB= presentó actividad bacteriostática; NPAB= no presentó actividad bacteriostática.

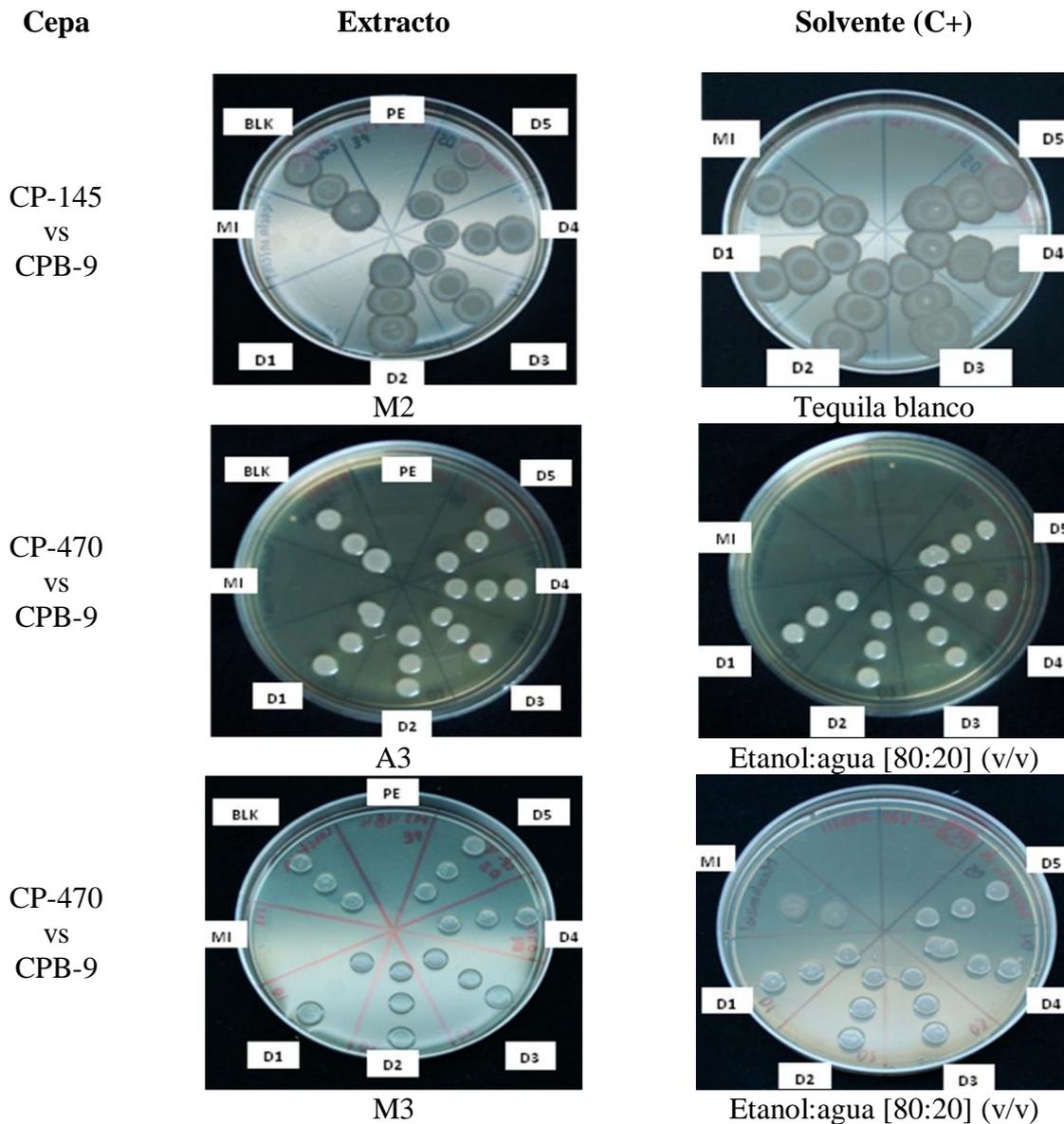
\*Datos calculados como se indica en el apartado 6.10.2.9.

Continuación cuadro 16.

Cepa	Procedencia de extracto	Extracto	Dilución	Concentración final de los extractos en µg/mL	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
CP-470	Macerado	M3	MI	434,782.61	<b>PAB</b>	ND
			D1	189,035.92	NPAB	ND
			D2	82,189.53	NPAB	ND
			D3	36,035.58	NPAB	ND
			D4	15,366.64	NPAB	ND
CP-470	Soxhlet	A1	D5	6,681.1484	NPAB	ND
			MI	130,139.01	NPAB	ND
			D1	56,582.184	NPAB	ND
			D2	24,600.947	NPAB	ND
			D3	10,696.063	NPAB	ND
CP-470	Soxhlet	A2	D4	4,650.4623	NPAB	ND
			D5	2,021.94	NPAB	ND
			MI	130,139.01	NPAB	ND
			D1	56,582.184	NPAB	ND
			D2	24,600.947	NPAB	ND
CP-470	Soxhlet	A3	D3	10,696.063	NPAB	ND
			D4	4,650.4623	NPAB	ND
			D5	2,021.94	NPAB	ND
			MI	130,139.01	<b>PAB</b>	ND
			D1	56,582.184	NPAB	ND
CP-145	Macerado	M1	D2	24,600.947	NPAB	ND
			D3	10,696.063	NPAB	ND
			D4	4,650.4623	NPAB	ND
			D5	2,021.94	NPAB	ND
			MI	434,782.61	NPAB	N/D
CP-145	Macerado	M2	D1	189,035.92	NPAB	N/D
			D2	82,189.53	NPAB	N/D
			D3	36,035.58	NPAB	N/D
			D4	15,366.64	NPAB	N/D
			D5	6,681.1484	NPAB	N/D
CP-145	Macerado	M2	MI	434,782.61	<b>PAB</b>	ND
			D1	189,035.92	<b>PAB</b>	ND
			D2	82,189.53	NPAB	ND
			D3	36,035.58	NPAB	ND
			D4	15,366.64	NPAB	ND
			D5	6,681.1484	NPAB	ND

### 7.7 Evaluación del efecto bactericida

Se procedió a iniciar la evaluación del efecto bactericida tomando muestras de los extractos y de sus respectivos controles con la finalidad de conocer su efecto de forma independiente. Estas muestras fueron tomadas de las diluciones de las microplacas en donde se realizaron las pruebas para evaluar el efecto bacteriostático. Las muestras se inocularon en cajas Petri con Agar Muller Hinton (Bioxon). En esta prueba la presencia de crecimiento bacteriano indicó un efecto bacteriostático y la ausencia de crecimiento un efecto bactericida (Reyes-Estebanez *et al.*, 2008). En la **figura 34** se muestran los resultados obtenidos para las cepas CP-145 y CP-470.



**Figura 34.** Evaluación del efecto bactericida para los extractos M2 (CP-145), A3 y M3 (CP-470) a las 24 horas de incubación. Ambas columnas tanto la del extracto como la del solvente (C+) muestran el efecto bactericida que se presentó contra la cepa CPB-9 de *B. subtilis*.

Los resultados de los ensayos preliminares realizados con los extractos de la cepa CP-405 sólo el extracto A3 mostró efecto bactericida en la en la dilución MI contra la cepa CPB-8 de *Escherichia coli* mientras que en la caja control de este extracto no se observó el mismo efecto. Estos resultados sugieren que el etanol extrajo los compuestos bioactivos que lograron destruir a las bacterias, ya que de haber actuado el etanol de forma independiente como agente bactericida, en la caja Petri control se hubiera presentado el mismo efecto. Estos resultados difieren con lo reportado por Zuluaga *et al.*, (2007) quienes obtuvieron resultados negativos para actividad bactericida utilizando extractos etanólicos de *Ganoderma* contra *E. coli*.

El extracto A3 perteneciente a la cepa CP-470 presentó actividad bactericida contra la cepa CPB-9 de *Bacillus subtilis* en la dilución MI. Sin embargo, el mismo comportamiento se pudo observar en la caja control del extracto. Estos resultados sugieren que el etanol posiblemente fue el que logró tal efecto sobre la bacteria, al alterar su permeabilidad debido a la afectación de la capa fosfolipídica de la membrana citoplasmática de la bacteria al entrar en contacto con el etanol.

Con lo que respecta al extracto M3 obtenido a partir de la cepa CP-470 se pudo observar actividad bactericida contra la cepa CPB-9 de *Bacillus subtilis* con la dilución MI. El mismo patrón se presentó en la caja control del extracto y aunque se pudo observar restos de células bacterianas, el crecimiento fue nulo.

Como se pudo observar en la figura 34, la caja Petri con Agar Muller Hinton perteneciente al extracto M2 de la cepa CP-145, mostró efecto bactericida contra la cepa CPB-9 de *Bacillus subtilis* en las diluciones MI y D1 mientras que al realizar la comparación con la caja control con las mismas diluciones únicamente se observó un efecto bacteriostático. Estos resultados sugieren que el tequila extrajo compuestos bioactivos que lograron detener de manera irreversible el crecimiento de la bacteria, ya que de haber actuado el tequila por sí solo como agente bactericida, en la caja Petri control se hubiera presentado el mismo efecto.

## VIII. CONCLUSIONES

De las cepas de *Ganoderma* estudiadas la más productiva fue la cepa CP-405 con una eficiencia biológica (EB%) de 8.758, seguida de la cepa CP-470 con una EB% de 8.363 y finalmente la cepa CP-145 con una EB% de 5.747.

La concentración más alta de polifenoles totales para la cepa CP-145 se encontró en el extracto M1 con  $116.98 \pm 11.59$  mg EAG/g basidiocarpo peso seco.

En las cepas CP-405 y CP-470, la concentración más elevada de polifenoles totales se halló en los extractos A1 para la cepa CP-405 con  $3.59 \pm 0.38$  mg EAG/g basidiocarpo peso seco y, en los extractos A2 y A3 de la cepa CP-470 las concentraciones más elevadas fueron de  $290.06 \pm 25.74$  mg EAG/g basidiocarpo peso seco y  $291.95 \pm 14.09$  mg EAG/g basidiocarpo peso seco, respectivamente.

De las tres cepas evaluadas la cepa CP-470 fue la que mayor concentración de polifenoles totales presentó cuantificándose en  $291.95 \pm 14.09$  mg EAG/g basidiocarpo peso seco para el extracto A3.

El mejor solvente extractante para obtener la mayor concentración de polifenoles totales fue el agua. Y el mejor método de extracción fue usando el equipo Soxhlet.

La actividad bacteriostática para la cepa CP-145 se encontró en el extracto M2 en las diluciones MI presentando una densidad óptica de  $0.48 \pm 0.08$  y D1 presentando una densidad óptica de  $0.11 \pm 0.07$ .

En la cepa CP-470 se determinó que los extractos con mayor actividad bacteriostática fueron A3 en la dilución MI en la que se obtuvo una densidad óptica de  $0.07 \pm 0.01$  y M3 en la dilución con una densidad óptica de  $0.17 \pm 0.03$ .

En la cepa CP-405, el extracto A3 en la dilución MI fue en donde se observó actividad bacteriostática presentándose una densidad óptica de  $0.00 \pm 0.01$ .

El efecto bactericida se pudo observar en el extracto M2 en la dilución MI y en la dilución D1 de la cepa CP-145, en la cepa CP-470 se presentó en los extractos A3 en la dilución MI y M3 en la dilución MI. Finalmente, en el extracto A3 en la dilución MI de la cepa CP-405 se observó también efecto bactericida.

En el caso de las cajas control de los extractos, solo el control del extracto A3 en las diluciones MI y D1, mostró el mismo comportamiento por lo que se sugiere, en este caso, que el solvente favorece las condiciones para tal efecto.

El mejor solvente extractante para inhibir el crecimiento bacteriano fue el tequila blanco y el etanol agua [80:20] (v/v). Los dos métodos de extracción resultaron efectivos al evaluar el efecto bacteriostático y bactericida en las cepas CP-145 y CP-470.

Se observó que entre mayor es la concentración del extracto, los fenómenos de inhibición y muerte de población bacteriana son más probables.

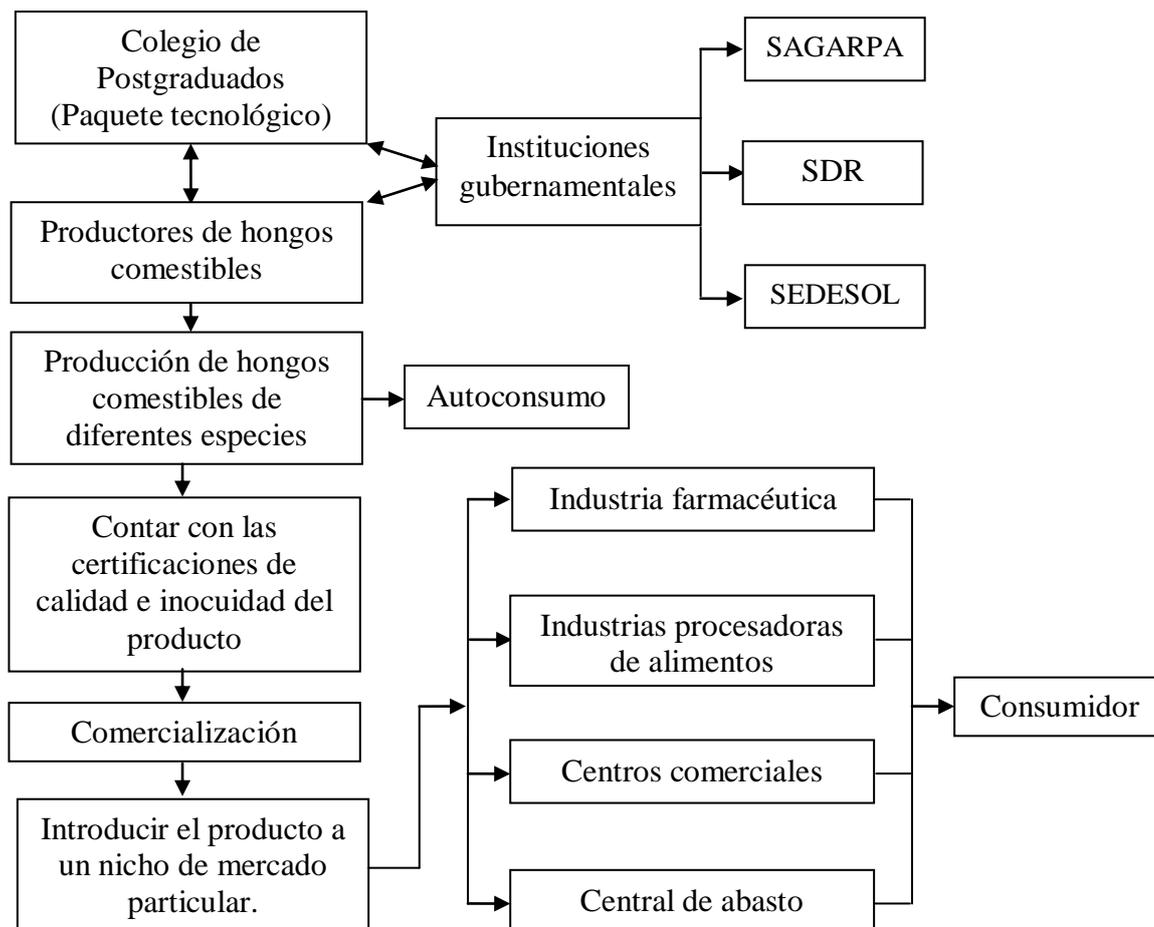
## **IX. ESTRATEGIA PROPUESTA PARA EL APROVECHAMIENTO DE LOS RECURSOS GENÉTICOS DE LAS CEPAS DEL HONGO MEDICINAL *GANODERMA***

Se propone un paquete tecnológico como estrategia para hacer llegar a los productores de hongos comestibles y pobladores de zonas rurales, el cultivo de las especies del hongo funcional *Ganoderma* con las que se trabajaron en esta investigación y de las cuales se concluyó mostraban actividad antibacteriana y contenido de polifenoles totales. Este paquete tecnológico busca proporcionar al productor y pobladores de zonas rurales la información necesaria que le guiarán en el cultivo de las especies del hongo *Ganoderma*. La finalidad de esta propuesta es mostrar otras opciones de cultivo de hongo y fuentes de ingreso lo cual permitirá en el caso de los productores de hongos comestibles ampliar su mercado de una producción de hongo fresco a poder transformarlos a productos con mayor plusvalía aprovechando las propiedades antibacterianas y antioxidantes encontradas en esta investigación. Mientras que a los pobladores de zonas rurales se les proporcionará una actividad extra-agrícola con la cual puedan complementar sus ingresos obtenidos.

### **Actores de la estrategia**

Los actores de la estrategia (**figura 35**) se mencionan a continuación:

1. Productores de hongos comestibles y pobladores de zonas rurales a quienes va dirigida la estrategia.
2. Consumidores de los hongos comestibles fresco o como producto procesado derivado del hongo.
3. Instituciones de investigación como el Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla que por medio de sus investigaciones puedan proporcionar a los productores beneficios como: especies nuevas con posibilidades de explotación comercial, micelio de calidad que garantice una producción segura y asesoramiento en todo lo referente a hongos comestibles.
4. El Gobierno, que a través de instituciones como SEDESOL, SAGARPA, etc. ofrezcan apoyos técnicos, financieros y administrativos a los productores de hongos comestibles.



**Figura 35.** Mapa conceptual de la aplicación del paquete tecnológico, intervenciones y actores participantes.

## PAQUETE TECNOLÓGICO

El objetivo del paquete tecnológico es el de poder realizar la transferencia de tecnología para la producción de las especies hongos de las especies *Ganoderma. curtissi*, *G. subamboinense* y *G. lucidum*.

La semilla para la siembra de las especies se puede conseguir en el Colegio de Postgraduados campus Puebla en presentaciones de 5 kg y 3 kg, se sugiere que el cultivo sea 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 L de agua. La formulación presenta un pH de 6.7 y una humedad de 61.6%.

Las instalaciones mínimas para el crecimiento de los hongos son 5:

### Área de almacenamiento de los substratos

Las dimensiones pueden ser de 3 m de ancho por 3 m de largo y la altura de 3 m, el área debe ser semi-cerrada y estar libre de todo tipo de humedades y contaminantes.

Material indispensable:

- Tambos de plástico para almacenar los diferentes ingredientes para elaborar el sustrato.
- Báscula granataria capacidad mínima 1 g y máxima 20 kg
- Tinas de plástico con tapa de 200 litros
- Pala de metal para tomar y combinar los ingredientes

### Área de preparación del sustrato

Las dimensiones pueden ser de 4 m de ancho por 4 m de largo y la altura de 3 m, el área debe de ser cerrada y libre de contaminantes como polvo.

Material indispensable:

- Un extractor de aire colocado en alguna esquina del área en la parte superior.
- Báscula granataria capacidad mínima 1 g y máxima 10 kg.
- Pala de metal para combinar los ingredientes.
- Tina de plástico de 500 litros.
- Ollas de presión de 21 litros con manómetro (All american).
- Parrilla con quemadores.
- Bolsas de polipropileno con filtro de 13.5 x 80 cm con filtro (*Unicorn Imp. E.U.A*).
- Pinzas de presión metálicas.
- Vaso graduado de 1 litro.

Elaboración del sustrato (las cantidades que se proporcionan de la fórmula COLPOS-17 proporcionan 12 unidades de producción con 1,900 g de sustrato): Los componentes son mezclados con la cantidad de agua recomendada en una tina, asegurando la homogenización mediante una pala, posteriormente el sustrato preparado es depositado en bolsas de polipropileno con filtro de 13.5 x 80 cm con filtro (*Unicorn Imp. E.U.A*) cerrando levemente las bolsas con las pinzas de presión metálicas, las bolsas con sustratos son esterilizadas mediante ollas de presión por hora y media a 121°C. Una vez transcurrido el tiempo las bolsas con sustrato estéril son enfriadas a temperatura ambiente durante 24 horas antes de ser utilizadas.

### Área de inoculación

Las dimensiones pueden ser de 3 m de ancho por 4 m de largo y la altura de 3 m, el área debe ser cerrada y libre de cualquier contaminante, corrientes de aire y tránsito de personas.

Material indispensable:

- Termosellador electrónico (Impulse sealer UL).
- Campana de flujo laminar con norma ISO 9002 (filtro tipo HEPA).
- Dosificador de alcohol etílico.
- Papel absorbente (servilletas).
- Semilla de hongo.
- Tijeras.
- Plumón.

Inoculación del sustrato y formación de las unidades de producción: las manos, la parte superior de la bolsa y las tijeras deben de estar desinfectadas con alcohol etílico antes de cualquier procedimiento. En una campana de flujo laminar las bolsas con sustrato se abren totalmente retirando las pinzas de presión metálicas. Posteriormente, el sustrato es inoculado con 250 gramos de “semilla” de *Ganoderma*, dispersando el inóculo por todo el sustrato, una vez homogeneizado las bolsas (unidades de producción) son selladas mediante un termo-sellador eléctrico y rotuladas.

### Área de incubación

Las dimensiones pueden ser de 3 m de ancho por 4 m de largo y la altura de 3 m, el área debe ser cerrada y estar libre de humedad, corrientes de aire bruscas y polvo.

Material indispensable:

- Estantes metálicos.
- Termómetro.

La incubación se debe realizar en un área ventilada hasta que el micelio cubra completamente al sustrato y los primordios sean visibles. Las unidades de producción no deben de tener contacto directo con el sol, la iluminación debe de ser del 50 al 80%. El área debe permanecer limpia libre de polvo y humedad a temperatura ambiente de entre 15 a 26 °C.

### Área fructificación

Las dimensiones pueden ser de 4 m de ancho por 4 m de largo y la altura de 3 m, el área debe ser cerrada y contener estructuras de metal con diferentes niveles y soportes para colocar las unidades de producción. El área de fructificación debe de estar limpia de lodo y de unidades de fructificación contaminadas, también se debe procurar la aireación continua a través de extractores, además del 50% de iluminación con una humedad relativa aproximada del 85%. La humedad puede conseguirse de manera manual con una mochila fumigadora o automática, mediante un sistema de nebulización y riego automatizado, el riego por ambos métodos deben ser los necesarios siempre y cuando se mantenga la humedad. A las unidades de producción se les retirará la parte superior de la bolsa exponiendo un 10% del substrato y se colocan sobre los soportes en los diferentes niveles, hasta que los cuerpos fructíferos alcancen el estadio adulto.

Las características favorables en el módulo para la producción de cuerpos fructíferos fueron de una temperatura mínima de 15 y una máxima de 26 °C y una humedad relativa de 85% para obtener eficiencias biológicas (EB%) de 5.747 a 8.363.

## X. LITERATURA CITADA

- Alexopoulos, C. J. 1962. *Introductory microbiology*, 2nd. Ed. John Wiley and Sons. Nueva York.
- Alvarez-Parrilla, E., L.A. de la Rosa, N.R. Martínez and G.A. González-Aguilar. 2007. Total phenols and antioxidant activity of commercial and wild mushrooms from Chihuahua, México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5 (5): 329-334.
- Anke T. 1989. Basidiomycetes: A source for new bioactive secondary metabolites. *Progress in Industrial Microbiology*, 27: 51-66.
- Aqueveque, P., J. Becerra and M. Silva. 2010. Secondary metabolites isolated from Chilean *Basidiomycetes*. Pp. 19-30. In: Martínez-Carrera, D., N. Cueto, 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.
- Arboleda-Echavarría, C. y Amanda Inés Mejía-Gallón. 2010. Inducción de la actividad de la lacasa de *Ganoderma* sp. y actividad antioxidante de su biomasa. *Revista Cubana de Farmacia*, 44(4): 519-532.
- Ayodele, S.M. and M.E. Idoko. 2011. Antimicrobial activities of four wild edible mushrooms in Nigeria. *International Journal of Science and Nature*, Vol. 2(1): 55-58.
- Bao, H. N. D., H. Ushio and T. Ohshima. 2008. Antioxidative activity and antidiscoloration efficacy of ergothioneine in mushroom (*Flammulina velutipes*) extract added to beef and fish meats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 10032-10040.
- Barros, L., R.C. Calhella, J.A. Vaz, I.C.F.R. Ferreira, P. Baptista and L.M. Estevinho. 2007. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *European Food Research Technology*, 225: 151-156.
- Básalo, M. E. and J.E. Weight. 1982. Survey of the argentine species of the *Ganoderma lucidum* complex. *Mycotaxon*, 16: 293-325.
- Beltrán, B.C. 2004. Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos: Utilidad práctica. *Revista Chilena de Infectología*; 21 (1): 39-S44.
- Bennati, E., L. Ferlit, M. Motta, S.U. Magnolfi, F. Malentacchi, M. Malaguamera, E. Petruzzi, I. Petruzzi and P. Pinzani. 2008. Cognitive and functional status in the extreme longevity. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 46: 245-252.
- Beristain, A.S., R.M.A.Sánchez, M. Ruiz y V.M. Mendoza. 2003. ¿Cómo evaluar la eficiencia del sistema antioxidante en el estrés oxidativo? Propuesta de un constructo. *Archivo Geriatrico*, 6: 100-104.
- Bhosle S. R., G. Bapat, J.G. Vaidya, S.A. Garad and H. B. Sonawane. 2010. Antimicrobial activity of terpenoid extracts from *Ganoderma* samples. *International Journal of Pharmacy y Life Sciences*, 1(4):234-240.
- Bisang R., M. Campi y V. Cesa. 2009. Biotecnología y desarrollo. Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). Impreso en Santiago de Chile.
- Bonatti, M., P. Karnopp, H. M. Soares and S. A. Furlan. 2004. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocelluloses wastes. *Food Chemistry*, 88: 425-428.
- Boveris, A. 2005. La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars Pharmaceutica*; 46 (1): 85-95.
- Bowman, W. C. y M. Raud. 1987. Coloraciones bacterianas. En: Farmacología: bases químicas y patológicas. 2 ed. La Habana:Editorial Científico-Técnica, 13:6-16.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56: 317-33.
- Brizuela, M.A., L. García, L. Pérez y M. Mansur. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15: 69-74.
- Calderwood, S. y D. Jr. Moellering, 1988. Principios de tratamiento antiinfeccioso. En: Stein LH. Medicina interna. 2 ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica:1469-1486.
- Cardellach, F. y O. Miró. 2004. Papel de la mitocondria en el proceso de envejecimiento. *Clinica e Investigación en Arteriosclerosis*, 16(1): 29-37.
- Carratú, B. and E. Sanzini. 2005. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimetni di origine vegetale. *Annali dell Istituto Superiore di Sanità*, 41(1): 7-16.
- Chang, S. T. 1995. *Ganoderma* – The Leader in production and technology of mushroom nutraceuticals. pp 43-52. In: *Proceedings 6th International Symposium Recent Advances in Ganoderma lucidum*. Eds. Kim, B. K., Kim I. H. and Y. S. Kim), The Pharmaceutical Society of Korea, Seoul, Korea.

- Chen, N.H., Jian-Wen Liu and Jian-Jiang Zhong. 2008. Ganoderic acid Me inhibits tumor invasion through downregulating matrix metalloproteinases 2/9 gene expression. *Journal Pharmacological Sciences*, 108: 212–216.
- Cheung, L. M., and P. C. K. Cheung. 2005. Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry*, 89: 403-409.
- Chirinang P. and K-O. Intarapichet . 2009. Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *Science Asia*, 35: 326–331.
- Colognato, R., I. Laurenza, I. Fontana, F. Coppedé, G. Siciliano, S. Coecke, O. I. Aruoma, L. Benzi and L. Migliore. 2006. Modulation of hydrogen peroxide-induced DNA damage, MAPKs activation and cell death in PC12 by ergothioneine. *Clinical Nutrition*, 25: 135-145.
- Cordiés-Jackson, L., L. A Machado-Reyes y M. L. Hamilton-Cordiés. 1998. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta médica*, 8 (1): 13-27.
- Corner, E. J. H. 1983. Ad Polyporaceas I, *Amauroderma* and *Ganoderma*. Beih. Nova. Hedwigia. 75, Cramer, Vaduz.
- Cortéz-Gallardo V., J.P. Macedo-Ceja, M. Hernández-Arroyo, G. Arteaga-Aureoles, D. Espinoza-Galván y J. F. Rodríguez-Landa 2004. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomedica*, 15:123- 136.
- Cowan, M.M: 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*, 12(4):564 582
- Daglia, M., A. Papetti, C. Gregotti, F. Berté and G. Gazzani. 2000. *In vitro* antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1449-1454.
- De Bruijn, J.; C. Loyola; P. Aqueveque; J. Cañumir; M. Cortéz and A. France. 2010. Extraction of secondary metabolites from edibles chilean mushrooms. Pp. 3-17. *In: Martínez-Carrera, D., N. Cueto, 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.*
- Deiana, M., A. Rosa, V. Casu, R. Piga, M. Assunta Dessì and O. I. Aruoma. 2004. L-Ergothioneine modulates oxidative damage in the kidney and liver of rats in vivo: studies upon the profile of polyunsaturated fatty acids. *Clinical Nutrition*, 23: 183-193.
- Dewick, P.M. 2002. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 2ed. Ed. John Wiley and Sons. Pág. 167.
- Diplock, A.T., J.L. Charleux, G. Crozier-Willi, F.J. Kok, C. Rice-Evans, M. Roberfroid, W. Stahl and J. Vina-Rives. 1998. Functional food science and defense against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, 80 (1): 77-112.
- Dubost, N. J., B. Ou and R. B. Beelman. 2007. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total capacity. *Food Chemistry*, 105: 727-735.
- Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82:47-95.
- Elejalde-Guerra, J.I. 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna (Madrid)*, 18: 326-335.
- Elmastas, M., O. Isildak, I. Turkecul and N. Temur. 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 337-345.
- Elsayed N.M. and A. Bendich. 2001. Dietary antioxidants: potential effects on oxidative products in cigarette smoke. *Nutrition Research*, 21:551-567.
- Erkel, E.I. 2009. The effect of different substrate mediums on yield of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Journal of Food, Agriculture y Environment*, 7 (3-4): 841-844.
- FAO. 1993 Forestry Department Forestry topics. Report 4. More than wood. Special options on multiple use of forest. Robert Lamb.
- FAOSTAT. (en línea). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Consulta: Mayo, 2012).
- Fernaroli's G. 1975. *Handbook of flavor ingredients*, Volume I. Ney York: CRC Press.
- Florey, H.W., W. Chain and N. G. Heatley. 1949. Antibiotics. London, Oxford University Press.
- Franzoni, F., R. Colognato, F. Galetta, I. Laurenza, M. Barsotti, R. Di Stefano, R. Bocchetti, F. Regoli, A. Carpi, A. Balbarini, L. Migliore, and G. Santoro. 2006. An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 60: 453-457.
- Fu H-Y. and D-E. Shieh. 2002. Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *Journal of Food Lipids*, 9: 35-46.

- Fuchs, L.Y.; L. Chihu, C. Conde, V. M. González, A. H. Noguez, E. Calderon, N. Avonce y C. Ovando. 1994. Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. *Salud Publica de México*, 36:428-438.
- Furtado J. S. 1965. Relation of microstructure of the taxonomy of the Ganodermoideae (Polyporaceae) with special reference to the structure of the cover of the pilear surface. *Micologia*, 57. 588-611.
- Gao Y., S. H. Zhou, M. Huang and A. Xu. 2003. Antibacterial and antiviral value of the genus *Ganoderma* P. Karst. Species (Aphyllorphomycetideae): a review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 5 (3): 235-246.
- Gao, Y., W. Tang, H. Gao, E. Chan, J. Lan, X. Li and S. Zhou. 2005. Antimicrobial Activity of the Medicinal Mushroom *Ganoderma*. *Food Reviews International*, 21: 211–229.
- García, Z.T. y O. J. Roca. 2008. Industrialización de los crustáceos para la obtención de Quitosano en ungüento con efecto cicatrizante. *Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial*, 11(2): 24-32.
- Garibay-Origel, R., F. Ruán-Soto y E. Estrada-Martínez. 2010. El conocimiento micológico tradicional, motor para el desarrollo del aprovechamiento de los hongos comestibles y medicinales. Pp. 243-270. In: Martínez-Carrera, D., N. Cueto, 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.
- Gilbert, D.L. (ed.) 1981a. Perspective on the history of oxygen and life. In: Oxygen and the Living Process: An Inter-disciplinary Approach. *Springer Verlag, New York*, pp 1–43.
- Gilbert, R. J., P.C.B. Turnbull, J.M. Parry and J.M. Kramer. 1981b. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species: their part in food poisoning and other clinical infections. In: Berkeley R C W, Goodfellow M (eds) The aerobic endospore-forming bacteria ; classification and identification. Academic Press, London, pp 297-314.
- González-Matute, R.; D. Figlas, R. Devalis, S. Delmastro and N. Curvetto. 2002. Sunflower seed hulls as a main nutrient source for cultivating *Ganoderma lucidum*. *Micología Aplicada Internacional*, 14(02): 19-24.
- Good-Kitzberger, C. Sorane, A. Smânia, R. Curi-Pedrosa, S. Regina and 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.
- Goodman y Gilman. 1998. Bases farmacológicas de la Terapéutica. 9 ed. Mc Graw-Hill Editores. N.York. Pág 1095–1098.
- Goodman, W. G. 1989. Chitin: A magic bullet. *The Food Insects Newsletter*, 2:1, 6-7.
- Haddad, J.J. 2002. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y) sensitive transcription factors. *Cellular Signalling*, 14: 879-97.
- Halliwell, B. and J. M.C. Gutteridge. 1989. Free radical in biology and medicine. Oxford: Clarendon, 1:142.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*, 52 (8): 253-265.
- Halliwell, B. y J.M. Gutteridge. 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18 (1):125-126.
- Halliwell, B. y M. Whiteman. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142: 231- 255.
- Han, X., T. Shen and H. Lou. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8: 950-988.
- Harman, D. 1956. Aging: A Theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11: 298-300.
- Hayet, E., M. Mastouri; S. Ammar, M.A. Mahjoub, S. Brahim, A. Kenani, M. Zine and M. Aouni. 2009. Antibacterial, antioxidant and cytotoxic activities of extracts of *Conyza canadensis* (L.) Cronquist growing in Tunisia. *Medicinal Chemistry Research*, 18:447–454.
- Hemmi, T. and Tanaka, I. 1936. Experiments for developing sporophores of *Ganoderma japonicum*. *Botany and Zoology* 4, 13–23.
- Hobbs, C.H. 1995. Medicinal Mushrooms: An Exploration of Tradition, Healing and Culture, 2ed., Botanica Press, Inc.; Santa Cruz, USA, p. 252.
- Hossain, K.; N. C. Sarker, A. J. Kakon, A. S. Khan and S. Ahmed. 2009. Cultivation of Reishi Mushroom (*Ganoderma lucidum*) on Sawdust of Different Tree Species. *Bangladesh Journal of Mushroom*, 3(2): 1-5.
- Huie, C. W. and X. Di. 2004. Chromatographic and electrophoretic methods for *Lingzhi* pharmacologically active components. *Journal of Chromatography*, 812. 241–257.
- Ihde, D. C. and D. Armstrong. 1973. Clinical spectrum of infection due to *Bacillus* species. *American Journal of Medicine*, 55 : 839- 845.

- Imtiaj, A. and T-S. Lee. 2007. Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild Mushrooms. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3 (3): 316-321.
- Jaramillo, M. 2009. Determinación estructural y de actividad antimicrobiana de los intra y exo metabolitos secundarios triterpenoidales en *Ganoderma lucidum* obtenido en cultivo sumergido. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Sede Bogotá.
- Jawetz E., J. L. Melnick y E. A. Adelberg. 1989. Manual de microbiología médica. La Habana: Editorial Pueblo y Educación, 110-37. (Edición Revolucionaria).
- Jayakumar, T., P. A. Thomas and P. Geraldine. 2009. In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 10: 228-234.
- Jia, J., X. Zhang, Y-S. Hu, Y. Wu, Q-Z. Wang, N-N. Li, Q-C. Guo and X-C. Dong. 2009. Evaluation of in vivo antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in STZ-diabetic rats. *Food Chemistry*, 115: 32-36.
- Kakon, A. J., K. Hossain, N.C. Sharker, M. Moonmoon and S. Ahmed. 2009. Performance of Six Strains of Reishi Mushroom (*Ganoderma lucidum*) on Different Amounts of Substrate. *Bangladesh Journal of Mushroom*, 3(2): 33-38.
- Kamata, H. and H. Hirata. 1999. Redox regulation of cellular signalling. *Cellular Signaling*, 11: 1-14.
- Karaman, M., E. Jovin, R. Malbaša, M. Matavuly and M. Popovic. 2010. Medicinal and edible Lignicolous fungi as natural sources of Antioxidative and antibacterial agents. *Phytotherapy Research*, 24: 1473-1481.
- Klaus, A. and N. Miomir. 2007. Influence of the extracts isolated from *Ganoderma lucidum* mushroom on some microorganisms. In: *Proceedings of National Science. Matica Srpska Novi Sad* 113: 219-226.
- Ko H-H., C-F. Hung, J-P. Wang and C-N. Lin. 2008. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry*, 69. 234-239.
- Kobori, M., M. Yoshida, M. Ohnishi-Kameyama and H. Shinmoto, 2007. Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. *British Journal of Pharmacology*, 150: 209-219.
- Kohen, R. and A. Nyska. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30 (6): 620-650.
- Kramer, J. M., P.C.B. Turnbull, G. Munshi y R.J. Gilbert. 1982. Identification and characterization of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species associated with foods and food poisoning. In: Corry, J. E. L. (eds) Isolation and identification methods for food poisoning organisms. Academic Press, London, pp 261-286.
- Kuznetsov, O.I., E.V. Milkova, A.E. Sosnina, N.I. Sotnikova. 2005. Antimicrobial action of *Lentinus edodes* juice on human microflora, *Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1: 80-82.
- Kuklinski, C. 2003. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural, 1ªed. Omega. España.
- Kuskoski, M.; A. G. Asuero, A. M. Troncoso, J. Mancini-Filho y R. Fett. 2005. Aplicación de distintos métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en pulpas de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4): 726-732.
- Lárez-Velazquez, C. 2008. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*, 8 (1): 1-22.
- Lee, Y-L., M-T. Yen and J-L. Mau. 2007. Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizygus marmoreus*. *Food Chemistry*, 104: 1-9.
- Li, L., T.B. Ng, M. Song, F. Yuan, Z.K. Liu, C.L. Wang, Y. Jiang, M. Fu and F. Liu. 2007a. A polysaccharide-peptide complex from abalone mushroom (*Pleurotus abalonus*) fruiting bodies increases activities and gene expression of antioxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in senescence-accelerated mice. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75: 863-869.
- Li, Y-Q., L. Fang and K-C. Zhang. 2007b. Structure and bioactivities of a galactose rich extracellular polysaccharide from submergedly cultured *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 68: 323-328.
- Liao, C-H., Yi-Min Hsiao, Ching-Hsiung Lin, Chin-Shui Yeh, James Chun-Huan Wang, Chia-Hung Ni, Chung-Ping Hsu y Jiunn-Liang Ko. 2008. Induction of premature senescence in human lung cancer by fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae*. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 1851-1859.
- Lindequist, U.; H. J. T. Niedermeyer and W-D. Jülich. 2005. The pharmacological potencial of mushrooms. *Review*, 2(3). 285-299.
- Liu, X., Bo Zhou, Rongshan Lin, Le Jia, Peng Deng, Keming Fan, Guoyi Wang, Li Wang, Jianjun Zhang. 2010. Extraction and antioxidant activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus* sp. Mycelium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47: 116-119.

- Liu, F., V.E.C. Ooi and S.T. Chang. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences*, 60 (10): 763-771.
- Logan, N. A. 1988. *Bacillus* species of medical and veterinary importance. *Journal of Medical Microbiology*, 25:157-165.
- Loguercio-Leite, C., Claudia Groposo and Maria Alice Halmenschlager. 2005. Species of *Ganoderma* Karsten in a subtropical area (Santa Catarina State, Southern Brazil). *IHERINGIA, Série Botânica*, Porto Alegre, v. 60, n. 2, p. 135-139, jul./dez.
- Maganhotto, C. M., D. M. Soares and P. R. Oliveira. 2005. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology*, 37:324-9.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales y M. Sobal, 1988. Cultivo de diversas cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus* sobre pulpa de café y paja de cebada. *Revista Mexicana de Micología*, 4: 153-160.
- Martínez-Carrera, D. 2002. Current development of mushroom biotechnology in Latin America. *Micología Aplicada Internacional*, 14: 61-74.
- 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. Capítulo 6.1, 20 pp. *In: El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México*. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata & H. Leal (Eds.). ECOSUR-CONACYT, México, D.F. ISBN 978-970-9712-40-7.
- Martínez-Carrera, D. y de Alva López-Martínez. 2010. Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México II: éxitos y fracasos durante el periodo 1991-2009. Pp. 513-551. *In: Martínez-Carrera, D., N. Cueto, 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.*
- Mau, J.L., H.C. Lin and S.F. Song. 2002a. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Research International*, 35: 519-526.
- Mau, J.-L., H-C. Lin and C-C. Chen. 2002b. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21): 6072-6077.
- Mau, J.-L., S.-Y. Tsai, Y.-H. Tseng and S.-J. Huang. 2005a. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food chemistry*, 93: 641-649.
- Mau, J.-L., S.-Y. Tsai, Y.-H. Tseng and S.-J. Huang. 2005b. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill. *LWT-Food science and Technology*, 38 589-597.
- McKenna, D.J., K. Jones and K. Hughes. 2002. Reishi Botanical Medicines: The desk reference for major herbal supplements, 2ed., The Haworth Herbal Press: New York, Oxford, pp. 825-855.
- Montiel-Arcos E., G. Olivares-Carrera and L. Acosta-Urdapilleta. 2002. The culture of three wild strains of *Ganoderma lucidum* on corn waste in Cuernavaca, Morelos, México. Book of abstracts. 4th CMBMP. Cuernavaca, Mor. p. 24.
- Morales, P., M. Sobal, M. Bonilla, W. Martínez, P. Ramírez-Carrasco, I. Tello, T. Spezzia, N. Lira, R. de Lima, S. Villa, E. Montiel y D. Martínez-Carrera. 2010. Los hongos Comestibles y medicinales en México: recursos genéticos, biotecnología, y desarrollo del sistema de producción-consumo. *In: Martínez-Carrera, D., N. Cueto, 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.*
- Müller L., S. Gnoyke, A. M. Popken and V. Böhm. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*, 43:992-999.
- Nayak, A.; R.N. Nayak and K. Bhat. 2010. Antifungal activity of a toothpaste containing *Ganoderma lucidum* against *Candida albicans* an in vitro study. *Journal. International Oral Health*, 2(1).
- Norris, J.R., R.C.W. Berkeley, N.A. Logan and A.G. O'Donnell. 1981 The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. *In: Starr M P, et al. (eds) The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*, Vol. 2, Springer- Verlag, Berlin and Heidelberg, pp 171 1-1742.
- OECD.2006. OECD Biotechnology Statistics - 2006, OECD.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud). 2004. Guía para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Washington, D.C. 20037-2895, E.U.A.
- Page, C.P., M. J. Curtis, M. C. Sutter, M. J. Walker y B. B. Hoffman. 1998. Farmacología integrada. Primera edición. Ed. Mosby. Pág. 419.
- Peláez, F. 2006. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat? *Biochemical Pharmacology*, 71(7): 981-990.
- Pennington, J. E., N.D. Gibbons, J.E. Strobeck, G.L. Simpson and R.L. Myerowitz. 1976 *Bacillus* species infection in patients with hematologic neoplasia. *Journal of the American Medical Association*, 235: 1473-1474.

- Pérez Armendáriz, B., Y. Mayett, F. R. Jiménez, M. Sobal, P. Morales, M. Bonilla, P. Ramírez- Carrasco, I. Tello, A. Trigos, G. Mendoza, J. Soriano-Santos, N. González & D. Martínez-Carrera. 2010. Desarrollo de bebidas y alimentos funcionales a partir de los recursos genéticos de hongos comestibles y medicinales en México. Pp. 221-240. 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 & V. M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales- COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla.
- Piqueras, J. 2004. Los hongos como alimentos funcionales. *Amfontiquer*, 2:46-48.
- Pontón, J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25: 78-82.
- Powell, S. G. 2000. The antioxidant properties of zinc. *Journal of Nutrition*, 130: 1447S-1454S.
- Prior, R.L., X. Wu and K. Schaich. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 4290-4302.
- Puttaraju N., G. S. U. Venkateshaiah, S. M. N. Dharmesh and R. Somasundaram. 2006. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 9764-9772.
- Quereshi, S.; A. K. Pandey and S. S. Sandhu. 2010. Evaluation of antibacterial activity of different *Ganoderma lucidum* extracts. *People's Journal of Scientific Research*, 3 (1): 9-13.
- Reyes-Estebanez M., Gabriela Heredia Abarca y María Marcela Gamboa Angulo. 2008. Perfil biológico de hongos anamórficos del sureste de México. *Revista Mexicana de Micología* 28: 49-56.
- Ríos-Cañavate, J. 2008. *Ganoderma lucidum*, un hongo con propiedades inmunoestimulantes. *Revista de Fitoterapia*, 8 (2): 135-146.
- Rodríguez-Ángeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44:464-475.
- Rojas-Herrera, A y T. González-Flores. 2006 Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica*, vol. 31, número 002. Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica. Distrito Federal, México pp. 69-76.
- Rosa, L.E., K. M. G. Machado, C. C. Jacob, M. Capelari, C. A. Rosa and C. L. Zani. 2003. Screening of Brazilian Basidiomycetes for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 967-974.
- Royse, D.J. 1985. Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitake mushroom. *Mycologia*, 77(5): 756-762.
- Russell R. y M. Paterson. 2006. *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* 67: 1985–2001.
- Ryvarden, L. 2000. Studies in neotropical polypores 2. A preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with laccate pileus. *Mycology*, 92:180-191.
- Sanodiya, B.S., G. S. Thakur, R. K. Baghel, G. B. K. S. Prasad and P.S. Bisen. 2009. *Ganoderma lucidum*: A Potent Pharmacological Macrofungus. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10: 717-742.
- Scranton, P. and S.R. Schrepfer. 2003. *Industrializing Organisms: Introducing evolutionary history*. London: Routledge.
- Seo G.-S. and P. M. Kirk. 2000. Ganodermataceae: nomenclature and classification. In: *Ganoderma diseases of perennial crops*. pp. 32.
- Shang-Hsin, G., C. Jeen-Kuan y L. Wen-Chien. 2004. Purificación and characterization of extracellular chitinase from *Aeromonas schubertii* Taiwan. *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 550-556.
- Sharapin, N., Machado, L., Souza, E., Rocha, E., Valverde, E., Lopez y J, CAB. 2000. *Fundamentos Tecnológicos de Productos Fitoterapéuticos*, Editorial Azucena Martínez, Santafé de Bogotá D.C., Colombia, pp. 40-66.
- Shi, L., A. Ren, D. Mu and M. Zhao. 2010. Current progress in the study on biosynthesis and regulation of ganoderic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88:1243–1251.
- Shin, G. C. and Seo, G. S. 1988. Classification of strains of *Ganoderma lucidum*. *Korean Journal of Mycology*, 16, 235–241.
- Sierra-Vargas, M. P.; A. M. Guzmán-Grenfell; I. M. Olivares-Corichi; Y.D. Torres-Ramos y J. J. Hicks 2004. Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México*, 17: 135-148.
- Silva, M., M. Bittner, M. Hoeneisen, J. Becerra, V. Campos, F. González, C. Céspedes y O. Marambio. 1992. *Química de los triterpenos*. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Programa regional de desarrollo científico y tecnológico. Washington, D.C. 353 pp.

- Smith, J.; N. Rowan y R. Sullivan. 2002. Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatment; special report commissioned by cancer research UK, The University of Strathclyde in Glasgow, pp. 256.
- Soares, A. A., C. Giatti-Marques, D. Francielle, G. Pezente-Ferrari, S.M. Gomes and R. Peralta. 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. *Food Chemistry*, 112: 775–781.
- Sobal, M., D. Martínez-Carrera, P. Morales and S. Roussos. 2007. Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of Mexico. *Micología Aplicada Internacional*, 19(1): 15-23.
- Sobal, M., P. Morales, M. Bonilla, W. Martínez, F. Galván, D. Sihuanca, F. Quriz, M. Juárez y D. Martínez-Carrera. 2010. Formulaciones para la producción intensiva de *Lentinula edodes* y *L. boryana* en México. In: Martínez-Carrera, D., N. Cueto, 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.
- Stamets, P. 1993. Evaluating a mushroom strain: Photosensitivity. In: *Growing Gourme and Medical Mushrooms*. Ten Speed Press, Berkely, California, pp. 117–126.
- Suay, I.; F. Arenal, F. J. Asensio, A. Basilio, M. A. Cabello, M. T. Diez, J. B. Garcia, A. G. del Val, J. Corrochategui, P. Hernandez, F. Pelaez and M. F. Vicente. 2000. Screening of Basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78: 129- 139.
- Synytsya, A., Míčková K., Synytsya A., Jablonský I., Spěvák J., Erban V., Kovářiková E. and Čopíková J. 2009. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 76: 548-556.
- Tang, W., J.-W. Liu, W.-M. Zhao, D.-Z. Wei and J.-J. Zhong. 2006. Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. *Life Sciences*, 80:205–21.
- Tello-Salgado, S. I. 2010. Diversidad de los recursos genéticos mexicanos del hongo funcional *Ganoderma* (Fungi, Ganodermataceae), conocido como Reishi en los mercados internacionales, y su relevancia para el desarrollo regional. Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*. México. Tesis doctoral.
- Thetsrimuang, C., S. Khammuang and R. Sarnthima. 2011. Antioxidant activity of crude polysaccharides from edible fresh and Dry mushroom fruiting bodies of *Lentinus* sp. Strain RJ-2. *International Journal of Pharmacology*, 7 (1): 58-65.
- Toussaint, O. 1993. La biología del envejecimiento celular. Convergencia de las teorías sobre el envejecimiento celular hacia el concepto de umbral crítico de acumulación de errores. *Revista de Gerontología*, 3:143-52.
- Tseng, Y-H., J-H. Yang and J.-L. Mau. 2008. Antioxidant properties from *Ganoderma tsugae*. *Food chemistry*, 107: 732-738.
- Vaquero-Raya, E. C. y X. Molero-Richard. 2005. Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas: ¿una posible diana terapéutica? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 28(8):473-484.
- Vaz, J. A., Lillian Barros, Anabela Martins, Celestino Santos-Buelga, M. Helena Vasconcelos e Isabel C.F.R. Ferreira. 2011. Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. *Food Chemistry*, 126: 610–616.
- Vertuani, S., A. Angusti and S. Mnafredini. 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current Pharmaceutical Design*, 10: 1677-1694.
- Wasser, S. P. and A. L. Weis. 1999b. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a current perspective. *Critical Reviews Immunology*, 19: 65-96.
- Wasser, S., 2002. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 258–274.
- Wasser, S.P. and A. L. Weis. 1997. Medicinal Mushrooms: *Ganoderma lucidum*, (Curtis: Fr.) P. Karst., (Nevo, E., Ed.), Peledfus Publ. House: Haifa, Israel, pp. 39.
- Wasser, S.P. and A.L. Weis. 1999a. General description of the most important medicinal higher basidiomycetes mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1: 351-370.
- Winston, M. L. 2002. *Travels in the genetically modified zone*. Cambridge (MA): Harvard University Press.
- Wong, J.-Y. and F.-Y. Chye. 2009. Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22: 269–277.
- Wu, C. –H., Chi-Chen Wu and Yuan-Soon Ho. 2007. Antitumor Activity of Combination Treatment of *Lentinus edodes* Mycelium Extracts with 5-Fluorouracil against Human Colon Cancer Cells Xenografted in Nude Mice. *Journal of Cancer Molecules* 3(1): 15-22.

- Xu, Jun-Wei, Wei Zhao y Jian-Jiang Zhong. 2010. Biotechnological production and application of ganoderic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2): 457-66.
- Yang, J-H., H-C. Linb and J-L. Maub. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, 77: 229-235.
- Yu, Z. H., L-H. Yin, Q. Yang and Y. Liu. 2009. Effect of *Lentinus edodes* polysaccharide on oxidative stress, immunity activity and oral ulceration of rats stimulated by phenol. *Carbohydrate Polymers*, 75: 115-118.
- Zaid, A., H.G. Hughes, E. Porceddu y F. Nicholas. 2004. Glosario de Biotecnología para la agricultura y la alimentación: estudio FAO investigación y tecnología 9.
- Zhong, J-J. y J-H. Xiao. 2009. Secondary Metabolites from Higher Fungi: Discovery, Bioactivity, and Bioproduction. *Advance in Biochemical Engineering Biotechnology*, 113: 79-150.
- Zhong, J.-J. 2004. Advances in biochemical engineering/biotechnology: biomanufacturing, vol 87. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Zjawiony, J. K. 2009. Biologically active compounds from Aphyllphorales (Polypore) Fungi. *Journal Natural Products*, 67: 300-310.
- Zuluaga, V. J., C. C. Pérez, A. Angulo, O. Torres y G. Santafé. 2007. Química y actividades antioxidante y bactericida del extracto etanólico del hongo *Ganoderma lucidum*. *Scientia et Technica*, 0122-1701.