



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

T E S I S

**Caracterización química parcial, de los extractos de
Lentinula edodes (Berk) Pegler. (Shiitake), empleando
disolventes de diferentes polaridades.**

Que para obtener el título de

Bióloga

P R E S E N T A

Carmen Elizabeth Zamora Mancera

Director de tesis

Biól. Víctor Manuel Esparza Martínez



Los Reyes Iztacala, Tlanepantla, México, 2013





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Here’s to the crazy ones. The misfits. The rebels. The troublemakers. The round pegs in the square holes. The ones who see things differently. They’re not fond of rules. And they have no respect for the *status quo*. You can quote them, disagree with them, glorify or vilify them. About the only thing you can’t do is ignore them. Because they change things. They push the human race forward. And while some may see them as the crazy ones, we see genius. Because the people who are crazy enough to think they can change the world, are the ones who do.”

Steven Paul Jobs.

Agradecimientos

A mis padres Mario Zamora y Mary Carmen Mancera

Que sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para dejarme la herencia más valiosa que puedo recibir, fruto del inmenso apoyo y confianza que en mi depositaron, por esto y más, gracias.

A mis hermanos Maricruz Zamora y Ramón Zamora

Por su apoyo incondicional en el transcurso de mi carrera universitaria, por compartir momentos de alegría, tristeza y demostrarme que siempre podré contar con ellos.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado.

A mis sinodales

Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, fue un honor trabajar junto a usted, tuve la fortuna de conocerlo y de expandir la admiración que le tengo, le agradezco su esfuerzo y dedicación, los conocimientos brindados a lo largo de esta etapa y por todas las facilidades que me ha otorgado para poder concluir este proyecto.

Dr. Rafael Villalobos Molina, por su amabilidad y buena disposición, por el tiempo que me dedicó y por su apoyo en todos los aspectos del proyecto.

M. en C. Luis Antonio Hernández González por sus conocimientos y sus sabios consejos a lo largo de este trabajo.

M. en C. Irma Delfín Alcalá Q. D. E. P. siempre brindando una sonrisa, contagiando su alegría, le agradezco el tiempo dedicado en este proyecto.

Biól. Víctor Manuel Esparza Martínez, mi tutor de tesis, le agradezco su infinita paciencia, su experiencia y apoyo brindado.

Biól. Soledad Chino Vargas por su tiempo dedicado y su buena disposición.

El presente trabajo se realizó en la planta piloto y laboratorio para la enseñanza en la producción de hongos comestibles y medicinales cultivados, proyectos productivos, jardín botánico y en el laboratorio de biología del desarrollo de la unidad de morfofisiología, FES Iztacala UNAM.

En este trabajo se contó con el apoyo de PAPIIT, DGAPA, UNAM, proyecto IN230611 y el autor fue beneficiario de este programa.

	Índice
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	8
Justificación.....	11
Objetivos.....	12
Material y Métodos.....	13
Cultivo en medio sólido.....	13
Cultivo en medio líquido.....	13
Micelio.....	13
Remoción, deshidratación y trituración de micelio.....	13
Cuerpo fructífero.....	14
Extractos.....	14
Cloroformo, metanol, agua.....	14
Fenoles.....	14
Polisacáridos.....	15
Compuesto similar a ácido ganodérico.....	15
Resultados y discusión.....	16
Crecimiento de micelio.....	16
Peso fresco y seco de micelio.....	17
Peso fresco y seco de cuerpo fructífero.....	19
Cuantificación de fenoles.....	20
Cuantificación de polisacáridos.....	23
Compuesto similar a ácido ganodérico.....	24
Conclusiones.....	28
Bibliografía.....	29
Anexos.....	36

Resumen

Al hongo *Lentinula edodes* se le atribuyen propiedades medicinales que son debidas a la generación de metabolitos secundarios, varios de los cuales han sido aislados y evaluados como compuestos con actividad farmacológica de comprobada acción medicinal, el uso de disolventes que por su polaridad y su estructura química, extraerán los compuestos con las mismas propiedades químicas, son comunes en este tipo de procedimientos. En el presente trabajo se caracterizó parcialmente la composición química del cuerpo fructífero y micelio de *L. edodes* (Shiitake) en base a los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso, en el extracto acuoso se determinó la cantidad de polisacáridos, en los extractos acuoso y metanólico se determinaron fenoles, mientras que en el clorofórmico se buscó una sustancia similar al ácido ganodérico. Se encontró una mayor concentración de polisacáridos en el cuerpo fructífero que en el micelio. En el primero se determinó un promedio de 2723.73 μg de polisacárido por g de peso seco, mientras que en el micelio el contenido de polisacáridos fue de 1581.32 $\mu\text{g/g}$ de peso seco. La concentración de fenoles fue menor en el micelio, el cual presentó 195.07 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, un 15.84% menos que el cuerpo fructífero que contuvo 231.76 $\mu\text{g/g}$ de peso seco. No se encontró algún compuesto similar a ácido ganodérico, cuya señal se detecta a una absorbancia de 254 a 262 nm. El cuerpo fructífero de *Lentinula edodes* presentó mayor concentración de polisacáridos y polifenoles, por lo que se esperaría que tuviera mayor actividad farmacológica.

Shiitake, *Lentinula edodes*, polisacáridos, fenoles, extractos, micelio, cuerpo fructífero.

Introducción

El reino Fungí comprende un grupo de organismos muy versátiles y diversos en su morfología, fisiología, ciclos de vida y ecología, se ha estimado que existen más de 1.500.000 especies de hongos; sin embargo, solo han sido descritas alrededor de 69.000, de estas últimas el 14 % son consideradas macroscópicas y de estas, se estima que el 7% son comestibles, 4% son medicinales y el 2% son tóxicas.

Los hongos están involucrados en numerosos fenómenos biológicos y químicos vinculados a la desintegración de la materia orgánica, procesos industriales de fermentación, producción comercial de medicamentos, alimentación humana y los sistemas de producción agroforestal. Se conocen 750 especies de hongos capaces de infectar insectos (entomopatógenos); por lo que se han empleado para regular las poblaciones de plagas en los cultivos agrícolas (Ardón, 2007).

La importancia de los hongos en la alimentación humana reside en su valor dietético (bajo contenido en carbohidratos y grasas), significativo contenido de proteínas (de 20-40% del peso seco) y vitaminas, lo que los coloca por arriba de la mayoría de vegetales, frutas y verduras. Adicionalmente, resultan ser complementos deliciosos en las comidas por sus propiedades organolépticas. Los hongos también están involucrados en diversos procesos industriales de fermentación (pan, vino, cerveza, etanol, ciertos quesos, etc.) (Tormo, 1996).

En cuanto a la industria farmacéutica y productos medicinales, algunos son elaborados a partir de hongos. La penicilina por ejemplo, es un antibiótico bactericida derivado del moho *Penicillium notatum*, la cual actúa inhibiendo el crecimiento de bacterias y por lo tanto su muerte por lisis osmótica (Ardón, 2007). Se ha reportado que dichos hongos presentan propiedades fisiológicas y efectos farmacológicos significativos (Wasser, 1999).

Los basidiomicetos producen una amplia gama de productos naturales que abarca, desde componentes estructurales con actividad antitumoral e inmunológicamente activos, hasta agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, enzimas, reguladores del crecimiento y aromas (García, 2009). Este gran espectro de actividades ha hecho que las

investigaciones en hongos hayan aumentado durante las últimas décadas, aislándose e identificándose sustancias promisorias (Wasser, 1999).

Gracias al desarrollo de la química de los productos naturales y al enfoque sobre el estudio de los metabolitos fúngicos, los hongos comestibles han sido reconocidos como alimentos funcionales (Piqueras, 2004) en las últimas cuatro décadas la tecnología química ha permitido aislar los componentes relevantes y usarlos en experimentos controlados. Estos métodos son utilizados como una forma efectiva para la extracción de los principios bioactivos (Borchers, 1999).

El uso de disolventes que por su polaridad y su estructura química, arrastrarán los compuestos con las mismas propiedades químicas, mediado por las fuerzas de atracción, es común en este tipo de procedimientos. Estos son agrupados, de acuerdo a su polaridad, en no polares y polares. Los disolventes no polares son de tipo orgánico y carecen de polos positivo y negativo, los disolventes polares, presentan un polo positivo y otro negativo; éstos a su vez se subdividen en disolventes polares próticos, que se caracterizan por poseer enlaces O-H o enlaces N-H, y los disolventes polares apróticos que no tienen enlaces O-H o N-H (Morrison, 1990).

Existe una similitud en las diferentes técnicas desarrolladas para la extracción de este tipo de compuestos indistintamente de la fuente de la que provengan, si es de los cuerpos fructíferos, del micelio o de los medios de cultivo (Mizuno, 1999). El uso de este método hace posible encontrar la presencia de compuestos como triterpenos, flavonoides, fenoles, esteroides, ácidos grasos y polisacáridos, entre otros (Chegwin, 2005).

Dentro del grupo de los terpenos están los triterpenos, compuestos ampliamente difundidos en el reino vegetal y en el reino fúngico y se pueden encontrar como glicósidos, ésteres o en forma libre. Por definición 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 éste” (Silva, 1992).

Los compuestos de tipo triterpeno de origen fúngico presentan interesantes propiedades biológicas, de las que 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, 2008).

En el género *Ganoderma* se ha reportado el aislamiento de más de 130 triterpenos oxigenados (específicamente lanostanos) obtenidos de cuerpo fructífero, esporas y biomasa micelial (Huei, 2004). Dentro de los compuestos encontrados en cuerpos fructíferos y micelios se incluyen triterpenos de esqueleto Ergostano y Lanostano, altamente oxidados como ácidos ganodéricos (Wasser, 1999).

Por otra parte los fenoles son alcoholes aromáticos. Están compuestos de moléculas que tienen un grupo $-OH$ unido a un átomo de carbono de un anillo bencénico, los compuestos fenólicos se caracterizan por una estructura química que ejerce actividad antioxidante, actuando como captosres de radicales libres, de manera que neutraliza peligrosas especies reactivas de oxígeno e iones metálicos (Gracia-Nava, 2007).

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos podemos denominarlos polifenoles. Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para los procesos fisiológicos de los vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.) (Kyoung 2010).

La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas, y para interferir consecuentemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares, puede deberse, al menos en parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción. Sus propiedades antioxidantes justifican muchos de sus efectos beneficiosos (Quiñones, 2012). Los antioxidantes son compuestos que actúan como captosres de radicales libres, neutralizando especies reactivas de oxígeno o quelando iones metálicos. Algunos compuestos fenólicos que capturan radicales libres son las flavonas, flavonoides, antocianinas (Satué, 1997).

Se ha reportado que los hongos comestibles contienen compuestos fenólicos con capacidad antioxidante y se considera que *L. edodes* es una fuente considerable de polifenoles (Kyoung 2010).

Dentro de los componentes reportados en los hongos con actividad medicinal, se encuentran los polisacáridos, que son un grupo de macromoléculas biológicas con una importante diversidad estructural y de presencia generalizada en la naturaleza, caracterizados por ser estructuras poliméricas repetidas de monosacáridos unidos unos a otros por enlaces glicosídicos, por esta razón son diferenciados de las proteínas y los ácidos nucleicos. Los polisacáridos presentan la más alta capacidad de llevar información biológica, ya que tienen el mayor potencial de variabilidad estructural entre las biomoléculas. Los aminoácidos en proteínas y los nucleótidos en ácidos nucleicos pueden enlazarse de una sola manera, mientras que las unidades de monosacáridos en oligosacáridos y polisacáridos, pueden hacerlo de varias maneras, para formar una gran variedad de estructuras ramificadas o lineales (Chihara, 1970).

Muchos, sino todos los hongos basidiomicetos han mostrado tener polisacáridos con actividades antitumorales e inmunoestimulantes. Los primeros reportes datan de finales de los 60s. Entre ellos, los hechos por Ikekawa *et al.* (1969) y Chihara *et al.* (1969) aislaron el lentinan por primera vez.

El lentinan es un polisacárido (β -(1-3) β -(1-6)-D glucano) con una estructura de triple hélice que contiene moléculas de glucosa con enlaces β -(1-3) en la parte central y enlaces glicosídicos β -(1-6) en las cadenas laterales. La configuración de las moléculas de glucosa en estructura de hélice es considerada importante para la actividad biológica, es soluble en agua y estable al calor. Chihara en 1970 demostró que los efectos antitumorales de los polisacáridos de este hongo eran mejores que las de otras setas, y que eran activos para algunos, pero no todos los tipos de tumores (Maeda, 1973). El polisacárido purificado ha mostrado en numerosas xenografías que causa regresión total del tumor y su actividad posiblemente puede deberse a la activación del sistema inmune del huésped (Hobbs, 1995).

Este polisacárido es característico del hongo shiitake [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler], nombre que se deriva de su asociación con el árbol shiia en Asia. Su cultivo y consumo ha aumentado aceleradamente en los últimos años, ocupando el segundo lugar de producción en el ámbito mundial entre los hongos cultivados (González, 2004).

El Shiitake es un hongo clasificado taxonómicamente de la siguiente forma: reino *Fungi*, phylum *Basidiomycota*, clase *Basidiomycetes*, orden *Agaricales*, familia *Thricholomataceae*, género *Lentinula* y especie *edodes*.

Este hongo se caracteriza por crecer en troncos, por no tener anillo ni volva y por su consistencia subcarnosa; es de color café pardusco. Crece de forma silvestre sobre residuos de lignina y celulosa de madera, el estípite mide de 3 a 5 cm de largo y de 8 a 13 mm de grosor, casi igual o ensanchado hacia abajo, sólido y correoso, de superficie delgada envainada por un velo delgado, que termina en la zona apical conforme la cortina se rompe; cortina hialina o pardusca (García, 2003).

Nutricionalmente, los hongos Shiitake tienen gran valor, debido a que es bajo en calorías, alto en proteínas, hierro, fibra, minerales y vitaminas. Contiene vitaminas B1, B2, B6, B12 y D2, con altas cantidades de riboflavina y niacina (Silva, 2010). Además de contener todos los aminoácidos esenciales, fibra dietaria, altos niveles de minerales como hierro, potasio y fósforo (Stamets, 2000).

El consumo de este hongo es una buena forma de prevenir las enfermedades, ya que como anti oxidantes contiene vitaminas A, E, C, y selenio; asimismo, su consumo conduce a la reducción del colesterol en la sangre, gracias a la eritadenina y también a la parte fibrosa de los hongos que tienen quitina, siendo además anticancerígeno por su contenido de lentinan (Silva, 2010).

En general las propiedades nutricionales y medicinales del Shiitake lo convierten en un excelente suplemento alimenticio para reducir la hipertensión y tratar enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la artritis y la diabetes (Martínez, 2000).

Este representa una fuente importante de polisacáridos con propiedades inmunoestimulantes y antitumorales, los que se encuentran en el cuerpo fructífero, micelio cultivado, caldo de cultivo; estos son de diferente composición química, pero la mayoría pertenecientes al grupo de glucanos (Wasser, 2002).

Se conoce que *L. edodes* presenta propiedades medicinales que son debidas a la generación de metabolitos secundarios, varios de los cuales han sido aislados y evaluados como compuestos con actividad farmacológica de comprobada acción medicinal.

Antecedentes

Ikekawa *et al.* (1969) y Chihara *et al.* (1970), aislaron el lentinan por primera vez y demostraron que este compuesto exhibió marcada actividad antitumoral en el huésped contra el sarcoma 180, observaciones que atrajeron la atención de la comunidad científica inmediatamente, incentivando el estudio de dichos componentes, que posteriormente fueron aislados con agua caliente, purificados y su estructura química fue determinada.

Chihara *et al.* (1969), aislaron varias fracciones activas a partir de cuerpos fructíferos de *Lentinula*, las cuales correspondieron a polisacáridos. La caracterización estructural de las mismas evidenció la presencia en una de ellas de un glucano lineal con enlaces β (1-3), poco soluble en agua.

Waser (2002), realizó un estudio sobre los polisacáridos en hongos medicinales, encontrando que pueden prevenir la oncogénesis y que muestran actividad antitumoral directa contra diversos tumores alogénicos y singénico, y evitan la metástasis del tumor.

García Cruz (2003), realizó un estudio para determinar la actividad de las enzimas ligninolíticas, presentes en el micelio de la cepa IE40 a diferentes valores de pH y temperatura ($^{\circ}\text{C}$) en *Lentinula edodes*, encontrando que la mayoría de las enzimas que son producidas por los basidiomicetos presentan su mayor actividad dentro de un rango de pH de 4 a 6.

Martínez (2004), propone a *Lentinula edodes* como suplemento alimenticio para reducir la hipertensión y tratar enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la artritis y diabetes.

Zhou *et al.* (2007), extrajeron polisacáridos de *Coriolus versicolor* con éter de petróleo como solvente para extracción de lípidos, los materiales se desengrasaron y el residuo se dejó secar, posteriormente se extrajo el polisacárido con agua caliente.

Mizuno (2010), determinó los polisacáridos extraídos del micelio cuando es cultivado en medio líquido, los que fueron separados en fracciones solubles (53 %) e insolubles (47 %). La fracción de polisacáridos insolubles en agua contenía (1-3)-D-glucanos con ramas beta-(1-6). Cuando este glucano fue administrado a ratones (10 mg/kg), mostró alta

actividad antitumoral, con una tasa de supresión de proliferación del tumor de 92% y una regresión completa de 4/6. La fracción soluble en agua contuvo un heteroglucano compuesto de glucosa, manosa y galactosa, pero no mostró ninguna actividad antitumoral.

Rivera (2010), propone el uso de los estípite del Shiitake para ser empleados de manera exitosa para la elaboración de alimentos procesados, o como alimento funcional debido a su contenido de polisacáridos con actividad biológica inmunomoduladora y anticancerígena.

Turlo *et al.* (2010), sembraron *Lentinula edodes* en medio líquido, enriquecido con selenio (Se), con el fin de determinar si este elemento afectaba la biosíntesis y composición de la pared y la membrana celular. Se aplicaron pruebas a los diferentes extractos: acuoso, metanólico y clorofórmico, que dieron como resultado que el medio enriquecido con Se ejerció potentes efectos sobre la composición de la pared y la membrana celular.

Sánchez-Minutti (2010), evaluó el contenido de polifenoles del hongo Shiitake tratado térmicamente mediante cocción durante tres tiempos 5, 12 y 20 minutos. La cantidad de polifenoles resultó mayor en la muestra con tratamiento de cocción a 12 min. También evaluó el efecto del tipo de molienda del hongo seco sobre el contenido de polifenoles, el cual no tuvo efecto significativo.

Kyoung *et al.* (2010), reportaron que los hongos comestibles contienen compuestos fenólicos con capacidad antioxidante y que los procesos de cocción en los hongos pueden incrementar la concentración de antioxidantes.

Choi *et al.* (2005), reportaron que encontraron en *L. edodes* un incremento de polifenoles totales y antioxidantes en hongos calentados a 100 °C y 121 °C por 15 y 30 min.

Mashiko *et al.* (1992), a diferentes pacientes con cáncer, les administraron lentinan durante la quimioterapia, mostrando que el crecimiento del tumor se logra inhibir, la eficiencia de la quimioterapia aumenta y la vida del paciente es más prolongada.

Kosaka *et al.* (1995), administraron lentinan a mujeres con cáncer recurrente de seno, obteniendo resultados favorables.

Taguchi *et al.* (1985), en un estudio clínico, a 275 pacientes con cáncer gástrico recurrente, les administraron quimioterapia, a algunos solo el agente quimioterapéutico (mitomycin C con 5-fluorouracil o tegafur) y a los otros les administraron lentinan un tiempo antes de administrarles los agentes quimioterapéuticos. El análisis mostro mejores resultados en el tratamiento con lentinan, prolongando considerablemente el tiempo de vida de los pacientes

Oka *et al.* (1992), en otro grupo de 16 pacientes con cáncer avanzado, les administró lentinan (4 mg/semana por 4 semanas) vía intravenosa, se observó que el 80% del tumor se inhibió en 7 pacientes. El tiempo de sobrevivencia para los 7 pacientes que mostraron respuesta inmunológica fue de 129 días, mientras que los pacientes que no mostraron respuesta inmunológica, tan solo tuvieron 49 días de sobrevivencia

Mora (2010), realizó el estudio químico del extracto crudo metanólico de cuerpo fructífero del hongo Basidiomiceto silvestre Colombiano *Fomitopsis sp.*, en busca de compuestos triterpenoidales, los extractos los sometieron a evaluación de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas encontrando una respuesta leve frente a *Staphylococcus aureus*.

Justificación

Debido al bajo conocimiento de las propiedades químicas de *Lentinula edodes* existente en nuestro país, y a los reportes empíricos que se han realizado respecto a las propiedades de Shiitake, es la razón por la cual este estudio se enfoca en la caracterización y cuantificación química parcial de polisacáridos, polifenoles y triterpenos de dos fases de desarrollo. Así como promover la investigación y búsqueda de compuestos biológicamente activos de otras especies de Basidiomicetos que también se encuentran en México, y que se han reportado propiedades medicinales entre la población.

Objetivo General

Caracterización química parcial, de los extractos de *Lentinula edodes* (Berk) Pegler, empleando disolventes de diferente polaridad.

Objetivos particulares

Cultivar el micelio en medio líquido.

Extraer los principios activos por arrastre polar.

Comparar la abundancia de polisacáridos y polifenoles en extractos de micelio y cuerpo fructífero.

Evaluar la posible presencia de un compuesto similar al ácido ganodérico en el extracto clorofórmico.

Material y Métodos.

Cultivo de micelios *Lentinula edodes*

El cultivo de los micelios se realizó en la planta piloto y laboratorio de la enseñanza en la producción de hongos comestibles y medicinales y proyectos productivos, del Jardín botánico de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Dichos cultivos se realizaron en medios de cultivo sólido y líquido.

Cultivo en medio sólido.

El medio de cultivo empleado fue agar dextrosa-papa (PDA), colocado en cajas de Petri. La técnica consistió, en tomar fragmentos del micelio, inoculando en el medio de cultivo para que se desarrolle, colocando fragmentos de forma distribuida. Posteriormente fue sellado con plástico adherible, rotulado y puesto en la cámara de incubación durante quince días, revisándose cada tercer día para observar el desarrollo del micelio.

Cultivo en medio líquido.

Para preparar el medio líquido se utilizó dextrosa-papa (PD), agregando 10 g del medio en 250 ml de agua destilada, se colocó en frascos de 500 ml. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 25 minutos. Se inoculó el micelio de una caja Petri, se sellaron y rotularon los frascos y se colocaron en la cámara de incubación a 25°C, revisándose cada tercer día durante 30 días para observar el desarrollo del micelio.

Remoción, deshidratación y trituración del micelio

El micelio se retiró del medio líquido con unas pinzas, se pesó para determinar la masa fresca y posteriormente se puso en una cámara de secado a 45°C durante 5 días. Una vez seco el micelio se pesó para determinar la cantidad de peso seco y se procedió a triturar en un mortero hasta obtener un polvo fino.

Cuerpo Fructífero

Los cuerpos fructíferos de *Lentinula edodes* fueron proporcionados por el laboratorio de Proyectos Productivos (Jardín botánico de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala), se colocaron en rejilla y se pusieron a deshidratar expuestos al sol hasta que estuvieran completamente secos. Una vez deshidratados se realizó el molido en un mortero hasta quedar completamente triturado.

Extractos

Cloroformo, metanol y agua

Cada proceso de extracción se realizó partiendo de 4 g de polvo de Shiitake (micelio o cuerpo fructífero) en 200 ml de disolvente. Cada extracción tuvo una duración de 1:30 hs, una vez finalizada se destiló y se concentró a 25 ml por muestra; se guardaron en frascos color ámbar.

Al terminar cada una de las extracciones se dejó secar la muestra de micelio y cuerpo fructífero, se pesó y después se sometió al siguiente disolvente.

Se realizó una extracción continua en el sistema de Soxhlet, empleando primero cloroformo y posteriormente metanol. Para eliminar el resto del disolvente se dejaron evaporar a temperatura ambiente hasta quedar completamente secos, para preservarlos hasta el momento de su uso.

En el caso del extracto acuoso, la muestra se colocó, después de la extracción en cloroformo y metanol, en un vaso de precipitado, con 200 ml de agua y se puso a baño maría. Se guardó en frascos y se liofilizó para secar la muestra para su conservación.

Fenoles

La cuantificación de fenoles se determinó por gramo de tejido en los extractos metanólicos y acuosos de micelio y cuerpo fructífero con el método de Folin-Ciocalteu.

Antes de utilizar cada muestra seca se preparó adicionándole disolvente del cual proviene, para el caso del metanólico se le agregó 15 ml y para el acuoso 23 ml y se agitó hasta que estuviera completamente disuelta. Se utilizaron alícuotas de 25, 50, 75 y 100 μ l se les adicionó a cada una 1.5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1:10), se dejó reposar por 5 min, posteriormente se le agregó 2 ml de solución carbonato de calcio (10%) y se dejó reposar durante 2 hs para medir la absorbancia a 725 nm. Se usó una curva patrón de ácido gálico. (Anexo 1).

Polisacáridos

Para determinar la cantidad de polisacáridos se utilizó el método de DuBois (fenol-ácido sulfúrico) (DuBois *et al.*, 2002) técnica modificada (Ibarra, 2012).

Se usaron los extractos acuosos (micelio y cuerpo fructífero) para la obtención del promedio de polisacáridos por gramo de tejido.

A un mililitro de la muestra del extracto acuoso se le añadió 4 ml de etanol al 95% se dejó reposar por 30 minutos a 4°C y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 minutos a 4°C, la pastilla obtenida se separó y se le adicionó 1 ml de solución NaOH 1M para disolverla, y se usó dextran como referencia y se midió la absorbancia a 490nm. (Anexo 2).

Triterpenos

Compuestos similar al ácido ganodérico.

Se realizó la prueba para detectar algún compuesto similar al ácido ganodérico (triterpeno) en los extractos de cloroformo y metanol tanto de micelio como de cuerpo fructífero.

Se utilizaron 3 ml de extracto y se dejaron secar, una vez seco se suspendió en 3 ml de agua destilada y se agregó 3 ml de cloroformo, se agitó perfectamente y se dejó reposar durante una hora, transcurrido el tiempo se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos.

La fase de cloroformo se vertió en un vaso de precipitado y se dejó secar. Ya seca la muestra se le adicionó 3 ml de la solución de bicarbonato de sodio al 0.5% y se ajustó el pH con ácido clorhídrico a no más de 3. Se midió la absorbancia de 200 a 700 nm. (Anexo 3).

Resultados

Micelio

La evaluación del crecimiento de micelio de *Lentinula edodes* se realizó de manera cualitativa, determinada por el tiempo necesario para colonizar todo el frasco.

En la figura 1 se observa el proceso de desarrollo de micelio en medio de cultivo dextrosa papa, el cual resultó ser el más eficiente.



Fig. 1 Desarrollo de micelio en medio de cultivo dextrosa papa, en donde A corresponde a 7 días, B a 10 y C a 15.

El crecimiento de esta especie está regulado por ciertos factores como la temperatura, la humedad del ambiente, la humedad del sustrato, el pH, las concentraciones de CO₂ y O₂, así como la luz. El tipo de desarrollo del hongo depende de las condiciones a las que esté expuesto y de éstas depende el crecimiento del micelio o la fructificación (García-Cruz, 2003).

El desarrollo de micelio se vio favorecido a temperatura ambiente, que coincide con el rango descrito por Zadrazil (1989), en el que expone que el micelio Shiitake crece bien en un amplio rango de temperaturas, que van desde 10°C hasta 40°C.

A diferencia de lo que reporta Ishikawa, que la luz es necesaria para la fructificación, pero inhibe el desarrollo micelial, el factor luz fue importante en este trabajo, dado que los medios de cultivo líquidos dejados en condiciones de poca luz, el crecimiento de micelio fue lento comparado con los que se encontraron expuestos a luz natural (Ishikawa, 1967).

El total de peso fresco obtenido fue de 372.6 gramos proveniente de 48 frascos, en un lapso de 15-20 días en condiciones ambientales. Una vez deshidratado presenta una pérdida de 90.53% de su peso, finalizando con 35.3 g de peso seco (Fig. 2).

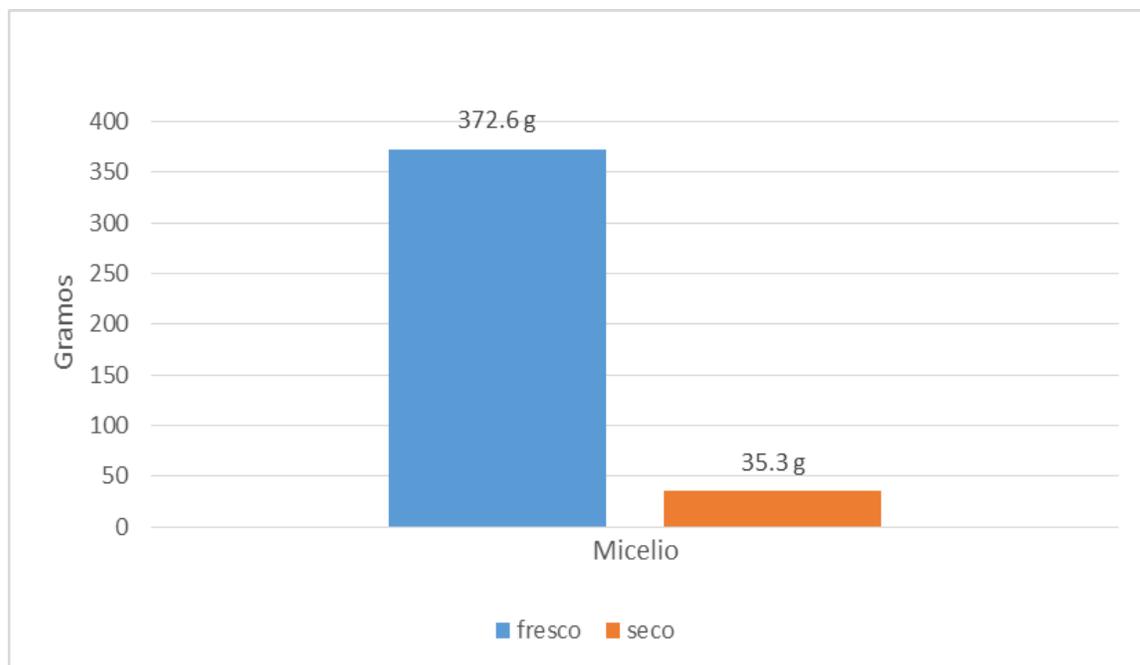


Fig. 2 Comparación entre el peso fresco y seco de micelio *Lentinula edodes* representado en gramos de tejido.

En la tabla 1 se observan los valores de peso fresco, seco y porcentaje de humedad de los micelios por cada frasco de cultivo. En concreto, por cada frasco se obtiene un promedio de 7.76 g de peso fresco y 0.73 g de peso seco de micelio de *L. edodes* (Tabla 1).

Frasco	Peso fresco	Peso seco	% pérdida de agua
1	7.5	0.67	91.1
2	8.2	0.74	90.98
3	7.4	0.65	91.3
4	7.8	0.67	91.42
5	7.5	0.66	91.2
6	6.8	0.64	90.58
7	7.2	0.66	90.83
8	8.2	0.73	91.09
9	6.8	0.68	90
10	7.4	0.77	89.59
11	6.9	0.69	90
12	8.2	0.79	90.36
13	7.7	0.79	89.74
14	8.3	0.73	91.3
15	7.9	0.76	90.25
16	7.8	0.73	90.64
17	7.6	0.7	90.78
18	8.1	0.79	90.24
19	7.6	0.72	90.52
20	8.3	0.82	90.12
21	7.4	0.69	90.67
22	8	0.79	90.12
23	7.5	0.71	90.53
24	8.2	0.81	90.12
25	7.4	0.7	90.54
26	6.9	0.68	90.14
27	7.4	0.7	90.54
28	6.8	0.68	90
29	7.2	0.69	90.41
30	8.2	0.81	90.12
31	9.2	0.87	90.54
32	7.4	0.71	90.4
33	6.9	0.69	90
34	8.2	0.79	90.36
35	7.7	0.68	91.16
36	8.3	0.74	91.08
37	7.9	0.76	90.37
38	7.8	0.74	90.51
39	7.6	0.69	90.92
40	8.4	0.77	90.83
41	7.6	0.69	90.92
42	8.3	0.79	90.48
43	7.4	0.7	90.54
44	9.1	0.88	90.32
45	8.3	0.76	90.84
46	7.9	0.78	90.12
47	7.8	0.77	90.12
48	8.6	0.84	90.23
Total	372.6	35.3	
Promedio	7.76	0.73	90.52%
Desviación estándar	0.55	0.05	0.43

Tabla 1 Gramos de micelio de Shiitake, obtenido en medio líquido por frasco, promedio, total y porcentaje de agua perdida por deshidratación.

El medio de cultivo dextrosa y papa resulta conveniente para el crecimiento de micelio, debido a que las papas aportan nutrientes requeridos para su desarrollo. Pertuz (2012) reporta que los nutrientes necesarios para su crecimiento, son tiamina, fósforo y hierro, todos estos nutrientes son aportados por las papas (en promedio, una papa mediana de 156 gramos contiene 11% del requerimiento diario de tiamina). García Cruz describe que el hierro en concentraciones adecuadas en el medio líquido promueven el crecimiento de micelio de *L. edodes* y el fósforo lo acelera (García, 2003).

Todos estos aspectos hacen de este medio una fuente de nutrientes que son una ventaja para el desarrollo de micelio de *L. edodes*; además de que el cultivo en medio líquido tiene la ventaja de ser de bajo costo de implementación, baja demanda de material y cortos periodos de producción, obteniendo un promedio de 7.76 g de peso fresco por cada 200 ml de medio líquido en un lapso de 15-20 días.

Es importante destacar que aparte de las condiciones nutritivas que debe cumplir un medio de cultivo, existen las condiciones físico-químicas apropiadas que permiten el crecimiento adecuado del organismo en estudio.

Cuerpo fructífero

Para el caso de cuerpo fructífero se contó con un total de 244.7 gramos de peso fresco, el cual después del proceso de deshidratación finalizó con 112.6 g.

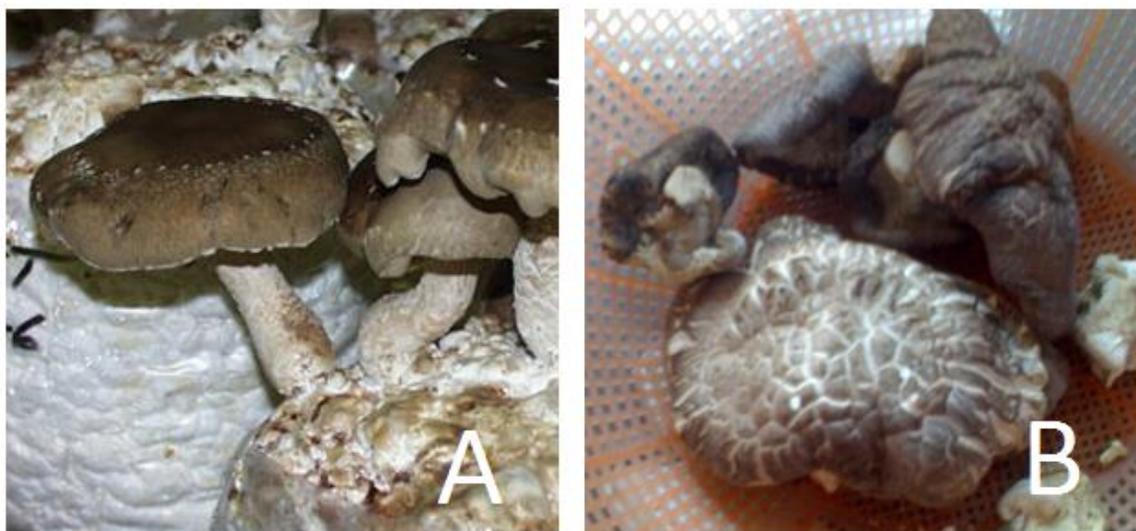


Fig. 3 Cuerpo fructífero de Shiitake en un bloque de sustrato antes de la cosecha (A) y después del proceso de deshidratación (B).

Después del proceso de secado, el cuerpo fructífero tuvo una pérdida de 54% de su peso, como se muestra en la figura 4.

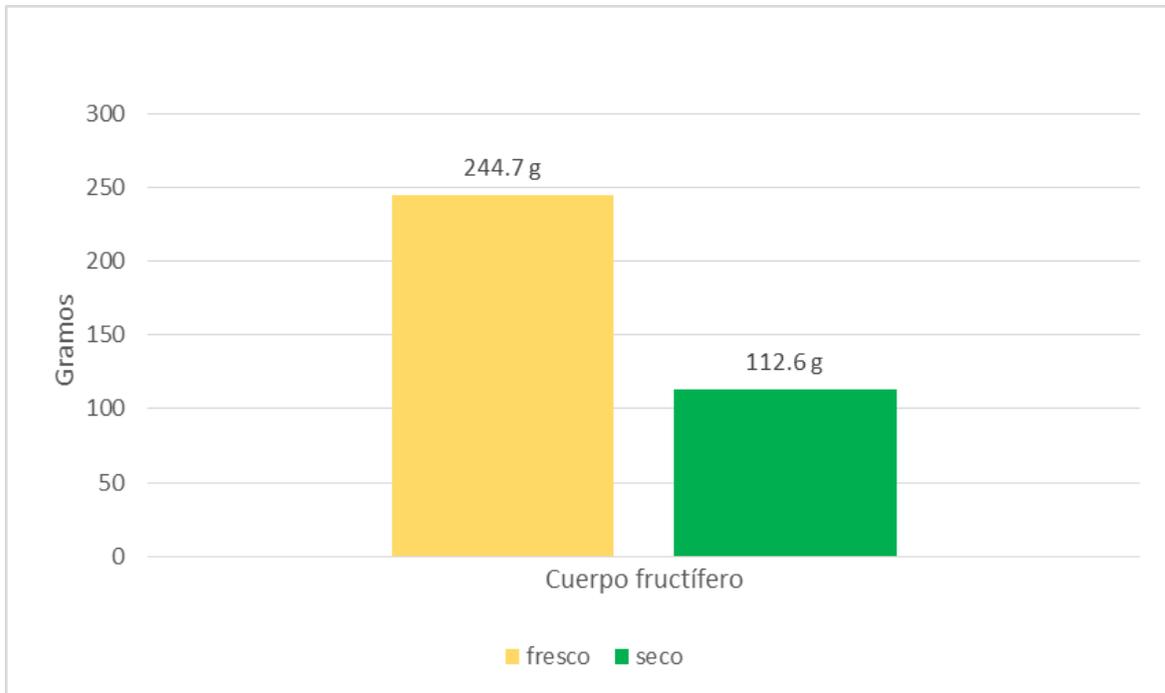


Fig. 4 Total de gramos de cuerpo fructífero de *L. edodes* antes y después del proceso de deshidratación.

Comparativamente con otros hongos, el shiitake contiene el 88.3% de agua, siendo el nivel más bajo entre los hongos comestibles y un porcentaje alto de materia seca (Kurtzman, 1997). El promedio de agua contenido en cuerpo fructífero obtenido en este trabajo difiere con lo que reporta Kurtzman, esto podría deberse a la humedad tanto del sustrato, como del ambiente en el que se desarrolló.

Fenoles

Los extractos metanólicos, tanto de micelio como de cuerpo fructífero, fueron concentrados en 15 ml y los acuosos en 23 ml, cada uno proveniente de 4g de tejido, la determinación de fenoles se realizó por gramo de tejido.

El extracto acuoso de cuerpo fructífero presentó la cantidad más baja de fenoles: 45.34 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, al revisar la figura 4 se observa que el extracto metanólico del

cuerpo fructífero presentó la mayor cantidad de polifenoles con 186.42 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, 2.2 veces la del extracto metanólico del micelio, el que contiene 82.86 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, por lo contrario en el extracto acuoso el contenido de fenoles (112.21 $\mu\text{g/g}$ de peso seco) fue mayor en el micelio que en el cuerpo fructífero.

En los datos de los fenoles totales (μg) por gramo de tejido se observa que en general el micelio contuvo 195.07 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, un 15.84% menos que el cuerpo fructífero que contuvo 231.76 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (Fig.5).

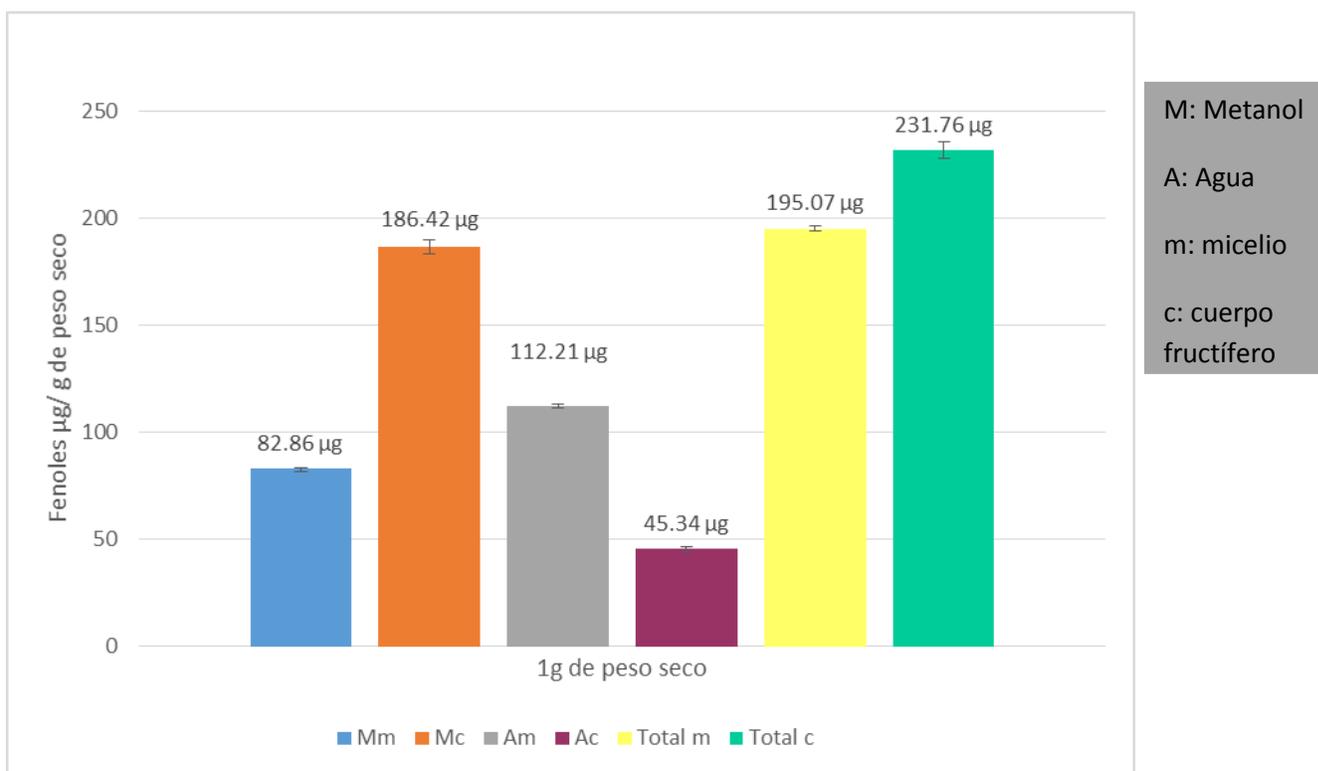


Fig. 5 Comparación de microgramos extraídos de fenoles, entre metanol y agua, micelio y c. fructífero.

Una de las propiedades de los fenoles es su capacidad para contribuir a las propiedades de los alimentos, como el sabor o la dulzura. El sabor y aroma del shiitake (*Lentinula*) son únicos entre los hongos comestibles, la mayoría de los consumidores los consideran incluso más intensos, en comparación con *Agaricus* y *Pleurotus* (Martínez, 2004).

Estas características de sabor y aroma son percibidas en cuerpo fructífero, que coincide con la mayor cantidad de fenoles obtenidos en este trabajo (231.76 µg por gramos de peso seco), y aunque es poca la diferencia, el micelio mostro una concentración de 197.07 µg/g de peso seco siendo solo un 14.97% de diferencia.

Sánchez-Minutti (1997) reporta que el contenido de fenoles en extracción con agua aumenta a medida que se prolonga el tiempo de ebullición, alcanzando un máximo a los 12 minutos (5.61 mg/g de muestra seca), y que después de éste tiempo disminuye al punto que se compara el resultado al obtenido a los 5 minutos de tratamiento. Argumentando que podría indicar que al contacto con el agua se extraen dichos compuestos, mientras que con el tratamiento térmico se llevan a cabo reacciones de oxidación, lo que hace que aumenten estos componentes en el hongo; pero al aumentar el tiempo, estos compuestos, ya sea que pasen a la fase líquida (agua) o que se transformen en otros compuestos que no reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Esto podría explicar el motivo por el cual se obtuvieron cantidades menores de fenoles por gramo de tejido en el extracto acuoso; ya que este fue sometido a calentamiento por 1:30 hs, mucho más tiempo que el descrito por Sanchez-Minutti.

Sin embargo, Choy *et al.* (2006) describen que la mejor opción para obtención de fenoles en extractos sometidos a calor, se lleva a cabo a los 30 minutos reportando 361 µg/g de peso seco, el cual se asemeja a los obtenidos en este trabajo (231.76 µg/g de peso seco) en cuerpo fructífero.

El análisis estadístico realizado con GraphPad InStat 3 arrojó que no existen diferencias significativas entre micelio y cuerpo fructífero en cantidad de fenoles totales extraídos ($f=7.989$ y $P=0.1113$)

Polisacáridos

El promedio de polisacárido de cuerpo fructífero es 2723.73 µg/g de tejido seco, el cual es 1.7 veces mayor que la cantidad del extracto de micelio (1581.32 µg/g de peso seco)

(figura 6), esto se determinó en el extracto acuoso de micelio concentrado en 43 ml y de cuerpo fructífero en 45 ml.

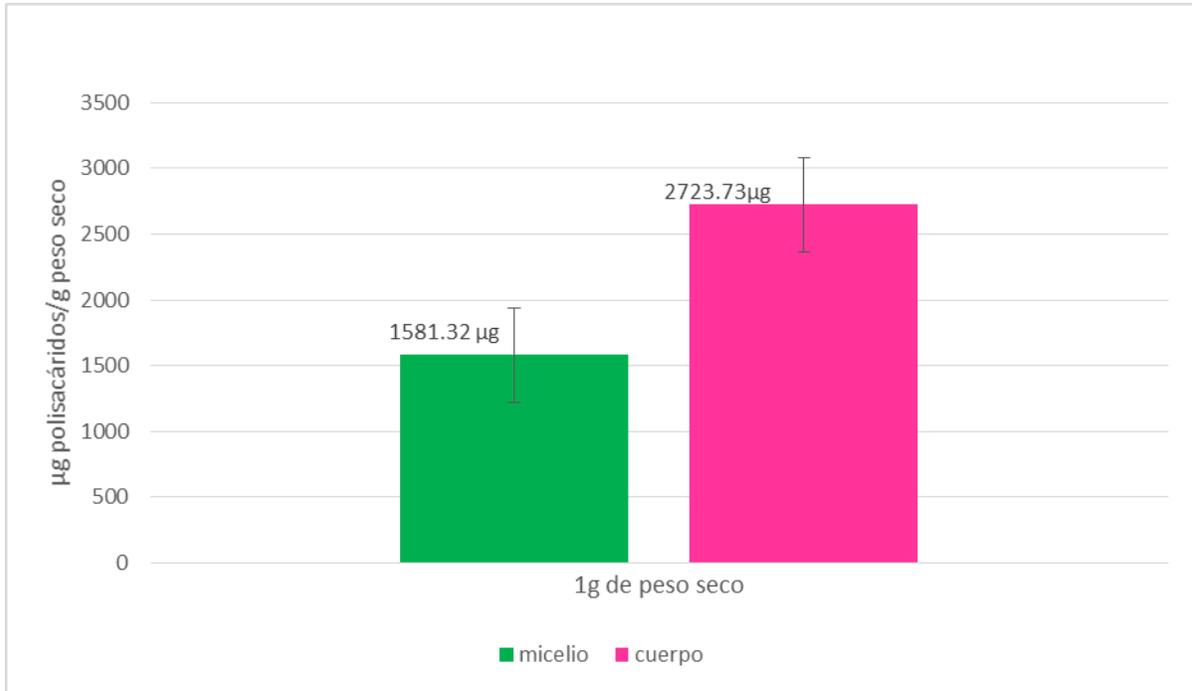


Fig. 6 Polisacáridos (µg) obtenidos en un gramo de peso seco de micelio y cuerpo fructífero (g) extraídos en agua.

En general, los polisacáridos son termoestables y solubles en agua, con mejores resultados en agua caliente. Los métodos usados hasta ahora para Shiitake enfocados especialmente en los polisacáridos fueron descritos por Wasser (2005) en donde los cuerpos fructíferos son deshidratados naturalmente, pulverizados y extraídos con agua caliente o alcohol y posteriormente son concentrados

A pesar de que los métodos mencionados no están enfocados en la purificación y el aislamiento de determinados polisacáridos, se han usado durante varios años para vender los denominados extractos y elixires en la medicina tradicional China (Wasser, 2005).

Existe una similitud en las diferentes técnicas desarrolladas para la extracción de este tipo de compuestos indistintamente de la fuente de la que provengan, si es de los cuerpos fructíferos, del micelio o de los medios de cultivo (Mizuno, 1999).

El contenido total de carbohidratos de medios líquidos, extractos, o medios líquidos puede ser determinado como azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados.

En cuestión de contenido de polisacáridos en hongos, no hay una cifra concreta, existen muchos estimados, como el propuesto en el 2001 por Natural Rural Living Institute, en Korea que reportan que el contenido de carbohidratos de Shiitake es de 0.57 mg/g de peso seco; así, nuestros resultados dieron mayor rendimiento ya que el micelio (1.58 mg/g de peso seco) y el cuerpo fructífero (2.72 mg/g de peso seco) fueron 3 a 5 veces lo reportado; sin embargo, si son comparados con los de Rivera (2010) con 4.8 mg/gramo de tejido, son bajos, tomando en cuenta que el realizó los extractos con Shiitake fresco.

La diferencia que se encuentra en la cantidad de polisacáridos se podría deber al entorno en donde se desarrolló el hongo, y a la disponibilidad de nutrientes y los factores físicos a los cuales se enfrentó, cabe mencionar que no fueron cuantificados los polisacáridos de la fracción soluble en alcohol.

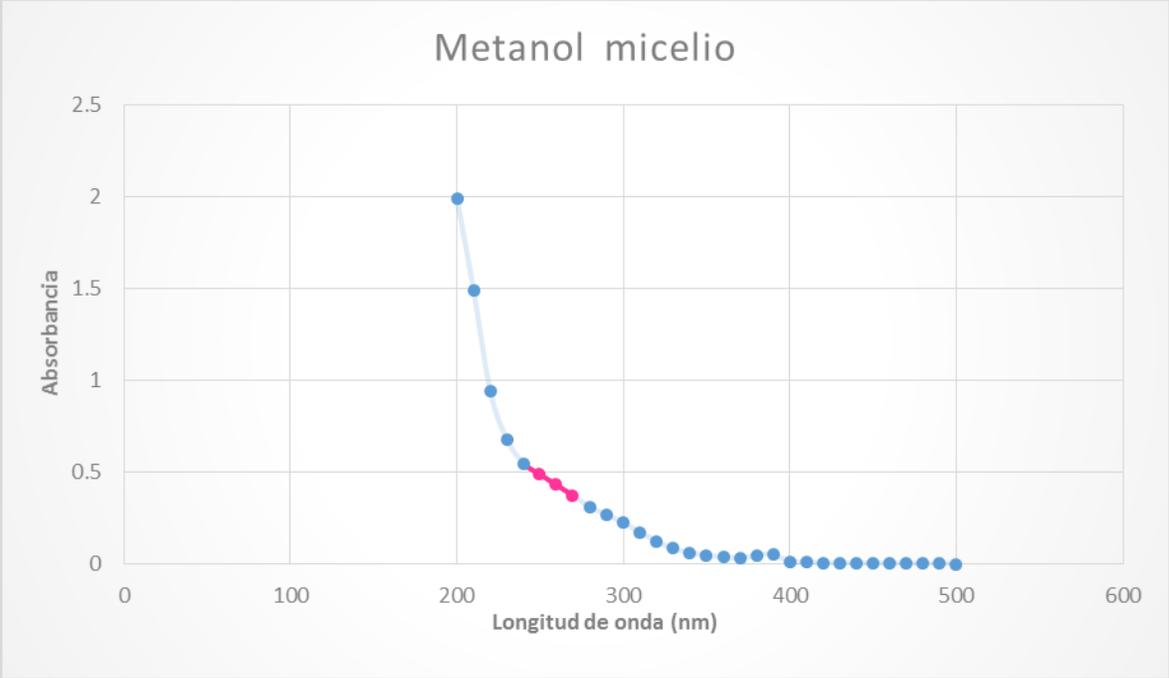
El Centro de Estudios Ecológicos Argentino (1999) describe que en el cuerpo fructífero se encuentra el componente clave del shiitake que es un polisacárido llamado lentinan, soluble en agua y producido en la pared celular del hongo, por este motivo fue que solo se determinó la cuantificación en extracto acuoso. Lo que podría explicar que en este caso se encontró 1.7 veces más polisacáridos en cuerpo fructífero que en micelio.

Sin embargo el análisis estadístico arrojó que no hay diferencias significativas entre micelio y cuerpo fructífero ($f=1.005$ y $P= 0.4485$). Realizado con el programa GraphPad InStat 3.

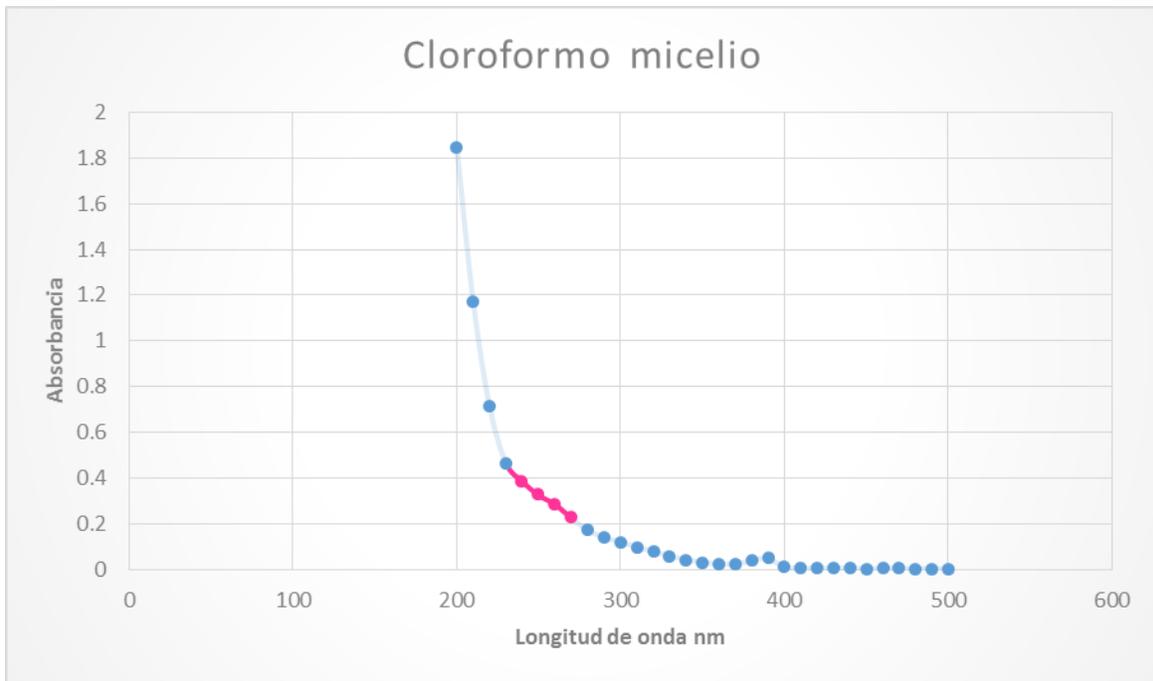
Compuestos similares a ácido ganodérico

Las gráficas de la figura 7 representan el espectro de absorción, después del procedimiento realizado en los extractos metanólicos (A y B) y de cloroformo (C y D) de cuerpo fructífero y micelio para detectar algún compuesto similar a ácido ganodérico, cuya señal se detecta a una absorbancia de 254 a 262 nm. En los espectros se puede observar que no hay indicios de la presencia de este. Sin embargo, se observa un ligero pico de

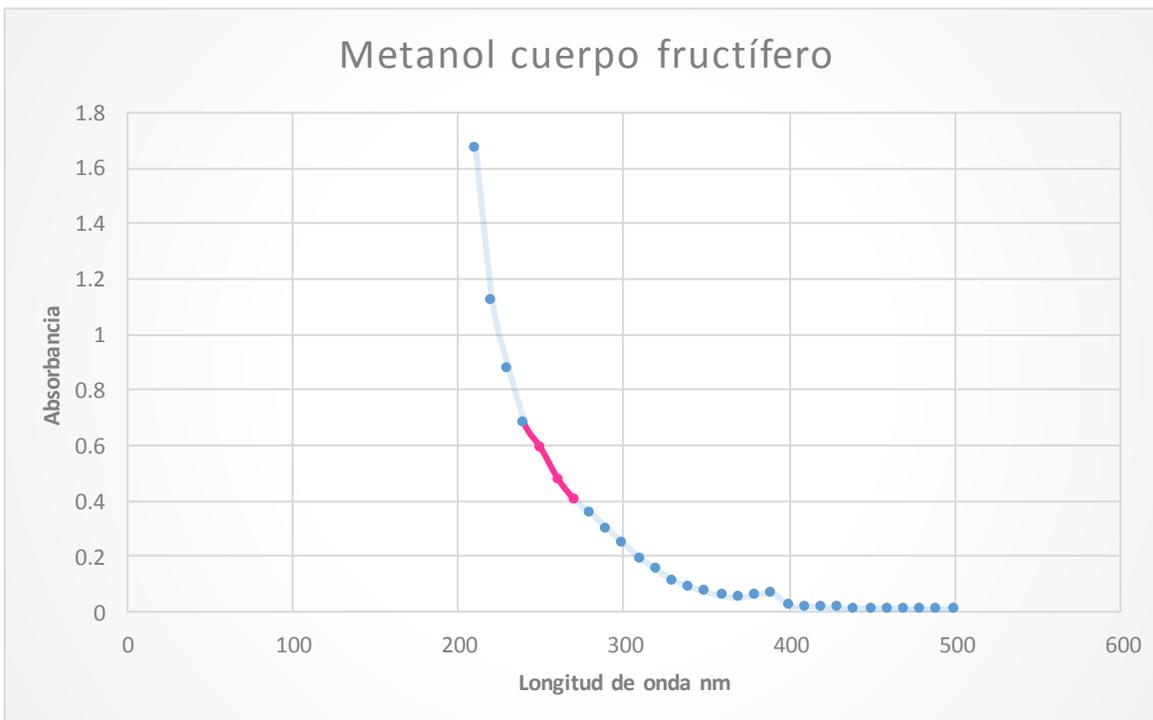
absorbancia cercano a 400 nm, indicio de un compuesto no identificado, que puede encontrarse en mayor cantidad el extracto clorofórmico del cuerpo fructífero.



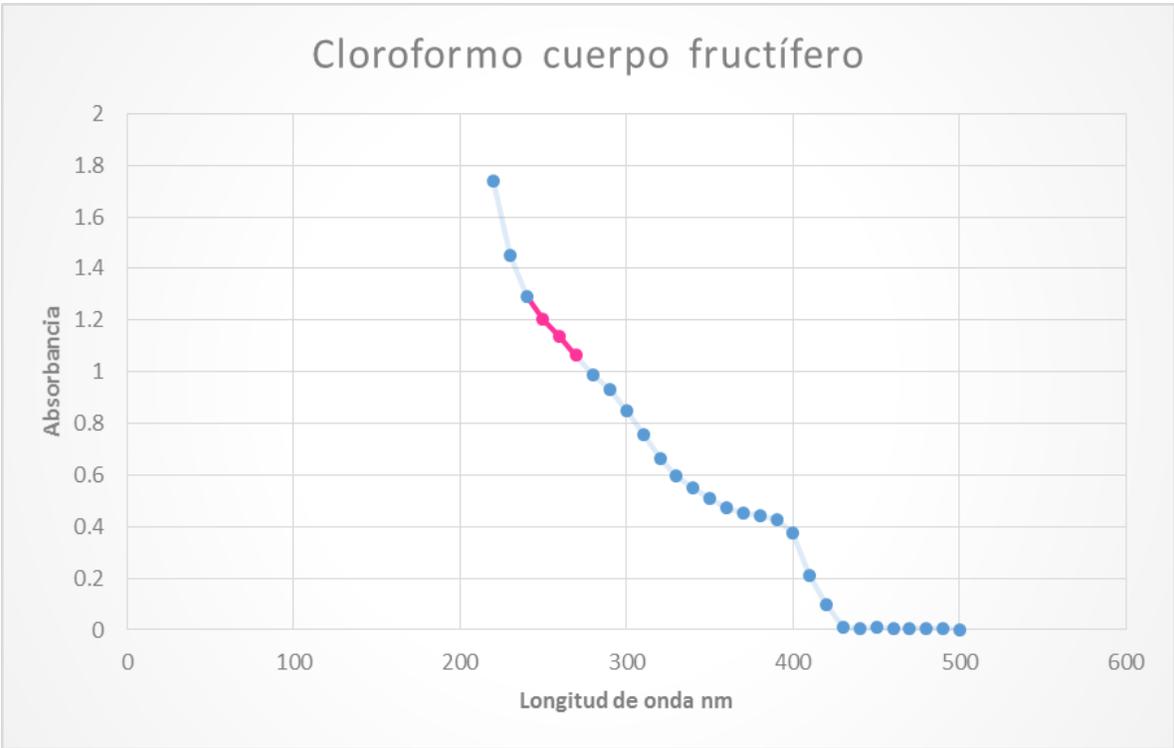
A



B



C



D

Conclusiones

El medio de cultivo líquido dextrosa-papa es eficiente para el desarrollo y crecimiento de micelio de *L. edodes*.

La mayor pérdida de agua se presenta en micelio, con 90.53% en comparación del cuerpo fructífero que pierde 54%.

El metanol extrae más fenoles del cuerpo fructífero de Shiitake ($\mu\text{g/g}$ de peso seco).

El agua extrae más fenoles de micelio de Shiitake ($\mu\text{g/g}$ de peso seco).

La cantidad de fenoles totales de micelio y cuerpo fructífero presentan poca diferencia en $\mu\text{g/g}$ de peso seco y el análisis estadístico arroja que no hay diferencias significativas.

La concentración de polisacáridos encontrados ($\mu\text{g/g}$ de peso seco) en cuerpo fructífero es 1.7 veces mayor que la del micelio de *L. edodes*, sin embargo el análisis estadístico no encontró diferencias significativas.

En *L. edodes* no se encontró ningún compuesto similar a ácido ganodérico, con el método utilizado.

Se detectó un compuesto no identificado cercano a 400 nm, que se encontró en mayor cantidad el extracto clorofórmico del cuerpo fructífero.

El cuerpo fructífero de *Lentinula edodes* presentó una mayor concentración de polisacáridos y polifenoles, por lo que se esperaría que tuviera una mayor actividad farmacológica.

Bibliografía

- Ardón, L. C. E. (2007), La producción de los hongos comestibles. Universidad de San Carlos Guatemala, Facultad de Humanidades, departamento de postgrados. Guatemala.
- Borchers, A.T., Stern, J.S. Hackman, R.M., Keen, C.L. y Gershwin, H.E. (1999), Mushrooms, tumors and immunity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 221, 281-293.
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. (1970), Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumour activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, an edible mushroom. *Cancer Research*, 30, 2776-2781.
- Chihara G, Maeda Y, Hamuro J, Sasaki T, Fukuoka F., (1969), Inhibition of mouse sarcoma-180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature* 222: 687-688
- Chegwin, C. (2005), Estudio químico preliminar de los metabolitos secundarios mayoritarios de tipo esterólico presentes en el extracto de acetato de etilo del hongo micromiceto *Pleurotus sajor-cajú* e inicio en la búsqueda de estatinas en el mismo. Doctorado En Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Sede Bogotá.
- Choi Y., Lee S.M., Chun J., Lee H.B. y Lee J. (2005), Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*, 99: 381-387.

- DuBois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., & Smith F., (2002), Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry* 28 (3): 350-356.
- García, I. (2003), Experimentación de diferentes tipos de sustratos para el cultivo de *Lentinula edodes* (Shiitake) y su desarrollo químico biológico. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.
- García P. Kim C. Bich N, Tillan N, Romero J D. J., Darío L. O., Fuste M. V, (2009), Metabolitos secundarios en los extractos secos de *Passiflora incarnata* L., *Matricaria recutita* L. Y *Morindacitrifolia* L. *Rev Cubana Plant Medv.*14 (2).
- González, M. A., (2004), Evaluación espectroscópica de quitina y β -D-glucanos del hongo comestible *Lentinula edodes* cultivado sobre madera de vid, manzano y encino. *Boletín CIAD* 13(6): 3-4.
- Gracia-Nava M.A., (2007), Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. Disponible en: www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias2007/56_1UAQGarciaNava.pdf
- Hobbs, C., (1995), *Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing and culture.* Botanica Press, Santa Cruz, California.
- Hongbo Hu, Nam-ShikAhn, Xinlin Yang, Yong-Soon Lee & Kyung-Sun Kang, (2002), *Ganoderma lucidum* extract induces cell cycles arrest and apoptosis in MCF-7 human Breast Cancer cell. 102: 250 –253.

- Huie, C. W., Di, X. (2004) Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. *J. Chromatogr. B.* 812: 241–257.
- Ikekawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nankinishi, M. y Fukoka, F. (1969), Antitumour activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Research* 29, 734-735.
- Ibarra, S. D., (2012), Obtención de extractos de *Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr.) Karst, con solventes de diferente polaridad y cuantificación de polisacáridos en las fracciones acuosa y etanólica. Tesis de licenciatura, Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ko, Horng-Huey.; Hung, Chi-Feng.; Wang, Jih-Pyang.; Lin, Chun-Nan. (2008), Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry.* 69: 234–239
- Kosaka, A., Suga, T., y Yamashita, A. (1995), Dose reductive effect of lentinan on the epirubicin therapy for breast cancer patients. *International Journal of Immunotherapy*, 11(4): 143-151.
- Kurtzman, R. H., Jr. (1997), Nutrition from mushrooms, understanding and reconciling available data. *Mycoscience* 38: 247-253
- Kyoung H.J., Wook H. C., Sun S. H., Hill J. P., Lee J. and Won S. K. (2010), Effect of steam treatment on soluble phenolic content and antioxidant activity of the Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*). *Food Chemistry*, 119: 619-625

- Maeda, Y. Y., y Chihara, G. (1973), The effects of neonatal thymectomy on the antitumor activity of lentinan, carboxymethyl pacymaran and zymosan and their effects on various immune response. *Int. J. Cancer*, 11: 153-161.
- Marambio, O. (1992), Química de los triterpenos. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C.
- Martinez, C. Sobul, M. Morales, P. Martinez, W. Mayett, Y. (2004), Los hongos comestibles, propiedades nutricionales, medicinales y su contribución a la alimentación mexicana. Colegio de Posgraduados, Chapingo, México.
- Martínez, D. A., Larqué, M., Aliphath, A., Aguilar, M., Bonilla y Martínez, W. (2000), La biotecnología de hongos comestibles en la seguridad y soberanía alimentaria de México,
II Foro nacional sobre seguridad y soberanía alimentaria, Academia Mexicana de Ciencias-CONACYT, México, D. F. 193-207.
- Mashiko, H. (1992), A case of advanced gastric cancer with liver metastasis completely responding to a combined immunochemotherapy with UFT, mitomycin C and Lentinan. *Gan to kagaku ryoho* 19: 715-718.
- Mizuno, T. (2010), Study of bioactive substances present in the Reishi mushroom (*Ganoderma lucidum*) and its medicinal effects. Universidad de Shizuoka, Japón.
- Mora, C. M A., (2010), Determinación estructural de los metabolitos Secundarios triterpenoidales en búsqueda de Antimicrobianos de un hongo silvestre *Aphylophoral colombiano*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia.

Morrison T. y Boyd N., (1990), Química Orgánica. 5ª edición, Pearson educación, E U.A. 220-243.

Oka, M. (1992), Immunological analysis and clinical effects of intraabdominal and intrapleural injection of lentinan. *Biotherapy* 5: 107-112

Pertuz C. S., (2012), LA PAPA (*Solanum tuberosum*) Composición química y valor nutricional del tubérculo. Departamento de Nutrición. Universidad Nacional de Colombia Instituto de Estudios Ambientales IDEA. Colombia.

Piqueras, J., (2004), Los hongos como alimentos funcionales. *A.M. Fontiquer* 2: 46-49.

Quiñones, M., (2012), Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid, España.

Rivera, M. A., (2010), Estudio del efecto de la adición del estípite de Shiitake (*Lentinula edodes* Berk. Pegler) y de un extracto rico en sus polisacáridos sobre las cualidades nutricionales del antipasto. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Sánchez, M. L., Tapia. L L., López V. F., Rosales P. M., Juárez D. S. M.T., Heinonen M. y Frankel E. N. (1997), Anthocyanin as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 45: 3362-3367

Silva, S., Consuelo Fritz F., Juan Cubillos A., Matías Díaz C. (2010), Utilización de desechos de podas del arbolado urbano como sustrato para la producción de

hongos comestibles (Shiitake) en la comuna de La Pintana. Manual para la producción de hongos comestibles (Shiitake), Proyecto CONAMA-FPA RM-027-2010 Santiago de Chile.

Stamets, P. (2000), Growing gourmet and medicinal mushrooms. McGraw-Hill, Canadá.

Taguchi, T., Furue, H., Kimura, T., Kondo, T., Hattori, T., Itoh, I., y Ogawa, N. (1985), Results of phase III study of lentinan. *Gan to Kagaku Ryoho*, 12, 366-78

Tormo M. R., (1996) Los hongos: generalidades (en línea). Lecciones hipertextuales de botánica, España. Consultado 10 de Marzo del 2012. Disponible en <http://www.unex.es/polen/LHB/hongos/hongos0.htm>

Turlo J., Gutkowska B., Herold F., Dawidowski M., Słowinski T. y Zobel A., (2010), Relationship between selenium accumulation and mycelial cell composition in *Lentinula edodes* (Berk.) cultures, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 73: 1211–1219.

Wasser, S. P.; Weis, A. (1999), Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1(1): 31-62.

Wasser S. P.; Weis A. (1999) Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. *Critical Reviews in Immunology*. 19(1):65-96.

Wasser, S.P, (2002), Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60:258–274

Wasser, S.P. (2005). Shiitake (*Lentinus edodes*). Encyclopedia of Dietary Supplements. DOI: 10.1081 E-EDS 120024880. Marcel Dekker, 653-664.

Zadrazil F. Y R. H. Kutzman. (1989). The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics. In S.T.Chang and Quimio Eds. Tropical mushrooms Biological Nature and Cultivation Methods. The Chinese University Press. Hong Kong. 277-297.

Zhou X., Jiang H.,Lin J.,Tang K. (2007). Cytotoxic activities of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extracts on human liver cancer and breast cancer cell line. African Journal of Biotechnology 6 (15): 1740-1743.

ANEXOS

Anexo 1

Método de Folin-Ciocalteu para cuantificación de fenoles.

Reactivo Folin-Ciocalteu (1:10)

Solución carbonato de sodio (10%)

Ácido gálico

Etanol

Alícuota de muestra 25, 50, 75 y 100 μ l

Agregar 1.5 ml de reactivo Folin-Ciocalteu (1:10)

Dejar reposar por 5 minutos

Adicionar 2 ml de solución de carbonato de calcio al 10%

Dejar en reposo 2 horas

Se usó una curva patrón de ácido gálico.

Tubo	Solución trabajo (μl)	Etanol 10% (μl)	Sol. CaCO₃ (ml)	Foulin-Ciocaltaeu (ml)
1	0	100	2	1.5
2	20	80	2	1.5
3	40	60	2	1.5
4	60	40	2	1.5
5	80	20	2	1.5
6	100	0	2	1.5
Muestra				
7	25	75	2	1.5
8	50	50	2	1.5
9	75	25	2	1.5
10	100	0	2	1.5

Medir absorbancia a 765 nm

Anexo 2

Cuantificación de carbohidratos por el método Dubois

Etanol 95%

Fenol 5%

Ácido sulfúrico concentrado

Solución NaOH 1M

Dextran

Preparación de Solución Madre

100 mg de dextran/ 10 ml NaOH al 1M

Preparación de solución Trabajo

1ml de la solución madre/79 ml de NaOH al 1M

Muestra

A un mililitro de la muestra del extracto acuoso se le añade 4 ml de etanol al 95% dejar reposar por 30 minutos a 4°

Se centrifuga la muestra a 13 000 rpm durante 10 minutos a 4°C

Una vez obtenida la pastilla se le añade 1 ml de solución NaOH 1M

Curva patrón

Tubo	Solución trabajo μl	Solución NaOH μl	Fenol μl	Ácido Sulfúrico ml
1	0	200	200	1
2	40	160	200	1
3	80	120	200	1
4	120	80	200	1
5	160	40	200	1
6	200	0	200	1
Muestra				
7	100	100	200	1
8	150	50	200	1
9	200	0	200	1

Medir la absorbancia a 490 nm.

Anexo 3

Determinación de compuesto similar ácido ganodérico

Cloroformo

Ácido clorhídrico 2M

Bicarbonato de sodio al 0.5%

3 ml de extracto metanólico se dejan secar

Suspender el extracto seco en 3 ml de agua destilada

Agregar 3 ml de cloroformo, agitar y dejar reposar por una hora.

Centrifugar a 10 000 rpm durante 10 minutos

Separar la fase de cloroformo en un vaso de precipitado

Dejar secar y adicionar 3 ml de la solución de bicarbonato de sodio al 0.5%

Ajustar el pH con ácido clorhídrico a 3 (puede ser un poco menos)

Nota: para ajustar el pH se utiliza aproximadamente un rango de 1.3 a 1.5 ml (+/-) de ácido clorhídrico. (Tener cuidado debido a que al llegar a estas cantidades es más susceptible el cambio)

Medir la absorbancia de 200 nm hasta 700