UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

TEMA:

"ESTUDIO SOBRE LAS PROPIEDADES TRADICIONALES Y FARMACOLOGICAS DEL HONGO SHIITAKE *(Lentinula edodes)* CULTIVADO EN DIFERENTES MEZCLAS DE SUSTRATOS AGRICOLAS"

TRABAJO DE TITULACIÓN PRESENTADO COMO REQUISITO PREVIO PARA OPTAR AL GRADO DE QUÍMICO Y FARMACÉUTICO.

AUTORES:

Jorge Eduardo Coppiano González

Gianni Gabriela Merchán Villamar

TUTORA:

Q.F. Grijalva Endara Ana De Las Mercedes MSc.

COTUTOR:

Ing. Juan Diego Valenzuela Cobos, PhD

GUAYAQUIL – ECUADOR

2020

FACULTAD: CIENCIAS QUÌMICAS
CARRERA: QUÌMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÒN

Presidencia de la República del Ecuador
Plan Nacional de Ciencia, Tecnología, Innovación y Saberes
SENESCYT

REPOSITORIONACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA			
ANEXO XI.- FICHA DE REGISTRO DE TRABAJO DE TITULACIÓN			
TÍTULO Y SUBTÍTULO:	"ESTUDIO SOBRE LAS PROPIEDADES TRADICIONALES Y FARMACOLOGICAS DEL HONGO SHIITAKE (Lentinula edodes) CULTIVADO EN DIFERENTES MEZCLAS DE SUSTRATOS AGRICOLAS"		
AUTOR(ES) (apellidos/nombres):	Jorge Eduardo Coppiano González Gianni Gabriela Merchán Villamar		
REVISOR(ES)/TUTOR (ES) (apellidos/nombres):	Q.F ANA GRIJALVA ENDARA MSC. (TUTORA) Q.F. MARÌA ELENA JIMENEZ MGS. (TUTORA REVISORA)		
INSTITUCIÓN:	UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL		
UNIDAD/FACULTAD:	FACULTAD DE CIENCIAS QUÌMICAS		
MAESTRÍA/ESPECIALIDAD:			
GRADO OBTENIDO:	TERCER NIVEL-QUÌMICO FARMACEÙTICO		
FECHA DE PUBLICACIÓN:	2020	No. DE PÁGINAS:	88
ÁREAS TEMÁTICAS:	INVESTIGACION		
PALABRAS CLAVES/ KEYWORDS:	Lentinula edodes, actividad antioxidante, actividad antitumoral		

El shiitake es una seta comestible de color marrón y aroma intenso originaria de Asia Oriental. Se encuentra a menudo deshidratada que fresca. Posee propiedades tradicionales y farmacológicas tales como: antitumoral, antidiabética, anticancerígena etc. En nuestro país la seta crece en un círculo rígido, se desarrolla en materiales leñosos o ricos en energía como los troncos de cierto ejemplar de árboles. Mediante revisión bibliográfica y como objetivo principal se evaluarán las propiedades farmacológicas del hongo shiitake (Lentinula edodes), cultivado en diferentes mezclas de sustratos agrícolas cultivado en diferentes mezclas de sustratos agrícolas mediante revisión bibliográfica es el objetivo principal de este trabajo. Se realizó una comparación de dos estudios; una en Colombia y otra en México dando como resultado; el sustrato del artículo realizado en México; este cumple con las condiciones adecuadas de rendimiento para el mercado las cuales deben ser superiores al 60 % y el articulo de Colombia El sustrato analizado en Colombia presenta un porcentaje de eficiencia biológica de 21.5 % La actividad antioxidante va a aumentar dependiendo de la cantidad de compuesto fenólicos existentes en la muestra, cada cepa puede presentar propiedades similares o diferentes u otra cepa del Lentinula edodes. Se evaluó la actividad antitumoral mediante un ensayo IN vitro donde se relaciona las concentraciones de los extractos de Lentinula edodes vs los porcentajes de inhibición.

ADJUNTO PDF:	X SI	NO
CONTACTO CON AUTOR/ES:	Teléfono: 0961795459 0995749766	E-mail: jorge.coppianog@ug.edu.ec gianni.merchanv@ug.edu.ec
CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN:	Nombre: SEDE CIENCIAS QUÌMICAS	
	Teléfono: 04229360	
	E-mail: www.fcq.edu.ec	

FACULTAD: CIENCIAS QUÌMICAS
CARRERA: QUÌMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÒN

ANEXO VI. - CERTIFICADO DEL DOCENTE TUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Guayaquil, 3 de octubre del 2020

Sr. /Sra.
Dra. Q.F. Zoila Luna Estrella Mgs.
DIRECTOR (A) DE LA CARRERA QUÌMICA Y FARMACIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÌMICAS
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
Ciudad, GUAYAQUIL

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la tutoría realizada al Trabajo de Titulación **Estudio sobre las propiedades tradicionales y farmacológicas del hongo shiitake *(Lentinula edodes)* cultivado en diferentes mezclas de sustratos agrícolas** de los estudiantes **COPPIANO GONZALEZ JORGE EDUARDO C.I.0952569788** y **MERCHAN VILLAMAR GIANNI GABRIELA C.I.0956309603**, indicando que han cumplido con todos los parámetros establecidos en la normativa vigente:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se adjunta el certificado de porcentaje de similitud y la valoración del trabajo de titulación con la respectiva calificación.

Dando por concluida esta tutoría de trabajo de titulación, **CERTIFICO,** para los fines pertinentes, que los estudiantes están aptos para continuar con el proceso de revisión final.

Atentamente,

Ana Grijalva Endara

QF. Ana Grijalva Endara; M.Sc
TUTORA DE TRABAJO DE TITULACIÓN
C.I. 0912286309

FACULTAD: CIENCIAS QUÌMICAS CARRERA: QUÌMICA Y FARMACIA

UNIDAD DE TITULACIÒN

ANEXO VIII.- INFORME DEL TUTOR REVISOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Guayaquil, 03 de Octubre del 2020
Dra. Q.F. ZOILA BELLA LUNA ESTRELLA;Mgs.
SUBDECANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
Ciudad. - Guayaquil

De mis consideraciones:
Envío a Ud. el informe correspondiente a la **REVISIÓN FINAL** del Trabajo de Titulación: **"ESTUDIO SOBRE LAS PROPIEDADES TRADICIONALES Y FARMACOLOGICAS DEL HONGO SHIITAKE *(Lentinula edodes)* CULTIVADO EN DIFERENTES MEZCLAS DE SUSTRATOS AGRICOLAS"** de los estudiantes **COPPIANO GONZALEZ JORGE EDUARDO Y MERCHAN VILLAMAR GIANNI GABRIELA** Las gestiones realizadas me permiten indicar que el trabajo fue revisado considerando todos los parámetros establecidos en las normativas vigentes, en el cumplimento de los siguientes aspectos:

Cumplimiento de requisitos de forma:
El título tiene un máximo de 15 palabras.
La memoria escrita se ajusta a la estructura establecida.
El documento se ajusta a las normas de escritura científica seleccionadas por la Facultad.
La investigación es pertinente con la línea y sublíneas de investigación de la carrera.
Los soportes teóricos son de máximo 5 años.
La propuesta presentada es pertinente.

Cumplimiento con el Reglamento de Régimen Académico:
El trabajo es el resultado de una investigación.
El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se indica que fue revisado, el certificado de porcentaje de similitud, la valoración del tutor, así como de las páginas preliminares solicitadas, lo cual indica el que el trabajo de investigación cumple con los requisitos exigidos.

Una vez concluida esta revisión, considero que los estudiantes **COPPIANO GONZALEZ JORGE EDUARDO Y MERCHAN VILLAMAR GIANNI GABRIELA** están aptos para continuar el proceso de titulación. Particular que comunicamos a usted para los fines pertinentes.

Atentamente

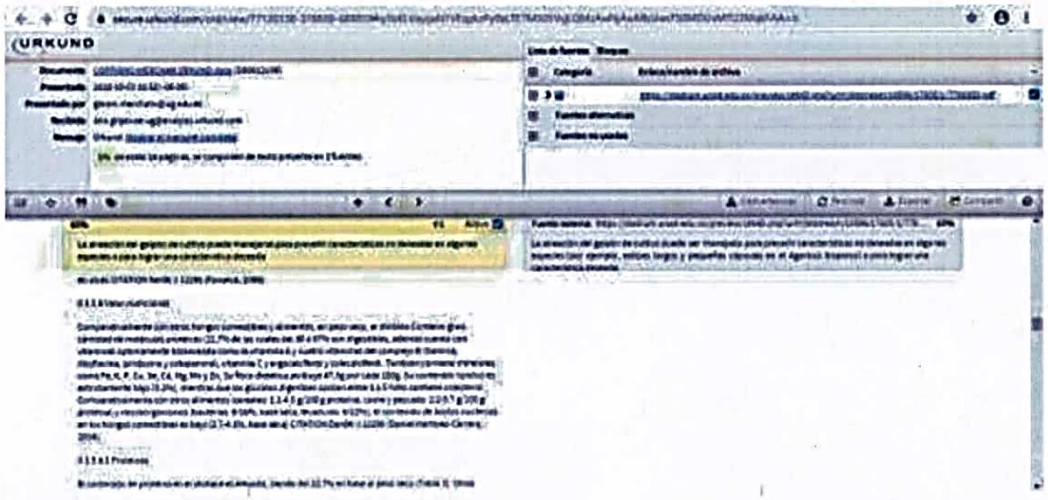
Q.F. MARIA ELENA JIMENEZ HEINERT; M.Sc
DOCENTE TUTOR REVISOR
C.I. 0905366985
FECHA: 03 de Octubre del 2020

FACULTAD: CIENCIAS QUÌMICAS
CARRERA: QUÌMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÒN

ANEXO VII.- CERTIFICADO PORCENTAJE DE SIMILITUD

Habiendo sido nombrado **Q.F. Ana Mercedes Grijalva Endara Msc.** tutor del trabajo de titulación certifico que el presente trabajo de titulación ha sido elaborado por **COPPIANO GONZALEZ JORGE EDUARDO C.I. 0952569788 Y MERCHAN VILLAMAR GIANNI GABRIELA C.I 0956309603**, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de **QUÍMICO FARMACÉUTICO.**

Se informa que el trabajo de titulación **"ESTUDIO SOBRE LAS PROPIEDADES TRADICIONALES Y FARMACOLOGICAS DEL HONGO SHIITAKE *(Lentinula edodes)* CULTIVADO EN DIFERENTES MEZCLAS DE SUSTRATOS AGRICOLAS"**, ha sido orientado durante todo el periodo de ejecución en el programa antiplagio **URKUND** quedando el 1% de coincidencia.



https://secure.urkund.com/old/view/77120338-378889
688939#q1bKLVayijaN1VEqzkzPy0zLTE7MS05VsjLQMzAwNjAwMbUwsTS0MDUxMTU2 MqkFAA==

QF. Ana Mercedes Grijalva Endara; Msc.

C.I. 0912286309
FECHA: 03 de Octubre del 2020

INFORME DE RESULTADO DE ANÁLISIS URKUND

URKUND

Urkund Analysis Result

Analysed Document: COPPIANO-MERCHAN URKUND.docx (D80612199)
Submitted: 10/4/2020 1:52:00 AM
Submitted By: gianni.merchanv@ug.edu.ec
Significance: 1 %

Sources included in the report:

https://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/17605/1/7708303.pdf

Instances where selected sources appear:

1

FACULTAD: CIENCIAS QUÌMICAS
CARRERA: QUÌMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÒN

Guayaquil, 03 de Octubre del 2020

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de tutora del Trabajo de Titulación, Certifico: Que he asesorado, guiado y revisado el trabajo de titulación en la modalidad de investigación, cuyo título es: **"ESTUDIO SOBRE LAS PROPIEDADES TRADICIONALES Y FARMACOLOGICAS DEL HONGO SHIITAKE *(Lentinula edodes)* CULTIVADO EN DIFERENTES MEZCLAS DE SUSTRATOS AGRICOLAS"**, presentado por: **COPPIANO GONZALEZ JORGE EDUARDO**, con **C.I. 0952569788** y **MERCHAN VILLAMAR GIANNI GABRIELA,** con **C.I. 0956309603** previo a la obtención del título de Químicos y Farmacéuticos.

Este trabajo ha sido aprobado en su totalidad y se adjunta el informe de Anti plagio del programa URKUND, quedando el 1% de coincidencia. Lo Certifico:

QF. Ana Mercedes Grijalva Endara; M.Sc

TUTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN
C.I. 0912286309
FECHA: 03 de Octubre del 2020

FACULTAD: CIENCIAS QUÌMICAS
CARRERA: QUÌMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÒN

Guayaquil, 03 de Octubre del 2020

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR REVISOR

Habiendo sido nombrada **Q.F. MARIA ELENA JIMENEZ HEINERT, M.Sc.,** tutora revisor del trabajo cuyo título es: **"ESTUDIO SOBRE LAS PROPIEDADES TRADICIONALES Y FARMACOLOGICAS DEL HONGO SHIITAKE *(Lentinula edodes)* CULTIVADO EN DIFERENTES MEZCLAS DE SUSTRATOS AGRICOLAS"**, certifico que el presente trabajo de titulación, elaborado por los estudiantes: **COPPIANO GONZALEZ JORGE EDUARDO**, con **C.I. 0952569788** y **MERCHAN VILLAMAR GIANNI GABRIELA,** con **C.I.0956309603**; con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de Químicos y Farmacéuticos, en la Facultad de Ciencias Químicas, ha sido **REVISADO Y APROBADO** en todas sus partes, encontrándose apto para su sustentación.

Q.F. MARIA ELENA JIMENEZ HEINERT; M.Sc
DOCENTE TUTOR REVISOR
C.I. 0905366985
FECHA: 03 de Octubre del 2020

FACULTAD: CIENCIAS QUÌMICAS
CARRERA: QUÌMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÒN

Guayaquil, 20 de Octubre del 2020.

CERTIFICADO DEL TRIBUNAL
ACTA DE REGISTRO DE LA SUSTENTACIÓN FINAL

El tribunal de Sustentación del trabajo de titulación del Sr. **Coppiano González Jorge Eduardo** con **C.I. 0952569788** y Srta. **Merchán Villamar Gianni Gabriela** con **C.I.0956309603,** después de ser examinado en su presentación, memoria científica, y defensa oral, da por aprobado el trabajo de Titulación.

Q.F. María Elena Jiménez Heinert; Msc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dra. Haydee María Alvarado Alvarado; Msc.
DOCENTE MIEMBRO 1 DEL TRIBUNAL

Q.F. Ma. Auxiliadora Alarcón P; Mgs.
DOCENTE MIEMBRO 2 DEL TRIBUNAL

Ab. Francisco Palomeque Romero; Mgs.
SECRETARIO GENERAL

FACULTAD: CIENCIAS QUÌMICAS
CARRERA: QUÌMICA Y FARMACIA
UNIDAD DE TITULACIÒN

ANEXO XII.- DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y DE AUTORIZACIÓN DE LICENCIA GRATUITA INTRANSFERIBLE Y NO COMERCIAL DE LA OBRA CON FINES NO ACADÉMICOS

Nosotros, **Jorge Eduardo Coppiano González** con C.I. No. **0952569788** y **Gianni Gabriela Merchán Villamar** con C.I. No.**0956309603,** certificamos que los contenidos desarrollados en este trabajo de titulación, cuyo título es **"ESTUDIO SOBRE LAS PROPIEDADES TRADICIONALES Y FARMACOLÓGICAS DEL HONGO SHIITAKE *(Lentinula edodes)* CULTIVADO EN DIFERENTES MEZCLAS DE SUSTRATOS AGRICOLAS"**, son de nuestra absoluta propiedad y responsabilidad, en conformidad al **Artículo 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN,** autorizamos la utilización de una licencia gratuita intransferible, para el uso no comercial de la presente obra a favor de la Universidad de Guayaquil.

JORGE EDUARDO COPPIANO GONZALEZ
C.I. No.0952569788

GIANNI GABRIELA MERCHAN VILLAMAR
C.I. No.0956309603

***CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN (Registro Oficial n. 899 - Dic./2016) Artículo 114.-** De los titulares de derechos de obras creadas en las instituciones de educación superior y centros educativos.- En el caso de las obras creadas en centros educativos, universidades, escuelas politécnicas, institutos superiores técnicos, tecnológicos, pedagógicos, de artes y los conservatorios superiores, e institutos públicos de investigación como resultado de su actividad académica o de investigación tales como trabajos de titulación, proyectos de investigación o innovación, artículos académicos, u otros análogos, sin perjuicio de que pueda existir relación de dependencia, la titularidad de los derechos patrimoniales corresponderá a los autores. Sin embargo, el establecimiento tendrá una

Dedicatoria

Este presente trabajo va dedicado a mis padres y abuelos, que con su esfuerzo día a día han forjado la persona que soy en la actualidad, muchos de mis logros se los debo a ustedes, entre todos ellos incluyo este.

A mi hermana por estar acompañándome siempre y brindándome el apoyo moral que necesitaba día, no solo en la realización de este trabajo si no a lo largo de toda la vida.

A mi novia, persona que se ha encontrado presente a toda hora de manera incondicional, que siempre ha tenido las palabras correctas para no desistir y seguir con la realización de esta investigación bibliográfica.

A Kira Anastacia, mi pequeño angelito que siempre recordare con todo mi corazón y con mucho amor.

Jorge Eduardo Coppiano González

Dedicatoria

Este presente trabajo va dedicado a la Ing.Com. Mónica Villamar Muñoz, mi madre que con amor y esfuerzo a forjada a la mujer que soy hoy en día.

A mis Abuelos Sra. Eulalia Muñoz y el Sr. Juan Abdón Villamar por estar acompañándome siempre y brindándome enseñanzas de vida.

A mi novio, por estar siempre de manera incondicional en todo lo largo de mi carrera.

Gianni Gabriela Merchán Villamar

Agradecimiento

Gracias a Dios por ayudarme en mis estudios y alcanzar mis metas y a no rendirme en todo lo que me he propuesto en la vida.

Gracias a mi Madre por darme su apoyo y ayudarme a terminar mis estudios.

Gracias a mi querida Facultad Ciencias Químicas que me dio la bienvenida a estudiar esta hermosa carrera la cual me enamoré de todas sus materias, me enseñó todo lo que he aprendido.

A cada uno de mis Docentes por enseñarme y amar tanto mi carrera en especial Q.F. Marianita Rendón M. Msc. por brindarme sus conocimientos a lo largo de mi carrera.

A mi Tutora de tesis Q.F. Grijalva Endara Ana De Las Mercedes Msc. por ayudarme a lo largo de este trabajo de investigación.

A mi Asesor de tesis Ing. Juan Diego Valenzuela Cobos, PhD por ayudarme de manera incondicional a realizar este trabajo.

.

Gianni Gabriela Merchán Villamar

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN ..... **XIX**
ABSTRACT ..... **XX**
INTRODUCCIÓN **1**
CAPÍTULO I. PROBLEMA **2**
I.1Planteamiento del problema 2
I.2 Formulación del problema **3**
I.3 Justificación e importancia 3
I.4 Hipótesis **4**
I.5 Objetivos 4
I.5.1 Objetivo general 4
I.5.2 Objetivos específicos 4
I.1.6 Operacionalización de variables **5**
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO **6**
II.1 GENERALIDADES **6**
II.1.2 ESTRUCTURA DE LOS HONGOS 7
II.1.2.1 SOMBRERO 7
II.1.2.2 HIMENIO 7
II.1.2.3 PIE O ESTÍPITE 8
II.1.2.4 ANILLO O VELO 8
II.1.2.5 VOLVA 8
II.1.2.6 MICELIO 8
II.1.3 CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS 9
III.1.3.1 Taxonómia. 10
II.1.4 Hongos comestibles 11
II.1.5 Hongo Shitake 11
II.1.5.1 Nombres comunes y científicos 11
II.1.5.2 Descripción 12
II.1.5.5Técnicas de cultivo 12
II.1.5.5.1 Siembra tradicional sobre troncos 12
II.1.5.5.2 Siembra en bolsas de aserrín 13
II.1.5.5.3 Contenido de agua 13

II.1.5.5.4 Temperatura 14
II.1.5.5.5 Humedad 14
II.1.5.5.6 Luz 15
II.1.5.5.7 Aireación 15
II.1.5.6 Valor nutricional 15
II.1.5.6.1 Proteínas 16
II.1.5.6.2 Carbohidratos y fibra dietética 16
II.1.5.6.3 Grasas 17
II.1.5.6.4 Vitaminas 17
II.1.5.7 Valor medicinal 18
II.1.5.7.1. El polisacárido "Lentinan" 19
II.1.5.7.2 El "LEM" (*Lentinus edodes mycelium*) 20
II.1.5.7.3 El "KS-2" 20
II 1.5.8 Técnica de Inoculación Liquida 20
II 1.5.8.1 Fructificación de esporas 21
II.1.5.9 Estudios en shiitake con distintos sustratos y cepas en relación a su calidad 21
II.1.5.9.1 Tipos de sustrato 22
II.1.5.9.2 Sustratos naturales 22
II.1.5.9.4 Incubación del Micelio 23
1.5.9.5 Tratamientos Térmicos 24
II.1.5.10 Determinación de propiedades farmacológicas 24
III.1.5.10.1 Propiedades antioxidantes 24
II.1.5.10.2 Compuestos fenólicos 25
II1.5.10.3 Método DDPPH 26
II.1.5.10.4 Ensayo de FRAP 26
II.1.5.11 Propiedad antitumoral 26
II.1.5.11.1 Otros compuestos anticancerígenos 27
II.1.5.11.3 Método colorimétrico de bromuro 28
II.1.5.12 Otras propiedades farmacológicas 28
II.1.5.12.1 Propiedades antibióticas 28
II.1.5.12.2 Propiedades que reducen el nivel de colesterol y la hipertensión 29

II.1.5.12.3 Propiedades antitrombóticas 29
II.1.5.13.4 Propiedades antidiabéticas 30
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO 31
III.1 Tipo de Investigación 31
III.2 Equipos, Aparatos, Materiales y Reactivos 31
III.2.1 Materiales de laboratorio 31
III.2.2 Equipos 32
III.2.3 Reactivos 32
III.3. Tipo de Sustrato 33
III.3.1 Muestra 33
III.3.2 Obtención de semilla 33
III.3.2.1 Obtención del medio de cultivo 33
III.3.2.2 Preparación del medio de cultivo 34
III.3.3. Formulación de la mezcla 34
III.3.3.1 Preparación del sustrato 34
III.3.3.2 Multiplicación e incubación del Micelio 35
III.3.3.3 Pesaje y tratamiento térmico 36
III.3.4 Inducción o choque térmico 36
III.3.5 Formación de cuerpo fructífero 36
III.3.6 Determinación de propiedades farmacológicas 37
III.3.6.1 Tratamiento de muestra 37
III.3.6.2 Actividad antioxidante 37
III.3.6.2.1 Obtención de los extractos 37
III.3.6.3.1 Determinación de la actividad antioxidante por el método del DPPH . 37
III.3.6.3.2. b-caroteno / ácido linoleico 38
III.3.6.2.3 Ensayo FRAP (poder antioxidante reductor férrico) 38
III3.6.3 Actividad antitumoral 39
II.3.6.3.1 Preparación de la muestra 39
III.3.6.3.2 En vivo prueba antitumoral Células S-180 40
III.3.7 Presentación de flujo gramas de las técnicas empeladas para la determinación de actividad antioxidante y actividad antitumoral 42
CAPITULO IV. RESULTADO Y DISCUSIONES 49

IV.1 Determinación del sustrato 49
IV.2 Determinación Actividad antioxidante 51
IV.3 Determinación de actividad antitumoral 55
IV.3.2 Técnica In vitro 55
IV.3.1 Técnica In vivo..... 56
CONCLUSIONES 58
RECOMENDACIONES 59
BIBLIOGRAFÍA 60
GLOSARIO 64

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1-Estructura del hongo shiitake 7

Imagen 2-Micelio del hongo shiitake 8

Imagen 3-Clasificación Taxonómica.....10

Imagen 4-Fructificación de esporas.....21

Imagen 5-Parámetros óptimos para el cultivo del hongo shiitake 35

Imagen 6-Tratamiento de la muestra para la actividad antioxidante 42

Imagen 7-Técnica DPPH.....43

Imagen 8-Técnica con el reactivo de FRAP 44

Imagen 9-Técnica B-caroteno/Ácido linoleico.....45

Imagen 10-Tratamiento de la muestra para actividad antitumoral 46

Imagen 11-Técnica en vivo de actividad antitumoral 47

Imagen 12-Técnica In vitro de actividad antitumoral.....48

Imagen 13-Resultado del articulo #4 55

Imagen 14-Resultado del articulo #5 55

Imagen 15-Articulo 5 65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Formula para medio de cultivo MYA 33

Tabla 2-Formulacion de los tratamientos para el cultivo de Shiitake 34

Tabla 3-Porcentaje de Eficiencia Biológica..... 49

Tabla 4-Tasa de producción..... 49

Tabla 5- Rendimiento 50

Tabla 6-Método DPPH 51

Tabla 7-Método FRAP..... 52

Tabla 8-b.caroteno / ácido linoleico 52

Tabla 9-Determinación de fenoles..... 53

“ESTUDIO SOBRE LAS PROPIEDADES TRADICIONALES Y FARMACOLOGICAS DEL HONGO SHIITAKE *(Lentinula edodes)* CULTIVADO EN DIFERENTES MEZCLAS DE SUSTRATOS AGRICOLAS”

Autores: Jorge Eduardo Coppiano González y Gianni Gabriela Merchán Villamar

TUTOR: Q.F. Grijalva Endara Ana De Las Mercedes

RESUMEN

El shiitake es una seta comestible de color marrón y aroma intenso originaria de Asia Oriental. Se encuentra a menudo deshidratada que fresca. Posee propiedades tradicionales y farmacológicas tales como: antitumoral, antidiabética, anticancerígena etc. En nuestro país la seta crece en un círculo rígido, se desarrolla en materiales leñosos o ricos en energía como los troncos de cierto ejemplar de árboles. Mediante revisión bibliográfica y como objetivo principal se evaluarán las propiedades farmacológicas del hongo shiitake (*Lentinula edodes*), cultivado en diferentes mezclas de sustratos agrícolas cultivado en diferentes mezclas de sustratos agrícolas mediante revisión bibliográfica es el objetivo principal de este trabajo. Se realizó una comparación de dos estudios; una en Colombia y otra en México dando como resultado; el sustrato del artículo realizado en México; este cumple con las condiciones adecuadas de rendimiento para el mercado las cuales deben ser superiores al 60 % y el articulo de Colombia El sustrato analizado en Colombia presenta un porcentaje de eficiencia biológica de 21.5 % La actividad antioxidante va a aumentar dependiendo de la cantidad de compuesto fenólicos existentes en la muestra, cada cepa puede presentar propiedades similares o diferentes u otra cepa del Lentinula edodes. Se evaluó la actividad antitumoral mediante un ensayo IN vitro donde se relaciona las concentraciones de los extractos de *Lentinula edodes* vs los porcentajes de inhibición.

Palabras claves: *Lentinula edodes*, actividad antioxidante, actividad antitumoral

"STUDY ABOUT THE TRADITIONAL AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF SHIITAKE FUNGUS (*Lentinula edodes*) CULTIVATED IN DIFFERENT MIXTURES OF AGRICULTURAL SUBSTRATES"

Authors: Jorge Eduardo Coppiano González y Gianni Gabriela Merchán Villamar

Advisorde: Q.F. Grijalva Endara Ana De Las Mercedes

ABSTRACT

Shiitake is an edible mushroom with a brown color and intense aroma, it is native to East Asia. It is often found dehydrated than fresh. It has traditional and pharmacological properties such as: anti-tumor, anti-diabetic, anti-cancer, etc. In our country the mushroom grows in a rigid circle, it develops in woody or energy-rich materials such as the trunks of a certain specimen of trees. In this research, the pharmacological properties of the shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) cultivated in different mixtures of agricultural substrates will be evaluated by means of a bibliographic review is the main objective of this work. It was verified with the evaluation of this analysis, a comparison of the results of 2 investigations carried out in different countries was made; one in Colombia and one in Mexico resulting in; the substrate of the article made in Mexico; This meets the appropriate performance conditions for the market, which must be greater than 60% and the article from Colombia The substrate analyzed in Colombia has a biological efficiency percentage of 21.5% The antioxidant activity will increase depending on the amount of compound existing phenolics in the sample, each strain may have similar or different properties or another strain of *Lentinula edodes*. The antitumor activity was evaluated by means of an IN vitro test where the concentrations of *the Lentinula edodes* extracts are related to the percentages of inhibition.

Key words: *Lentinula edodes*, antioxidant activity, antitumor activity

INTRODUCCIÓN

El hongo shiitake abarca múltiples propiedades farmacológicas y tradicionales, es estrechamente popular en el ámbito terapéutico. El shiitake (*Lentinula edodes*) es un hongo comestible lo cual hace mención a la representación que consiste en un vaso o boina; su expresión etimológica es en oriental shiitake (*Lentinula edodes*) u hongo del macizo shii, y es originario de Asia oriental. (BERDUGO, 2015, JULIO 07)

En Latinoamérica, se han adaptado y modificado las técnicas tradicionales para reducir el ciclo del cultivo y bajar los costos de producción al utilizar como substratos materiales antes no considerados, tales como la viruta y el aserrín de diferentes árboles, como el encino (*Quercus* sp.), pino (*Pinus* sp.), palo mulato (*Bursera* sp.) etc., Datos oficiales de 2006, establecen que en México se produjeron 75.73 millones de ton de materia seca proveniente de 20 cultivos, de los cuales 60.13 millones de ton corresponden a residuos primarios, obtenidos al momento de la cosecha, entre los que están: hojas y tallos del maíz, tallos y vaina de sorgo, puntas y hojas de caña de azúcar, paja de trigo, paja de cebada y de frijol, así como cáscara de algodón (Romero-Arenas, 2015).

En Ecuador en los últimos años, hay un corto desarrollo en el comercio por la siembra de shiitake, y la observación de parte de algunas empresas para el impulso de medicamentos no ha sido beneficioso. La seta crece en un círculo rígido, se desarrolla en materiales leñosos o ricos en energía como los troncos de cierto ejemplar de árboles. El shiitake sobresale por su aroma, matiz, gusto, contextura; posee mayor concentración de proteínas que los vegetales; se destaca por tener al polisacárido llamado como Lentinan, presenta características anti-infecciosas y anti-cancerígenas. Presenta componentes del conjunto B, que contribuyen al recuento metabólico, mejorando la labor del sistema inmune y reduciendo el colesterol (ROMERO, 2015)

CAPÍTULO I. PROBLEMA

I.1Planteamiento del problema

Los hongos presentan propiedades nutricionales y farmacológicas, lo cual hace de suma importancia su investigación; además la forma en la cual se desarrolla en el medio ambiente es impredecible, pero con las condiciones climáticas específicas su crecimiento es favorable.

Tradicionalmente el hongo shiitake era utilizado para ayudar a fortalecer nuestro sistema inmunológico, en países como Japón y China la ingesta de estos hongos en la dieta cotidiana permitía una mejor calidad de vida, debido a que estas sociedades presentaban una reducción en el número de enfermedades, por lo cual no es muy descabellado decir que estas características farmacológicas aportan a la longevidad.

La producción de los hongos comestibles en la actualidad es cada vez más demandante, a nivel mundial; en México la producción de este hongo es del 58.6%, en Chile es del 17.6% y en Brasil la producción es del 10.6% representando el 86.8% de la producción total de este hongo en Latinoamérica. (Romero et al., 2015)

El hongo shiitake (*Lentinula edodes*), se encuentra como la segunda especie de hongos cultivados a nivel mundial, por sus diversas oportunidades en el mercado debido su valor nutricional.

El cultivo del shiitake se ha realizado principalmente por su aporte nutricional, sin embargo, presenta una amplia cantidad de componentes bioactivos lo que convierte a esta especie vegetal como el nutraceútico por excelencia; pueden llegar a crecer incluso en residuos de aserrín de forma no natural, por lo cual sus posibilidades de producción en diversos sustratos agrícolas son muy altas; en Estados unidos es muy popular el crecimiento de estas setas de Shiitake haciendo uso de este método.

Por este motivo es necesario la recopilación bibliográfica para poder conocer en que sustrato se han podido obtener cuerpos fructíferos con alto contenido proteico y que otorguen diversos beneficios para salud en Latinoamérica.

I.2 Formulación del problema

¿Cuál es la relación que existe entre el uso de sustratos agrícolas para el cultivo de Hongo Shiitake (*Lentinula edodes*) y sus propiedades farmacológicas?

I.3 Justificación e importancia

Este estudio se realiza para presentar las propiedades farmacológicas del hongo shiitake (*Lentinula edodes*) cultivado en diversos sustratos agrícolas, mediante un estudio bibliográfico promoviendo el consumo de este hongo que ayudaría a la población que ha sido afectada por la crisis sanitaria mundial causada por el COVID 19.

Latinoamérica cuenta con estaciones climáticas y vegetación que ayudarían al crecimiento del hongo shiitake, obteniendo el cultivo de este hongo en menor tiempo y con mayor rendimiento.(Jiménez & Armijos, 2008). El hongo shiitake posee características organolépticas, y alto contenido proteico en comparación que los vegetales.

Entre los principales substratos utilizados en el cultivo del hongo shiitake (*Lentinula edodes*) tenemos: viruta, aserrín de diferentes árboles como: el encino (*Quercus* sp.*),* pino (*Pinus* sp.*),* palo mulato (*Bursera* sp.*)* y varios residuos agrícolas que ayudan a mejorar su productividad y su contenido proteico como el maíz (*Zea mays*), caña de azúcar (*Saccharum* sp.) avena (*Avena sativa*).(Romero et al., 2015)

La importancia de este proyecto radica en presentar en que mezcla de residuos agrícolas para el cultivo del hongo comestible shiitake (*Lentinula edodes*) presenta un mejor crecimiento del cuerpo fructífero; además de desglosar las características farmacológicas justificando el uso de esta especia vegetal en la medicina actual.

I.4 Hipótesis

Existe una relación entre el cultivo del hongo shiitake en diversos sustratos agrícolas y sus propiedades farmacológicas.

I.5 Objetivos

I.5.1 Objetivo general

- Presentar las propiedades farmacológicas del hongo shiitake (*Lentinula edodes*) cultivado en diferentes mezclas de sustratos agrícolas mediante revisión bibliográfica.

I.5.2 Objetivos específicos

- Revisar las diferentes mezclas de sustratos agrícolas utilizados en la producción del hongo comestible shiitake (*Lentinula edodes*).
- Identificar las propiedades farmacológicas que posee el hongo comestible shiitake (*Lentinula edodes*) utilizando en su cultivo diferentes sustratos.

I.1.6 Operacionalización de variables

Tabla I. Operacionalización de variables

TIPO	VARIABLES	CONCEPTUALIZACION	INDICADOR
Dependiente	Características morfológicas	Tamaño Peso	Unidad de medida (S.I)
	Propiedades farmacológicas	Actividad antioxidante Actividad antitumoral	Porcentaje de actividad (%) ug/mL mg/mL
Independiente	Tipo de muestra	Nombre de la especie	Seta
	Tipo de sustrato	Crecimiento del micelio Fructificación de la primera cosecha Fructificación de la segunda cosecha Fructificación de la tercera cosecha	Porcentaje de crecimiento y fructificación (%)

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

II.1 GENERALIDADES

En una temporada de la década, cuando la inteligencia biológica estaba limitada a lo que podía percibir la vista humana, existían dos reinos, el vegetal y el de los animales. Una revista conocida como Species Plantarum divulgada en 1753 perteneciente al gran Lineo encasilló a los hongos dentro del reinado vegetal, la razón fue la presencia de un muro celular en su estructura. (García & Mechán , 2011)

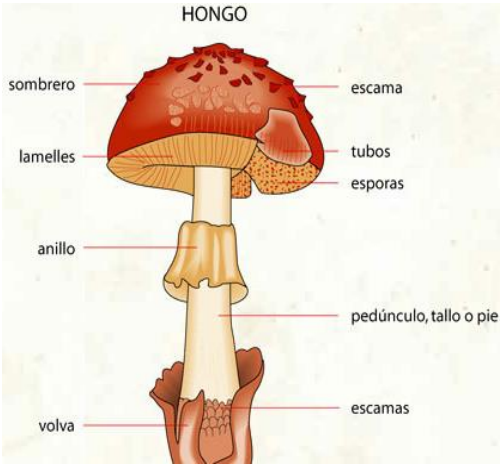
El reinado fúngico presentaba una química diferente por lo que empezó a desunirse del reinado vegetal, ya que los hongos discrepan en las paredes celulares con respectos a las plantas, ya que, al no contener cloroplastos ni clorofila, están destinados a generar digestión extracelular mediante excreción enzimática hidrolítica y después de esto la absorción de las sustancias alimenticias se pre digiere por su pared celular y membrana plasmática. Las pruebas filogenéticas y demás características determinaron la formación de un nuevo reino llamado reino Fungi o Micetos.

El reino fungi lo pueden componer tanto seres macroscópicos como microscópicos. Respecto al primer grupo, una aglomeración algodonosa denominada micelio de color blanco forma el cuerpo reproductivo.

El hongo Shiitake de cuyo nombre científico es *Lentínula edodes* correspondía a un linaje endémico del oriente de Asia. Actualmente, se considera un manjar de primera clase siendo tradicional a nivel mundial por sus virtudes saludables y su delicioso sabor, además su producción es la misma que otras setas(Forrest, 1982).

II.1.2 ESTRUCTURA DE LOS HONGOS

Imagen 1-Estructura del hongo shiitake



Los micelios, himenio, sombrero, lámina, laminilla, volva y pie son las partes esenciales de las setas. (Rodríguez , 2011)

La *Lentínula edodes* es conocida por las medidas de su sombrero semiesférico que oscila entre 5 a 15 centímetros diametrales. En sus primeras etapas de vida se lo identifica por tener una coloración marrón oscuro llegando a tono negruzco sin embargo, a medida que va creciendo se puede observar un cambio en el color a marrón claro. (Arredondo & Pérez, 2007)

II.1.2.1 SOMBRERO

El píleo al comienzo se presenta de manera de rollo, en el transcurso de su crecimiento se curva y una vez que ya es maduro, se aplana. Es por esto que se puede decir que la forma de este puede ser irregular. (Toharia, 1985)

II.1.2.2 HIMENIO

Parte fértil o reproductora del hongo, que contiene esporas y se encuentra debajo del sombrero. La estructura más común es en forma de laminillas, aunque también puede presentarse como tubos, arrugas o venosidades, o agujas. (Toharia, 1985)

II.1.2.3 PIE O ESTÍPITE

Parte del hongo que soporta el sombrero, y puede tener diversas formas: grueso, fino, corto, abombado, retorcido, excéntrico, estas características son las que permiten clasificar las especies de hongos. (Toharia, 1985)

II.1.2.4 ANILLO O VELO

Parte encargada de proteger el himenio cuando el hongo esta joven y puede ser doble, sencillo y caído. (Toharia, 1985)

II.1.2.5 VOLVA

Es el resto del velo que cubre originariamente a algunas especies al momento de fructificar, que posteriormente puede quedarse encima del sombrero (como verruguitas), como una cortina se presenta en el borde, en forma de aro está presente en el píe, mientras que en forma de volva se encuentra en la base del pie.(Toharia, 1985)

II.1.2.6 MICELIO

a. Micelio

Los hongos pasan la mayor parte de su vida como micelio vegetativo; su producción es análoga a la producción de un tomate por la planta de tomate; en los hongos la seta es el fruto del micelio, no obstante, sin micelio no hay setas. (Shimomura , 2006)

Imagen 2-Micelio del hongo shiitake

El micelio es muy frágil ya que cualquier perturbación física lo rompe o tritura, ya que está compuesto por muchas líneas de interconexión individual (hifas) que son invisibles, excepto bajo un microscopio. (Shimomura , 2006)

El crecimiento del micelio es sólo en la punta de cada hifa, puesto que la digestión se produce a lo largo de la longitud de la hifa hasta ocupar por lo general casi todo el sustrato.

b. Micelio Primario y Secundario

Los hongos tienen dos tipos básicos de micelio: primario y secundario, el primero se produce cuando una ascospora o basidiospora germina, teniendo un solo núcleo por célula monocariótica llamado monocarión; mientras que el segundo antes de que un ascomicete o basidiomicete produzca ascosporas o basidiosporas puras, este tiene un par de núcleos en cada célula dicariótica denominado dicarión.

El Shiitake y la mayoría de otros hongos pueden producir setas sólo con el micelio secundario, en vista de que este se ha formado por la manifestación del micelio primario. (Shimomura, 2006)

Una característica distintiva del micelio secundario en muchos basidiomicetes, incluyendo el Shiitake es la presencia de conexiones en forma de abrazadera, que asegura que los nuevos núcleos de células reciban la información del dicarión.

II.1.3 CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS

Al principio la agrupación del reino fungi se dio por medio de propiedades celulares y morfofisiológicas como las particularidades de estructura de las esporas, esporocarios y gametos o los ciclos biológicos. En los últimos años, estudios relacionados con disciplinas como la química de la vida, biología a nivel molecular e ingeniería genética aportaron vitales conocimientos sobre la modificación de las clases de hongos, con el propósito de obtener información amplificada sobre la evolución y origen de estos organismos.

El reino de los hongos presenta 5 clasificaciones taxonómicas que son: Basidiomycota, Chytriodiomycota, Ascomycota, Zygomycota y Deuteromycota. Este último tiene características que destacan de entre los demás ya que no poseen sexualidad y por ende su reproducción es asexual generando conidios. En los

Chytridiomicetes su reproducción involucra la unión de gametos que se mueven, mientras que en los Zygomicetos su sexualidad está dada por fusión de gametos y creación de zigosporas.

III.1.3.1 Taxonómia.

La taxonomía de Lentínula edodes se clasifica mediante lo estipulado por Pegler en 1983 tal y como se muestra en la siguiente tabla.

Reino	Fungi
División	*Basidiomycota*
Clase	*Basidiomycetes*
Subclase	*Agaricomycetidae*
Orden	*Agaricales*
Familia	*Agaricaceae*
Género	*Lentinus*
Cepa	*Lentinus edodes*

Imagen 3-Clasificación Taxonómica

a. Ascomicetes y Basidiomicetes

Estudios realizados por Tokimoto (1978) y Pegler (1983) demuestran: que la mayoría de los hongos son de importancia económica, en las dos grandes clases que son agrupadas bajo la dominación de hongos. Estas dos clases de hongos se distinguen por sus esporas sexuales (Ascomicetes producen ascosporas formadas dentro de un saco llamado asca y Basidiomicetes originan basidiosporas en los basidios), forma, color, tamaño y textura de fructificación del cuerpo (Basidiomicetes mayores a una pulgada y Ascomicetes son microscópicos en su mayoría a excepción de las morchelas).

La Lentínula edodes se encuentra dentro del orden taxonómico Agaricales que es de tipo Bacidiomicetes, su característica principal es la de presentar un píleo pequeño y un pedicelo (falso tallo). (Graham, 1988)

Las cepas que presentan compatibilidad en los Ascomicetos son relacionados de distintas maneras, ya sea por compatibilidad de fusión de núcleos (cariogamia) y después por una reducción en la división nuclear (meiosis). Internamente, existe una estructura en configuración de bolsillo denominada asca, las meiosporas experimentan disgregaciones ecuacionales conocidas como mitosis, de esta manera se forman las ascosporas. (Rivera & Lares, 2017)

II.1.4 Hongos comestibles

Alimentarse de manera natural no es solamente sabroso, también ayuda a nutrirse y otorga propiedades que significan un beneficio para la salud, los hongos representan una gran parte de especies vegetales en américa latina; su uso depende de las características inherentes de cada especie. (Martínez-Carrera, M. Sobal, P. Morales, W. Martínez, M. Martínez, 2004)

Los hongos comestibles poseen vitaminas, proteínas, incluso lípidos libres de colesterol, su consumo en la actualidad tiene con finalidad satisfacer, ya sea por su textura, aroma u otras características; ayuda a nutrir de una manera correcta favoreciéndonos de metabolitos con acciones farmacológicas únicas y diferente.

En el grupo de los hongos comestibles que más se resalta tenemos al Shiitake, por su capacidad de poder desarrollarse en diversas mezclas de sustratos agrícolas y residuos forestales; este último mencionado representa una gran ventaja debido a que ayuda a una mejor conservación de bosques (Romero et al., 2015).

II.1.5 Hongo Shitake

II.1.5.1 Nombres comunes y científicos

Shitake en Japón y Xiangu en China. Nombre científico: *Lentinula edodes*.

II.1.5.2 Descripción

Es un hongo de casco curvado de 4 a 16 cm de radio y de tono variable de café parduzco claro a pardo-rojizo con cierto matiz violáceo. Al desarrollarse se torna crecidamente sombrío por el eje y suele agrietarse, viéndose la carne más clara en el fondo de las grietas. Además, son frecuentes las escamas, de tamaño y tono variables, sobre todo en la periferia, cuyo borde está enrollado de joven. Sus esporas tienen forma alargadas y de coloración lechoso. El estípite a menudo extravagante, blanco en lo alto y de color más claro que el casco por debajo, donde es sombra escamosa. La carne es blanquecina, de sabor ácido apetitoso (Garcìa, 1998) .

II.1.5.5Técnicas de cultivo

Básicamente se distinguen ambos tipos de cultivo de *L. edodes:*

1) Siembra tradicional sobre troncos

2) Siembra en bolsas con aserrín.

II.1.5.5.1 Siembra tradicional sobre troncos

La siembra sobre troncos ha sido siempre en Oriente utilizando troncos de árboles de follaje ancho, tales como encino, hayas, abedul, álamos y sauces de 5 a 20 cm de radio. Los troncos son talados en época de invierno y se apilan en la selva formando capas en direcciones cruzadas para dejar la circulación del soplo y rebajar la humedad incluso un 40-45%.

Los troncos deben ser inoculados con micelio propagado en aserrín con 20% de salvado de trigo o arroz y 3% de glucosa, humedecido y aséptico. Cuando los troncos ya están invadidos por el micelio, luego de 5 a 16 meses (dependiendo de la variedad de tronco y sobre todo de la temperatura), los troncos se llevan al área terminante para la fructificación que será inducida por las lluvias (o riegos) y los cambios de temperatura que ocurren en primavera y otoño. El desarrollo de esporóforos en los troncos sucede por oleadas o brotes separadas entre sí por una

etapa muy cambiante de 3 a 6 meses, y pueden mantenerse los troncos en producción por un ciclo de 2 a 6 años, obteniéndose rendimientos de 10 a 20% del peso seco de la madera (Garcìa, 1998).

II.1.5.5.2 Siembra en bolsas de aserrín

A principios de 1970 en Taiwán, Japón y China, se empezó a fabricar shiitake comercialmente en residuos madereros como el aserrín de maderas duras, bajo condiciones controladas de temperatura, luz, humedad relativa del medio ambiente y contenido de humedad del sustrato.

El gran avance para la siembra a escala comercial fue el uso de bolsas de plástico esterilizables, en las cuales el sustrato puede comprimirse, esterilizarse, inocularse y acceder la propagación del micelio. El sustrato suele mezclarse con salvado de trigo o arroz, restos de maíz o de semillas de algodón, cáscaras de cacahuates, etc., se ajusta el contenido de humedad, se esteriliza y se inocula con el micelio de la seta. En estas bolsas el micelio se propaga formando un macizo sólido al termino de 30-70 días; cuando aparecen manchas húmedas cafés sobre la cara del bloque, el sustrato está preparado para seguir a la etapa de fructificación, en esa etapa la bolsa es retirada. Para generar la formación de primarios se debe incrementar la humedad relativa por medio de riegos continuos, bajar la temperatura del ambiente (12 - 20ºC) y dar ciclos 12 horas de luz natural o artificial por 12 horas de oscuridad (Schmidt, 2006). Los resultados que se reportan mediante el empleo de este tipo de cultivo son del 70-261% de siembra en bolsas de aserrín (Ramirez, 2002).

II.1.5.5.3 Contenido de agua

Relacionado con otros alimentos, el shiitake contiene el 88.3% de agua, siendo el nivel más bajo entre las setas comestibles, por su contenido de agua, el shiitake se compara mucho a las verduras y las frutas, así como a otros alimentos de consumo masivo como la leche y el huevo. Por otra parte, las semillas contienen una baja cantidad de agua ya que se venden en seco; aunque, al cocinarse incrementan de manera significativa su contenido de agua (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II.1.5.5.4 Temperatura

La temperatura es el factor más investigado respecto a su efecto en el desarrollo de las especies fúngicas, no obstante, no es resultado importante sobre el mismo, además indagar sobre este factor en el laboratorio generalmente es muy facil (Miles y Chang, 1999). El cultivador de hongos está en la capacidad de tratar con:

- La temperatura adecuada para el crecimiento micelial.
- La temperatura adecuada para el desarrollo de un producto metabólico (compuestos medicinales como Lentinan que es un carbohidrato utilizado como medicina para diferentes pitos de cáncer, esta molécula se forma por el miscelio del hongo)
- La temperatura más adecuada para el desarrollo del cuerpo reproductor, que es el producto de interés para el cultivador de setas (Fonseca, 2006).

II.1.5.5.5 Humedad

La mayoría de las setas necesita altos niveles de humedad. Al examinar los elementos de humedad para la siembra de las setas, deben tener en cuenta ambos dos aspectos importantes, el primero es el porcentaje de humedad total del suelo mientras que el segundo se refiere al desarrollo de las setas ya para que haya condiciones favorables se necesita controlar la humedad relativa.

Las especies pueden diferir entre los intervalos adecuados de humedad, mismos que pueden modificarse según la etapa de crecimiento en la que se encuentre. La humedad relativa adecuada para gran parte del reino fungi oscila entre 95 a 100%, esto ocasiona que se genere un crecimiento óptimo sin que exista cantidad significativa en la pérdida de humedad del sustrato por evaporación. Por otra parte, el progreso de micelio se considera óptimo si el porcentaje de humedad del sustrato oscila entre 50 y 75%. (Fonseca, 2006).

II.1.5.5.6 Luz

Los seres que general luz propia presentan un peculiar aspecto de influjo de la luz en las setas. También existen investigaciones que indican que la inhibición de luz puede atribuirse al desarrollo de algunas especies de algas conocidas como agares. Es una práctica normal de laboratorio, cultivar el micelio de la cepa shiitake en la oscuridad para obtener un mejor crecimiento (Fonseca, 2006).

II.1.5.5.7 Aireación

El oxígeno y CO2 son las partículas gaseosas atmosféricas de mayor relevancia en el estudio del reino fungi. La aireación es una cuestión de gran importancia para el control de cultivos fúngicos. Otro dato importante es el nivel de oxigenación ya que los hongos son seres aerobios y el control de este requisito impacta en el manejo adecuado de los sembríos de micelios. El desarrollo de vegetación tiene una relación directamente proporcional con el nivel de CO2 ya que, si este aumenta ligeramente, la vegetación también lo hará, de la misma forma que en las áreas aisladas, esto se debe al micelio y sus actividades respiratorias. La aireación del galpón de cultivo puede manejarse para prevenir características no deseadas en algunas especies o para lograr una característica deseada en otras (Fonseca, 2006).

II.1.5.6 Valor nutricional

Comparativamente con otros hongos comestibles y alimentos, en peso seco, el shiitake Contiene gran cantidad de moléculas proteicas (22,7% de las cuales del 80 a 87% son digestibles, además cuenta con vitaminas óptimamente balanceada como la vitamina A y cuatro vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, piridoxina y cobalamina), vitamina C y ergocalciferol y colecalciferol. También contiene minerales como Fe, K, P, Cu, Se, Ca, Mg, Mn y Zn. Su fibra dietética atribuye 47,3g por cada 100g. Su contenido lipídico es estrictamente bajo (3.2%), mientras que los glúcidos digeribles oscilan entre 1 a 5 %No contiene colesterol. Comparativamente con otros alimentos (cereales: 1.1-4.0 g/100 g proteína; carne y pescado: 2.2-5.7 g/100 g proteína) y microorganismos (bacterias: 8-16%, base seca; levaduras: 6-12%), el

contenido de ácidos nucleicos en los hongos comestibles es bajo (2.7-4.1%, base seca) (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II.1.5.6.1 Proteínas

El contenido de proteína en el shiitake es elevado, siendo del 22.7% en base al peso seco (Tabla 3). Otros alimentos de amplio consumo tienen un contenido equivalente o más bajo, tales como la leche (25.2%), el maíz (11.2%), el frijol negro (24.2%) y el aguacate (7.1%). Entre los aminoácidos esenciales, destaca el contenido de leucina, lisina, metionina, y tirosina (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II.1.5.6.2 Carbohidratos y fibra dietética

La composición de los carbohidratos totales es un aspecto relevante del shiitake debido a su complejidad. Se incluyen aquí polisacáridos, disacáridos, monosacáridos, alcoholes azucarados, y azúcares libres. El shiitake contiene el nivel más alto de fibra dietética (47.3 g/100 g, base seca) dentro de los hongos comestibles cultivados de mayor importancia comercial. Una proporción importante de la fibra dietética está compuesta por quitina y β-glucanos, los cuales tienen propiedades antitumorales y pueden llegar a prevenir el cáncer rectal y de colon. La fibra dietética es un buen medio para el desarrollo de enterobacterias, cuya combinación puede ayudar a prevenir la arterioesclerosis, la trombosis, la hipertensión, y la diabetes mediante la absorción intestinal de colesterol y otras substancias potencialmente dañinas para la salud. Asimismo, pacientes diabéticos alimentados con dietas ricas en fibra redujeron su requerimiento diario de insulina y estabilizaron sus niveles de glucosa sanguínea. Dentro de los azúcares libres pueden mencionarse la trehalosa y el manitol, los cuales no son comunes en la dieta humana y han sido asociados a un efecto “prebiótico”, promoviendo el crecimiento y la redistribución de bacterias en el intestino humano (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II.1.5.6.3 Grasas

Aunque el contenido de lípidos totales en el shiitake es bajo, debe resaltarse la presencia de ácidos grasos, glicolípidos, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, esteroles y fosfolípidos. Su balance también es adecuado, ya que el 76.5% de los ácidos grasos son insaturados, los cuales se consideran esenciales para la dieta humana. El ácido linoleíco es el ácido graso insaturado que se presenta en mayor proporción (72.8%). Una buena parte de las grasas también está formada por ergosterol (602-679 mg/100 g peso seco), el cual recientemente se ha demostrado que tiene propiedades antitumorales, probablemente mediante la inhibición de la angiogénesis inducida por tumores cancerosos sólidos (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II.1.5.6.4 Vitaminas

El contenido de vitaminas en el shiitake, en forma comparativa con levaduras ampliamente utilizadas como suplemento alimenticio. El shiitake puede considerarse como una buena fuente de vitaminas: A, complejo B, C, D2, D3, niacina y pro-vitamina D2. Debe mencionarse que los hongos, y en particular el shiitake, constituyen el único alimento natural de origen no animal que contiene vitamina D (efectiva para la prevención y el tratamiento del raquitismo, la osteomalacia, y la osteoporosis postmenopáusica), siendo la única fuente de esta importante vitamina para las personas con dietas vegetarianas. En este tipo de dietas, el shiitake también proporciona la importante vitamina B12 (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II.1.5.6.5 Minerales

En orden de importancia, el shiitake contiene altas concentraciones de potasio, fósforo, magnesio, calcio, sodio, zinc, cobre, hierro, boro y manganeso. El potasio es importante para regular la presión arterial y la condición muscular, mientras que el fósforo es fundamental para la transferencia de energía, y la información genética dentro del cuerpo. Otros minerales se presentan en concentraciones menores, tales como el selenio. Este micronutriente es esencial para la dieta humana, ya que funciona

como cofactor del sistema enzimático glutation-peroxidasa, cuya función principal es proteger los lípidos de la membrana celular contra los daños ocasionados por radicales libres. Diversos estudios han indicado que el consumo de altos niveles de selenio en la dieta reduce la incidencia de ciertos tipos de cáncer (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II.1.5.7 Valor medicinal

Las propiedades medicinales de los hongos comestibles, así como sus efectos benéficos en la salud humana, han sido reconocidas durante más de 2000 años por diversas culturas en todos los continentes. En las últimas décadas, extractos obtenidos a partir de hongos son ampliamente comercializados como nutracéuticos, concentrados, o suplementos nutricionales, dietéticos o alimenticios para mantener o mejorar la salud. El shiitake es considerado un excelente alimento funcional que proporciona beneficios a la salud y ayuda a prevenir o aliviar enfermedades si se consume regularmente dentro de la dieta. Sus propiedades medicinales se han popularizado comercializando suplementos alimenticios para reducir la hipertensión y tratar enfermedades cardiovasculares, la diabetes, el cáncer, y la artritis. Estudios epidemiológicos realizados en la isla nipona mencionan que la ingesta de hongos como alimento se asocia a tasas inferiores de muerte por cáncer, al compararse con el valor promedio nacional de ese país. El consumo diario de tan sólo 90 g de shiitake fresco durante 7 días induce la reducción de hasta 12% del colesterol en sangre.

Actualmente, se cuenta con evidencia científica sólida basada en análisis químicos y la utilización de modelos in vitro, animales y humanos. Diversos estudios demuestran la presencia de una amplia variedad de moléculas bioactivas en el shiitake, tales como polisacáridos de alto peso molecular, glicoproteínas, terpenoides, proteínas fúngicas inmunomoduladoras, esteroides, fenoles, nucleótidos y sus derivados. Actualmente, el shiitake es utilizado como un verdadero modelo dentro de los hongos comestibles con propiedades funcionales. Estas propiedades se han estudiado científicamente desde la época de los 1960s, principalmente por investigadores japoneses. Diversos compuestos se han logrado aislar, purificar, determinar su composición química, y estudiar en relación a sus efectos directos en la salud humana, constituyendo

medicinas comercialmente disponibles con volúmenes de venta superiores a los 100 millones de dólares anuales, tan sólo en Japón (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II.1.5.7.1. El polisacárido “Lentinan”

Término derivado del nombre científico del shiitake: Lentinula. Este compuesto fue aislado en 1970, y se trata de un β-(1,3)-glucano ramificado (2:5), (C6 H10 O5) n, con peso molecular 4-8 x 105 Da, y estructura superior (triple hélice). La administración de este polisacárido antitumoral produce reacciones biológicas inmediatas, específicas y no específicas, a nivel celular, inmunológico y complementario. El *“lentinan*” estimula la producción de células antitumorales naturales, tales como las células T, células N-K (natural-killer), macrófagos citotóxicos, y anticuerpos. Los pacientes con cáncer gástrico, suministrados con sólo 2 mg de “*lentinan*” cada dos semanas, incrementaron más del 50% su producción de glóbulos blancos (macrófagos). Es importante mencionar que el desarrollo de células cancerosas generalmente suprime la producción de células asociadas al sistema inmunológico. Por ello una estrategia fundamental para prevenir, tratar o revertir el cáncer consiste en estimular al máximo el sistema inmunológico de los pacientes. Esto puede lograrse a través de los polisacáridos aislados del shiitake. En Japón, el “lentinan” ha prolongado eficazmente la sobrevivencia de pacientes con cáncer, principalmente gástrico y colon rectal, en comparación con tratamientos convencionales de quimioterapia. Asimismo, prácticamente no se observa en los pacientes la toxicidad, ni las reacciones secundarias adversas, típicas de los tratamientos contra el cáncer. A nivel molecular, se ha logrado identificar la ubicación cromosómica de genes involucrados en otras respuestas inmunes inducidas por el “lentinan”, tales como el incremento de proteínas de fase aguda (APP: complejo haptoglobina-hemoglobina, hemopexina, haptoglobina) y la dilatación vascular (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II.1.5.7.2 El "LEM" (*Lentinus edodes mycelium*)

Es otro polisacárido bioactivo (conjugado proteico heteroglicano) aislado del shiitake, el cual se ha demostrado que inhibe la carcinogénesis del hígado en ratas mediante la activación del sistema inmunológico (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II.1.5.7.3 El "KS-2"

Se trata de un polisacárido (péptido α-manana, con aminoácidos dentro de la cadena peptídica) aislado del shiitake, el cual es capaz de inducir la producción de interferón. De esta forma inhibe eficazmente el desarrollo del cáncer, particularmente del carcinoma de Ehrlich y del Sarcoma 180 (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II.1.5.7.1.4 Otros compuestos anticancerígenos

Recientemente, también se han aislado otros compuestos potencialmente benéficos, tales como la tioprolina (134 mg/100 g shiitake seco), la cual tiene la capacidad de bloquear la formación de compuestos carcinogénicos N-nitrosos. Extractos termoestables de shiitake inhibieron eficazmente la proliferación del cáncer de mama, el más común que afecta a las mujeres, mediante la supresión de la actividad aromatasa. Se ha demostrado que esta enzima (complejo enzimático citocromo P450) está involucrada en la producción de estrógeno in situ que induce la proliferación de tumores de cáncer mamario en mujeres. Este prometedor estudio sugiere que el consumo de shiitake puede llegar a ser un alimento funcional importante en la quimio prevención del cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II 1.5.8 Técnica de Inoculación Liquida

La inoculación es el proceso de introducir las esporas o micelio en el medio de cultivo estéril.

Se realiza con asa de siembra, esta se encarga con la muestra problema solida o liquida en condiciones de esterilidad y se adiciona al medio líquido agitándola.

Si se realiza con escobillón o hisopo el método es igual que con el asa de siembra.

II 1.5.8.1 Fructificación de esporas

Imagen 4-Fructificación de esporas

Fuente: (ARIAS, 2008)

Se necesita de Oxigeno: debido a su condición de organismo aeróbico, los hongos requieren de oxígeno para su metabolismo; Carbono: los hongos emplean una variedad de compuestos orgánicos para sus requerimientos de carbono. Estos compuestos le proporcionan la energía para desarrollar sus actividades metabólicas; Nitrógeno: los hongos requieren de este para convertirlo en proteínas, purinas y pirimidinas y para el componente de la pared celular; Sulfuro: es un elemento estructural en algunos productos secundarios del metabolismo siendo el más conocido la penicilina antibiótica; Fósforo: es importante para el movimiento de materiales a través de las membranas; Potasio: su papel es de cofactor en algunas nos sistemas de enzimas y su requerimiento es suplido por el medio; Magnesio: es requerido por los hongos para la activación de los sistemas de enzimas (ARIAS, 2008)

II.1.5.9 Estudios en shiitake con distintos sustratos y cepas en relación a su calidad

En la literatura se encuentran diversas investigaciones sobre el crecimiento de micelio de shiitake en distintos sustratos, un ejemplo es lo reportado por (GOMES-DA-COSTA, 2008), quienes utilizaron cepas de L. edodes para evaluar el crecimiento del

micelio en sustratos de aserrín de eucalipto (*Eucalyptus sp*.), roble australiano (*Grevillea robusta*) y árbol santo (*Melia azedarach*), utilizando suplementos como harina de soja y arroz. Los sustratos de eucalipto y roble australiano fueron los mejores para el crecimiento de *L. edodes*.

Actualmente (GAITÁN-HERNANDEZ, 2017) utilizaron paja de trigo como sustrato en la siembra de varias cepas de L. edodes reportando un intervalo de eficiencia biológica (EB) de 66.0 a 320.1%. El resultado fue dependiente de las características de las cepas y de los factores ambientales. Por otro lado, para evaluar el contenido y propiedad antioxidante del shiitake, determinaron el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de hongos comestibles y medicinales, encontrando correlación significativa entre actividad DPPH y polifenoles para *Lentinula edodes.*

II.1.5.9.1 Tipos de sustrato

Los sustratos específicos para el cultivo de hongos comestibles como la *Lentínula edodes* pueden ser artificiales o naturales. (Ricardo Silva S., 2010).

II.1.5.9.2 Sustratos naturales

Estos tipos de sustratos se generan por ramitas o troncos en el que se inocula el hongo de forma directa, es decir, sin la intervención de ninguna modificación como la esterilización. Durante la fructificación e incubación el cultivo se genera cuidando que se tenga la corteza de los mismos troncos, ya que esta genera verdaderas barreras fisicoquímicas contra la contaminación por crecimiento de hongos malignos de esta forma se consigue que el sustrato sea natural sin complicaciones. Sin embargo, algunos troncos son contaminados en la parte transversal de la superficie, pero se las deja pasar por que el cultivo las tolera, son fácilmente controlables con el uso de agua oxigenada como desinfectantes. (Ricardo Silva S., 2010).

II.1.5.9.3 Sustratos artificiales

Estos sustratos son mezclas de algunas moléculas orgánicas e inorgánicas sobre la matriz del componente lignocelulósico, ya que por separado o en unión estos presentan un mayor índice nutricional para numerosos microbios, ya que son componentes de fácilmente accesibles y simples. Hay más probabilidad que los microbios existentes naturalmente invadan el sustrato de cultivo con mayor rapidez de crecimiento que los hongos que se intentan cultivar. Esto ocurre cuando los sustratos no son tratados térmicamente mediante el proceso de esterilización. Muchos cultivadores desprevenidos que han intentado cultivar *Pleurotus ostreatus* inoculando pasto de trigo húmedo, dando como resultado rendimientos desorbitantes de trigo, malezas y moho. Por lo tanto, el sustrato debe tratarse por medio físicos o químicos para aniquilar eficientemente la carga de microbiana contaminante. El tratamiento y el contenido de nutrientes del conglomerado hacen del sustrato uno con gran potencial para el desarrollo de los hongos comestibles utilizados para sembrar el sustrato. Generalmente, el sustrato artificial aguarda una estrecha relación entre el carbono y nitrógeno (C: N), el potencial de hidrógeno, humedad, compactación, tamaño de partícula, entre otros ya que pueden hacer que los hongos inoculados sobre o dentro del sustrato se desarrollen como vegetales y se reproduzcan más efectivamente. Estas propiedades y condiciones ambientales designan en última instancia el éxito de la producción. (Ricardo Silva S., 2010).

II.1.5.9.4 Incubación del Micelio

El tiempo de incubación antes de la fructificación es determinada por la fórmula del sustrato y las características de la cepa. La incubación tiene dos fases: 1) Durante la fase inicial de la colonización, el micelio crece a través del sustrato, acumulando los recursos necesarios para la fructificación, y 2) El tiempo en que la cepa realiza el corrido de micelio, que dependerá únicamente de que la cepa sea un colonizador rápido o lento; en el primer caso puede requerir de un largo período de tiempo para acumular la energía suficiente para realizar un brote, no así en el segundo caso en

que la cepa esté lista para fructificar una vez colonizado totalmente el sustrato (FLEGG, 1962).

1.5.9.5 Tratamientos Térmicos

El tratamiento térmico para eliminar o reducir las poblaciones de organismos competidores que están presentes en el sustrato. La velocidad a la que se calienta el sustrato depende de una serie de factores cómo: el calor húmedo que se moviliza en el aserrín más rápidamente que a través del aire, la cantidad de calor (vapor) aplicada al sustrato y el total de masa o volumen de mezcla en las bolsas, que determinan el tiempo necesario para alcanzar la temperatura ideal con la mitad del sustrato (REGES, 2008)

II.1.5.10 Determinación de propiedades farmacológicas

III.1.5.10.1 Propiedades antioxidantes

La inhibición o retraso de la oxidación de moléculas son las acciones preponderantes de los antioxidantes, estos inhiben las etapas de iniciación y propagación de las reacciones radicalarias en cadena. Los antioxidantes pueden ser naturales o artificiales. Generalmente los artificiales son moléculas con núcleo fenol en el cual presentan ramificaciones carbonadas, en tanto que los de origen natural pueden ser moléculas fenólicas como ácido benzoico, el grupo de tocoferoles o flavonoides, moléculas nitrogenadas como aminas, aminoácidos, alcaloides y derivados de clorofila, además de contener vitamina C (SOTO, 2007).

En algunos antioxidantes sintéticos como el BHA y BHT (Butil hidroxianisol y Butil hidroxitolueno) su uso ha sido restringido debido a su carcinogenicidad, por lo cual el interés por los antioxidantes naturales se ha incrementado además de que su potente actividad antioxidante se ha demostrado en el laboratorio y mencionado en la literatura (BRANEN, 1975) .

Algunos antioxidantes naturales muestran propiedades biológicas incluyendo funciones antibacteriales, antivirales y antiinflamatorias. Una terapia antioxidante

provee una alternativa accesible para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (VELIOGLU, 1998).

La capacidad antioxidante de una sustancia o extracto se mide mediante un método llamado DPPH que se fundamenta en la capacidad estabilizadora del radical orgánico 1,1-difenil-2-picrilhidrazil la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 520 nm. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical, se produce la forma reducida DPPH-H o DPPH-R con la consecuente pérdida del 13 color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia (BRAND-WILLIAMS, 2015) .

En el caso de L. edodes los compuestos antioxidantes que se encuentran comúnmente son compuestos fenólicos como el ácido trans-cinámico, ácido protocatéquico y ácido gálico, ácido ascórbico, flavonoides como catequina y esteroles (YANG, 2017).

II.1.5.10.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (también llamados polifenólicos) forman un conjunto amplio de sustancias, que se caracterizan por la presencia de al menos un anillo bencénico, el cual está directamente unido al menos un grupo hidroxilo, libre o ligado con otra función. En los animales, plantas y hongos, estos compuestos protegen contra los daños oxidativos (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

Con base a su estructura, a los compuestos polifenólicos se les clasifica en fenoles simples o ácidos fenólicos, ácidos benzoicos y relacionados, acetofenonas y ácidos fenil acéticos, derivados de ácidos hidroxicinámicos, flavonoides, entre otros (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

Las rutas metabólicas responsables de la biosíntesis de compuestos fenólicos son la del shiquimato y acetato. Algunos compuestos fenólicos son biosintetizados por

cada una de estas vías por sí sola, sin embargo, la clase más grande de compuestos fenólicos, los flavonoides, son productos de origen biosintético mixto que incorporan en sus estructuras subunidades de ambas rutas metabólicas (BRAND-WILLIAMS, 2015).

Los polifenoles son potentes antioxidantes que se suman a las funciones de vitaminas y enzimas en la acción contra el estrés oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno (Tsao, 2010). Entre los polifenoles con capacidad antioxidante reconocida destacan los flavonoides, ácidos fenólicos(hidroxicinámico, hidroxibenzóicos, cafeico, clorogénico, gálico), taninos, chalconas y camarines, los cuales constituyen la fracción polifenólica de varios alimentos (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II1.5.10.3 Método DDPPH

El DPPH es un radical nitrogenado orgánico y estable, de un intenso color púrpura, y no necesita generación previa. El método fue planteado por Brand-Williams, y sirve para determinar la capacidad antioxidante con base en la disminución de color, medida a 517 nm, por acción de un compuesto antioxidante. Dicha actividad también puede medirse por resonancia espín-electrón (RODRIGUEZ, 2015).

II.1.5.10.4 Ensayo de FRAP

Ensayo FRAP (ferric reducing/antioxidant power): este método evaluó la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo con su capacidad para reducir el hierro férrico (Fe^{+3}) presente en un complejo con la 2, 4,6-tri (2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}) (MESA, 2010).

II.1.5.11 Propiedad antitumoral

Los polisacáridos de alto peso molecular (ramificados, estructura superior), así como otros compuestos bioactivos modulan e incrementan la respuesta del sistema inmunológico del organismo, lo que les confiere propiedades antitumorales. Tiene una gran capacidad de inhibición (73 al 97.5%), además tiene una función preventiva en

un 31 al 83% e inclusive dar marcha atrás en la síntesis de tumores en un 22 a 77% en diversas investigaciones clínicas y experimentales. Su administración es normalmente por vía intraperitoneal en dosis de 0.2-25 mg/kg peso corporal, observándose efectos positivos dentro de las primeras 24 h y hasta por siete días. Asimismo, han demostrado enorme capacidad para prevenir cánceres inducidos viralmente o químicamente, así como metástasis cancerosa. Esto mediante la activación (maduración, diferenciación, proliferación) de macrófagos, linfocitos T, células T, interleucinas y otras células inmunológicas que modulan la liberación de citoquinas. Paralelamente, se han demostrado los efectos regenerativos de estos compuestos bioactivos celulares, del cual desencadenan condiciones secundarias que indujeron los tratamientos usuales para casos oncológicos. Gracias a esto generan una verdadera opción natural para la restauración de pacientes expuestas a operaciones de gran riesgo, radioterapia o quimioterapia.

Entre los efectos regenerativos estudiados se puede destacar los efectos antieméticos, recuperación de las ganas de comer, aumento de glóbulos blancos, regeneración de las funciones del sistema inmune, reducción de la sensación de dolor y el cabello deja de caerse. (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II.1.5.11.1 Otros compuestos anticancerígenos

Recientemente, también se han aislado otros compuestos potencialmente benéficos, tales como la tioprolina (134 mg/100 g shiitake seco), la cual tiene la capacidad de bloquear la formación de compuestos carcinogénicos N-nitrosos. Extractos termoestables de shiitake inhibieron eficazmente la proliferación del cáncer de mama, el más común que afecta a las mujeres, mediante la supresión de la actividad aromatasa. Se ha demostrado que esta enzima (complejo enzimático citocromo P450) está involucrada en la producción de estrógeno in situ que induce la proliferación de tumores de cáncer mamario en mujeres. Este prometedor estudio sugiere que el consumo de shiitake puede llegar a ser un alimento funcional importante en la quimio prevención del cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II.1.5.11.2 En vivo prueba antitumoral Células S-180

Esta prueba busca marcadores tumorales, a veces llamados marcadores de cáncer, en la sangre, orina etc. Los marcadores tumorales son sustancias que las células cancerosas o las células normales producen en respuesta al cáncer. Algunos marcadores tumorales son específicos de un tipo de cáncer. Otros se pueden encontrar en varios tipos de cáncer.

II.1.5.11.3 Método colorimétrico de bromuro

Este nuevo método colorimétrico hace uso de la oxidación de iones bromuro a bromo molecular mediante la reacción de iones bromuro con óxido de cromo (VI) en solución ácida; luego el bromo molecular resultante de la reacción anterior, es extraído con disulfuro de carbono analizando su concentración por espectroscopia ultravioleta-visible a 420 nm (GALLEGOS, 2013).

II.1.5.12 Otras propiedades farmacológicas

L. edodes presenta diversas propiedades funcionales, como función antitumoral e hipocolesterolemia y en estudios recientes se ha demostrado su potencia antimicrobiana y antioxidante (Good, 2007).

II.1.5.12.1 Propiedades antibióticas

Al incrementar la respuesta del sistema inmunológico, se generan efectos antibióticos en el organismo. Un derivado del “lentinan” (sulfato de “lentinan”) también ha demostrado tener una potente actividad para suprimir la expresión e infección del virus de inmunodeficiencia humana (HIV). Otras propiedades antibióticas adicionales del “*lentinan*” y sus derivados incluyen efectos terapéuticos positivos contra bacterias (*Mycobacterium tuberculosis*; *Listeria monocytogenes*), virus (Adenovirus tipo 12; Abelson virus; VSV-encefalitis virus; Herpes simple I & II), y parásitos (*Schistosoma mansoni; S. japonicum*; *Mesocestoides corti*). Por otro lado, el “LEM” también ha demostrado su capacidad para inhibir la infección in vitro del virus HIV, y actualmente es utilizado como parte del tratamiento contra el síndrome de inmunodeficiencia

adquirida (SIDA). En estudios clínicos con 40 pacientes afectados por hepatitis B crónica, el LEM mejoró el funcionamiento del hígado y redujo la presencia del Virus hepatitis B en sangre. Otros compuestos antibacterianos también han sido identificados, tales como la lentinamicina A y B. Un extracto de shiitake demostró una reducción del 46% de lesión pulmonar ocasionada por el virus de la influenza, lo cual fue incluso más eficiente que algunas drogas comúnmente utilizadas en tratamientos médicos (40%). También detuvo la multiplicación del virus de la poliomielitis. Una fracción de ARN (dsRNA) demostró estar involucrada en la efectividad contra la infección del virus de la influenza A/ SW del ratón, mediante la inducción de interferón (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II.1.5.12.2 Propiedades que reducen el nivel de colesterol y la hipertensión

La hipertensión y demás enfermedades del corazón están estrechamente relacionados con niveles altos de colesterol. La eritadenina (C9 H11O4 N5) aislada del shiitake (600-700 µg/g, base seca) tiene la capacidad de reducir eficazmente las concentraciones de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos en suero sanguíneo. Se ha propuesto que este compuesto hipocolesterolémico, también conocido como “lentisina”, esta molécula incrementa la velocidad del metabolismo en las etapas de excreción y descomposición del colesterol absorbido. Un efecto similar lo produce también la fibra dietética contenida en el shiitake. Una molécula encontrada el el Shiitake, fue administrado a 200 mg/Kg de dosis, esta concentración consiguió la reducción de colesterol total plasmático hasta en un 25,1%, en tanto que los triglicéridos disminuyeron hasta en un 44.5% (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II.1.5.12.3 Propiedades antitrombóticas

La “lentinacina”, un componente de bajo peso molecular de los ácidos nucleícos, tiene actividad antitrombótica efectiva, la cual se ha demostrado mediante la aglutinación inhibida de plaquetas (Daniel Martínez-Carrera, 2004).

II.1.5.13.4 Propiedades antidiabéticas

Investigaciones recientes demostraron los efectos hipoglucémicos de un exo-polímero aislado del shiitake. Al administrarse en una dosis de 200 mg/ kg peso corporal, se registró una reducción de hasta el 21.5% en el nivel de glucosa plasmática, así como un incremento de 22.1% en el nivel de insulina plasmática (Daniel Martínez-Carrera, 2004)

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

III.1 Tipo de Investigación

El método que se utilizó en la realización del presente trabajo fue la revisión bibliográfica. Las fuentes bibliográficas utilizadas fueron fuentes primarias (artículos de investigación) y fuentes secundarias (bases de artículos de investigación como Science Direct, Scielo, Google Académico. Además, se consultó a través de libros de texto para los conceptos fundamentales encaminados a dar cumplimiento a los objetivos propuestos.

III.2 Equipos, Aparatos, Materiales y Reactivos

III.2.1 Materiales de laboratorio

- Matraces Erlenmeyer 250 ml, 100 ml
- Pipetas Graduadas 2 ml, 5 ml y 10 ml
- Beakers 50 ml, 100 ml y 250 ml
- Espátulas
- Probetas 250 ml
- Vidrio de Reloj
- Pipetas automáticas
- Matraz Aforado
- Gradilla
- Tubos de Ensayos
- Bolsas Herméticas
- Caja Petri
- Aza de inoculación
- Bolsas oscuras
- Algodón
- Rollo de aluminio

III.2.2 Equipos

- Tamices moleculares
- liofilizador
- Fotómetro laser
- Balanza analítica
- espectrofotómetro UV.
- Rota-evaporador
- vórtex
- Mechero de gas
- Lámparas UV
- Licuadora

III.2.3 Reactivos

- Carbonato de calcio
- Peróxido de hidrógeno
- Hipoclorito de Sodio
- Formol
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Ácido fosfowolfrámico y Ácido fosfomolíbdico)
- 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)
- Ácido Clorhídrico
- Etanol
- Hidróxido de sodio
- Agua
- Metanol
- b-caroteno
- ácido linoleico
- tween 40
- Cloroformo
- FRAP (10 mM de solución de 2,4,6-tris (2-piridil) -triatria (TPTZ) en HCl 40mM, FeCl 20 mM 3) 6H 2 O y tampón de acetato (300 mM, pH 3.6))

- $NaBH_4$
- Piridina
- Ácido clorosulfónico
- 5-Fluorouracilo
- Ácido acético
- MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio)

III.3. Tipo de Sustrato

III.3.1 Muestra

Al ser un trabajo bibliográfico el origen de la cepa del Hongo Shiitake puede variar, dependiendo de su laboratorio en el que sea exportado o conservado.

El objeto de estudio es una cepa del Hongo *Lentinula edodes*, obtenida del Laboratorio (IIBINTECH) en la república de Argentina, provincia de Buenos Aires.

III.3.2 Obtención de semilla

III.3.2.1 Obtención del medio de cultivo

La fórmula para la obtención del cultivo Fue descrito por (Jiménez & Armijos, 2015)

Tabla 1 Formula para medio de cultivo MYA

Cantidad	Materia prima
12 gramos	Agar
12 gramos	Extracto de malta liviano
1 gramo	Harina de trigo
0.5 gramos	Alimento para conejo
4.5 gramos	pellets de madera
1 Litro	Agua

III.3.2.2 Preparación del medio de cultivo

La preparación del medio de cultivo fue descrita por (Jiménez & Armijos, 2008)

- Esterilizar el frasco y las cajas Petri
- Colocar las materias primas en el frasco y calentar hasta fundir el agar
- En una mesa previamente desinfectada con hipoclorito de sodio colocar el frasco dejando que se enfrié.
- Una vez enfriado el medio, se lo coloca en una olla de agua templada y se agrega con una pipeta peróxido de hidrogeno al 0,018%, mezclando el peróxido con el medio de manera circular evitando la formación de muchas burbujas.
- Se vierte el medio en las cajas Petri, taparlos y dejar solidificar a temperatura ambiente durante unos días.

III.3.3. Formulación de la mezcla

Según la formulación suiza, no indica las proporciones de cada uno de los residuos agroindustriales para el cultivo del hongo Shiitake.

Tabla 2-Formulacion de los tratamientos para el cultivo de Shiitake

Materiales	**Porcentaje de los Componentes en Peso Seco**
Residuo Agroindustrial **(Fuente de Carbono)**	75 %
Salvado de Trigo **(Fuente de Nitrógeno)**	24 %
Carbonato de Calcio ($CaCO_3$) **(Buffer)**	1 %
Agua	La necesaria para mantener una humedad de 65 a 75%

Fuente: KALBERER, P. P.

III.3.3.1 Preparación del sustrato

Las condiciones para el que el sustrato sea el más óptimo para el crecimiento del hongo Shiitake deben ser la siguiente. Según: (Rodríguez et al., 2006)

Imagen 5-Parámetros óptimos para el cultivo del hongo shiitake

Condiciones de proceso	Incubación	Fructificación Inducción	Fructificación Desarrollo
Temperatura	21-27ºC	6 - 21ºC	21 - 27ºC
Humedad relativa	95-100%	95 -100%	60 - 80%
Duración	1 - 2 meses	5 - 7 días	5 - 8 días
$[CO_2]$	Tolera 1%	< 0,1%	< 0,1%
Cambios de aire fresco	Entre 0 y 1/día	Como sea requerido para mantener el nivel de CO_2	Como sea requerido para mantener el nivel de CO_2
Requerimiento de luz	50-100 lux	500-2.000 lux	500-200 lux
Relación C/N del sustrato	40-100	40-100	40-100
Humedad del sustrato	60-65%	60-65%	60-65%
Tamaño de partícula del sustrato	1-5 mm	1-5 mm	1-5 mm

El Residuo agroindustrial usados para esta investigación es Aserrín Encino en diversas proporciones.

Según la preparación del sustrato del trabajo del trabajo de investigación de (Jiménez & Armijos, 2008), hacen uso de la siguiente formula:

- Sustrato agrícola(Encino)
- marlo de maíz molido
- pH y agua

Los materiales se mezclan y se pasteurizan por 4 horas, para realizar el traspaso del micelio de las cajas Petri hacia el nuevo sustrato.
Luego de la primera esterilización se enfría la mezcla y se añade 80 ml de agua y se aplica una segunda esterilización por un tiempo 5 horas.

III.3.3.2 Multiplicación de incubación del Micelio

La técnica fue descrita por: (Jiménez & Armijos, 2008)

- Esterilizar la caja aséptica con hipoclorito de sodio y formol y dejándola durante 6 horas sometida a una luz UV.
- Pasado este tiempo se introducen las manos protegidas con guantes y procedemos a tomar 2 fragmentos del micelio de la caja Petri y los ubicamos en el frasco en el cual se encuentra el sustrato.

- Una vez colocado el fragmento de micelio, limpiar con alcohol antes de tapar evitando su descontaminación.
- Dejar en una incubadora a una temperatura de 23°C durante 15 a 21 días.

III.3.3.3 Pesaje y tratamiento térmico

La mezcla de los materiales se procede a pesar en base a la proporción dicha en la formulación suiza, formando bloques de residuos orgánicos y haciendo uso de unas mallas plásticas que son sometidas a pasteurización por medio de vapor a una temperatura que no sobrepase los 60 °C durante 5 horas.

III.3.3.4 Inoculación del micelio en el sustrato

Una vez frio el material con el asa de siembra se realiza un orificio en la mitad del bloque de sustrato con un diámetro de 1.5 a 2 cm; luego se flamea el asa de siembra con el mechero de gas, y se procede a tomar la semilla y colocarla en el agujero realizado; al mismo instante se cierra la funda se envuelve con papel aluminio para darle oscuridad.

III.3.4 Inducción o choque térmico

En los bloques de sustrato previamente inoculados, se quita el aluminio que tiene como cobertura y se realizan pequeños agujeros para sumergirlos en agua fría durante 36 horas a una temperatura de 12°C para la formación de cuerpo fructíferos.

III.3.5 Formación de cuerpo fructífero

La condición de humedad relativa desde oscilar entre un 30 a 50 % en una temperatura de 16 a 21 °C durante un periodo de 10 días con el sustrato que fructificó.

Una vez madurado el micelio el hongo está listo para brotar y desarrollarse en un tiempo de 3 días

La cosecha se realiza cortando el tallo base del hongo.

III.3.6 Determinación de propiedades farmacológicas

III.3.6.1 Tratamiento de muestra

Pesar el hongo y proceder a secar la muestra en una estufa a una temperatura de 40 °C en un tiempo de 48 horas, una vez seca la muestra se pulveriza en un molino hasta obtener un polvo grueso.

III.3.6.2 Actividad antioxidante

III.3.6.2.1 Obtención de los extractos

Según la técnica descrita por (Da Silva & Jorge, 2011) La extracción se realiza haciendo uso de los diferentes solventes:

- Agua/metanol (1:1)
- Etanol/Agua (1:1)
- Metanol y agua (1:1)

Se pesan 8 gramos del polvo grueso del hongo o parte del hongo en 80 mL del solvente, en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente.

La mezcla se centrifuga en un periodo de 5 minutos a 3000 rpm, se filtra el sobrenadante en una bomba al vacío y se somete a rota evaporador a temperatura de 40-60 °C.

Se pesan 10 g del extracto y se diluyen en 10 mL de metanol.

III.3.6.3.1 Determinación de la actividad antioxidante por el método del DPPH

El método fue descrito por (Avila Castañeda, 2009)

Se procede a mezclar los extractos obtenidos de diferentes concentraciones del analito junto con el reactivo de DPPH disuelto (0,2 ml/Etanol); obteniendo concentraciones 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 y 2.0 mg/mL de DPPH.

Mantener durante 30 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad y luego se calcula el porcentaje haciendo uso de la siguiente formula:

$$\%AA = (A_{blanco} - A_{muestra} / A_{blanco}) \times 100$$

III.3.6.3.2. b-caroteno / ácido linoleico

La actividad antioxidante se evaluó por triplicado (Da Silva & Jorge, 2011)

El estándar a usar es BHT (0,08 mg/mL)

Se toma una alícuota de b-caroteno (0,2 mg/mL en cloroformo) junto con el ácido linoleico (0,04 g) y el tween 40 (0,4 g).

Se deja evaporar el cloroformo, añadir 100 mL de un agente oxidante y agua destilada a la mezcla hasta la formación de una emulsión.

En un tubo de ensayo que contiene 1 mL de los extractos en diversas concentraciones se incuba 50°C en baño maría.

De la emulsión se toman 5 mL que son transferidos al tubo que se encuentra en el baño de agua y tan pronto se añade la emulsión, se procede a leer la absorbancia cero a 470 nm usando un espectrofotómetro UV visible.

Durante un periodo de 2 horas se realizan las lecturas en intervalos de 20 minutos.

III.3.6.2.3 Ensayo FRAP (poder antioxidante reductor férrico)

El reactivo FRAP usado en esta técnica (Carneiro et al., 2013a) está compuesto por 10 mM de solución de 2,4,6-tris (2-piridil) -triatria (TPTZ) en HCl 40mM, FeCl 20 mM 3) 6H 2 O y tampón de acetato (300 mM, pH 3.6) (1: 1: 10, v / v / v).

Se añade 100 uL de los extractos en diferentes concentraciones a 3 mL del reactivo FRAP.

Se incubo el tubo con la mezcla a temperatura ambiente durante 6 min y luego de esto se procede a leer las absorbancias a 593 nm en un espectrofotómetro.

III.3.6.2.4 Determinación de Fenólicos totales por ensayo de Folin-Ciocalteu

La solución de extracto (1 mL) se mezcló con el reactivo de Folin-Ciocalteu (5 mL, previamente diluido con agua 1:10, v / v) y carbonato de sodio (75 g / L, 4 mL). Los tubos fueron agitados en el vórtex durante 15 segundos y se deja reposar durante 30 min a 40 ºC para que se desarrolle el color y al finalizar se midió la absorbancia a 765 nm.

III3.6.3 Actividad antitumoral

II.3.6.3.1 Preparación de la muestra

El tratamiento de la muestra se realizó usando la técnica descrita por (Nursaikhan et al., 2015)

Se extrae con una solución de NaOH al 5%/ NaBH al 0,05% 2 veces y se neutraliza el medio con ácido acético al 36% para eliminar glucano.

Los precipitados que contengan el analito de estudio (-Glucan) se lavan con agua 5 veces y pasan a liofilizarse y separados en distintos pesos de manera respectiva.

Se pesan 500 mg del polvo liofilizado y se suspenden en 50 mL de agente sulfatante DMSO a temperatura ambiente en agitación constante en un periodo de 2 horas.

Se añade piridina y ácido clorosulfonico gota a gota en agitación durante media hora.

Calentar durante 60 °C por 3 Horas y al término de la reacción enfriar y ajustar pH 10 con NaOH al 10%.

Para su concentración el producto se liofilizó hasta obtener un polvo amarillo.

III.3.6.3.2 En vivo prueba antitumoral Células S-180

La técnica tratada en este presente trabajo está dada por (Nursaikhan et al., 2006)

La especie animal usada fueron ratones de un peso aproximado de 1 g los cuales fueron trasplantados en la ingle derecho a través de la vía subcutánea.

Se dividieron en 10 grupos de 10 ratones entre ratones de control, ratones tratados con la muestra y ratones tratados con 5-Fluorouracilo.

Se disolvió 5-Fluorouracilo y las muestras de estudio en 0,2 mL de NaCl.

Al grupo de control se inyecto por vía intraperitoneal una vez al día durante 10 días 0,2 mL de NaCl. (La misma vía de administración, la misma cantidad y durante igual periodo fue la administración de 5-Fluorouracilo y las muestras).

La dosis del 5-Fluorouracilo fue de 20 mg/Kg y la dosis de las muestras fue de 20 m/Kg y 60mg/Kg.

Los ratones luego de este proceso fueron sacrificados y comparados con los ratones de control, dicha relaciones de pesos de inhibición y mejora del peso corporal fueron calculadas por la siguiente forma:

¼ ½ð W C W t Þ = W C 100% re 3 Þ

F ¼ ½ð W una W si Þ = W si 100% re 4 4 Þ

Wc= Peso tumoral promedio grupo de control

Wt= peso promedio del grupo analizado

Wsi Y W una= Son los pesos antes y luego del ensayo de los ratonesIII.3.6.3.3 In vitro prueba antitumoral Se usó un método colorimétrico de bromuro

La técnica usada fue prescrita por (Nursaikhan et al., 2015)

Para esta prueba se cultivó células tumorales S-180 en medio Roswell Park (1640 suplementado con 10 % de serio fetal bovino).

En este medio de cultivo se agregan concentraciones de las muestras en solución salina a condiciones de temperatura de 37°C en un periodo de 72 Horas con una atmosfera de 5% de CO_2.

Luego de su tiempo de incubación se agrega MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) y se determina colorimétricamente.

III.3.7 Presentación de flujo gramas de las técnicas empeladas para la determinación de actividad antioxidante y actividad antitumoral

Imagen 6-Tratamiento de la muestra para la actividad antioxidante

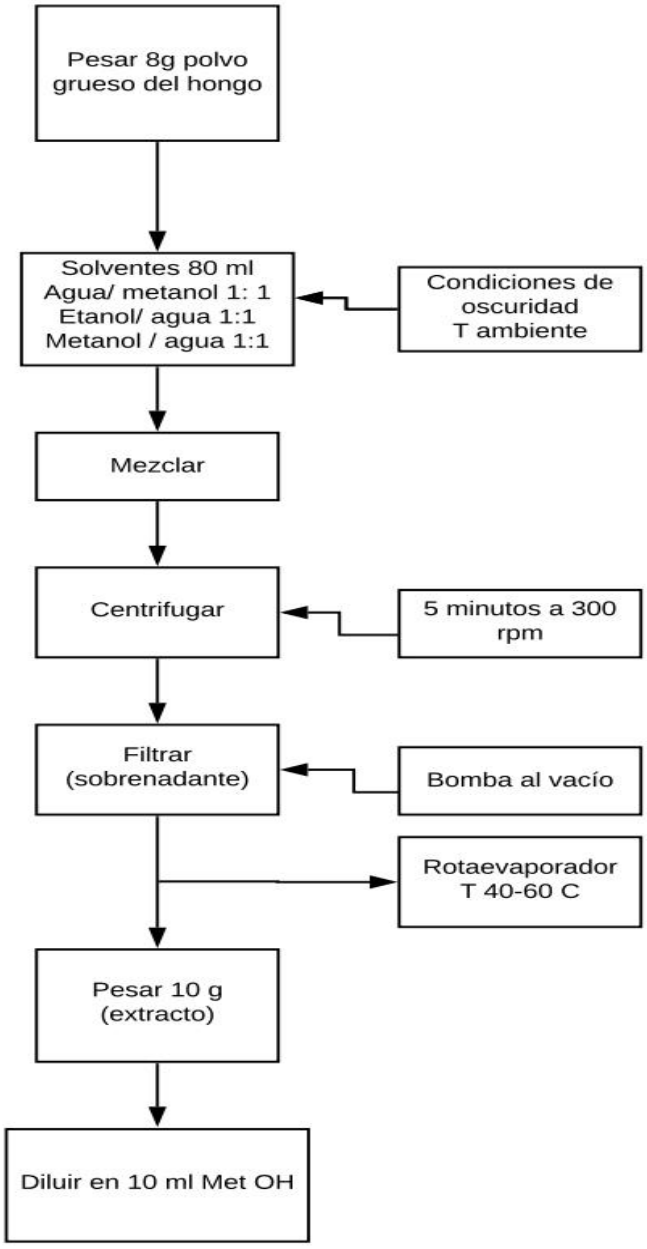


Imagen 7-Técnica DPPH

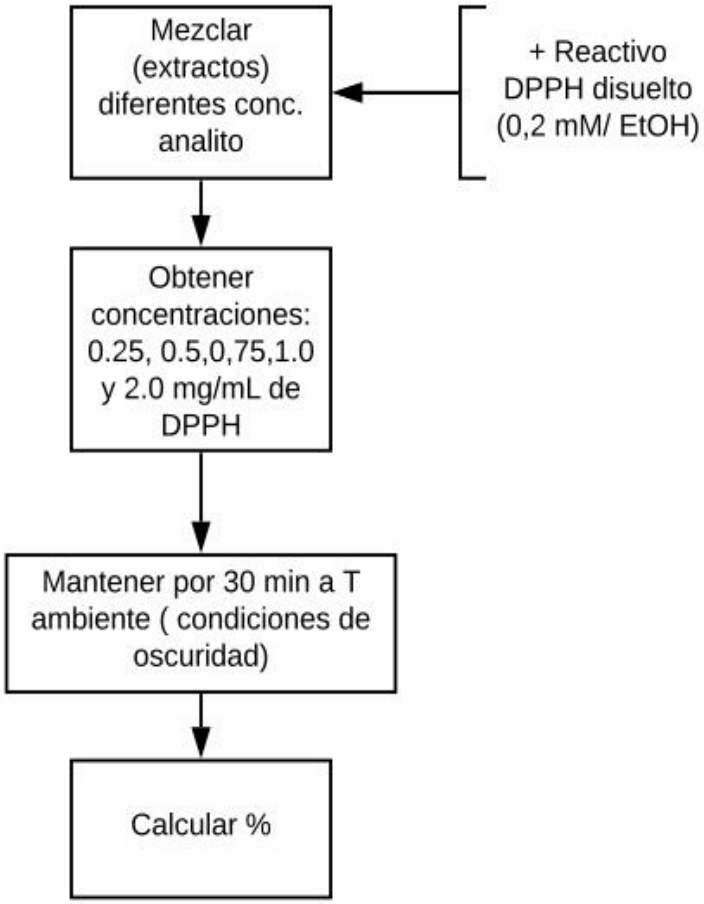


Imagen 8-Técnica con el reactivo de FRAP

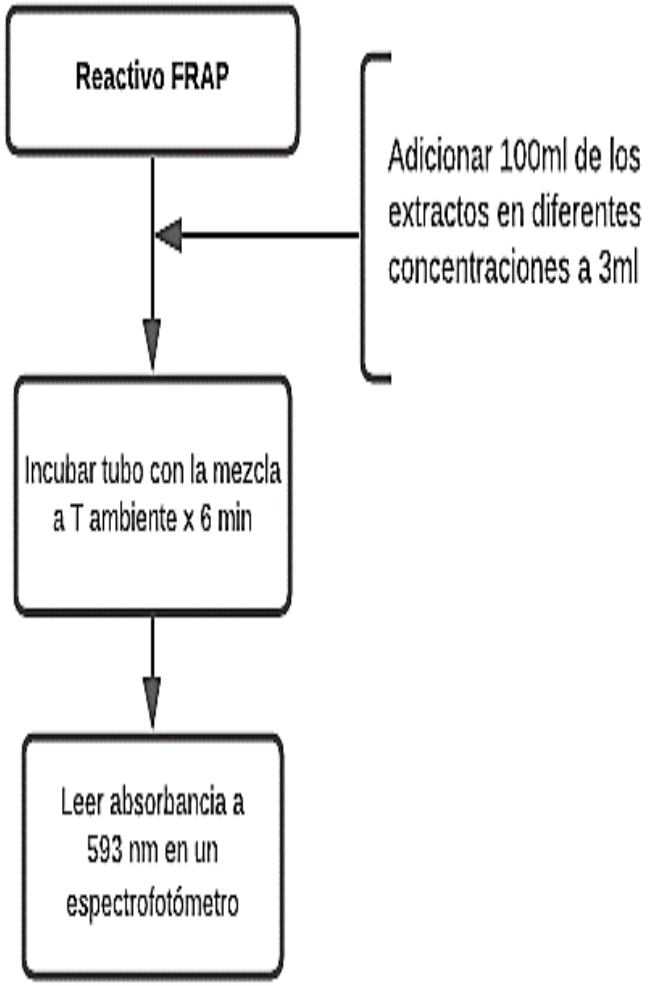


Imagen 9-Técnica B-caroteno/Ácido linoleico

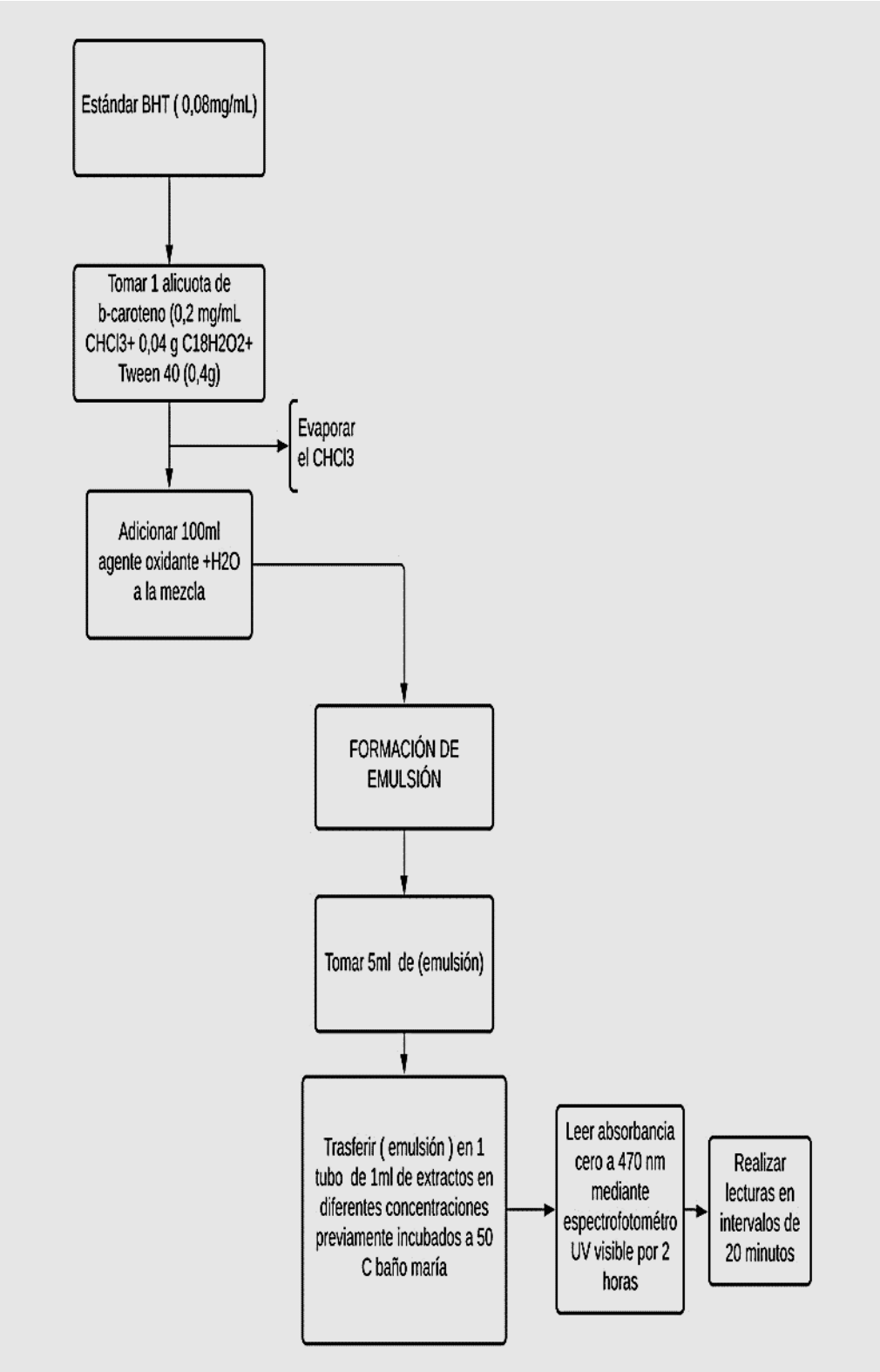


Imagen 10-Tratamiento de la muestra para actividad antitumoral

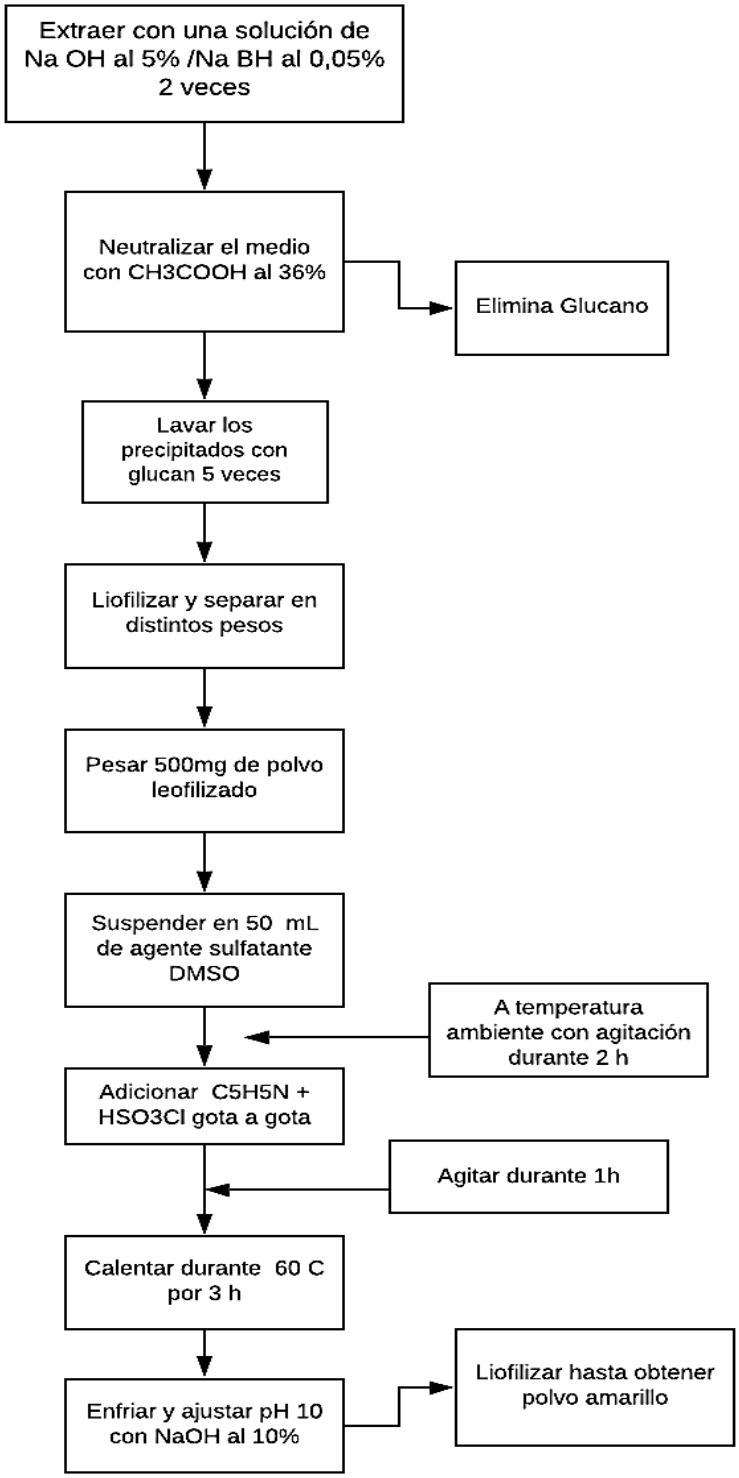


Imagen 11-Técnica en vivo de actividad antitumoral

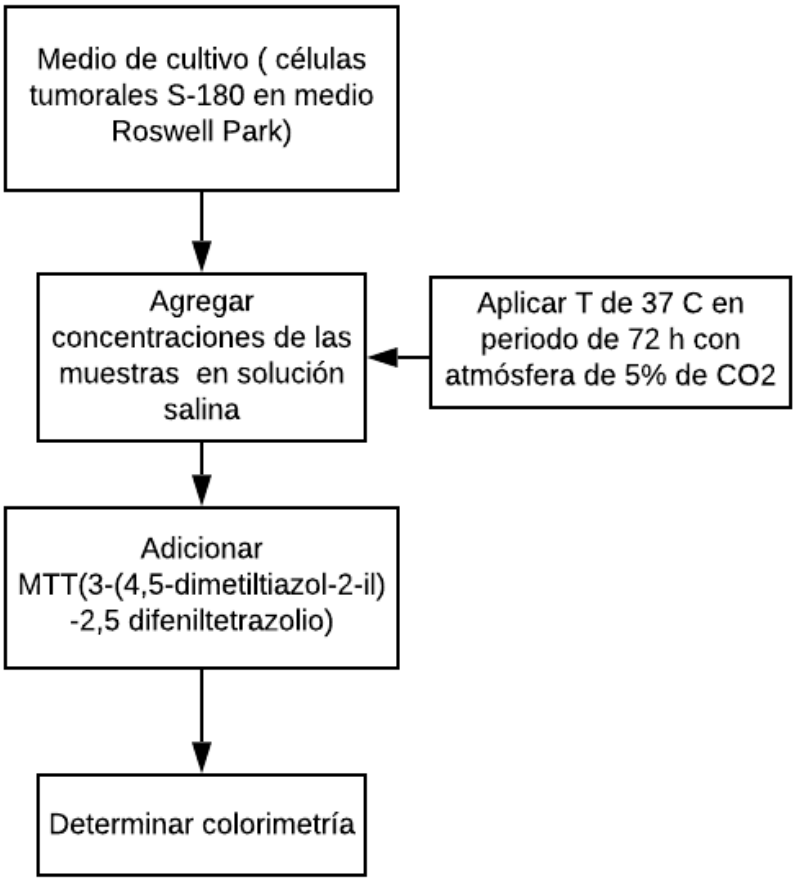
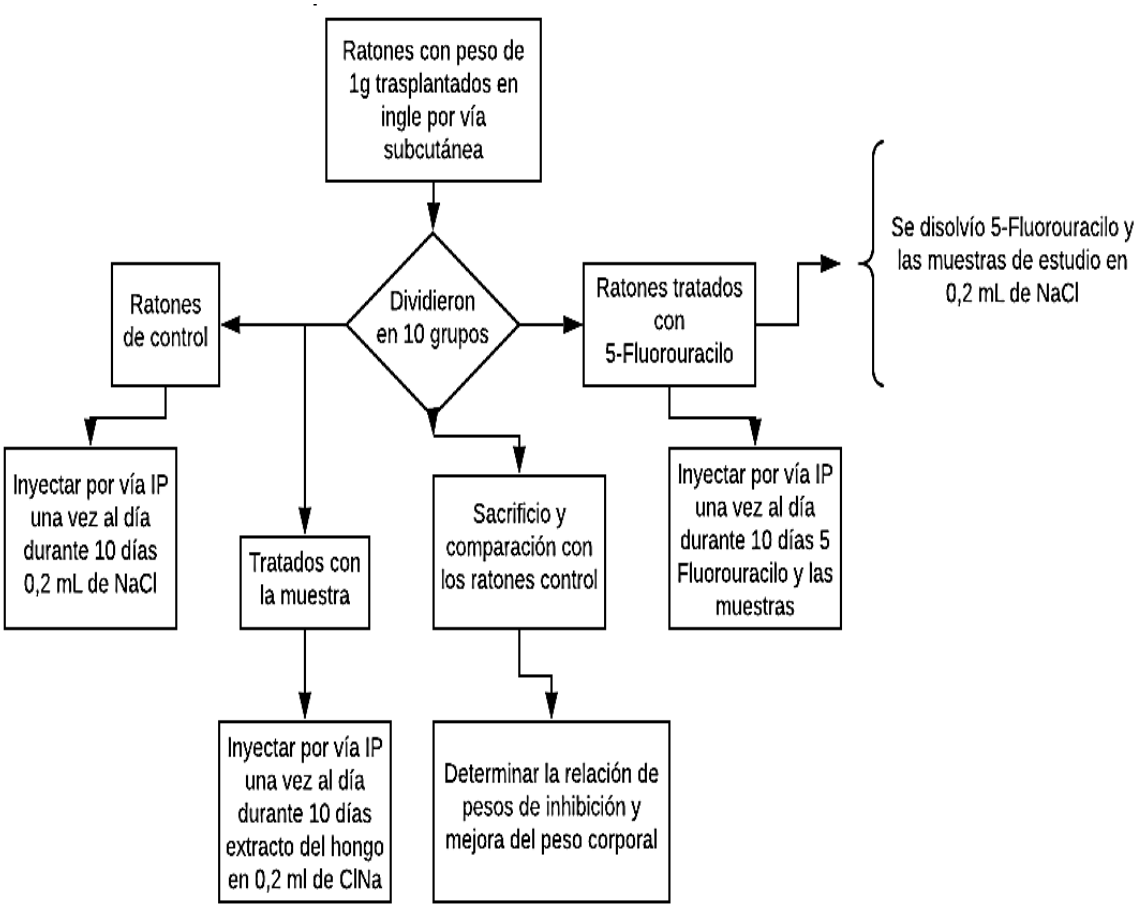


Imagen 12-Técnica In vitro de actividad antitumoral



CAPITULO IV. RESULTADO Y DISCUSIONES

IV.1 Determinación del sustrato

Para la evaluación de este análisis se compararon investigaciones realizadas en Colombia y México; en las que el sustrato de análisis que dio mejores resultados fue el aserrín de Encino en los dos países. Sin embargo, las propiedades farmacológicas presentaron diferencias, tal como se detalla a continuación:

Tabla 3-Porcentaje de Eficiencia Biológica

Sustrato Agrícola	**Resultado**	**Referencia**
Aserrín del Encino C	21,5	**Artículo 1 (Colombia)** (Villegas Escobar et al., 2007)
Aserrín del Encino M	88.63	**Artículo 2 (México)** (Romero et al., 2015)

Tabla 4-Tasa de producción

Sustrato Agrícola	**Resultado**	**Referencia**
Aserrín del Encino C	0,28%	**Artículo 1 (Colombia)** (Villegas Escobar et al., 2007)
Aserrín del Encino M	0.38%	**Artículo 2 (México)** (Romero et al., 2015)

Tabla 5- Rendimiento

Sustrato Agrícola	Resultado	Referencia
Aserrín del Encino C	47,04%	**Artículo 1 (Colombia)** (Villegas Escobar et al., 2007)
Aserrín del Encino M	63.13%	**Artículo 2 (México)** (Romero et al., 2015)

Para la determinación del sustrato agrícola con mejores propiedades farmacológicas se evaluó el porcentaje de eficiencia biológica, tasa de producción de cuerpos fructíferos y el rendimiento. Se puede observar una diferencia en los valores obtenidos de las 3 variables analizadas; siendo el de mayor porcentaje en los 3 parámetros mencionados, el sustrato analizado en México; indica un valor de rendimiento del 63,13% cumpliendo con las condiciones adecuadas para el mercado, las cuales deben ser superiores al 60 %. (Bernabé et al., 2006).

El sustrato analizado en Colombia presenta un porcentaje de eficiencia biológica de 21.5 %, lo cual es 4 veces menor que el porcentaje de eficiencia biológica expresado anteriormente, de igual forma esta misma mezcla de sustrato presenta 0,28 % en la tasa de producción y 47,04 % en el rendimiento del mismo.

Existe una variación entre los valores obtenidos en las investigaciones presentadas, dicha variación puede deberse a la composición del sustrato, el articulo 1 tiene una formula en proporciones de 75% materia seca de aserrín de encino y 25% de salvado de trigo. El artículo 2 tiene 60% de aserrín encino, 38.5 % de salvado de trigo, 1.5 % de Yeso.

Teniendo en cuenta las proporciones de los sustratos en las dos investigaciones, se observó que los resultados del artículo 2 son mayores, esto puede significar que el

uso de mayor porcentaje de salvado de trigo, otorga niveles necesarios de carbono y nitrógeno para el desarrollo de la especie, el yeso es el material que solo existe en una de las 2 fórmulas de sustratos presentados; y la función de este material en la mezcla es de mantener un pH adecuado para el crecimiento del cuerpo fructífero.

IV.2 Determinación Actividad antioxidante

Tabla 6-Método DPPH

Técnica	Resultado	Referencia
DPPH	7,30 ± 0,13 mg / mL	**Artículo 1** (Heleno et al., 2015)
DPPH	6.58±0,7 mg/ mL	**Artículo 2** (Carneiro et al., 2013b)
DPPH	1.012 ± 0.024 mg/mL	**Artículo 3** (Roncero-Ramos et al., 2017)

Tabla 7-Método FRAP

Técnica	Resultado	Referencia
FRAP	1.376 ± 0.017 mg/mL	**Artículo 3** (Roncero-Ramos et al., 2017)
FRAP	2.62 ±0.06 mg/mL	**Artículo 2** (Carneiro et al., 2013b)
FRAP	3.19 ± 0.03 mg/mL	**Artículo 1** (Heleno et al., 2015)

Tabla 8-b.caroteno / ácido linoleico

Técnica	Resultado	Referencia
b-caroteno / ácido linoleico	3.54 ± 0.55 mg/mL	**Artículo 1** (Heleno et al., 2015)
b-caroteno / ácido linoleico	0.64±0.15 mg/mL	**Artículo 2** (Carneiro et al., 2013b)

b-caroteno / ácido linoleico	0.413 ± 0.007 mg/mL	**Artículo 3** (Roncero-Ramos et al., 2017)

Tabla 9-Determinación de fenoles

Técnica	**Resultado**	**Referencia**
Fenoles totales	1.27 ± 0.00 mg/mL	**Artículo #1** (Heleno et al., 2015)
Fenoles totales	0.69±0.08 mg/mL	**Artículo #2** (Carneiro et al., 2013b)
Fenoles totales	0.104 ± 1.13 mg/mL	**Artículo #3** (Roncero-Ramos et al., 2017)

Para la determinación de actividad antioxidante se consideraron tres artículos, en los que aplicaron las mismas técnicas, obteniendo resultados con ligeras variaciones en las concentraciones de extractos.

Se realizaron técnicas del método de FRAP y la determinación de fenoles totales, obteniéndose resultados que se asemejan entre sí, con una diferencia aceptable de ±

1 mg/mL, El uso de distintos solventes en los 3 artículos científicos no generan mayores cambios en los datos obtenidos sobre los análisis.

Caso contrario ocurre con la técnica de DPPH y el ensayo de b-caroteno / ácido linoleico**,** que presentan una diferencia entre resultados de ± 6 mg/ mL.

Como primera variación notable tenemos que el estudio realizado en Departamento de Fisiología y Bioquímica de Nutrición animal, España (artículo 3), tiene una cantidad de actividad antioxidante por el método DPPH de 1.012 ± 0.024 mg/mL**,** la cual es cinco veces menor que el valor obtenido en el estudio realizado en el Instituto Politécnico de Bragança, Portugal (artículo 2), y 6 veces menor que la muestra analizada en el Campus de los Inconfidentes en Brasil (artículo 1).

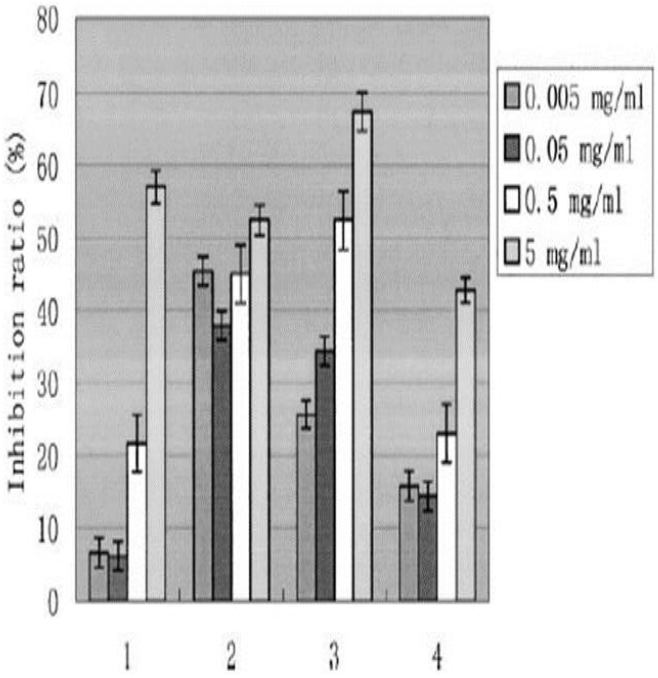
La segunda variación se encuentra en la técnica de fenoles totales, El articulo 1 tiene un valor de 1.27 ± 0.00 mg/mL, valor el cual es 2 e incluso hasta 9 veces mayor que los resultados de fenoles totales obtenidos en los artículos 2 y 3.

El uso de diversas cepas tiende a generar resultados diferentes, ya que, por su naturaleza, las cepas del hongo Shiitake pueden presentar ciertos metabolitos en diferentes proporciones, por lo que la actividad antioxidante también varía, ya que es directamente proporcional al porcentaje de compuesto fenólicos en su estructura. (Reis et al., 2012)

IV.3 Determinación de actividad antitumoral

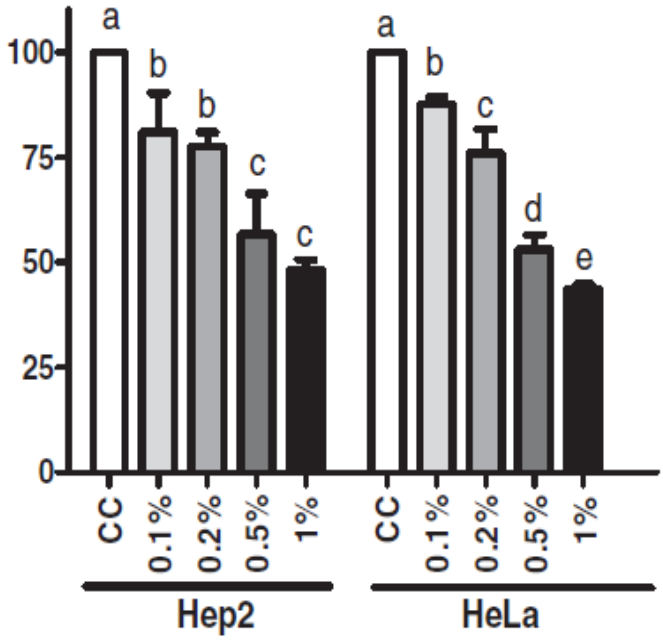
IV.3.2 Técnica In vitro

Imagen 13-Resultado del articulo #4



(Nursaikhan et al., 2015),

Imagen 14-Resultado del articulo #5



(Finimundy et al., 2016)

Se evaluó la actividad antitumoral mediante un ensayo in vitro donde se relaciona las concentraciones de los extractos de *Lentinula edodes* vs los porcentajes de inhibición. La investigación realizada en el Departamento de Química de la Universidad de Wuhan, China (Nursaikhan et al., 2015), comprara extractos del Hongo Shiitake con el fármaco 5-Fluorouracilo usado en tratamientos de quimioterapias, dicho artículo menciona que al menos uno de los extractos presenta la propiedad de reducir el crecimiento tumoral igual que el 5-Fluorouracilo a una misma concentración de 0.005mg.

El estudio del Centro Alemán de Investigación del Cáncer (Finimundy et al., 2016) compara al hongo Shiitake con la especie de hongo *Pleurotus sajor*, ambos con

propiedades antineoplásicas; sin embargo, el extracto de *Lentinula edodes* que mayor porcentaje de inhibición presentaba se encontraba a una concentración 0,1 mg/mL.

Los extractos de hongo Shiitake analizados en las 2 investigaciones expuestas presentan una actividad antitumoral, la diferencia radica en su concentración y su capacidad de inhibición de crecimiento de celular, el extracto del articulo 4 actúa a una concentración menor que el extracto del articulo 5 y esta variación puede ser explicada por el método de extracción del polisacárido y los solvente usados en la técnica descrita en la metodología.

IV.3.1 Técnica In vivo

Imagen 15-Articulo 4

Sample	Dose (mg/kg × 10 d)	Mice	W_{tumor} (g)	Inhibition ratio (%)	Enhancement ratio of body weight (%)
Control		10/10	1.26 ± 0.26		49.6
FU-5	20	10/10	0.48 ± 0.28	62.0	18.9
L-II$_1$	20	10/10	1.14 ± 0.40	9.8	46.9
	60	10/10	0.86 ± 0.32	31.7*	34.4
L-II$_2$	20	10/10	1.06 ± 0.41	15.9	50.7
	60	10/10	1.05 ± 0.41	16.7	47.8
L-II$_3$	20	10/10	0.94 ± 0.34	25.4	43.4
	60	10/10	0.88 ± 0.25	30.5	46.3
L-II$_4$	20	10/10	1.12 ± 0.40	4.0	50.5
	60	10/10	1.21 ± 0.46	11.5*	38.2
Control		10/10	1.57 ± 0.66		47.7
FU-5	20	10/10	0.76 ± 0.16	51.6	20.4
SL-II$_1$	20	10/10	1.40 ± 0.34	10.8	57.6
	60	10/10	0.69 ± 0.30	56.1*	32.6
SL-II$_2$	20	10/10	1.04 ± 0.22	33.8*	45.6
	60	10/10	0.68 ± 0.27	56.2	31.7
SL-II$_3$	20	10/10	1.22 ± 0.34	22.2	41.2
	60	10/10	1.64 ± 0.41	59.0*	36.4
SL-II$_4$	20	10/10	1.12 ± 0.35	28.6	50.7
	60	10/10	0.81 ± 0.25	48.4*	38.8

En la imagen se presentan los resultados del análisis realizado en ratones, comparando extractos del hongo shiitake en diferentes concentraciones, el peso de

los ratones tratados, porcentaje de inhibición y radio de inhibición (Nursaikhan et al., 2015).

Se puede observar que los extractos inyectados a los ratones presentan actividad antitumoral directamente proporcional a la dosis usada, sin embargo, los niveles de inhibición se encuentran por debajo del 5- Fluorouracilo.

De los extractos de *Lentinula edodes* se obtuvo el compuesto que presenta actividad antineoplásica, el cual fue denominado como un O- derivado sulfonado-Re—Glucano, polisacárido cuya relación con el peso corporal es mucha más altas que usando el 5-Fluorocilo, el cual mata a células normales y cancerígenas.

CONCLUSIONES

- El sustrato agrícola ideal para buenos resultados en un análisis de propiedades del hongo Shiitake debe tener cantidades de nitrógeno y carbono no menos del 30%, debe tener una base de residuo agrícola obtenida del encino a concentraciones que oscilen entre 65 y 60%, además de poseer un material que mantenga su pH óptimo para el desarrollo del cuerpo fructífero.

- El hongo Shiitake que se encuentra cultivado en un sustrato de encino con proporciones definidas de nitrógeno, carbono y materia seca va a obtener un rendimiento del 60% y presentara actividades antioxidantes y antitumorales eficaces para la medicina por la existencia de moléculas como fenoles y polisacáridos que emplean estas funciones.

- La actividad antioxidante de *Lentinula edodes* aumentará en relación a la cantidad de compuesto fenólicos existentes en la especie, sin embargo, cada cepa del *Lentinula edodes* puede presentar concentraciones mayores o menores de fenoles en un extracto.

- El polisacárido O- Derivado sulfonado - RE- Glucano presenta una actividad antitumoral muy similar a la del compuesto antineoplásico 5-Fluorouracilo, el polisacárido que se obtiene del hongo Shiitake genera menos citotoxicidad que el fármaco mencionado, por su relación con la masa del cuerpo en los ensayos realizados.

RECOMENDACIONES

- Realizar la actividad antioxidante y actividad antitumoral en Ecuador para comparar valores con otros países
- Comparar experimentalmente setas del hongo shiitake de diferentes lugares del país.
- Realizar estos métodos con los parámetros adecuados para resultados óptimos.

BIBLIOGRAFÍA

- Arias. (2008). Producción de hongo propuesta del cultivo de hongo Pleurotus y Lentinula Edodes a partir de la biomasa del café en las. En o. Gutierres. Bogota, colombia: cuadernos latinoamericanos de administración.
- Arredondo, C. A., & Pérez, A. M. (2007). Evaluación del crecimiento del hongo Lentinula edodes Berk Pegler en residuos agroindustriales. Obtenido de departamento de ingenieria de procesos medellin: https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/395/anamilena_perezmartinez_2007.pdf?Sequence=1&isallowed=y.
- Avila Castañeda, I. M. (2014). Estudio de los compuestos polifenólicos, con énfasis en flavonoides, del hongo lentinula edodes y determinación de la actividad antioxidante. 100.
- Berdugo, h. D. (2015, julio 07). Diccionario ietaan.
- Brand-williams. (2015). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. En B. C. Curvelier m, food sience and tecnology (págs. 25-30).
- BRANEN. (1975). Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hidroxy toluene. En bravo. Jornal of the american oil chemists society.
- Carneiro, A. A. J., Ferreira, I. C. F. R., Dueñas, M., Barros, L., Da Silva, R., Gomes, E., & Santos-Buelga, C. (2016). Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of Agaricus blazei and Lentinus edodes. Food Chemistry, 138(4), 2168–2173. Https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.036
- Da Silva, A. C., & Jorge, N. (2014). Antioxidant properties of Lentinus edodes and Agaricus blazei extracts. Journal of Food Quality, 34(6), 386–394. Https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2011.00416.x
- Daniel Martínez-Carrera, M. S. (2004). Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales, y su contribución a la alimentación mexicana. En Shiitake (págs. 9-19). Mexico. Puebla: Coking book.
- Flegg, c. Y. (1962). The relation between yield of the cultivated mushroom and stage of maturity at picking. En h. Science.

- Fonseca, N. R. (2006). Producción de los hongos shiitake. En hongo shiitake (págs. 5-7). COLOMBIA: Sección de Divulgación y Transferencia, Cenicafé, FNC.
- Forrest, G. I. (1982). Relationship of Some European Scots Pine Populations to Native Scottish Woodlands Based on Monoterpene Analysi. An International Journal of Forest Research.
- Gaitán-hernandez. (2017). Manual práctico del cultivo de setas,aislamiento,siembre y produccion. Instituto de ecología. En s. D. R. Xalapa,mexico: instituto de ecologia a.c.
- GALLEGOS. (2013). Propuesta y validación de un nuevo método para cuantificar bromo. PERU.
- García, C. G., & Mechán, P. M. (2011). ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL. Obtenido de https://www.espoch.edu.ec/index.php/en/facultad-de-ciencias-2.
- Garcìa, M. (1998). Cultivo de setas y trufas. En G. Mundi, Culltivos (págs. 17-22, 143-145). Barcelona, España: Ediciones Mundi.
- Gomes-da-costa. (2008). Crecimento micelial de dois isolados de Lentinula edodes (Berk.) Pegler, en residuos lignocelulosicos. En C. L. E., ACTA SCIENTIARUM BIOLOGICAL (págs. 192-196).
- Good, C. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (Lentinula edodes) extracts obtained by organics solvents and supercritical fluids. En S. A. Smania. R.Curi, Organics solvents and supercritical fluids (págs. 631-638). Salvador: J. Food Eng.
- Graham, L. P. (1988). Cultivation of the Shiitake Mushroom (Lentinus edodes) on Lignocellulosic Waste. J. Sci. Food Agric. Society of Chemical Industry.
- Heleno, S. A., Ferreira, R. C., Antonio, A. L., Queiroz, M. J. R. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. In Food Bioscience (Vol. 11, pp. 48–55). Https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.04.006

- Jiménez, J., & Armijos, D. (2015). Estudio comparativo de tres sustratos para la produccion de Shiitake Lentinus edodes Sing. (Berg) en Yaguarcocha, Imbabura. In Repositorio. Http://repositorio.utpl.edu.ec/handle/123456789/3271
- Martínez-Carrera, M. Sobal, P. Morales, W. Martínez, M. Martínez, Y. M. (2004). Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales y su contribción a la alimentación mexicana. In Colegio Posgraduados. Http://www.hongoscomestiblesymedicinales.com/P/P/25.pdf
- Mesa, g. (2010). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales. Revista cubana de plantas medicinales, 5-6.
- Nursaikhan, S. U., Fanbo, X. X. U., & Colgar, L. Z. (2015). Actividades antitumorales de O- Derivados sulfonados de (¡1! 3) - - RE- Glucano de diferentes Lentinus edodes. 70, 38–46.
- Ramirez, R. H. (2002). Symmetrical recovery of monokariotic components from Lentinula edodes using dedicaryotization. En Sànchez et al., Mushroom Biology and Mushroom products (págs. 141-149). Mexico: UAEM.
- Reges. (2008). Curso general para el cultivo de hongos. San andres.
- Ricardo Silva S., C. F. (2010). Manual para la producción de hongos comestibles. Santiago.
- Rivera, O. A., & Lares, W. M. (2017). Sociedad Venezolana de Farmacología Clínica y Terapéutica. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal, pp. 67-71.
- Rodríguez, J. F. (2011). Principale tipos de intoxicaciones por consumo de setas.
- Rodríguez, N., Araque, M., & Perdomo, F. (2006). Producción de los hongos comestibles Orellanas y Shiitake. Sena, Asofungicol, FNC, Cenicafé, 33. Http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/857/1/Hongos comestibles Orellanas Shiitake.pdf
- Rodriguez. (2015). Actividad antioxidante.
- Romero, A., Omar, G., Martínez, M., Huato, M., & Ramírez, B. (2015). Producción del hongo Shiitake (Lentinula edodes Pegler) en bloques sintéticos

utilizando residuos agroforestales *. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 6(6), 1229–1238. Http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n6/v6n6a7.pdf

- Romero, m. (2015). Produccion del hongo shiitake en bloques sinteticos utilizando reiduos agroforestales. En huato, revista mexicana de ciencias agricolas (págs. 1229-1238). Mexico.
- Roncero-Ramos, I., Mendiola-Lanao, M., Pérez-Clavijo, M., & Delgado-Andrade, C. (2017). Effect of different cooking methods on nutritional value and antioxidant activity of cultivated mushrooms. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 68(3), 287–297. Https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1244662
- Shimomura, N. (2006). Morphological mutation of Lentinula edodes mycelium, particularly detectable in the dikaryotic state. The Mycological Society of Japan and Springer-Verlag, 224–227.
- Soto, m. (2007). Actividad antioxidante de shiitake. En fitotecnia mexicana (págs. 43-49). Mexico.
- Toharia, M. (1985). El libro de las setas. España: Publicado por Alianza Editorial.
- Velioglu. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. En g. L. Mazza g., journal of agricultural and food chemistry (págs. 4113-4117).
- Villegas Escobar, V., Pérez, A., & Arredondo, C. (2017). Evaluación de la producción del hongo Lentinula edodes Pegler en bloques sintéticos a base de residuos agroindustriales. Ingeniería y Ciencia, 6, 23–40.
- YANG. (2017). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. En M. J. LIN H., FOOD CHEMISTRY (págs. 229-235).

GLOSARIO

Abedul: Árbol caducifolio que puede alcanzar hasta 30 m de altura.

Ácido linoleico: es un ácido graso esencial de la serie omega 6 (ω-6), es decir, el organismo no puede crearlo y tiene que ser adquirido a través de la dieta. Es un ácido graso poliinsaturado, con dos dobles enlaces

Actividad antitrombotica: Reduce el riesgo de sufrir un ataque cardíaco, un accidente cerebrovascular y una obstrucción de las arterias y venas, ya que evitan que se formen coágulos de sangre (trombos) o que estos aumenten de tamaño.

Aromatasa: es una enzima que es responsable de un paso fundamental en la biosíntesis de los estrógenos.

Ascomicetos: son hongos con micelio tabicado que producen ascosporas endógenas. Pueden ser unicelulares y talófitos.

BHA: o hidroxibutilanisol es una mezcla de dos isómeros de compuestos orgánicos, 2-*tert*-butil-4-hidroxianisol y 3-*tert*-butil-4-hidroxianisol, es un sólido ceroso que exhibe propiedades antioxidantes.

BHT: o butilhidroxitolueno (E-321) es un antioxidante sintético procedente de la industria petrolera. Es capaz de modificar la acción de algunos carcinógenos.

Carcinogénesis: Indica origen o inicio del cáncer del griego “génesis” y es el proceso por el que las células normales adquieren mutaciones y comienzan a reproducirse descontroladamente, afectando el balance entre nacimiento y muerte celular. Estas células escapan al control de la normalidad del organismo para crear tumores.

Cariogamia: es el paso final en el proceso de fusión de dos células eucariontes haploides, y se refiere específicamente a la fusión de los dos núcleos celulares.

Cepa: es una población de microorganismos de una sola especie descendientes de una única célula o que provienen de una determinada muestra en particular, la que

usualmente es propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias.

Efectos hipoglucémicos: Es una afección que ocurre cuando el azúcar en la sangre del cuerpo (glucosa) disminuye y es demasiado bajo.

Eritadenina: principio activo del *Lentinula edodes.*

Esporas: Célula vegetal reproductora que no necesita ser fecundada.

Fungicultor: es un arte, disciplina o actividad dedicada a cultivar setas y otros hongos en un medio controlado, a diferencia de la recolección de hongos, para producir alimentos, medicinas como la penicilina y otros productos.

Hipocolesterolemia: Aumento de la cantidad normal de colesterol en la sangre.

Inhibición: Impidiendo el crecimiento de los microorganismos. Esterilización, matando, destruyendo o eliminando todos los microorganismos viables de un medio. Los agentes que destruyen o matan las bacterias son bactericidas.

Inoculación: Inoculante, al producto elaborado a base de microorganismos que se aplican al suelo o a la semilla con el fin de aprovechar los nutrimientos contenidos en asociación con el vegetal

Lentinan: Polisacárido termolábil del shiitake, que tiene actividad antitumoral.

Meiosis: es un proceso de división celular a través del cual a partir de una célula diploide se producen cuatro células haploides.

Micelio: conjunto de hifas que forman la parte vegetativa de un hongo.

Setas: son los esporocarpos, o cuerpos fructíferos, de un conjunto de hongos pluricelulares (basidiomicetos) que incluye muchas especies.

Sustrato: es un medio material en el que se desarrollan las raíces de las plantas, limitado físicamente en su volumen, aislado 65 del suelo para impedir el desarrollo de

las raíces en el mismo y capaz de proporcionar a la planta el agua y los elementos nutritivos que demande, y a las raíces el oxígeno necesario para su respiración.

Tioprolina: inhibidor de enzima**.**

Vía intraperitoneal: está localizado en el interior de la cavidad peritoneal.