



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA**

**TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Establecimiento de condiciones de cultivo en laboratorio del hongo *Pleurotus djamor* para la producción de metabolitos con posible aplicación terapéutica.**

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTORA: Hurtado Cabrera, María Gabriela

DIRECTOR: Cartuche Flores, Luis Emilio, Mgtr.

LOJA-ECUADOR

2015



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

Septiembre, 2015

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magíster.

Luis Emilio Cartuche Flores.

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “**Establecimiento de condiciones de cultivo en laboratorio del hongo *Pleurotus djamor* para la producción de metabolitos con posible aplicación terapéutica**” realizado por **Hurtado Cabrera María Gabriela**; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, octubre de 2015

f).....

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo **Hurtado Cabrera María Gabriela** declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Establecimiento de condiciones de cultivo en laboratorio del hongo *Pleurotus djamor* para la producción de metabolitos con posible aplicación terapéutica, de la titulación de Bioquímico farmacéutico, siendo Cartuche Flores Luis Emilio director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la universidad"

f.....

**Autora:** Hurtado Cabrera, María Gabriela

**Cédula:** 1105153488

## DEDICATORIA

*A Dios, fuente de amor verdadero e incondicional. Él amigo que nunca falla.*

*A mi padre, Adolfo, ejemplo de humildad, sacrificio y amor.*

*A mi madre, Carmen, tu valentía y amor me dio la vida.*

*A mi hermana, Jessy, alegría y luz de mi vida.*

*A mi familia y amigos.*

**Ma. Gabriela**

## AGRADECIMIENTO

*A Dios, por bendecirme y guiar mis pasos día a día.*

*A mi madre, Carmen, por enseñarme que con valentía y amor todo es posible, por guiarme y cuidarme desde el cielo.*

*A mi padre, Adolfo, la vida no me alcanzara para agradecerte TODO lo que has hecho por mí, esto es por y para ti. Te amo.*

*A mi hermana, Jessy, gracias por ayudarme a levantarme tantas veces, por darme ánimo, tus palabras son mi mayor inspiración. Este logro también es tuyo.*

*A mis tíos, Iván y Luz, gracias por su apoyo y amor incondicional durante toda mi vida y en especial durante estos últimos 5 años. Gracias por cuidarme como a una hija más.*

*Agradezco de manera especial al M. Sc. Luis Cartuche, por compartir sus conocimientos y guiar cada paso de este trabajo con paciencia.*

*A la Universidad Técnica Particular de Loja, por formar mi vida espiritual y profesional.*

*A mi familia y amigos.*

*A todos los que hicieron esto posible... ¡GRACIAS!*

**Ma. Gabriela**

## TABLA DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
TABLA DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I	
MARCO TEÓRICO .....	4
1.1.1. Conceptos generales. ....	5
1.1.2. Importancia de los hongos en la naturaleza. ....	5
1.1.3. Características de Basidiomycetes .....	6
1.1.4. El género <i>Pleurotus</i> .....	6
1.1.5. Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i> spp. ....	7
1.1.6. Taxonomía de <i>Pleurotus djamor</i> . ....	8
1.2. Metabolitos producidos por Basidiomicetos .....	9
1.2.1. Conceptos generales. ....	9
1.2.2. Antitumorales. ....	9
1.2.3. Antibióticos.....	10
1.2.4. Aromas. ....	11
1.2.5. Enzimas e inhibidores. ....	12
1.3. Cultivo de Hongos comestibles.....	13

1.3.1. Conceptos generales. ....	13
1.3.2. Importancia del cultivo de <i>Pleurotus</i> spp. ....	13
1.3.3. <i>Pleurotus djamor</i> .....	14
1.3.4. Factores ambientales para el crecimiento. ....	15
1.3.5. Propiedades nutricionales de las setas. ....	17
1.3.6. Propiedades medicinales de las setas. ....	18
1.4. Producción mundial de hongos comestibles.....	20
1.6. Métodos de crecimiento, separación y análisis.....	21
1.6.1. Cultivos para fructificación. ....	21
1.6.2. Cromatografía en capa fina (CCF). ....	26
1.6.3. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). ....	27
1.6.4. Concentración mínima inhibitoria (CMI). ....	32
 CAPÍTULO II	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
2.1. Cepa <i>Pleurotus djamor</i> .....	35
2.2. Velocidad de crecimiento.....	35
2.2.1. Crecimiento exponencial. ....	36
2.2.2. Velocidad volumétrica de producción de biomasa por peso seco.....	37
2.3. Cultivos para Fructificación.....	37
2.3.1. Preparación del inóculo primario. ....	37
2.3.2. Preparación del sustrato. ....	38
2.3.3. Inoculación en los sustratos. ....	39
2.3.4. Incubación.....	40
2.3.5. Fructificación.....	41
2.3.6. Cosecha.....	41
2.3.7. Parámetros de producción ....	41
2.3.8. Obtención de extracto de basidiocarpos. ....	42

2.4. Cultivo en medio líquido .....	42
2.4.1. Preparación del medio de cultivo y siembra. ....	42
2.4.2. Obtención del extracto de micelio. ....	43
2.4.3. Obtención del extracto de medio de cultivo agotado. ....	44
2.5. Cromatografía en capa fina (CCF).....	45
2.6. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).....	46
2.7. Actividad antibacteriana.....	46
2.7.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI). ....	46
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>49</b>
3.1. Velocidad de crecimiento.....	50
3.1.1. Velocidad volumétrica de biomasa por peso seco.....	50
3.1.2. Tiempo de generación. ....	55
3.2. Cultivos para fructificación.....	56
3.2.1. Inóculo primario.....	56
3.2.2. Inoculación e incubación. ....	57
3.2.3. Cultivo sobre bagazo de caña de azúcar 5mm (100%). ....	58
3.2.4. Cultivo sobre tallo de plátano 5mm (100%).....	59
3.2.5. Cultivo sobre bagazo de caña 5mm (50%)- tallo de plátano 2,5cm (50%).....	60
3.2.6. Cultivos sobre sustrato (100% tallo de plátano). ....	61
3.2.7. Porcentajes de eficiencia biológica (EB), tasa de producción (TP), y Rendimiento (R). .....	63
3.3. Rendimiento de extractos .....	65
3.3.1. Extracto de basidiocarpos.....	65
3.3.2. Extracto de micelio.....	66
3.3.3. Extracto de medio de cultivo agotado.....	66
3.4. Cromatografía en capa fina (CCF).....	67

3.5. Cromatografía <i>líquida</i> de alta resolución (CLAR).....	69
3.5.1. Extracto de basidiocarpos (E1). .....	70
3.5.2. Extracto de micelio (E2). .....	71
3.5.3. Extracto de medio de cultivo agotado (E3). .....	72
3.6. Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	72
CONCLUSIONES .....	75
RECOMENDACIONES .....	76
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	77
ANEXOS.....	84
ANEXO 1. Preparación de Medios de cultivo .....	85
ANEXO 2. Determinación de humedad .....	86
ANEXO 3. Diagrama del proceso de Fructificación de <i>Pleurotus djamor</i> .....	87
ANEXO 4. Cromatogramas obtenidos de los extractos a 254 nm y 360 nm .....	88

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Compuestos con actividad antibiótica producidos por basidiomicetos. ....	10
<b>Tabla 2.</b> Aromas asignados a micelios de basidiomicetos cultivados en medio sintético. ....	12
<b>Tabla 3.</b> Composición nutricional de <i>Pleurotus</i> spp. (mg de aminoácidos en 100 g de proteína cruda) .....	17
<b>Tabla 4.</b> Cultivos preparados en diferentes sustratos .....	40
<b>Tabla 5.</b> Bacterias patógenas y caldos de cultivo para inoculación.....	47
<b>Tabla 6.</b> Tiempo de generación de <i>P. djamor</i> en medio YNPD y MEM .....	56
<b>Tabla 7.</b> Comparación de los diferentes sustratos para formación de primordios y basidiocarpos de <i>Pleurotus djamor</i> .....	63
<b>Tabla 8.</b> Porcentajes de Eficiencia biológica, tasa de producción y rendimiento.....	65
<b>Tabla 9.</b> Pesos fresco y seco de los basidiocarpos cosechados.....	66
<b>Tabla 10.</b> Resultados CMI de los extractos.....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Partes de una seta <i>Pleurotus</i> .....	7
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i> .....	8
<b>Figura 3.</b> Estructura de las estatinas de origen fúngico .....	19
<b>Figura 4.</b> Desplazamiento y separación de una mezcla a través de una placa.....	27
<b>Figura 5.</b> Partes fundamentales de un sistema HPLC .....	28
<b>Figura 6.</b> Esquema del proceso de velocidad de crecimiento por peso seco.....	36
<b>Figura 7.</b> Proceso de preparación del inóculo primario.....	38
<b>Figura 8.</b> Sustratos utilizados .....	39
<b>Figura 9.</b> Inoculación en el sustrato.....	40
<b>Figura 10.</b> Obtención de extracto de basidiocarpos.....	42
<b>Figura 11.</b> Siembra de <i>P. djamor</i> en medio YNPD .....	43
<b>Figura 12.</b> Obtención del extracto de micelio.....	44
<b>Figura 13.</b> Filtrado al vacío del medio de cultivo.....	44
<b>Figura 14.</b> Cromatografía en capa fina. ....	45
<b>Figura 15.</b> Concentración mínima inhibitoria .....	48
<b>Figura 16.</b> Velocidad volumétrica (g/Lh) de la biomasa de <i>Pleurotus djamor</i> en YNPD.....	51
<b>Figura 17.</b> Velocidad volumétrica (g/Lh) de la biomasa de <i>P. djamor</i> en YNPD .....	52
<b>Figura 18.</b> Curva de variación de pH del medio YNPD .....	53
<b>Figura 19.</b> Velocidad volumétrica (g/Lh) de la biomasa de <i>P. djamor</i> en medio extracto de malta .....	54
<b>Figura 20.</b> Velocidad volumétrica (g/Lh) de la biomasa de <i>P. djamor</i> en medio extracto de malta .....	54
<b>Figura 21.</b> Curva de variación de pH en Medio extracto de malta .....	55
<b>Figura 22.</b> Inóculo primario.....	57
<b>Figura 23.</b> Condiciones de incubación de cultivos .....	58
<b>Figura 24.</b> Cultivos sobre bagazo de caña de azúcar .....	58
<b>Figura 25.</b> Cultivo sobre Bagazo de caña 5mm .....	59
<b>Figura 26.</b> Cultivo sobre tallo de plátano 5mm .....	59
<b>Figura 27.</b> Basidiocarpo maduro de <i>Pleurotus djamor</i> en sustrato de tallo de plátano.....	60
<b>Figura 28.</b> Cultivo de <i>Pleurotus djamor</i> sobre sustrato (bagazo de caña/tallo de plátano).....	60
<b>Figura 29.</b> Cultivo de <i>Pleurotus djamor</i> sobre tallo de plátano.....	61
<b>Figura 30.</b> Basidiocarpo de <i>Pleurotus djamor</i> desarrollado en tallo de plátano 100%.....	62

<b>Figura 31.</b> CCF del extracto obtenido de basidiocarpos .....	67
<b>Figura 32.</b> CCF del extracto obtenido de micelio .....	68
<b>Figura 33.</b> CCF del extracto obtenido de medio de cultivo agotado.....	68
<b>Figura 34.</b> Cromatograma del extracto acetónico de basidiocarpos .....	70
<b>Figura 35.</b> Cromatograma del extracto acetónico de micelio .....	71
<b>Figura 36.</b> Cromatograma del extracto acetónico de medio de cultivo agotado .....	72

## RESUMEN

*Pleurotus* spp. son hongos basidiomycetes con capacidad de descomponer materia orgánica especialmente celulosa y lignina, con gran importancia alimenticia y terapéutica. Sin embargo hay limitantes en su aislamiento y conservación en condiciones de laboratorio para la exploración de sus metabolitos. Se establecieron condiciones para el cultivo de la cepa *Pleurotus djamor* para evaluar la riqueza metabólica de los basidiocarpos (E1), micelio (E2) y medio de cultivo agotado (E3). La velocidad de crecimiento se determinó mediante peso seco de biomasa, la fructificación se realizó sobre dos sustratos: bagazo de caña y tallo de plátano, determinando la eficiencia biológica (EB), tasa de producción (TP) y rendimiento (R). La riqueza metabólica se valoró mediante cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (DAD). La mayor EB (23%) fue obtenida en el cultivo de sustrato combinado, bagazo de caña-tallo de plátano. El extracto acetónico E2 presentó mayor cantidad de compuestos y una actividad antibacteriana débil frente a *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) con una CMI de 1000 µg/ml y 500 µg/ml, respectivamente.

**PALABRAS CLAVES:** basidiocarpos, velocidad de crecimiento, eficiencia biológica, concentración mínima inhibitoria.

## ABSTRACT

*Pleurotus* spp. are mushrooms basidiomycetes ability to decompose organic matter especially cellulose and lignin, with great nutritional importance and therapeutic. However there are limitations in their isolation and conservation conditions of laboratory for the exploration of its metabolites. Established conditions for the cultivation of the strain of *Pleurotus djamor* for assessing metabolic wealth from the basidiocarps (E1), mycelium (E2) and exhausted (E3) culture medium. The rate of growth was determined by dry weight of biomass, fruiting occurred on two substrates: cane bagasse and banana stem, determining the biological efficiency (EB), rate of production (TP) and yield (R). Metabolic wealth was assessed by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography with diode (DAD) array detector. The greater EB (23%) was obtained in the cultivation of combined substrate cane bagasse-banana stem. E2 acetone extract presented more compounds and a weak antibacterial activity against: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) with a CMI of 1000 µg/ml and 500 µg/ml, respectively.

**KEYWORDS:** basidiocarps, rate of growth, biological efficiency, minimum inhibitory concentration.

## INTRODUCCIÓN

Ecuador es un país con una gran biodiversidad, los bosques húmedos tropicales ofrecen el hábitat propicio para el crecimiento y desarrollo de muchas especies de hongos. A pesar de poseer una inmensa variedad de micobiota en nuestra naturaleza, este es un campo poco estudiado. Los hongos, son seres vivos que desempeñan un rol importante en la naturaleza, pues junto con las bacterias forman el grupo de los descomponedores dentro de los ciclos tróficos del carbono, nitrógeno y azufre (Herrera & Ulloa, 1990; Webster, 1986).

Las setas (macrohongos) comestibles son conocidas por su alto valor proteico, su considerable concentración de vitaminas, minerales, fibra dietaria, bajos niveles de sodio y grasas insaturada. Esto las convierte en un excelente nutraceutico ya que sus propiedades medicinales están directamente relacionadas con los compuestos que presentan acciones biológicas con potencial terapéutico. Dichos compuestos se pueden aislar tanto del micelio como del basidiocarpo y del medio de cultivo agotado. Dentro de estos se encuentran glucanos, enzimas, policétidos, ácidos grasos, polifenoles, flavonoides y terpenoides, entre otros (Kong, 2005).

Los hongos del género *Pleurotus* poseen diferentes acciones biológicas y su mayor interés radica en la producción de polisacáridos inmunoestimuladores y estatinas naturales que son hipocolesterolémicas y que poseen ventajas sobre las sintetizadas químicamente por sus pocos efectos secundarios. Además, debido a la gran producción de lacasas de baja especificidad y su eficiencia en la degradación de compuestos xenobióticos, *Pleurotus* spp. ha sido estudiado ampliamente para la biorremediación de diferentes efluentes (Anastasi, Prigione & Varese, 2010).

El género *Pleurotus* a diferencia de otros, es capaz de crecer sobre una diversidad de sustratos, lo cual permite apreciar de manera directa el impacto benéfico de cultivar hongos, sobre todo para el aprovechamiento de residuos agropecuarios, con el fin de aminorar la contaminación. El cultivo de hongos abarca tres etapas que son la producción de la semilla, la preparación del sustrato y el cultivo propiamente del hongo, en el cual se mantienen las condiciones adecuadas para la fructificación y posterior cosecha. Cuando el micelio ha crecido suficientemente sobre el sustrato y las condiciones del medio ambiente lo permiten (temperatura, pH, sustrato, humedad del sustrato, humedad del aire, tamaño de partícula, aireación, y la luz), las hifas se agregan para formar basidiocarpos, también denominados basidiocarpos (Sánchez & Royse, 2001).

Los hongos del género *Pleurotus* no son la excepción, ya que se les reconoce su alto contenido de proteínas y carbohidratos poliméricos como glicógeno y quitina. *P. djamor* tiene alto valor nutritivo comparado con los hongos *Agaricus bisporus* y *Lentinula edodes*, posee macro y micronutrientes, vitaminas como la B9 y C, en mayor cantidad que estas dos especies (Álvarez & Vega, 2010).

*Pleurotus djamor*, hongo que crece en los bosques del sur del Ecuador no ha reportado ningún tipo de investigación en nuestra provincia en cuanto a su cultivo, desarrollo, utilización de residuos como sustrato, producción o análisis fitoquímico. En base a esto, se realizó el estudio de este hongo con el fin de obtener nuevos compuestos que sirvan para posteriores estudios y puedan ser aplicados dentro del campo farmacéutico como fuente natural debido a sus propiedades.

El presente estudio consistió en establecer condiciones de cultivo en laboratorio de *Pleurotus djamor* para la producción de metabolitos con posible aplicación terapéutica, lo cual contribuye al estudio de una de las especies de *Pleurotus*, un género ampliamente estudiado y que está siendo cultivado en muchos países de América y en diversas partes del mundo. La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Bioensayos del Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja.

Para la producción de *Pleurotus djamor* se utilizó el método de fructificación, en el cual se utilizaron granos de trigo para la preparación del inóculo primario y residuos agrícolas (bagazo de caña de azúcar y tallo de plátano) como sustratos. Se cultivó también en medio líquido para la producción de biomasa o micelio y se obtuvo extractos acetónicos de los basidiocarpos, micelio obtenido en medio líquido y medio agotado empleado en la obtención del micelio. Para la comparación de la riqueza metabólica se realizaron placas en cromatografía en capa fina y mediante cromatografía *líquida* de alta eficacia con detector de arreglo de diodos-DAD se obtuvo perfiles cromatográficos de cada uno de los extractos. Finalmente la actividad antibacteriana se evaluó mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria por el método de microdilución en caldo contra diferentes bacterias patógenas Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y bacterias Gram negativas: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997) *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2) y *Proteus vulgaris* (ATCC 8427).

**CAPÍTULO I**  
**MARCO TEÓRICO**

## **1.1. Basidiomicetos**

### **1.1.1. Conceptos generales.**

Los hongos constituyen un grupo muy variable y polimórfico difícil de caracterizar, sin embargo, cuando se hace referencia a ellos se habla de organismos que nacen de esporas, carecen de clorofila, se reproducen sexual o asexualmente y tienen un cuerpo generalmente formado por filamentos muy ramificados llamados hifas, los cuales en conjunto forman el micelio. El crecimiento del micelio se caracteriza por formar masas algodonosas o afelpadas de forma radial, que es común observar en la hojarasca, troncos caídos y en el suelo de bosques y praderas húmedas. Los hongos se distinguen de las plantas porque no almacenan su energía en forma de almidón o polisacárido insolubles, en su lugar, almacenan otros polisacáridos como la trehalosa y el glucógeno (Sánchez & Royse, 2001).

### **1.1.2. Importancia de los hongos en la naturaleza.**

Los hongos y las bacterias forman el grupo de los descomponedores dentro de los ciclos tróficos del carbono, nitrógeno y azufre, capaces de utilizar los desechos de las plantas en su forma original. Los hongos para alimentarse secretan enzimas sobre el sustrato donde se encuentran desarrollados, lo degradan en sustancias simples y absorben los nutrientes necesarios para su crecimiento. En este contexto, especies de *Pleurotus* degradan y utilizan la lignina, la hemicelulosa y la celulosa con una tasa de descomposición variable según la especie o la temperatura (Sánchez & Royse, 2001).

Los hongos son considerados cosmopolitas ya que pueden vivir en el suelo, en aguas dulces y marinas y sus esporas son abundantes en el aire. Ecológicamente los hongos pueden ser saprófitos debido a que se alimentan de cuerpos muertos o de desechos de organismos. Otros, los parásitos pueden penetrar las células de tejidos vegetales y animales y tomar sus nutrientes del interior de éstas. Así mismo facultativamente algunos hongos saprófitos pueden vivir como parásitos si se les presenta la oportunidad. La estrategia alimenticia de todos los hongos es el ser heterótrofos, pues ninguno de ellos es capaz de sintetizar compuestos de carbono complejos a partir de dióxido de carbono como las plantas. Sin embargo ciertos grupos de hongos pueden formar asociaciones de tipo simbiótico con las raíces de las plantas, conocidas como micorrizas, o con algas para dar origen a los líquenes. Los hongos juegan un

papel muy importante en la naturaleza, pues junto con las bacterias son los que permiten el recambio de nutrientes por medio de ciclos tróficos de carbono, nitrógeno y azufre (Herrera & Ulloa, 1990; Webster, 1986).

### **1.1.3. Características de Basidiomycetes**

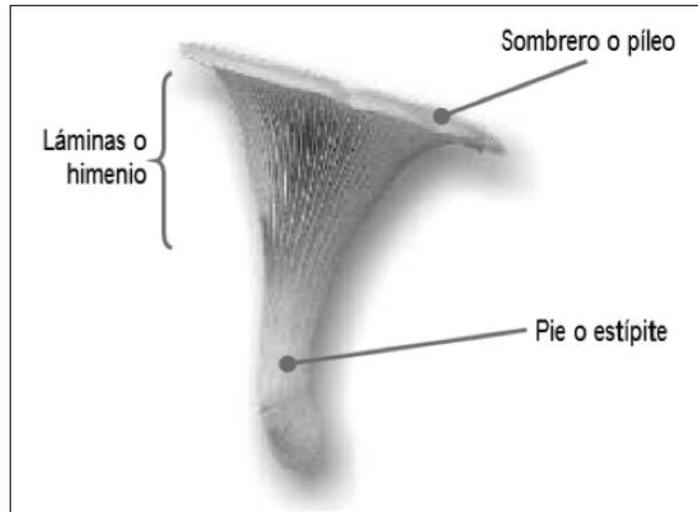
Los basidiomicetos se caracterizan por producir esporas sexuales en basidiocarpos llamados basidiocarpos o también conocidos como basidiomatas o basidiomas (del griego basidion=base pequeña, basidio + karpos=fruto), el cual porta estructuras especializadas conocidas como basidios. La estructura común a todos los basidiomicetos es el basidio, órgano homólogo y quizá derivado del asco de los ascomicetos. El basidio se origina como una estructura binucleada en la que se lleva a cabo la cariogamia y la meiosis, siendo notable el hecho que las basidiosporas por él producidas están situadas por fuera, a diferencia de los ascomicetos que conservan sus ascosporas dentro del asco. En la mayoría de las especies, cada basidia produce cuatro basidiosporas, que son fuertemente disparadas al llegar a su madurez (balistosporas).

La mayor parte de estos hongos produce un micelio bien desarrollado, con septos simples, dependiendo del orden taxonómico. Usualmente es blanco, amarillo brillante o naranja, y a menudo se dispersa hacia el frente, creciendo en forma de abanico, puede entretrejerse formando estructuras parecidas a cuerdas o raíces llamadas rizomorfos, resistentes a condiciones adversas como la falta de nutrientes o la humedad. Estos presentan una característica especial y es que en condiciones adversas pueden permanecer latentes hasta que se presenten nuevamente las condiciones favorables para el crecimiento. Los rizomorfos se conforman de un número de hifas arregladas paralelamente y algunas veces envueltas en una vaina o corteza. Comúnmente son producidos por muchas especies de hongos ectomicorrízicos y por varios descomponedores de la madera y son importantes no sólo en la dispersión de ciertas especies sino también en las actividades de exploración y acumulación de nutrientes (Sánchez & Royse, 2001).

### **1.1.4. El género *Pleurotus***

Los hongos en general son conocidos por su forma de sombrero más o menos circular y un pie que lo sostiene, pero para el caso del género *Pleurotus* (término que deriva del griego *pleurá* o

*pleurón*, costado o lado y del latín *otus*, oreja) este pie es más lateral que céntrico, por lo que su desarrollo se da en forma de una ostra u oreja. (Gaitán, Salmones, Pérez & Mata, 2006). Las partes de una seta *Pleurotus* se muestran en la Figura 1:



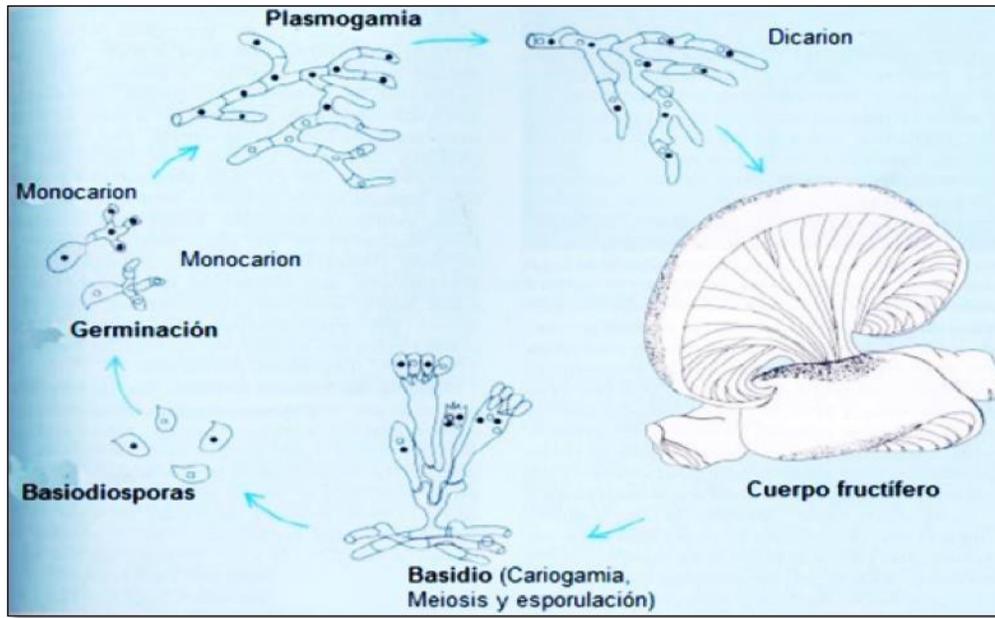
**Figura 1.** Partes de una seta *Pleurotus*.  
**Fuente:** Gaitán et al. 2006

#### 1.1.5. Ciclo de vida de *Pleurotus* spp.

Las basidiosporas de los hongos comestibles germinan cuando entran en contacto con un sustrato y encuentran una temperatura, pH y humedad adecuados para su crecimiento (Casselton, 1978).

La germinación de una basidiospora, produce el desarrollo de hifas filamentosas monocarióticas y haploides las cuales al ramificarse forman al micelio, este continúa creciendo (de forma monocariótica), hasta llegar a la plasmogamia con otro micelio contiguo que sea sexualmente compatible. Cuando las células se fusionan, el septo, que permanecía cerrado para evitar el intercambio intranuclear se abre para que ocurra la migración nuclear y después la formación de micelio secundario dicariótico por división conjugada simultánea de los dos núcleos iniciales y la distribución de los pares de núcleos hermanos compatibles o dicarion en las células hijas. Una vez que se ha formado el basidiocarpo, a partir del micelio indiferenciado generado por crecimiento vegetativo, se llevan a cabo la cariogamia y la meiosis, la meiosis da como resultado núcleos haploides (poseen de manera aislada factor de incompatibilidad) que emigran a una tétrada de esporas formadas en la parte externa del basidio, donde son liberados durante

el proceso de esporulación del basidiocarpio maduro, finalmente si las basidiosporas se encuentran en condiciones ambientales apropiadas germinan produciendo micelio monocariótico y comienza nuevamente el ciclo de vida del género *Pleurotus* (Alexopolus & Mins, 1985).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *Pleurotus*  
**Fuente:** Martínez, 1998

### 1.1.6. Taxonomía de *Pleurotus djamor*.

Las especies de *Pleurotus* se caracterizan por generar basidiocarpos de diferentes tamaños, se desarrollan sobre madera y usualmente crecen en grupos con estípite generalmente excéntrico, lateral, rudimentario o ausente, algunas veces central. Todas las especies descritas de este género son comestibles (Guzmán, 1977).

Kirt (2001) describe su clasificación taxonómica de la siguiente manera:

**Reino** Fungi

**División** Basidiomycota

**Clase** Basidiomycetes

**Orden** Agaricales

**Familia** Pleurotaceae

**Género** *Pleurotus*

**Especie** *Pleurotus djamor*

## **1.2. Metabolitos producidos por Basidiomicetos**

### **1.2.1. Conceptos generales.**

Hasta la actualidad se han descrito cerca de un millón de compuestos naturales aislados a partir de diferentes fuentes, de las cuales los microorganismos ofrecen grandes posibilidades para la obtención de nuevas estructuras con actividad biológica pero constituyen una de las menos estudiadas. Dentro de los microorganismos los basidiomicetos presentan una capacidad de producción de metabolitos biológicamente activos apenas investigada (Anke, 1989).

Existe una amplia gama de productos naturales con actividad biológica producidos por estos hongos y abarca desde componentes estructurales con actividad antitumoral e inmunológicamente activos hasta agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, enzimas, reguladores de crecimiento y aromas (Suárez & Nieto, 2013).

### **1.2.2. Antitumorales.**

Chihara et al., (1969) aislaron varias fracciones activas a partir de basidiocarpos de *Lentinus* spp., las cuales correspondieron a polisacáridos, luego de su caracterización se evidencio la presencia de un glucano lineal con enlaces  $\beta$  (1-3), poco soluble en agua y con peso molecular entre 950-1050 kDa. Se continuaron los estudios hasta la formulación de un fármaco que se comercializa bajo la firma Ajinomoto con el nombre de Lentinan®, estudios biológicos han demostrado que este fármaco prolonga la vida y reduce el tamaño del tumor. Su modo de acción se caracteriza por la activación mediada del hospedero de sus factores de defensa y mediante estudios clínicos se ha demostrado que en combinación con otras drogas incrementa la reducción del tamaño del tumor y prolonga la vida en paciente con cáncer gástrico.

Otro compuesto aislado de los cultivos miceliares de *Trametes versicolor* usado para tratar enfermedades malignas, es un complejo polisacárido-proteína altamente soluble en agua y peso molecular promedio de 94 kDa. Este compuesto que se comercializa bajo el nombre de

Krestin® (también denominado “PSK” o Polisacárido-K) ha sido evaluado en pacientes operados de cáncer colorectal y para el tratamiento combinado con quimioterapia, radioterapia y cirugía en pacientes con cáncer gastrointestinal, cervico-uterino, de mamas y pulmonar (Ito, Hidaka, Sugiura, 1979; Fujii, Saito, & Matsunaga, 1995).

### 1.2.3. Antibióticos.

Constituyen el grupo más importante de sustancias farmacéuticas sintetizadas por células microbianas. Comprende compuestos antitumorales y alcaloides. Los compuestos con actividad antibiótica producidos por basidiomicetos han sido agrupados acorde a su naturaleza química y su relación con las diferentes actividades biológicas reportadas (Tabla 1).

El hynophilin, el pleurotelol y el ácido pleurotético son compuestos aislados de fermentaciones de *Pleurotellus hypnophilus*. Mientras que el pleurotelol y el ácido pleurotético pertenecen al grupo de los sesquiterpenoides, el hynophilin es un nuevo miembro de la familia de los hirsutanos a la cual pertenecen un gran número de los típicos metabolitos presentes en basidiomicetos. Estos tres antibióticos poseen alta actividad antimicrobiana y citotóxica (Anke, 1989).

El collybial aislado de una cepa de *Collybia confluens*, es un sesquiterpenoide que inhibe el crecimiento de bacterias gram positivas, y ha demostrado una potente actividad citotóxica (Toyota & Hostettmann, 1990).

**Tabla 1.** Compuestos con actividad antibiótica producidos por basidiomicetos.

Naturaleza química	Microorganismo	Actividad biológica	Producto
<b>Sesquiterpenos y compuestos relacionados</b>	<i>Merulius, Marasmius, Naematoloma, Pleurotellus, Lentinelus, Panaelus.</i>	Antimicrobiana, antifúngica, antiviral, citotóxica, mutagénica	Merulidial, Naematolin, Naematolon, Hynophilin, Leianafulveno, Pleurotelol, Acido pleurotelico, Omphalone, Fulvoferruginin

<b>Diterpenoides</b>	<i>Cyathus, Crinipellis</i>	Citotóxica, antifúngica, antibacteriana	Estriatin, Pleuromutilin, Cavipetin
<b>Acetilenos</b>	<i>Marasmius, Clitocybe, Coprinus, Pleurotus, Merulius</i>	Antibacterial, antifúngica, cototóxica.	Escorodonin
<b>Glicolípidos</b>	<i>Ustilago, Schizonella</i>	Antimicrobiana, citotóxica	Schizonellina
<b>Policetonas</b>	<i>Merilius, Phlebia</i>	Antimicrobiana, hemolítica	Ácido merulínico
<b>Nucleósidos</b>	<i>Clitocybe, Lentinus</i>	Antibacteriana, antiviral	Nebularin
<b>Sales de diazonio</b>	<i>Agaricus xanthodermus</i>	Antibacteriana, citotóxica	Agaridin

Fuente: Brizuela, García, Pérez & Mansur, 1998

#### 1.2.4. Aromas.

Los cultivos miceliares de basidiomicetos son una fuente potencial de sustancias aromáticas, algunos de estos compuestos presentan a su vez actividad antifúngica y pueden definir la función de los hongos como antagonistas ante otros microorganismos. Otros de estos compuestos son inductores de la germinación, crecimiento micelial o de la fructificación (Gross & Asther, 1989).

Algunos aromas obtenidos a partir de micelios de basidiomicetos crecidos en medios sintéticos se muestran en la Tabla 2. Los aromas en general se clasifican según su grupo químico. Los compuestos de anillo bencénico son numerosos, presentando propiedades aromáticas interesantes para la industria alimentaria, y su metabolismo está relacionado fundamentalmente con las propiedades ligninolíticas de los basidiomicetos (Wood, 1988).

**Tabla 2.** Aromas asignados a micelios de basidiomicetos cultivados en medio sintético.

Olor	Especie	Olor	Especie
Aliáceo	<i>Marasmius alliaceus</i>	Cítrico, limón	<i>Poria xantha</i>
Benzaldehído, aromático	<i>Poliperos benzoinus</i>	Manzana	<i>Daedalea quercina</i> , <i>Polyporus betulinus</i>
Laurel, cereza	<i>Fomes scutellatus</i> <i>Polyporus abducens</i> <i>Polyporus frondosus</i>	Perfumado	<i>Pleurotus sapidus</i> , <i>Stereum sanguinolentum</i>
Anisado	<i>Polyporus schweintzii</i> , <i>Trametes suaveloens</i>	Perfumado, terpenico, vainilla	<i>Bjerkandera adusta</i>
Anisado, bálsamo del Perú	<i>Lentinus lepideux</i>	Agua de colonia	<i>Poria cocos</i>
Frutal	<i>Phellinus igniarius</i> <i>Phellinus laevigatus</i> <i>Phellinus tremulae</i> <i>Poria aurea</i>	Narciso	<i>Polyporus coccreus</i>
Floral	<i>Pleurotus enosmus</i>	Vainilla	<i>Stereum Murayi</i>
Frutal, plátano	<i>Stereum rugosum</i>	Rosa, anís, frutal	<i>Trametes odorata</i>

Fuente: Brizuela et al. 1998

### 1.2.5. Enzimas e inhibidores.

Matsui en 1986 obtuvo un nuevo tipo de bilirrubina-oxidasa a partir de *Trachyderma tsunodae*, esta enzima permite la determinación cuantitativa de bilirrubina en fluidos biológicos obteniendo mejores resultados a los obtenidos mediante determinación química. Otras cepas pertenecientes a los géneros *Auricularia*, *Coprinus*, *Lentinus*, *Oudemansiella* y *Poria* producen una enzima colesterol oxidasa diferente a las conocidas hasta el momento y es empleada en laboratorios clínicos para la determinación enzimática de colesterol (Matsui, Yoshima & Taniguchi, 1986).

Los basidiomicetos además poseen la capacidad de producción de inhibidores de enzimas, de manera que aportan numerosas actividades farmacológicas beneficiosas. En 1990, Atsumi et al reporta que los cultivos filtrados del basidiomiceto *Phellinus* sp. muestran fuerte actividad inhibitoria frente a la  $\beta$ -glucosidasa, luego del aislamiento del principio activo se encontró un compuesto llamado cyclophelitol.

### **1.3. Cultivo de Hongos comestibles**

#### **1.3.1. Conceptos generales.**

Los hongos del género *Pleurotus* se han convertido en un producto comestible ampliamente reconocido en la industria alimenticia. Para la producción de estas setas existen una serie de etapas importantes industrialmente. El cultivo del hongo se inicia con la obtención de la cepa, desarrollada en un medio de cultivo apropiado; posteriormente la producción de inóculo; más tarde la preparación y tratamiento del sustrato, en el cual se sembrará el inóculo y, por último, la siembra y producción del hongo. La ventaja que tiene este cultivo es que utiliza desechos de las actividades productivas agropecuarias, generalmente de fácil obtención y bajo precios, para la producción de un alimento nutritivo y beneficioso para la salud. Las especies de hongos más cultivadas a más de *Pleurotus ostreatus* o *P. djamor* en el mundo son el *Agaricus bisporus* también llamado champiñón, y especies del género *Lentinula edodes* conocido como shiitake (Gaitán et al. 2006).

#### **1.3.2. Importancia del cultivo de *Pleurotus* spp.**

*Pleurotus* spp. se ha cultivado con fines comerciales por menos de 30 años, destacándose por una rápida aceptación en el mercado y un crecimiento elevado de la agroindustria relacionada. Actualmente, el cultivo de este género disputa con *Lentinula edodes* el segundo lugar en producción mundial, solo después de *Agaricus bisporus*. La razón de este crecimiento es que las especies de este género tienen una calidad organoléptica excelente, crecen sobre una gran diversidad de sustratos en un amplio rango de temperaturas y son fáciles de cultivar. En efecto, el hecho de que para la preparación del sustrato no se requiera un proceso de composteo complejo y prolongado, ni de la aplicación de tierra de cobertura al final del crecimiento micelial como lo demanda el *A. bisporus*, o que tampoco necesite una fase de oscurecimiento ni de inmersión en agua como en el caso del *L. edodes*, hacen que su cultivo sea tal vez el más

sencillo de todos los macromicetos conocidos. Por otra parte, el potencial que tiene este hongo en procesos de biorremediación, parece muy prometedor (Gaitán et al. 2006).

Los hongos comestibles son una fuente natural de nutrientes, poseen agua, hidratos de carbono, lípidos y proteínas que contienen nueve de los aminoácidos esenciales para el hombre, incluidas lisina y metionina. También son fuente de vitaminas, minerales y aportan de 150 a 350 calorías por kilogramo. Los hongos comestibles satisfacen en gran medida las necesidades proteicas y nutricionales más importantes (por su contenido en proteínas, grasas, vitaminas y carbohidratos), lo que constituye una esperanza para solucionar el hambre en el mundo, en función de su bajo costo de producción, alto contenido proteico y su obtención en grandes cantidades en un corto lapso de tiempo. Por ser una fuente alimentaria de excelente sabor y de alta calidad nutritiva, se consideran ideales en muchos programas de seguridad alimentaria (cultivos destinados a satisfacer las necesidades de nutrición en comunidades pobres). Además, tienen propiedades biológicas como un alto contenido de fibra y bajo contenido de grasa, adecuadas para las dietas alimentarias. Desde el punto de vista bioquímico y ecológico, la importancia de los hongos radica en el complejo sistema enzimático que posee, el cual les permite, según la especie, degradar moléculas de alto peso molecular como la celulosa, la lignina, la quitina, etc. Estas moléculas son normalmente difíciles de degradar *in vitro* por las vías químicas, enzimáticas o microbianas conocidas hasta ahora, sin embargo el sistema metabólico de estos hongos les permite degradar esos compuestos, de los que obtienen energía para sus procesos vitales y metabólicos para su nutrición (Sánchez & Royse, 2001).

### **1.3.3. *Pleurotus djamor***

#### **1.3.3.1. *Características macroscópicas.***

Posee fructificaciones carnosas, píleo de 3 a 8 cm de ancho, a veces algo lobulado, color blanquecino a café-amarillento claro o parduzco-grisáceo, principalmente en el centro; superficie lisa, láminas bien definidas. Estípite algo lateral, muy corto sin presencia de velo. Contexto blanquecino, con sabor y olor semejante a harina fermentada o tortillas acedas. Crece en conjuntos sobre troncos podridos, a veces sobre árboles vivos, en lugares soleados (Guzmán, 1977).

Sánchez & Royse (2001) menciona que en la parte inferior del píleo hay unas láminas dispuestas radialmente, que van desde el pie o tallo que lo sostiene hasta el borde, son anchas, espaciadas unas de otras, blancas o crema, a veces bifurcadas, y en ellas se producen las esporas destinadas a la reproducción de la especie. Estas esporas son pequeñas, oblongas, casi cilíndricas, que en gran número forman masas de polvo o esporadas, de color blanco con cierto tono lila-grisáceo.

#### **1.3.3.2. Características miceliares.**

Micelio blanco; al principio longitudinal, que al ir madurando se torna algodonoso. La mayoría de las cepas desarrollan tonos rosados fuertes cuando el micelio es maduro y alrededor de los sitios de formación del primordios. Los primordios son blanco o rosa, formando a menudo colonias en racimo a lo largo de la periferia en el interior de la caja de Petri y/o alrededor de la inoculación (Guzmán, 1977).

#### **1.3.3.3. Hábitat.**

Pueden crecer en forma aislada sobre una superficie horizontal o en grupo formando repisas laterales superpuestas sobre un costado de los árboles. La carne de la seta es blanca, de olor algo fuerte al principio y después correosa. El hábitat es en grupos superpuestos sobre tocones erectos o caídos; otoñales pero puede hallarse en otras épocas del año (Sánchez & Royse, 2001).

#### **1.3.4. Factores ambientales para el crecimiento.**

Los hongos, como otros organismos, necesitan para su crecimiento condiciones específicas de temperatura, humedad, pH, luz y aireación. Para cada uno de estos factores, existe un rango delimitado por un punto mínimo y un punto máximo, bajo y sobre los cuales no habrá crecimiento.

##### *a. Temperatura.*

La temperatura es un factor que afecta el metabolismo de las células e influye en la capacidad enzimática del organismo. *Pleurotus* es un género que puede crecer en un rango amplio de temperaturas. La mayoría de hongos son mesófilos, por lo que crecen a temperaturas entre 5 y

40°C. Generalmente el rango de temperatura óptima se encuentra entre 25 y 33°C para el crecimiento miceliar y a 28°C para la formación de basidiocarpos (Sánchez & Royse, 2001).

*b. pH.*

El pH del medio de cultivo donde crece un hongo influye directamente porque incide en el carácter iónico del medio; es decir, actúa sobre las proteínas de la membrana afectando directamente el metabolismo. Los hongos tienen un rango amplio de pH en el que pueden crecer, pero la mayoría de ellos prefieren un medio ácido para su desarrollo. Para el crecimiento de *Pleurotus* se han citado rangos de pH entre 4 y 7, con un óptimo entre 5 y 6 y para la fructificación entre 6,5 a 7.0. Si el pH del sustrato donde crece un hongo no es el adecuado, aunque las condiciones de temperatura y nutrientes sean óptimas, el crecimiento se verá afectado (Sánchez & Royse, 2001).

*c. Humedad.*

El contenido de humedad en el sustrato es importante porque de este depende la disponibilidad de nutrientes y oxígeno. El contenido óptimo de humedad depende, a más de la especie de hongo que se cultiva, del tipo de sustrato utilizado. Es así, que cada sustrato tiene una capacidad de retención de agua diferente por lo que la humedad óptima de crecimiento también será diferente. El crecimiento máximo del micelio de la mayoría de especies de *Pleurotus* ocurre a una humedad relativa entre 60-95% (Sánchez & Royse, 2001).

*d. Luz.*

Aunque se requiere luz para el crecimiento del micelio, cierta cantidad es esencial para la esporulación en muchas especies. La luz también juega un papel importante en la dispersión de las esporas, ya que las estructuras encargadas de expulsarlas en muchos hongos son fototróficas. Se requiere de exposiciones a la luz para ayudar a la formación de basidiocarpos. Por otra parte, algunas especies requieren de oscuridad total para lograr el crecimiento de basidiocarpos. En general, las especies de *Pleurotus* para crecimiento miceliar requieren oscuridad y para la fructificación requieren luz de longitudes de onda corta, aproximadamente 150-200 lux (Sánchez & Royse, 2001).

### 1.3.5. Propiedades nutricionales de las setas.

Los hongos comestibles satisfacen en gran medida las necesidades proteicas y nutricionales más importantes, por su contenido en proteínas, grasas, vitaminas y carbohidratos, lo que constituye una posible alternativa para solucionar el hambre en el mundo, en función de su bajo costo, alto contenido proteico y la obtención de grandes cantidades en un corto lapso de tiempo (Tabla 3).

**Tabla 3.** Composición nutricional de *Pleurotus spp.* (mg de aminoácidos en 100 g de proteína cruda)

	<b>Contenido mg/100 mg</b>	<b>Componente</b>	<b>Contenido mg/100 mg</b>
<b>Vitamina C</b>	30-144	Niacina	109
<b>Isoleucina</b>	267	Ácido fólico	65
<b>Leucina</b>	610	Cistina	29
<b>Lisina</b>	287	Fenilamina	233
<b>Metionina</b>	97	Tirosina	189
<b>Triptófano</b>	87	Glicina	281
<b>Valina</b>	310	Prolina	287
<b>Arginina</b>	334	Serina	309
<b>Histidina</b>	107	Tronina	290
<b>Potasio</b>	306	Acido aspártico	570
<b>Acido glutámico</b>	1041	Alanina	402

Fuente: Sánchez & Royse, 2001

#### **1.3.5.1. Carbohidratos.**

Dentro de los carbohidratos que contienen dichos hongos, se encuentran pentosas, hexosas, sacarosa, azúcares ácidos, metilpentosas y aminoazúcares como la quitina (Sánchez & Royse, 2001).

#### **1.3.5.2. Proteínas.**

Los diferentes valores de proteínas en los hongos dependen del tipo de tejido, estado de desarrollo, sustrato utilizado e inclusive a veces del método de análisis utilizado. Los hongos normalmente contienen entre 19-35% de proteína, los basidiocarpos son una excelente fuente de proteína debido a la presencia de aminoácidos esenciales ricos en leucina y lisina (Fierro, 2005).

#### **1.3.5.3. Vitaminas.**

Todos los hongos suelen ser una fuente importante de vitaminas, como la tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina, biotina y ácido ascórbico (vitamina C) (Sánchez & Royse, 2001).

#### **1.3.5.4. Minerales.**

Los hongos absorben todos los minerales que contiene el sustrato donde son cultivados, por lo general contienen buena cantidad de fósforo y potasio, y calcio en menor cantidad. Además en *Pleurotus* spp. se han encontrado buenas cantidades de zinc, cobre y magnesio (Sánchez & Royse, 2001).

### **1.3.6. Propiedades medicinales de las setas.**

#### **1.3.6.1. Acción antitumoral.**

Estudios recientes han demostrado que algunas variedades de hongos comestibles contienen cantidades importantes de polisacáridos de estructura molecular compleja, a los cuales se les ha encontrado una capacidad antitumoral, es decir, se ha comprobado a nivel de laboratorio que estas sustancias son capaces de retardar y disminuir el tamaño de algunos tumores, además de prevenir su formación. El mecanismo consiste en que estos polisacáridos actúan

como potenciadores de las células de defensa que posteriormente destruyen las células cancerosas sin ocasionar efectos colaterales al enfermo (Ramos, G. 2007).

### 1.3.6.2. Acción antiinflamatoria.

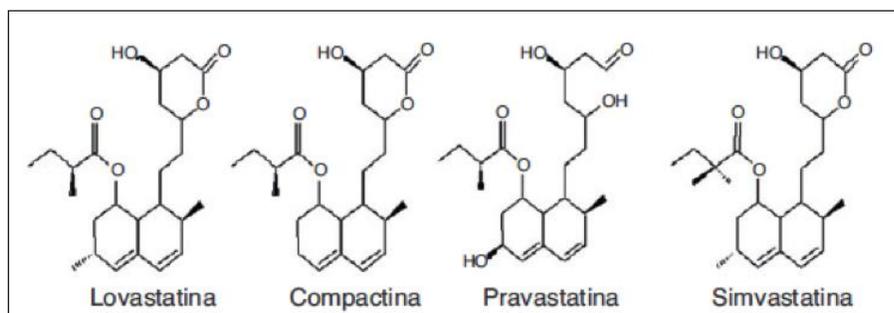
Se han realizado estudios en donde se aislaron glicopeptidos (lectinas) que contienen aminoácidos ácidos con glucosa, arabinosa, manosa y xilosa, en la cadena de carbohidratos, con excelente capacidad fungicida y antibiótica. Estos compuestos se han aislado de *Pleurotus japonicus*, *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus cornucopiae* (Ramos, G. 2007).

### 1.3.6.3. Acción antioxidante.

Los hongos de pudrición blanca, es decir hongos que crecen en troncos de madera, a los que pertenece los *Pleurotus* sp. o setas, poseen sustancias con propiedades antioxidantes, por lo que pueden constituir una fuente potencial de bio-antioxidantes (Ramos, G. 2007).

### 1.3.6.4. Regulador del colesterol.

A nivel experimental, se ha demostrado en ratas de laboratorio que el consumo frecuente de setas disminuye el nivel de ácidos grasos en sangre y el colesterol en el hígado, por otro lado en estos experimentos se detectó un aumento en la relación fosfolípidos-colesterol lo cual sugiere un efecto antiteratogénico favorable, es decir que puede ayudar a prevenir el endurecimiento de las arterias y por lo tanto la prevención de posibles enfermedades cardiovasculares. De los basidiocarpos de *P. ostreatus* se ha aislado una sustancia llamada Lovastatin o Lovastatina (Figura 3) cuyo uso ha sido aprobado por la FDA y se utiliza como principio activo de diferentes medicamentos para el tratamiento de hipercolesterolemia (Ramos, G. 2007).



**Figura 3.** Estructura de las estatinas de origen fúngico  
**Fuente:** Suarez y Nieto, 2013.

#### 1.4. Producción mundial de hongos comestibles

*Pleurotus* spp. se cultiva en países de Europa y América. Una de las razones del incremento en la popularidad de este género es la habilidad de este hongo para crecer en una amplia variedad de materias primas agrícolas. En el Trópico, el hongo ostra, o setas, como se le llama también en México, puede ser producido sobre una mezcla de aserrín y salvado de arroz, salvado y rastrojo de arroz, aserrín y otras combinaciones de materiales tropicales como olote de maíz, cáscara de semilla y ramas de algodón, bagazo y hojas de caña, tallos y hojas de maíz, pastos, cáscara de arroz, lirio acuático, entre otros (Quimio, 1986; Quimio, Chang & Royse, 1990). Muchos otros sustratos pueden ser utilizados, dependiendo de la disponibilidad de los mismos en cada región.

En el año 2007, se reportó que la importancia ecológica del cultivo de hongos comestibles, principalmente champiñón y setas (*Pleurotus*), radica en el uso y reciclaje de más de 474 000 toneladas de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales; siendo México el mayor productor de hongos en Latinoamérica, generando alrededor de 58.9% de la producción total por lo que se ubica en el puesto 16 como productor a nivel mundial. Se estimó que los volúmenes de producción ascienden a 47 468 t anuales de hongos frescos, además con esta actividad se generaron alrededor de 25 mil empleos directos e indirectos, dando un monto anual de operaciones comerciales que superó los 200 millones de dólares (Martínez-Carrera, Morales, Sobal, Bonilla & Martínez, 2007).

En China, Japón y otros países asiáticos, los hongos son utilizados como medicina tradicional y alimentos funcionales; por lo que en la actualidad las setas se investigan por sus propiedades alimenticias y la posibilidad para obtener productos farmacéuticos. El interés ha crecido en torno a la obtención de componentes bioactivos a partir de hongos, por sus propiedades y usos como fuentes naturales de antioxidantes, antitumorales, antivirales, antimicrobianos y agentes inmunomoduladores. Entre los componentes bioactivos, los polisacáridos obtenidos de hongos del género *Pleurotus*, tienen gran importancia, actualmente se encuentran en investigación para tratamientos contra el cáncer. Entre los polisacáridos que componen la pared celular de los hongos del género *Pleurotus* se encuentran la quitina y una matriz compuesta de  $\beta$ -glucano,  $\alpha$ -glucano y glicoproteínas (Xu, Yan, Chen & Zhang, 2011; Zhang, Cui, Cheung & Wang, 2007).

La mayor parte de la producción de los Estados Unidos se hace con rastrojo de trigo picado, con cáscara de semilla de algodón o con mezclas de ambos. El cultivo de *Pleurotus* spp. adquiere cada vez más interés en los países de América. No existen estadísticas oficiales al respecto, sin embargo, es cultivado en Cuba, Colombia, Guatemala, Venezuela y Brasil. Por otra parte, se sabe que ha habido intentos por desarrollarlo o que existen pequeñas empresas de producción variable en El Salvador, Perú, Ecuador y en general en aquellos países donde se cultiva *Agaricus bisporus* (Argentina, Costa Rica). Dada la extrema facilidad para cultivar este género, es previsible que su producción se siga incrementando en los años venideros y que se inicie en otros países no citados ahora; sin embargo, la falta de una tradición por el consumo de los hongos comestibles probablemente hará que este incremento sea lento (Sánchez & Royse, 2001).

## **1.6. Métodos de crecimiento, separación y análisis**

### **1.6.1. Cultivos para fructificación.**

Se utiliza un método de cultivo sobre y dentro de las partículas de la matriz sólida (sustrato sólido), donde el líquido contenido, ligado con este, está a un nivel correspondiente de forma que la actividad del agua asegure el contenido de crecimiento y metabolismo de las células, pero no excediendo en la capacidad máxima de tenencia de agua en la matriz sólida. A continuación se presentan algunas ventajas y desventajas del cultivo a base de sustratos agrícolas (Ramos, G., 2007).

#### **1.6.1.1. Ventajas**

- Las condiciones de crecimiento del hongo son similares a su hábitat natural.
- Los bajos niveles de humedad reducen los niveles de contaminación.
- La aireación es facilitada por los espacios entre partículas de la fibra y de la mezcla.
- El medio es simple y no genera residuos.
- Menor costo de inversión.

#### **1.6.1.2. Desventajas**

- La baja disponibilidad de agua permite el desarrollo de mohos, excluyendo el uso potencial de bacterias y levaduras.

- La fermentación de materiales a gran escala plantea serios problemas para el control de temperatura, pH, humedad y concentración de gases.

#### **1.6.1.3. Inóculo primario.**

Se denomina inóculo primario o semilla a la forma en que el micelio del hongo es inoculado en un sistema productivo, es decir, la semilla es el vehículo de transporte del micelio desde el medio de cultivo in vitro hasta el sustrato definitivo donde crecerá el hongo. Para la preparación de la semilla, se utilizan granos de cereal, siendo más comúnmente empleados el trigo y sorgo. La selección de granos consiste en elegir aquellos que se encuentren limpios, de buena calidad, sin residuos de productos químicos o contaminados con otros hongos o insectos. Es preferible utilizar granos que provengan de siembras libres de aplicaciones de fungicidas, ya que sus residuos pueden inhibir el crecimiento del hongo. El factor más importante a considerar en la elección del grano, es la capacidad del micelio del hongo para crecer en él, otros son la disponibilidad, el costo y la facilidad de preparación (Sánchez & Royse, 2001).

#### **1.6.1.4. Sustrato.**

Los hongos del género *Pleurotus*, toman los nutrientes necesarios para su alimentación de los materiales sobre los que crecen. Tienen la capacidad de degradar celulosa y lignina presentes en diversos residuos agrícolas (pajas, rastrojos), desechos agroindustriales (bagazos de caña de azúcar, pulpa de café), y/o forestales (aserrín y viruta de diversas maderas). Algunas veces, es recomendable hacer una combinación de sustratos en diferente proporción, para incrementar la producción de hongos. La selección del sustrato de cultivo dependerá, principalmente, de las exigencias nutricionales del hongo y de su disponibilidad (Sánchez & Royse, 2001).

Como sustrato se puede emplear una gran variedad de residuos lignocelulósicos, entre ellos pajas de cereales y residuos agroindustriales, como también subproductos de la industria maderera y madera sólida. En este último caso, se debe evitar especies resinosas o de alta durabilidad natural, pues pueden generar un producto de gusto fuerte y desagradable, o dificultar el crecimiento del hongo (Gaitán et al. 2006).

- Bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*)

El bagazo es el producto final obtenido después de la molienda de la caña de azúcar y está formado por partículas de tamaño variable. Físicamente está constituido por fibra o bagazo, sólidos solubles e insolubles, cenizas y agua. La fibra cruda o bagazo está compuesto por celulosa 52%, hemicelulosa 29% y lignina 19% (Sánchez, 1997).

a. Celulosa.

La celulosa es un homopolímero de cadena lineal formado por moléculas de glucosa con alto peso molecular formado por unidades de D-glucosa con uniones 1-4 glucosídicas. La molécula es alargada y plana, sin ramificaciones, identificando químicamente tres tipos de celulosa: alfa, beta y delta-celulosa (Leal, 1985).

b. Hemicelulosa.

Está formada de heteropolímeros altamente ramificados y generalmente no cristalino. Contiene azúcares tales como pentosas (D-xilosa, L-arabinosa), hexosas (D-galactosa, L-galactosa, D-manosa, L-arabinosa, L-fucosa) y ácidos urónicos (ácido D-glucorónico) y puede contener diversas modificaciones tales como acetilaciones o metilaciones (Lucas et al. 2001).

c. Lignina.

Es un polímero estructural de las plantas vasculares formadas por unidades de fenil propano; proporciona a las plantas rigidez y unión entre sus células, además de disminuir la permeabilidad del agua a través de las paredes celulares y proteger a las células de invasiones por microorganismos. La lignina es un polímero aromático heterogéneo a diferencia de la mayoría de los polímeros que constituyen la pared celular. Las unidades de fenilpropano están enlazadas al azar mediante diferentes tipos de enlaces (Lucas et al. 2001).

- Tallo de plátano (*Musa paradisiaca*).

El plátano (*Musa paradisiaca*) es una fruta tropical de alto consumo en nuestro país. La práctica agronómica del corte de la planta de plátano para el crecimiento de otra, genera día a día grandes cantidades de residuos que son descartados cerca de las orillas de los ríos o quebradas y en los caminos, causando un problema ambiental. Es importante aprovechar el

potencial que tiene el residuo de hojas de plátano para la producción de enzimas peroxidasas, las cuales tienen muchas aplicaciones, principalmente su utilización como sustrato para el crecimiento de algunas especies de hongos, por ejemplo, *L. crinitus*, *P. djamor*, *P. ostreatus*, entre otros. Los residuos de la cosecha de plátano son en su mayoría hojas y tallos, las cuales contienen niveles importantes de ligninocelulosa y gran cantidad de micronutrientes. Estas propiedades hacen de estos residuos, sustratos eficientes para el crecimiento de algunos hongos basidiomicetos, especialmente hongos de la podredumbre blanca, los cuales producen enzimas ligninolíticas capaces de degradar completamente la lignina, polímero conformado por p-hidroxi-cinnamil alcohol (Granda, Mejía & Jiménez, 2005).

#### **1.6.1.5. Incubación.**

El objetivo de la etapa de incubación es proporcionar al hongo las condiciones necesarias para que invada el sustrato (colonización) lo más rápido posible. Estas condiciones son de 25 a 28°C de temperatura, humedad 70-80%, oscuridad y bajo intercambio gaseoso (Flores & Arias, 2006).

El sustrato una vez colocado en recipientes o bolsas plásticas, es llevado a incubación, permitiendo el desarrollo del hongo al interior de él (Sánchez & Royse, 2001). La etapa de incubación termina cuando el sustrato se encuentra completamente colonizado por el micelio, lo cual se nota por el color blanco que adquiere. En condiciones óptimas, la colonización completa se logra en unas 4 semanas (Guarín & Ramírez, 2004).

#### **1.6.1.6. Fructificación y cosecha.**

En esta etapa se induce la formación de basidiocarpos. Para ello se entregan estímulos al hongo, tales como cambios bruscos de luz, temperatura y aireación, lo que desencadena un proceso irreversible de inducción de formación de primordios que posteriormente formarán los *basidiocarpos* (Sánchez & Royse, 2001).

En la producción de los basidiocarpos, es importante mantener la humedad ambiental entre 80 y 90%, si la humedad es inferior los basidiocarpos se deshidratan y los bordes se parten, en cambio, si la humedad excesiva pueden atacar bacterias y los hongos se vuelven blandos, frágiles o amarillentos (Flores & Arias, 2006; Michel, Otero & Díaz, 2010).

Los primeros basidiocarpos se cosechan alrededor de 7 días después de la aparición de los primordios. La cosecha se realiza en forma manual, cortando el estípite empleando un cuchillo previamente desinfectado. El corte se realiza justo en la base, en la unión con el sustrato, sin dañarlos y sin producir hoyos en el sustrato. Después de la primera cosecha, se humedece y se mantienen en las condiciones descritas, hasta que después de 7 a 14 días se vuelve a producir una segunda oleada o cosecha. Se pueden producir de 2 a 4 oleadas, pero la producción de cada una de ellas es cada vez menor, siendo más importantes, las dos primeras (Gaitán et al. 2006).

#### **1.6.1.7. Plagas y enfermedades.**

Los contaminantes aparecen por lo general en la fase de incubación y esto es debido principalmente a una mala preparación del sustrato, al mal manejo del mismo o a la falta de asepsia en el momento de la siembra. Los contaminantes generalmente son hongos (mohos), bacterias y levaduras siendo los de mayor importancia los hongos como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Mycogone* y *Coprinus*, entre otros. Estos hongos aparecen en forma de manchas verdes, amarillentas, negras y/o anaranjadas sobre el sustrato, invadiéndolo de forma rápida y evitando el crecimiento miceliar de las setas. Su presencia se ve favorecida por la alta humedad en el ambiente y en el sustrato, así como por alta temperatura, luz directa y sustrato mal esterilizado, entre otros. Las plagas las constituyen insectos que atacan a los cultivos tanto en incubación como en el área de producción, atraídos por el olor del sustrato, estos insectos son los dípteros del género *Lycoriella* que ponen sus huevecillos en el sustrato donde en un principio se alimentan del micelio del hongo y después de las fructificaciones adultas. Otros insectos comunes en los cultivos de setas son pequeños escarabajos de los géneros *Mycotretus* y *Pseudyschirus* que se comen los hongos en desarrollo. Las enfermedades que se manifiestan en las fructificaciones son causadas en gran medida por bacterias y virus. Estos microorganismos se propagan rápidamente a través del agua, insectos o utensilios sucios, por lo que su tratamiento y control es realmente difícil. Las enfermedades se favorecen con la humedad excesiva, el calor y una escasa ventilación, provocando que en los píleos de los hongos aparezcan zonas de color amarillo, anaranjado o café, que se pudren con rapidez y despiden mal olor, afectando los rendimientos de producción. Una de las principales bacterias que causan estas manchas en las fructificaciones son las *Pseudomonas* (Gaitán et al. 2006).

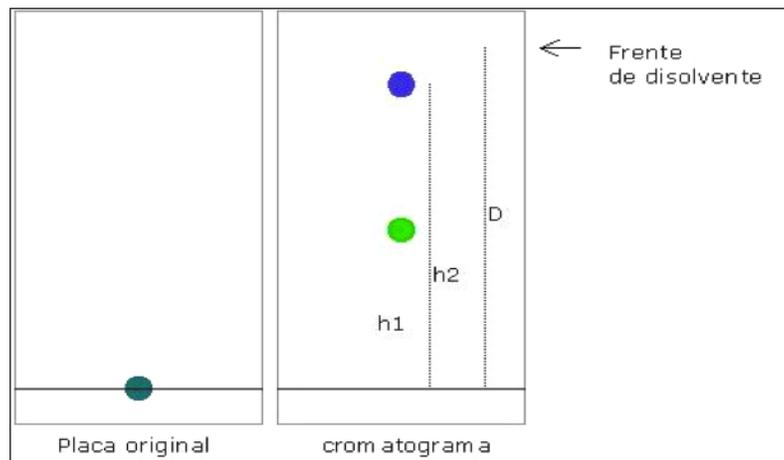
### **1.6.2. Cromatografía en capa fina (CCF).**

La cromatografía en capa fina es una técnica analítica que consiste en la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, una fase estacionaria y una fase móvil, obteniéndose como resultado la retención de los componentes de la mezcla a diferentes distancias del punto de partida (Figura 4). La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. En la cromatografía en fase normal, la fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares (Abbott & Andrews, 1970).

Se realiza en placas de vidrio o plástico recubiertos con una capa delgada de partículas finamente divididas contenidas en la fase estacionaria. El mecanismo predominante es la adsorción. Los materiales más usados han sido: gel de sílice, alúmina, celita, poliamidas. Para la fase móvil, el disolvente a utilizar debe reunir una serie de características: inerte frente a los componentes de la muestra y de la fase estacionaria, elevada pureza, adecuada viscosidad y tensión superficial, bajo punto de ebullición para facilitar el secado de las placas, económico, baja inflamabilidad y toxicidad (Harris, 2001).

#### **1.6.2.1. Fundamento.**

La muestra a analizar se deposita cerca de un extremo de una lámina de plástico o aluminio que previamente ha sido recubierta de una fina capa de adsorbente (fase estacionaria). Entonces, la lámina se coloca en una cubeta cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil). A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente. Antes de que el frente del disolvente llegue al otro extremo de la placa, se retira, se deja secar y se observa (Hammond, 1999).



**Figura 4.** Desplazamiento y separación de una mezcla a través de una placa  
**Fuente:** Valcárcel, 1988

### 1.6.2.2. Factor de retención.

La relación entre la distancia recorrida por un compuesto y por el disolvente desde el origen se conoce como  $R_f$  (rate factor). El valor  $R_f$  depende de las condiciones en las cuales se corre la muestra (tipo de adsorbente, eluyente, así como las condiciones de la placa, temperatura, vapor de saturación) (Bates & Schaefer, 1977).

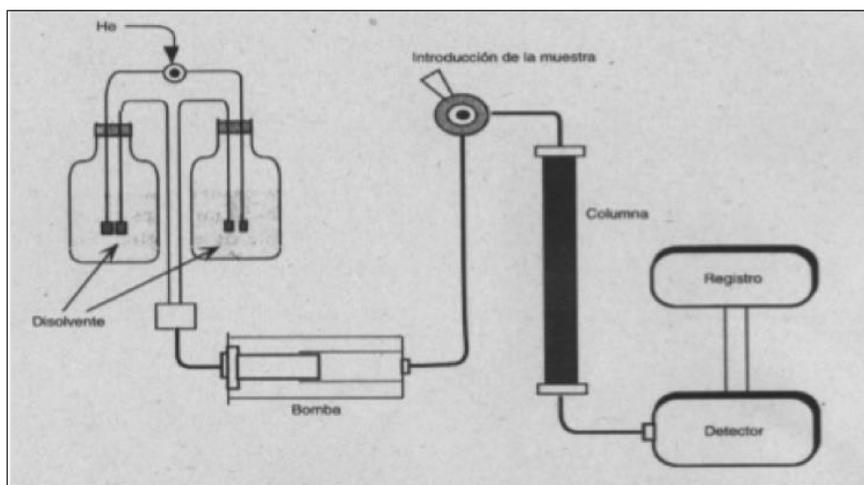
### 1.6.3. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

La cromatografía es un método físico de separación, basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase estacionaria. La cromatografía líquida se lleva a cabo en una columna de vidrio. Después se coloca la muestra por la parte superior y se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Para aumentar la eficiencia en las separaciones, en la cromatografía de alta resolución; el tamaño de las partículas de fase fija se disminuye hasta los micrones, usando altas presiones para lograr que la fase móvil pueda fluir (Harris, 2001).

#### 1.6.3.1. Fundamento.

La Cromatografía de líquidos, es una técnica de análisis químico ampliamente utilizada, la cual permite separar físicamente y cuantitativamente los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla. Consta de dos fases, una fija que

suele llamarse fase estacionaria, y una fase móvil que fluye permanente durante el análisis, y que en este caso es un líquido. La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes; algo importantes es que deben ser grado HPLC, esto implica un 99% o más de pureza para evitar contaminantes que puedan interferir en la elución de la muestra o bien que contengan algunas pequeñas partículas que puedan tapar la columna; por lo que es necesario filtrarlos antes de que entren a la columna. Los componentes de la mezcla interaccionan de distinta forma con la fase estacionaria y la fase móvil a distintas velocidades y se van separando según su polaridad. La bomba envía el disolvente hacia la válvula inyectora que es una válvula de seis vías que permite introducir al disolvente, la muestra contenida en el loop de volumen calibrado. Luego de que se produzca la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan al detector, el cual da una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia; esta señal es enviada al registrador que a su vez da un cromatograma de intensidad en función del tiempo; en el cual, lo ideal es obtener picos gaussianos los cuales corresponden cada uno a un componente diferente de la muestra (Harris, 2001). En la Figura 5 se indican los componentes principales de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución.



**Figura 5.** Partes fundamentales de un sistema HPLC  
**Fuente:** Hernández & González, 2002

### **1.6.3.2. Columnas cromatográficas.**

Las columnas cromatográficas consisten en un número de zonas adyacentes en cada una de las cuales hay suficiente espacio para que un analito esté en equilibrio entre dos fases. En las columnas cromatográficas es donde se produce la velocidad diferencial de los solutos que permite su separación. El material de las columnas cromatográficas suele ser de acero

inoxidable cuya longitud varía de 5 a 30 cm y un diámetro de 1 a 5 mm. La eficacia de las columnas aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. El tamaño típico de las partículas es de 3-10  $\mu\text{m}$  (Harris, 2001).

Las columnas son caras y se degradan con facilidad, por eso, se protege la entrada de la columna con otra más corta, la *precolumna*, que retiene por adsorción las impurezas de forma irreversible. No es necesario el control estricto de la temperatura de la columna, pero las separaciones resultan más reproducibles cuando la temperatura se mantiene constante. Los instrumentos comerciales modernos están equipados con calentadores que regulan la temperatura de la columna (Harris, 2001).

### **1.6.3.3. Inyector.**

Los volúmenes de muestra que se inyectan deberán ser pequeños para evitar la sobrecarga de la columna. Hay varios tipos:

#### *a. Jeringa de alta presión*

El método más simple es la utilización de una jeringa de alta presión con un diafragma ("septum") a la entrada de la columna. Está limitado a una presión máxima de operación de 1500 psi.

#### *b. Válvulas de inyección*

Las válvulas de inyección con bucles de volumen conocido, es el método más utilizado (Harris, 2001).

### **1.6.3.4. Bombas.**

Debido a las elevadas presiones de trabajo y al pequeño tamaño de las partículas de la fase estacionaria, se utiliza una bomba que es la encargada de introducir la fase móvil o disolvente a través de la columna.

Los sistemas de bombeo deben reunir las siguientes características (Hernández & González, 2002):

- Generar presiones superiores a 6000 psi.

- Capaces de cubrir un amplio rango de flujo entre 0,1 y 10 ml/min con una precisión del 0,5% y que esté libre de pulsaciones.
- Construidos con materiales inertes respecto a los disolventes empleados.

Las bombas empleadas en HPLC son de tres tipos:

*a. Bombas recíprocas o de vaivén*

Son las más utilizadas y están formadas por una pequeña cámara cilíndrica que se llena y luego se vacía por oscilación de un pistón de zafiro. El bombeo produce un flujo pulsado que después debe amortiguarse. Sus principales ventajas son que se consiguen presiones elevadas y se suministra un caudal constante, pudiéndose adaptar a la técnica de elución con gradiente, debido a su pequeño volumen interno (Skoog et al. 2001).

*b. Bombas neumáticas o de presión constante*

Hacen uso de la presión de un gas aplicado al recipiente conteniendo la fase móvil. Son sencillas, no provocan pulsaciones pero están limitadas a presiones relativamente bajas. (Hernández & González, 2002).

*c. Bombas de desplazamiento o tipo jeringa*

Consisten en una cámara equipada con un mecanismo de tornillo y suministran un flujo libre de pulsaciones pero con una capacidad limitada a unos 250 ml (Harris, 2001).

**1.6.3.5. Detector.**

El papel del detector es indicar los momentos de aparición de los componentes y proporcionar indicación cuantitativa y cualitativa de los mismos. El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá reunir una serie de características como son, tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad, amplio margen de respuesta lineal, insensible a cambios en la presión y la temperatura (Hernández & González, 2002).

El detector se coloca al final de las columnas, responde a la concentración del soluto y se registra en función del tiempo, generando una serie de picos y un gráfico que se denomina

cromatograma. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra.

En CLAR existen dos tipos básicos de detectores:

- Los basados en una propiedad de la disolución.
- Los basados en una propiedad del soluto

Algunos de los detectores más usados son: detectores de absorbancia, detectores de fluorescencia, detectores de índice de refracción, detector de dispersión de luz, detectores electroquímicos, detectores por espectrometría de masas. El integrador calcula el área de cada pico, la cual se puede relacionar con la concentración del componente si se tiene una curva patrón; si no se cuenta con ella, sólo sería cualitativa. Debido a que los detectores que se usan en estos equipos no son destructivos, es posible recuperar los productos que salen de él, y de esta manera realizar otro tipo de separaciones analíticas (Hernández & González, 2002).

#### **1.6.3.6. Disolventes utilizados en CLAR.**

Se deben emplear disolventes de pureza cromatográfica, compatibles con el detector utilizado y además presenten transparencia óptica. Es importante ajustar la fase móvil para conseguir la retención y resolución deseadas. Los disolventes más usados en HPLC son agua, disoluciones tampón acuosas y disolventes orgánicos como el metanol. Deben ser espectroscópicamente puros, exentos de partículas sólidas y desgasificados, esto se lleva a cabo con un gas inerte muy poco soluble como el helio. Como fase estacionaria lo más común es usar partículas microporosas esféricas de sílice muy puro, que son permeables al disolvente (Harris, 2001).

#### **1.6.3.7. Condiciones de elución.**

En función de la composición de la fase móvil inyectada a la columna, la elución de moléculas puede ser de dos tipos: isocrática y en gradiente. La *elución isocrática* se lleva a cabo con un único disolvente o una mezcla de disolventes fija, es decir, los compuestos eluyen usando una fase móvil de composición constante durante toda la cromatografía. Todos los compuestos acaban migrando a través de la columna hasta el final. Sin embargo, cada uno migra con una velocidad diferente, resultando en una relación de elución más rápida o más lenta. Si un disolvente no permite una elución suficientemente rápida de todos los componentes, se puede

usar una *elución gradiente*. En este caso, se van añadiendo cantidades crecientes del disolvente B al disolvente A produciendo un gradiente continuo, es decir, los diferentes compuestos son eluidos modificando gradualmente la composición de la fase móvil durante el transcurso de la cromatografía (aumentando la fuerza iónica, modificando la polaridad, etc.). El resultado sobre la elución es un acortamiento de los tiempos de retención, el factor de retención disminuye conforme aumenta la variación de flujo del gradiente y el compuesto eluye. Este gradiente puede llevarse a cabo de forma lineal, escalonada o linealmente escalonada (Hernández & González, 2002).

#### **1.6.4. Concentración mínima inhibitoria (CMI).**

La concentración mínima inhibitoria se define como la concentración más baja de una sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación. Es un método utilizado en los laboratorios de diagnóstico principalmente para confirmar la resistencia, pero más a menudo como una herramienta de investigación para determinar la actividad in vitro de nuevos antimicrobianos (Andrews, 2001). En la técnica de microdilución en caldo se utilizan tubos o placas que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El microorganismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las placas y la concentración mínima inhibitoria se determina después de la incubación (Wilkinson, 2007)

Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar la CMI en un gran número de muestras y una ventaja radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales, además permite diferenciar entre un efecto bacteriostático o bactericida (Langfield et al. 2004).

La técnica de microdilución se realiza en placas de 96 pocillos, en cada una se estudia un mismo microorganismo, 9 sustancias o extractos, un control positivo, un control negativo y un control de esterilidad. Estas se sellan para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se sometan a incubación, posteriormente se observa la turbidez que indica si existe o no crecimiento del microorganismo, el pocillo que contenga la menor concentración del agente que inhibe completamente el crecimiento define la CMI (Gil et al. 1999)

En los bioensayos de actividad antibacteriana se deben tener en cuenta algunos aspectos:

- El panel de microorganismos a evaluar siempre debe tener dentro de la batería, microorganismos gram positivos y gram negativos. Las cepas ATCC son bien caracterizadas, aunque también se pueden utilizar aislamientos clínicos. El inóculo se recomienda que este en el rango de  $10^5$  y  $10^6$  ufc/ml (Cos, Vlietinck, Vanden, Berghe & Maes, 2006)
- La concentración de los extractos a evaluar no debe exceder el rango de 1 mg/ml para extractos y 0.1 mg/ml para compuestos aislados (Ríos & Recio, 2005).

**CAPÍTULO II**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1. Cepa *Pleurotus djamor*

El hongo *Pleurotus djamor* fue recolectado en la provincia de Zamora Chinchipe y formó parte del proyecto PROY\_QUI\_817. “Recolección, caracterización y evaluación del potencial farmacológico de actinomicetos y basidiomicetos en la Región Sur del Ecuador”, financiado por la UTPL en el año 2014. *P. djamor* se aisló en agar papa dextrosa (PDA) constituyéndose en la cepa (*P. djamor* BC007) de la cual se realizaron resiembras en placas de agar YNPD (Anexo 1) y agar sabouraud. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 24 horas y posteriormente mantenidas a temperatura ambiente (18-20°C).

## 2.2. Velocidad de crecimiento

La evaluación de la velocidad de crecimiento de *Pleurotus djamor* se realizó en dos medios de cultivo líquidos: YNPD y MEM detallados en el Anexo 1. El experimento se realizó por triplicado y los factores a tener en cuenta en el proceso fueron: temperatura ambiente, pH y nutrientes. Inicialmente se inocularon 10 frascos con 50 ml de medio YNPD cada uno, 5 frascos se inocularon a partir de crecimiento miceliar de placas en agar YNPD y 5 frascos a partir de crecimiento miceliar en caldo sabouraud (SDB), posteriormente se incubaron a temperatura ambiente y 200 rpm. Se tomó dos cultivos (de cada inóculo) a las 72, 96, 120, 144 y 168 horas de incubación. De cada cultivo se tomaron 3 muestras de 10 mL, se colocaron en tubos de centrifuga previamente pesados y etiquetados, centrifugados a 3.000 r.p.m. por 10 minutos; se eliminó el sobrenadante y se colocó en la estufa a una temperatura de 105 °C durante 1 hora, se colocaron los tubos en el desecador durante 15 minutos y se anotó los pesos correspondientes. Se repitió el procedimiento de secado hasta estabilización del peso. En la Figura 6 se resume el procedimiento utilizado.

El resultado obtenido se expresó como gramos de muestra seca por cada litro de medio decultivo, de acuerdo a la fórmula descrita a continuación (Arnáiz, Isac & Lebrato, 2000):

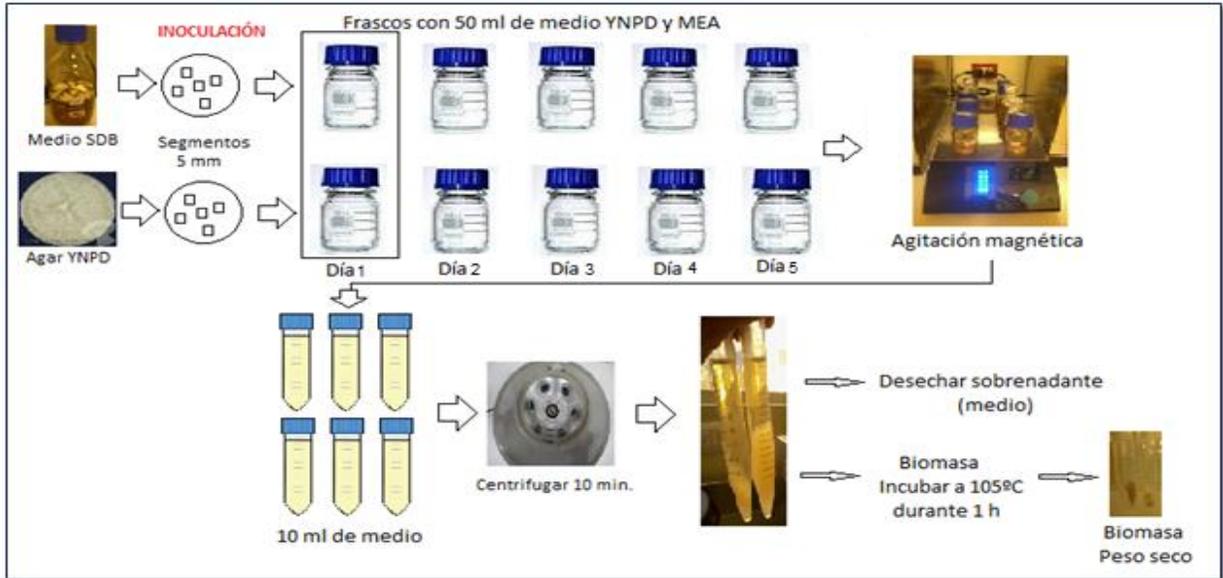
$$\text{Peso seco} \left( \frac{g}{mL} \right) = \frac{Ps - Pv}{Vm}$$

Donde:

**Ps**= peso seco (muestra seca + tubo).

**Pv**= peso del tubo vacío.

**Vm**= volumen de la muestra.



**Figura 6.** Esquema del proceso de velocidad de crecimiento por peso seco  
**Fuente:** Autora

### 2.2.1. Crecimiento exponencial.

Si se define el tiempo de generación como el tiempo necesario para que la población en estudio se duplique, entonces se tiene que el tiempo de generación es (Castillo & Rodas, 2007):

$$Tg = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde:

**Tg**= tiempo de generación

**μ**= velocidad volumétrica (g/Lh)

### 2.2.2. Velocidad volumétrica de producción de biomasa por peso seco.

La velocidad de producción implica la medición del crecimiento y mantenimiento celular, y, la formación de productos a partir de un cultivo cerrado. Para determinar la velocidad de producción se emplea la siguiente ecuación (Castillo & Rodas, 2007):

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} = \frac{d \ln X}{dt}$$

Donde:

$\mu$ = velocidad volumétrica (g/Lh)

$x_2$ = gramos de biomasa en tiempo final

$x_1$ = gramos de biomasa en tiempo inicial

$t_1$ = tiempo inicial

$t_2$ = tiempo final

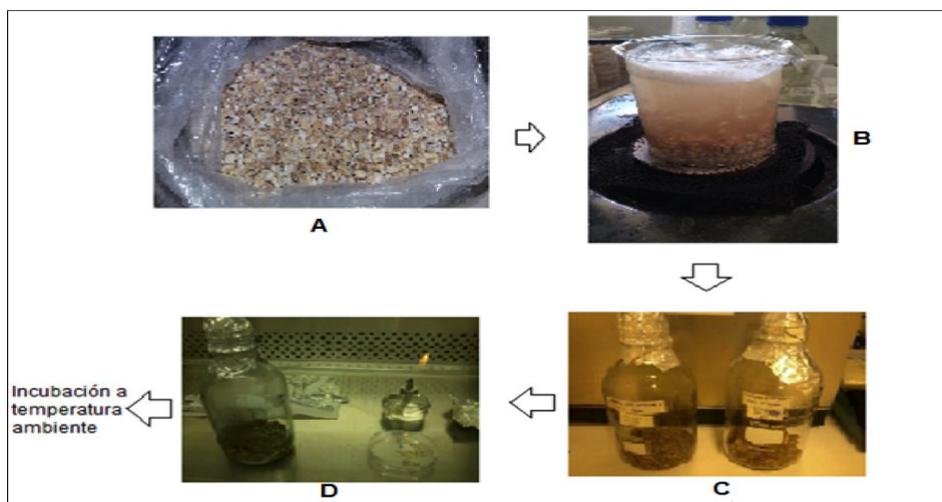
$\frac{dx}{dt}$  = velocidad volumétrica de biomasa

## 2.3. Cultivos para Fructificación

### 2.3.1. Preparación del inóculo primario.

El inóculo primario se preparó en granos de trigo, ya que es un tipo de cereal que posee múltiples nutrientes que ayudan al óptimo crecimiento del micelio. El procedimiento seguido se realizó a partir del trabajo de Romero et al. (2010), con algunas modificaciones que se detallan a continuación: se pesó 50 g de granos de trigo pelado en un vaso de vidrio, se lavó y se colocó 500 ml de agua destilada, posteriormente se llevó a ebullición durante 20 min. Una vez frío se colocó en un frasco Boeco de 1000 ml, se suplementó con 0,5 g de CaO y 2 g de CaSO<sub>4</sub> y se esterilizó a 121°C durante 30 minutos. Posteriormente se procedió con la inoculación a partir de micelio obtenido de medio de cultivo YNPD en una cabina de flujo laminar, se mezcló de manera homogénea y se incubó a temperatura ambiente hasta observar la colonización

completa en todo el trigo. El proceso de preparación del inóculo primario se resume en la Figura 7.



**Figura 7.** Proceso de preparación del inóculo primario  
Granos de trigo (A) Ebullición 20 min. (B) Esterilización 121°C por 30 min. (C) e Inoculación (D)  
Fuente: Autora

### 2.3.2. Preparación del sustrato.

Los sustratos de cultivo empleados fueron bagazo de caña de azúcar y tallo de plátano (Figura 8) recolectados en los cantones Catamayo y Malacatos, respectivamente. Los dos sustratos fueron sometidos primeramente a una fase de lavado, posteriormente cortado y triturado en trozos de 2,5 cm (en el caso del tallo de plátano), luego se hidrataron con agua destilada durante 1 hora, se dejó escurrir para eliminar el exceso de agua, se colocaron en frascos de vidrio de boca ancha y se esterilizaron a 121°C durante 30 minutos. Una vez fríos se colocaron en bolsas ziploc previamente esterilizadas en luz UV y, al igual que en la preparación del inóculo, se suplemento con 0,5 g de óxido de calcio y 2 g de sulfato de calcio. Se tomó una pequeña cantidad de cada sustrato para realizar la determinación de humedad, antes de colocar los suplementos. Se pesó el contenido de sustrato de cada bolsa y los datos se registraron para los posteriores cálculos de producción.



**Figura 8.** Sustratos utilizados  
Tallos de plátano (A) y bagazo de caña de azúcar (B).  
**Fuente:** Autora

#### ***2.3.2.1. Determinación de la humedad del trigo y los sustratos.***

Se determinó la humedad calculando la pérdida de peso al secar los granos de trigo, el bagazo de caña de azúcar y el tallo de plátano, para lo cual se tomó muestras del inóculo preparado para sembrar y de los sustratos listos para la inoculación. El proceso se realizó por triplicado y consistió en colocar aproximadamente 1 g de cada una de las muestras en cápsulas previamente taradas. Las cápsulas con las muestras fueron colocadas en la lámpara ULTRA X por 15 minutos y posteriormente se colocaron en el desecador por 15 minutos más. Se repitió el proceso por 3 veces hasta que se obtuvo un peso constante. El cálculo se realizó de acuerdo a la fórmula descrita en el Anexo 2, cuyo resultado se expresa en porcentaje.

#### **2.3.3. Inoculación en los sustratos.**

Los sustratos esterilizados se colocaron en bolsas plásticas estériles y para la inoculación se procedió a tomar una cantidad considerable de inóculo primario, cuando este se encontraba totalmente colonizando los granos de trigo, lo cual se observó mediante un color blanco en todo el recipiente. El proceso se realizó en una cabina de flujo laminar clase II, con el fin de evitar contaminación de los cultivos. Se tomó aproximadamente 25 g de inóculo primario y se mezcló completamente en los sustratos (Figura 9).



**Figura 9.** Inoculación en el sustrato  
**Fuente:** Autora

Todos los cultivos se desarrollaron siguiendo el mismo procedimiento de preparación, utilizando como sustratos bagazo de caña y tallo de plátano. La preparación de los cultivos en los sustratos se detalla en la Tabla 4:

**Tabla 4.** Cultivos preparados en diferentes sustratos

Cultivo	Sustrato	Cantidad (g)	Código
1	Bagazo de caña 5mm 100%	250	BC1
2	Tallo de plátano 5mm 100%	400	HP1
3	Bagazo de caña (5mm) 50%-Tallo de plátano (2,5cm) 50%	300 (150-150)	BC-HP
4	Tallo de plátano 2,5cm 100%	400	HP2

**Fuente:** Autora

#### 2.3.4. Incubación.

Finalmente se llevó los cultivos sólidos a incubación a temperatura ambiente, durante el tiempo necesario hasta la completa colonización del hongo en el sustrato, esto se observó cuando el sustrato se torna de color blanco. Una vez que el micelio coloniza el sustrato se colocan a una temperatura entre 25°C y 30°C, de preferencia 27°C, se abren las fundas para la oxigenación de los cultivos, hasta que se observó la formación de los primordios. Para mantener la humedad del sustrato se roció agua destilada tres veces durante el día, el rango fue de 70-90%.

### **2.3.5. Fructificación.**

Para la formación de los basidiocarpos se mantuvo los cultivos a una temperatura de 27°C. Inicialmente se observó la aparición de los primordios y posteriormente el desarrollo de los basidiocarpos.

### **2.3.6. Cosecha.**

La etapa de cosecha se realizó mediante la utilización de tijeras y bisturí estériles, para evitar la contaminación de los cultivos. El corte se realizó en la base del basidiocarpo y se colocó en papel aluminio para el pesado (peso fresco en g).

El proceso empleado para la fructificación de *Pleurotus djamor* se detalla en el Anexo 3.

### **2.3.7. Parámetros de producción**

La producción de un cultivo se evalúa mediante algunos parámetros, como la eficiencia biológica (%EB), tasa de producción (%TP) y rendimiento (%R), los mismos que determinan la rentabilidad y eficacia de los cultivos.

#### **2.3.7.1. Eficiencia biológica (%EB).**

La eficiencia biológica consiste en la producción de basidiocarpos, es decir, en la bioconversión de la energía y la biodegradación del sustrato. Se expresa en porcentaje y la fórmula para el cálculo es la siguiente (Sánchez & Royse, 2001):

$$EB = \frac{\text{Peso de los basidiocarpos frescos}}{\text{Peso del sustrato seco}} \times 100$$

#### **2.3.7.2. Tasa de producción (%TP).**

La tasa de producción es la relación que existe entre la eficiencia biológica y el tiempo en días desde la inoculación hasta la cosecha de basidiocarpos. La fórmula es la siguiente (Sánchez & Royse, 2001):

$$TP = \frac{EB}{\text{Días requeridos para la cosecha}}$$

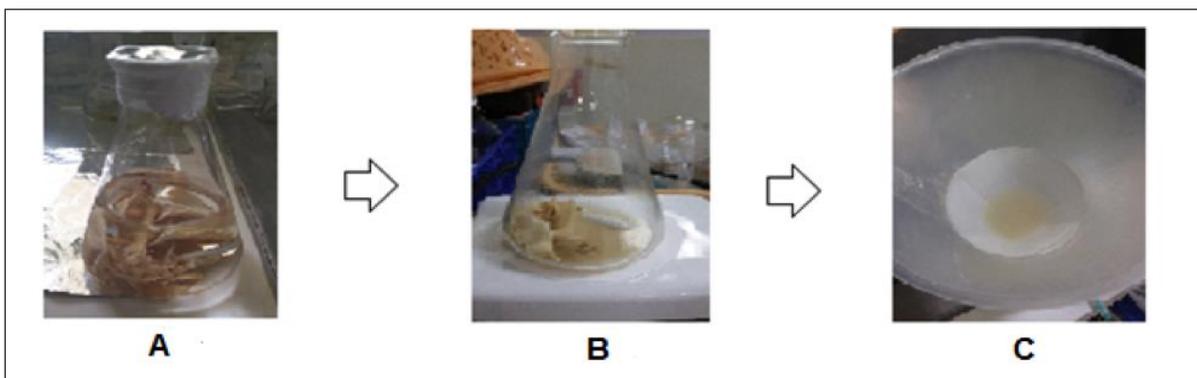
### 2.3.7.3. Rendimiento (%R).

Se define como la relación entre el peso fresco del hongo y el peso del sustrato húmedo. El rendimiento se expresa en porcentaje y se calcula con la siguiente fórmula (Ramos, 2007):

$$R = \frac{\text{Peso fresco del hongo}}{\text{Peso del sustrato húmedo}} \times 100$$

### 2.3.8. Obtención de extracto de basidiocarpos.

Los basidiocarpos cosechados fueron secados en una estufa a 30°C por 12 horas, una vez secos se pesaron para obtener el peso seco por diferencia de peso, posteriormente se colocaron en un recipiente con 400 ml de acetona y se llevaron a agitación orbital a 200 rpm durante 12 horas. Al día siguiente se procedió a filtrar el macerado (Figura 10), se concentró en un rotaevaporador; luego el concentrado se recuperó con cloroformo-metanol (9:1), se colocó en un vial previamente pesado y se lo seco con vacío. Una vez seco, se pesó y por diferencia de peso se obtuvo el peso del extracto.



**Figura 10.** Obtención de extracto de basidiocarpos. Basidiocarpos + acetona (A) Maceración (B) y Filtración (C)  
Fuente: Autora.

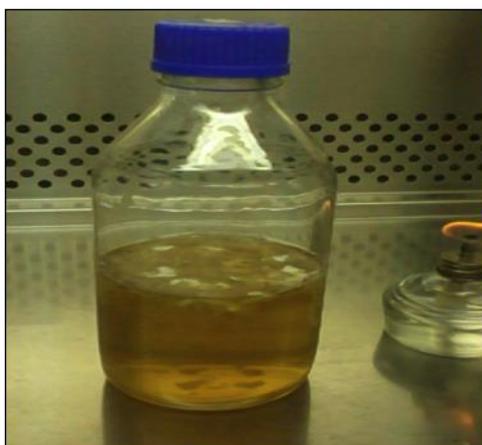
## 2.4. Cultivo en medio líquido

### 2.4.1. Preparación del medio de cultivo y siembra.

Para el cultivo en medio líquido se utilizó Sabouraud Dextrose Broth (SDB) y el procedimiento se realizó en dos fases:

**Fase 1:** se preparó dos matraces con 50 ml de medio de cultivo SDB cada uno, se esterilizo a 121°C durante 20 minutos. Una vez fríos, en la cabina de flujo laminar, se realizó la inoculación del hongo a partir de placa de agar YNPD, con una asa se tomó una cantidad de micelio y se inoculo en el medio varias veces, finalmente se incubo a temperatura ambiente hasta observar crecimiento e invasión completa del medio y posterior a ello pasarlos a frascos de 1L.

**Fase 2:** se preparó 500 ml de medio SDB y 500 ml de medio YNPD en frascos Boeco de 1000 ml, se esterilizo a 121°C durante 20 minutos. En la cabina de flujo laminar, una vez que estuvieron fríos, se procedió a realizar la siembra a partir de los matraces de medio SDB sembrados previamente. Se colocó el contenido de cada matraz en cada uno de los frascos de cultivo preparados, se incubo a temperatura ambiente hasta el observar la formación completa del micelio (Figura 11).

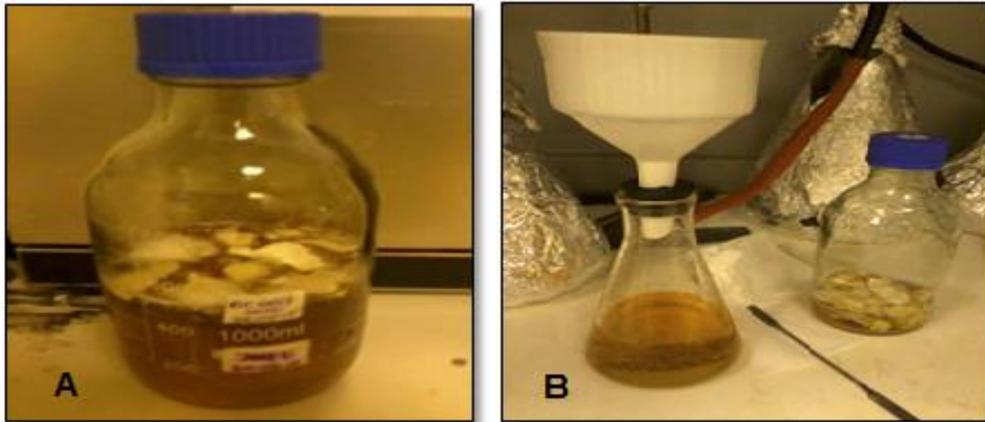


**Figura 11.** Siembra de *P. djamor* en medio YNPD  
Fuente: Autora

#### **2.4.2. Obtención del extracto de micelio.**

Una vez que el hongo se desarrolló completamente en el medio YNPD, se procedió a filtrar la biomasa o micelio (Figura 12) y el medio se llevó a congelación. La biomasa se pesó en un papel filtro previamente pesado, se obtuvo el peso húmedo de la misma y posteriormente, para el secado se llevó a la estufa a 30°C durante 12 horas. Una vez seco, se pesó el micelio nuevamente para obtener el peso seco, se colocó en un recipiente con 500 ml de acetona y se procedió a macerar mediante agitación orbital en el shaker a 200 rpm durante 12 horas. Al termino de este tiempo, se filtró el macerado y se concentró en el rotaevaporador a 30°C, el

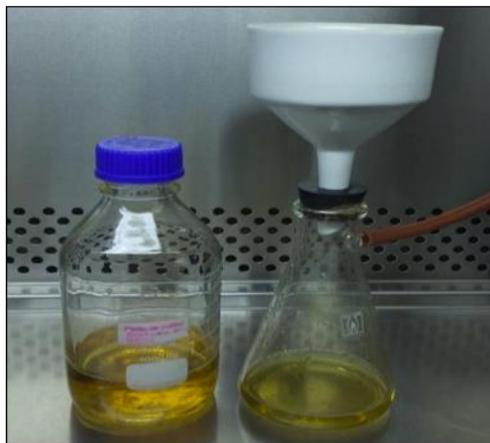
concentrado se recuperó con cloroformo-metanol (9:1), se colocó en un vial previamente pesado y se secó al vacío. Finalmente, una vez seco el extracto, se pesó nuevamente obteniéndose el peso seco del mismo.



**Figura 12.** Obtención del extracto de micelio  
Micelio en medio YNPD (1 mes) (A) y Filtrado al vacío del micelio (B)  
**Fuente:** Autora

#### 2.4.3. Obtención del extracto de medio de cultivo agotado.

Para la obtención del extracto a partir del medio de cultivo agotado primeramente se procedió a descongelar el medio, luego se filtró al vacío para eliminar cualquier resto de micelio (Figura 13).



**Figura 13.** Filtrado al vacío del medio de cultivo  
**Fuente:** Autora.

Una vez filtrado, se colocó resina de absorción Diaion® HP-20 (Supelco, USA) hasta la mitad del medio agotado y se llevó a agitación durante 12 horas en el Shaker a 70 rpm, para evitar que la resina se rompa. Luego se procedió a filtrar la resina al vacío, de manera que se eliminó totalmente cualquier residuo de agua, la resina se colocó en un frasco con 400 ml de acetona y se llevó a agitación en el Shaker a 100 rpm durante 12 horas y se filtró al vacío. Se colocó acetona en la resina y se repitió el proceso hasta que se observó que el solvente extrajo todos los compuestos de la resina, disminuyendo la coloración. Finalmente se concentró el solvente filtrado previamente en el rotaevaporador a 35°C. El concentrado final fue recuperado con una elución compuesta de metanol-cloroformo (9:1), se colocó en un vial de vidrio previamente pesado, se lo secó al vacío y se pesó nuevamente para obtener el peso seco de extracto crudo de medio de cultivo agotado.

Todos los extractos se mantuvieron tapados, sellados con papel parafilm y almacenados en refrigeración hasta la realización de los posteriores ensayos.

## 2.5. Cromatografía en capa fina (CCF)

Para la comparación de la riqueza metabólica de los tres extractos obtenidos: basidiocarpos, micelio y medio de cultivo agotado se utilizó cromatografía en capa fina (Figura 14), fase directa y fase inversa. Para la fase directa se empleó como fase móvil una elución compuesta de Hex-AcOEt (9:1 y 1:1) y para la fase inversa, MeOH-H<sub>2</sub>O (9:1 y 6:4) con las cuales se obtuvo la separación de los compuestos contenidos en cada extracto. Las placas fueron observadas a luz UV a longitud de onda de 254 nm y 365 nm.



**Figura 14.** Cromatografía en capa fina.  
**Fuente:** Autora

## **2.6. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)**

Para la valoración cualitativa del perfil metabólico de los extractos de acetona obtenidos, se empleó el equipo CLAR Waters modelo 2695 LC, con un sistema de bombas cuaternario. Los extractos se disolvieron en metanol grado HPLC (por sus siglas en inglés, *High Performance Liquid Chromatography*) a una concentración de 1mg/mL. Se utilizó el detector de arreglo de diodos (DAD) Waters modelo 996 con un barrido de longitud de onda desde 200 a 600 nm. La corrida cromatográfica se realizó en una columna empacada C18 (longitud 150 mm x 4,6 mm y porosidad 5 µm), de la casa comercial Supelco (USA). Se estableció un método que cumpla con los requerimientos para la separación adecuada de los metabolitos presentes en cada uno de los extractos de *P. djamor*, trabajando en modo gradiente MeOH:Agua (%v/v) grado HPLC y manteniendo constantes las siguientes condiciones: volumen de inyección de 20 µL, tiempo de corrida de 30 minutos, tiempo de lavado 10 minutos, flujo de 0,5 mL/min, presión de 300 bar y temperatura de 20°C.

Se utilizó el software Masslynx versión 4.1 para la comparación simultánea de los datos de los cromatogramas a diferentes longitudes de onda.

## **2.7. Actividad antibacteriana**

### **2.7.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI).**

Se evaluó la concentración mínima inhibitoria de los extractos obtenidos mediante el método de microdilución en caldo frente a siete bacterias patógenas de interés clínico, para lo cual se utilizó una concentración de cada extracto de 5mg/250µl diluido en Dimetilsulfóxido (DMSO).

El ensayo se realizó en la cabina de flujo laminar tipo II y se empleó cajas multipocillos (96 pocillos) estériles de fondo redondo y se procedió con la dilución doble seriada de manera que se obtuvo concentraciones de 1000 µg/ml a 7.81 µg/ml.

Para el ensayo de actividad antibacteriana se empleó medio de cultivo comercial Muller Hinton, como control positivo se usó Tetraciclina 500mg/100ml y como control negativo DMSO. Para la preparación del inoculó bacteriano, se inoculó 100 µl de cada una de las bacterias patógenas gram positivas y gram negativas contenidas en criotubos y conservadas en reserva criogénica a -82°C, en un volumen de 7 ml de los respectivos medios, tal como se muestra en la Tabla 5:

**Tabla 5.** Bacterias patógenas y caldos de cultivo para inoculación.

<b>BACTERIAS PATÓGENAS</b>			
<b>Bacterias Gram positivas</b>	<b>Caldo de cultivo</b>	<b>Bacterias Gram negativas</b>	<b>Caldo de cultivo</b>
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b> <b>ATCC 25923</b>	Soya tripticasa (TSC)	<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b> ATCC 9997	Soya tripticasa (TSC)
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b> <b>ATCC 29212</b>	Infusión cerebro-corazón (BHI)	<b><i>Pseudomona aeruginosa</i></b> ATCC 27853	Muller Hinton
		<b><i>Escherichia coli</i></b> ATCC 25922	Soya tripticasa (TSC)
		<b><i>Salmonella typhimurium</i></b> LT2	Oxoid
		<b><i>Proteus vulgaris</i></b> ATCC 8427	Muller Hinton

**Fuente:** Autora

Para la preparación del inóculo bacteriano, de cada bacteria se tomó 10 µl y se diluyó en 10 ml de medio Muller Hinton contenido en cubetas previamente etiquetadas, homogenizando con la micropipeta correctamente. En cada placa multipocillos se colocó inicialmente 100 µl de medio Muller Hinton en todos los pocillos, luego 80 µl más en la primera fila, a excepción del último pocillo. En los pocillos del 1 al 9 de las cajas se colocó 20 µl de cada extracto; 20 µl de Tetraciclina en el pocillo 10 (control positivo); 20 µl de DMSO en el pocillo 11 (control negativo) y en toda la columna del pocillo 12 se colocan directamente 100 µl de Muller Hinton de manera que se completan 200 µl (control de esterilidad). En los pocillos del 1 al 9 de la fila A que contenían un total de 200 µl (180 µl de medio + 20 µl de extracto) se realizó las diluciones seriadas con la ayuda de una micropipeta multicanal se pipeteo 10 veces para lograr una mezcla correcta, se tomó 100 µl de volumen y se colocó en los siguientes pocillos de la fila B, se pipeteo 10 veces nuevamente, se tomó 100 µl y se colocó en los pocillos de la fila C y así sucesivamente hasta la fila H en donde se desechan los últimos 100 µl.

Finalmente se tomó 100 µl de medio previamente inoculado con las bacterias patógenas en la respectivas cubetas y se colocó en todos los pocillos, menos en la fila 12 donde se realizó el control de esterilidad. Se realizó el mismo procedimiento en las filas 10 y 11.

Una vez terminado todo el procedimiento de microdilución, las cajas se sellaron con papel parafilm y se incubaron en las siguientes condiciones: temperatura 37°C durante 14 a 16 horas (Figura 15).



**Figura 15.** Concentración mínima inhibitoria  
Condiciones de incubación: 37°C durante 14-16h.  
**Fuente:** Autora

**CAPÍTULO III**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1. Velocidad de crecimiento**

Según Prosser (1995), el crecimiento celular es un incremento ordenado de los componentes celulares que involucra un aumento de biomasa. Griffin (1994), lo define en cambio, como un proceso balanceado que implica generalmente el mantenimiento más o menos constante de la composición química de un organismo, va acompañado de procesos de desarrollo y diferenciación, difiere de la simple acumulación de reservas, alargamiento o engrosamiento físico.

El crecimiento de un hongo varía según si se da en medio líquido o en medio sólido. En medio líquido en reposo crecen solo sobre la superficie; y si el medio es permanentemente agitado crecen en todo el volumen. En medio líquido agitado, los hongos suelen presentar un desarrollo similar al de otros organismos, y que consta de las siguientes fases: latencia, exponencial, declinación, estacionaria y muerte. La fase de latencia es una etapa de adaptación en la que no hay crecimiento aparente, sino más bien síntesis de los componentes celulares necesarios para iniciar la elongación celular. La fase exponencial es alcanzada cuando un hongo crece en medio líquido, después de que se ha adaptado al medio de cultivo y está en capacidad de aprovechar al máximo las condiciones que éste le ofrece. Durante esta etapa el hongo alcanzará la tasa de crecimiento máxima que el sustrato sobre el que crece le permite. La fase de declinación se presenta cuando la acumulación de los desechos del metabolismo del hongo alcanzan niveles que se vuelven limitantes para el crecimiento o porque alguno de los nutrientes escasea o se termina y por último, la fase estacionaria es el punto en el cual el crecimiento cesa, aún hay consumo de glucosa y otros nutrientes y se producen diversos tipos de enzimas autolíticas que conducen a la muerte del hongo (Sánchez & Royse, 2001).

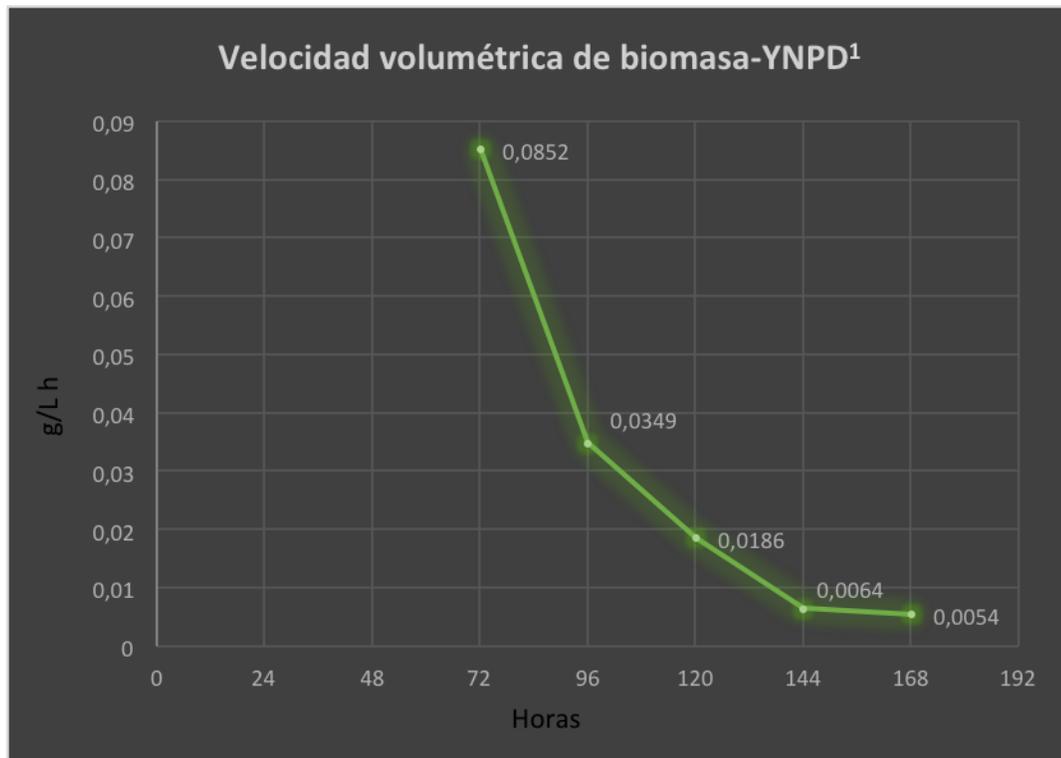
Para determinar la velocidad de crecimiento de *P. djamor* se evaluó tres parámetros, que fueron: nutrientes (YNPD y MEM), pH y temperatura.

#### **3.1.1. Velocidad volumétrica de biomasa por peso seco.**

##### **3.1.1.1. Velocidad volumétrica en medio YNPD.**

La velocidad volumétrica de biomasa obtenida por unidad de volumen (medios inoculados con micelio desarrollado en placa) se expresa como g/Lh. El peso seco del inóculo de micelio desarrollado en placa con agar YNPD fue de aproximadamente 0,2231 g. A partir del cálculo del

logaritmo natural de cada valor de biomasa obtenida a diferentes horas, se alcanzó un máximo de producción a las 72 horas con un valor de 0,085 g/Lh y disminuye hasta las 168 horas con un valor de 0,005 g/Lh, como se observa en la Figura 16. Cuando se inocula una cantidad conocida de una población en un medio con nutrientes estos crecen y se reproducen, de manera que pueden distinguirse las fases de desarrollo caracterizadas por variaciones de la velocidad de crecimiento con respecto al tiempo. La tasa de crecimiento es una característica muy importante y propia de cada hongo, que varía según las condiciones del medio (Sánchez & Royse, 2001).



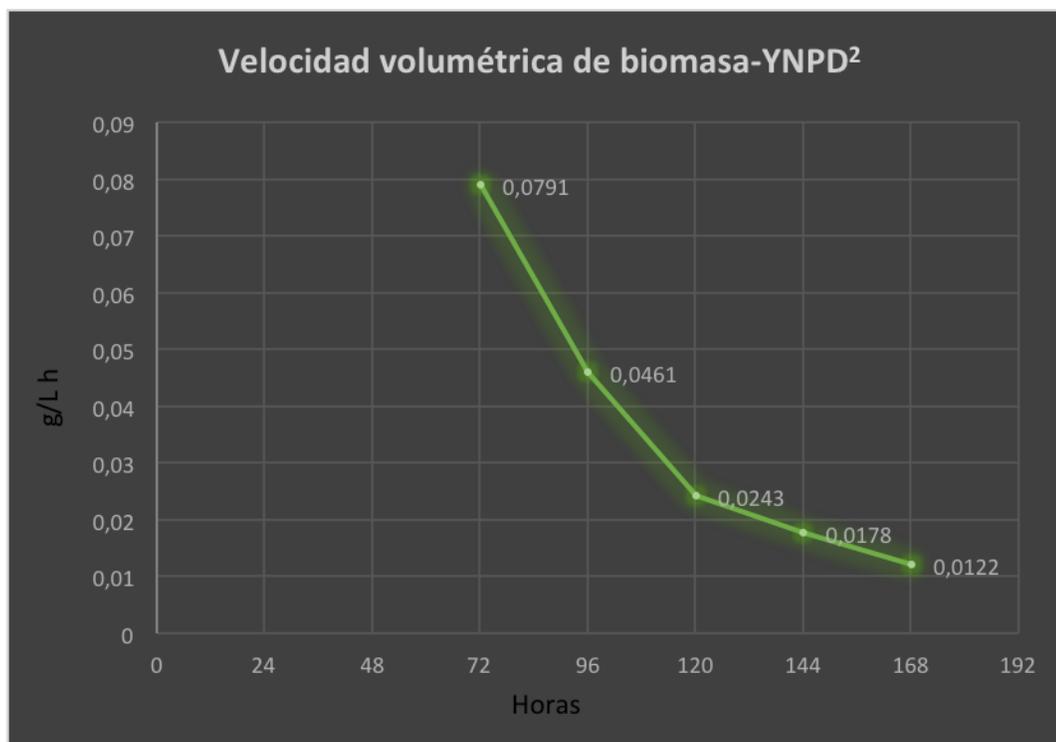
**Figura 16.** Velocidad volumétrica (g/Lh) de la biomasa de *Pleurotus djamor* en YNPD

<sup>1</sup>Inóculo: micelio desarrollado en placa

**Fuente:** Autora

Para los cultivos inoculados a partir de micelio desarrollado en medio líquido (peso seco de aproximadamente 0,1773 g), la velocidad volumétrica alcanza su máximo a las 72 horas con un valor de 0,079 g/Lh y disminuye de forma lineal hasta las 168 horas con un valor de 0,012 g/Lh, como se observa en la Figura 17. En medio YNPD inoculado a partir de micelio desarrollado en placa y medio líquido, la mayor velocidad de crecimiento se presenta a las 72 horas de cultivo. La diferencia entre los dos tipos de medio radica en que en los cultivos inoculados a partir de

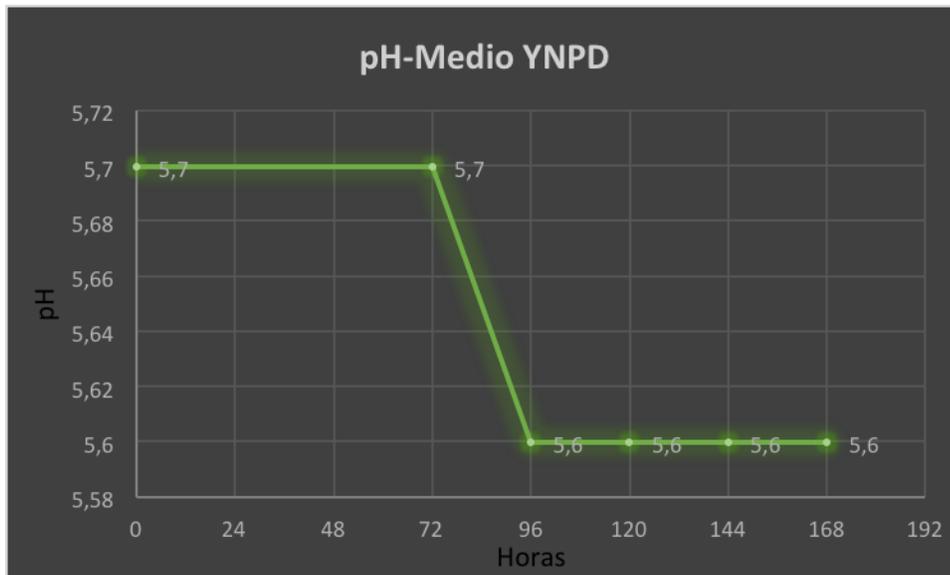
micelio desarrollado en placa existió mayor producción de biomasa mientras que en los cultivos inoculados a partir de micelio obtenido de medio de cultivo, la producción de biomasa fue menor.



**Figura 17.** Velocidad volumétrica (g/Lh) de la biomasa de *P. djamor* en YNPD<sup>2</sup>  
<sup>2</sup>Inóculo: micelio desarrollado en medio líquido  
**Fuente:** Autora

### 3.1.1.2. Variación de pH del medio YNPD

El potencial de hidrógeno del medio de cultivo donde crece un hongo tiene una influencia directa sobre éste, porque incide sobre el carácter iónico del medio e influye directamente sobre las proteínas de la membrana y sobre la actividad de las enzimas ligadas a la pared celular; es decir, afecta directamente su metabolismo. Para el crecimiento de *Pleurotus* se han citado rangos de crecimiento entre 4 y 7 de pH, con un óptimo entre 5 y 6 (Sánchez & Royse, 2001). Mientras que Rajarathnam & Bano (1989), citan valores de 6,5-7,0 para *P. djamor*. El pH inicial del medio YNPD fue de 5,72 y no presentó variaciones significativas a lo largo del cultivo, disminuyendo ligeramente de 5,7 a 5,6 (Figura 18):

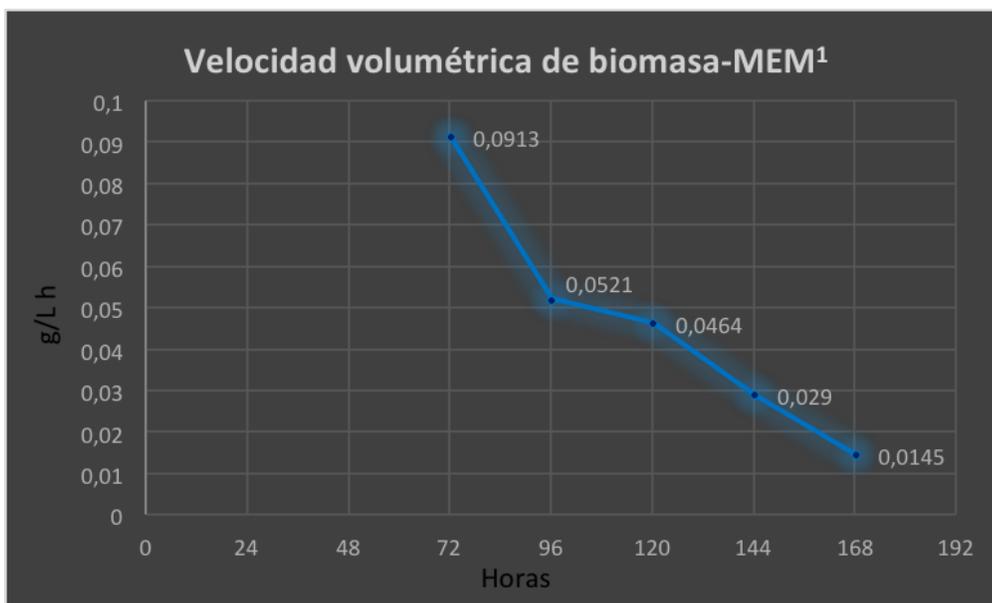


**Figura 18.** Curva de variación de pH del medio YNPD  
**Fuente:** Autora.

El pH inicial del medio se mantuvo estable durante los primeros días de cultivo del hongo en el medio, ya que como se muestra, en el día 1 el pH es de 5,7 y, además, no se evidenció ningún cambio en la coloración del medio de cultivo. En el día 2 existió un ligero descenso de pH de 5,7 a 5,6 -manteniéndose estable en este último valor hasta el día 5-.

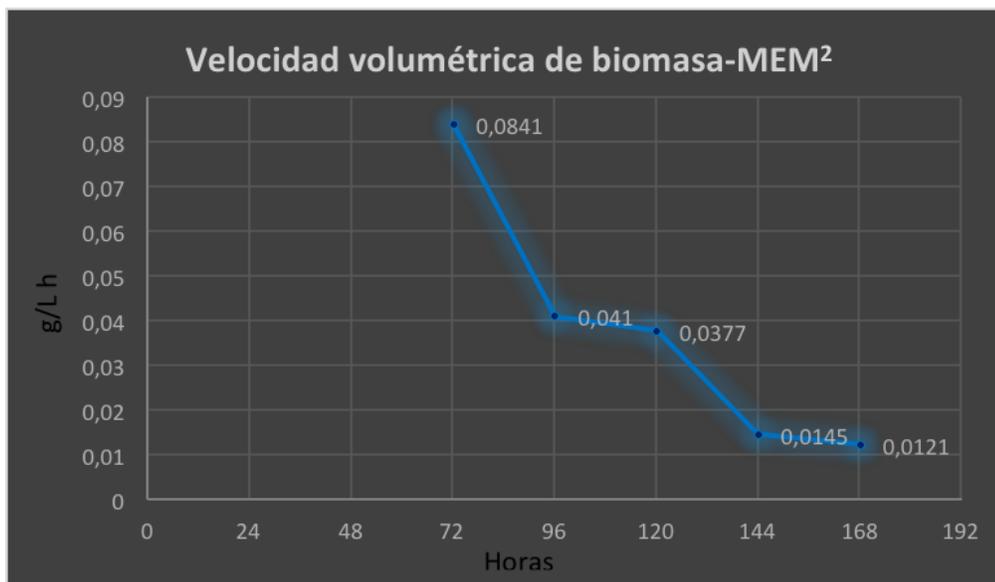
### **3.1.1.3. Velocidad volumétrica en Medio extracto de malta (MEM).**

En la Figura 19 se muestra la velocidad volumétrica de biomasa por unidad de volumen expresado como g/L h, obtenido a partir del cálculo del logaritmo natural de cada valor de biomasa a diferentes horas, para los cultivos inoculados a partir de micelio desarrollado en placa, en el cual alcanza su máximo a las 72 horas con un valor de 0,091 g/Lh y disminuye hasta las 168 horas con un valor de 0,014 g/Lh



**Figura 19.** Velocidad volumétrica (g/Lh) de la biomasa de *P. djamor* en medio extracto de malta  
<sup>1</sup>Inóculo: micelio desarrollado en placa  
**Fuente:** Autora

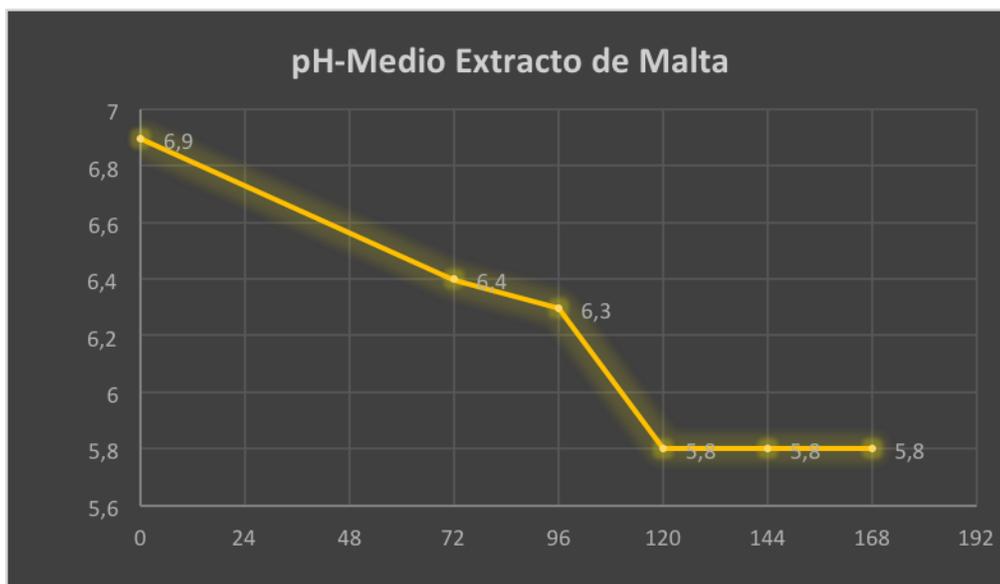
En la Figura 20 se observa que la velocidad volumétrica (g/Lh) para los cultivos inoculados a partir de micelio desarrollado en medio líquido, alcanza su máximo a las 72 horas con un valor de 0,084 g/Lh y disminuye de manera lineal hasta las 168 horas con un valor de 0,012 g/Lh.



**Figura 20.** Velocidad volumétrica (g/Lh) de la biomasa de *P. djamor* en medio extracto de malta  
<sup>2</sup>Inóculo: micelio desarrollado en medio líquido  
**Fuente:** Autora

#### 3.1.1.4. Variación de pH del MEM

El pH inicial del medio extracto de malta fue de 6.9, los valores de pH que presentó diariamente el cultivo se muestran en la Figura 21:



**Figura 21.** Curva de variación de pH en Medio extracto de malta

Fuente: Autora

El pH del medio presentó variaciones desde el día inicial hasta las 96 horas. A las 72 horas el pH disminuyó a 6,4; a las 96 horas a 6,3 y desde las 120 horas hasta las 168 horas se mantuvo en 5,8. La producción de biomasa en el medio extracto de malta fue mayor que en el medio YNPD, pues se reportan valores óptimos de pH para el crecimiento de *P. djamor*, entre 6.5 a 7.0 (Rajarathnam & Bano, 1989), por ende el pH del medio extracto de malta favorece un mayor crecimiento del hongo, a diferencia del pH del medio YNPD que se encuentra por debajo de 6.0.

#### 3.1.2. Tiempo de generación.

La velocidad de crecimiento exponencial se expresa como tiempo de generación ( $T_g$ ) y éste se define como el tiempo que tarda una población en duplicarse. Los tiempos de generación varían ampliamente entre los microorganismos, algunos crecen rápidamente (minutos) y otros tienen tiempos de generación de varias horas o días. Utilizando el logaritmo natural de 2 y los datos de la mayor velocidad volumétrica de biomasa obtenidos de los cultivos, en donde la velocidad de crecimiento es elevada, se calculó el tiempo de generación (Tabla 6).

**Tabla 6.** Tiempo de generación de *P. djamor* en medio YNPD y MEM

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Inóculo (fuente micelio)</b>	<b>Tiempo de generación (Tg)</b>
<b>YNPD</b>	Placa	8,15 horas
<b>YNPD</b>	Medio líquido	8,77 horas
<b>MEM</b>	Placa	7,61 horas
<b>MEM</b>	Medio líquido	8,55 horas

Fuente: Autora.

El menor tiempo de generación fue de 7,61 horas y se presentó en el cultivo de medio extracto de malta inoculado con micelio de placa, lo cual indica que en este tiempo se duplica el número de células y se presenta una mayor velocidad de crecimiento, mientras que, el mayor tiempo de generación fue 8,77 para el cultivo en medio YNPD inoculado con micelio de medio líquido.

### **3.2. Cultivos para fructificación**

#### **3.2.1. Inóculo primario.**

Para el desarrollo del inóculo primario se empleó semillas de trigo pelado y sin pelar suplementados con CaO y CaSO<sub>4</sub>. Empleando trigo pelado, se obtuvo una colonización más rápida del micelio a diferencia del trigo sin pelar cuya colonización se desarrolló más lentamente.

Esto debido a la mayor humedad captada por el trigo pelado durante el pre-tratamiento del mismo. La humedad del trigo pelado fue de 61% y del trigo sin pelar 37%; es decir, el trigo pelado absorbió una mayor cantidad de agua, manteniendo una humedad adecuada para el crecimiento y desarrollo del hongo. Según Sánchez & Royse (2001), esta es la fase más importante ya que su ejecución correcta evita semillas demasiado secas o muy húmedas que afectarán el crecimiento miceliar. Si los granos quedan muy secos, el crecimiento del micelio será muy lento. Si los granos tienen mucha agua, el crecimiento es también muy lento y finalmente se detendrá cuando el agua se acumule en el fondo. La humedad óptima para los granos es alrededor del 50%.

Según Gaitán, et al (2006), después de 15 a 20 días el micelio cubre completamente las semillas, incubado a una temperatura entre 25-28°C en oscuridad, y está listo para ser inoculado en el sustrato. Se obtuvo una colonización completa del inóculo primario entre 7 a 15 días de incubación con exposición a períodos de luz y oscuridad normales, a temperatura ambiente y humedad del 61% (Figura 22).



**Figura 22.** Inóculo primario  
**Fuente:** Autora

### **3.2.2. Inoculación e incubación.**

La inoculación en los sustratos se realizó después de que estos fueron lavados, hidratados y esterilizados. El promedio de humedad de cada sustrato fue: bagazo de caña de azúcar 5mm, 77,86%; tallo de plátano 5mm, 92,70% y tallo de plátano 2,5cm, 93,43%. Una vez inoculados los sustratos, los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente hasta observar la colonización completa del hongo en el mismo. Cuando se observó la formación de micelio en todo el sustrato, manifestado por una coloración blanca en el mismo, todos los cultivos fueron monitoreados diariamente para mantener constantes las siguientes condiciones: temperatura 24-27°C y humedad 70-80% (Figura 23).



**Figura 23.** Condiciones de incubación de cultivos  
Temperatura 24°C o 76°F y humedad 78%.  
**Fuente:** Autora

### 3.2.3. Cultivo sobre bagazo de caña de azúcar 5mm (100%).

La aparición de los primordios se desarrolló entre los 29 y 30 días de incubación a temperatura ambiente, los cuales fueron de color blanco (Figura 24) y la formación de los basidiocarpos a partir de los 40 días (10 días después de la aparición de los primordios), que es un tiempo mayor que el determinado en otros trabajos que es de 7 días desde la aparición de los primordios (Gaitán et al. 2006).



**Figura 24.** Cultivos sobre bagazo de caña de azúcar  
Cultivos en bolsas incubados a 25°C (A). Primordios (B) y (C).  
**Fuente:** Autora

Los basidiocarpos obtenidos fueron de color blanco y su tamaño fue pequeño. Se cosechó 11 basidiocarpos y el peso fresco fue de 10,9408 g. El peso del sustrato húmedo fue de 250 g, mientras que el peso del sustrato seco fue de 100,73 g.

Se realizó un segundo cultivo en el mismo sustrato y el peso del sustrato húmedo fue de 350 g.

La formación de los primordios se desarrolló a los 32 días de la incubación y la primera cosecha se efectuó 12 días después (Figura 25). Se desarrollaron dos basidiocarpos a los 44 días desde la inoculación y el peso fresco de los mismos fue de 4,9219 g y 3,3765 g. El peso del sustrato seco fue de 270,23 g.



**Figura 25.** Cultivo sobre Bagazo de caña 5mm  
Sustrato colonizado, incubación: temperatura ambiente (A) (B) y Basidiocarpos desarrollados (C).  
**Fuente:** Autora

#### 3.2.4. Cultivo sobre tallo de plátano 5mm (100%).

El sustrato que se utilizó fue tallo de plátano reducido a fragmentos de 5 mm. La formación de los primordios se presentó a los 30 días de incubación a partir de la inoculación y los basidiocarpos se formaron 8 días después, en la cosecha 1 se obtuvo 3 basidiocarpos con un peso fresco de 12, 3733 g (Figura 26).



**Figura 26.** Cultivo sobre tallo de plátano 5mm  
Basidiocarpos en el cultivo (A), Pileo del basidiocarpo (B) Laminillas del basidiocarpo (C).  
**Fuente:** Autora

En la cosecha 2 se obtuvo un basidiocarpo, con un peso de 13,7665 g, cuyo diámetro fue de 13,7 cm y longitud 8,5 cm. Martínez (2014), en su trabajo obtuvo un diámetro de 5,5 cm en sustrato de caña (Figura 27).



**Figura 27.** Basidiocarpio maduro de *Pleurotus djamor* en sustrato de tallo de plátano  
**Fuente:** Autora

En un segundo cultivo, la formación de los primordios se desarrolló a los 44 días de incubación, la primera cosecha se realizó 8 días después, obteniendo un basidiocarpio de 1,7351 g peso fresco y 7 días después, se obtuvo otro basidiocarpio con un peso fresco de 7,8888 g.

### **3.2.5. Cultivo sobre bagazo de caña 5mm (50%)- tallo de plátano 2,5cm (50%).**

La formación de los basidiocarpos se presentó a los 32 días de la inoculación y la primera cosecha se produjo a los 10 días y se obtuvo un basidiocarpio de 1,3147 g; la segunda cosecha se desarrolló 7 días después, se obtuvieron 2 basidiocarpos, con un peso fresco de 9,2992 g y 7,0691 g (Figura 28).



**Figura 28.** Cultivo de *Pleurotus djamor* sobre sustrato (bagazo de caña/tallo de plátano).  
**Fuente:** Autora.

La tercera cosecha se produjo a 6 días de la segunda, es decir 55 días desde la inoculación y se obtuvo 3 basidiocarpos de 5,6634 g, 2,7389 g y 1,6843 g peso fresco.

Se cosechó un total de 6 basidiocarpos y el peso fresco total de los mismos fue de 27,7696 g. En este cultivo se desarrolló un mayor número de basidiocarpos a diferencia del resto, demostrado además con el peso fresco total obtenido. De manera que la combinación de los dos sustratos mostró un buen resultado que además se confirma mediante los parámetros de evaluación de los cultivos, mismos que se detallan en el apartado 3.2.7.

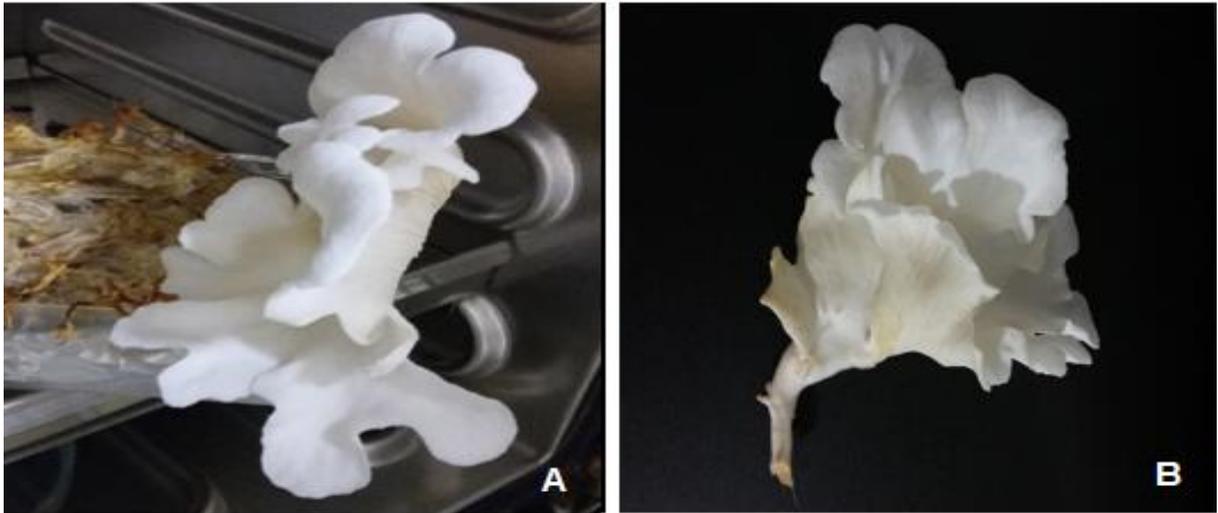
### 3.2.6. Cultivos sobre sustrato (100% tallo de plátano).

Se desarrolló el cultivo utilizando como sustrato tallo de plátano trozado a un tamaño de partícula de 2,5cm, la humedad del mismo fue de 93,43% y fue suplemento con CaSO<sub>4</sub> y CaO. Los primordios se formaron a los 30 días de incubación desde la fecha de inoculación (Figura 29).



**Figura 29.** Cultivo de *Pleurotus djamor* sobre tallo de plátano  
Colonización completa del sustrato, incubación: temperatura ambiente (A), Cultivo colocado en bandeja para su oxigenación, incubación: 27°C (B) y Aparición de primordios a los 30 días (C).  
**Fuente:** Autora

En este cultivo se realizó una sola cosecha a los 8 días y se obtuvo un basidiocarpo de 13,3182 g peso fresco, con un diámetro de 12,7 cm y 7,5 cm de longitud, siendo el segundo hongo de mayor tamaño (Figura 30).



**Figura 30.** Basidiocarpo de *Pleurotus djamor* desarrollado en tallo de plátano 100%  
Basidiocarpo en sustrato (A) y parte frontal (B).

**Fuente:** Autora

Con el fin de realizar una comparación de cada cultivo, en la Tabla 7 se puede observar la producción de cada uno. El cultivo con el que se obtuvo una mayor producción fue el compuesto por Bagazo de caña 5mm-Tallo de plátano 2,5cm, en el cual se obtuvo un peso fresco total de 31,5183 g, seguido del cultivo en Tallo de plátano 5mm (R1) con un peso fresco de 25,1398 g. La menor producción dada por g peso fresco se obtuvo en Bagazo de caña 5mm (R2) con un peso de 8,2984 g. El cultivo en bagazo de caña y tallo de plátano, aportó una mayor cantidad de nutrientes para el crecimiento del hongo, es así que la aparición de los primordios fue a los 32 días, en el cual se realizó tres cosechas en un período de 23 días.

**Tabla 7.** Comparación de los diferentes sustratos para formación de primordios y basidiocarpos de *Pleurotus djamor*

Cultivos	Nº de réplicas (R)	Primordios (días <sup>†</sup> )	Basidiocarpos (días <sup>†</sup> )	Nº de cosechas (C)	Peso fresco (g)
Bagazo de caña 5mm (100%)	R1	30	40	C1	10,9408
	R2	32	44	C1	8,2984
Tallo de plátano 5mm (100%)	R1	30	38	C1	12,3733
			46	C2	13,7665
	R2	44	52	C1	1,7351
			59	C2	7,8888
Bagazo de caña 5mm (50%)-Tallo de plátano 2,5cm (50%)	R1	32	42	C1	5,0634
			49	C2	16,3683
			55	C3	10,0866
Tallo de plátano 2,5cm (100%)	R1	30	38	C1	13,3182

<sup>†</sup>Días transcurridos desde la inoculación

Fuente: Autora

### 3.2.7. Porcentajes de eficiencia biológica (EB), tasa de producción (TP), y Rendimiento (R).

Nuestros porcentajes de eficiencia biológica muestran al sustrato de bagazo de caña 5mm-tallo de plátano 2,5cm como el mejor para cultivar y fructificar a *Pleurotus djamor*. Este porcentaje esta dentro de los rangos que describe Ramos (2007), quién menciona que la eficiencia biológica debe alcanzar valores como mínimo del 40% y los rendimientos deben ser superiores al 10%, siendo aspectos importantes para que un cultivo sea factible económicamente.

Mientras que Martínez (2014), con la especie *Pleurotus djamor*, obtuvo una eficiencia biológica promedio en sustrato de caña del 25,48%. Además este autor menciona que la eficiencia biológica está determinada por algunos aspectos, como: la calidad del inóculo primario, el grado de desarrollo de la reproducción del inóculo en el sustrato, el grado de contaminación de la semilla y el grado de descomposición del sustrato para el cultivo de hongos. En cuanto a la calidad del inóculo primario, se puede decir que es buena, ya que no existe una diferencia significativa entre la eficiencia biológica obtenida y la eficiencia biológica de la literatura.

Sihuanca (2011), obtuvo un porcentaje de eficiencia biológica del 32,9% en el cultivo de *P. djamor* sobre bagazo de caña de azúcar, mientras que en el presente trabajo se obtuvieron valores bajos en este sustrato de 6,8%. El problema con este sustrato probablemente radicó en que el tamaño de las partículas fue menor al aceptable, lo que ocasionó que se compacte de manera que no se pudo mantener el mismo porcentaje de humedad en todo el sustrato. Al rociar agua destilada en los cultivos, no se logró que esta penetre el sustrato, por ende en el interior la humedad fue menor. Además al estar compactado, no se permitió una correcta oxigenación dentro y fuera del cultivo. El resultado de la combinación de bagazo de caña (50%) y tallo de plátano (50%) como sustrato, fue satisfactorio ya que la mayor eficiencia biológica (23%) fue obtenida en este cultivo. Al ser las partículas de hoja de plátano trozado de un tamaño mayor que las de bagazo de caña, no permitió que el sustrato se compacte, sino que al mezclarlos correctamente, se consiguió una consistencia adecuada para mantener constantes la humedad y la oxigenación del cultivo. Además, Zhang et al. (2011) menciona que las partículas tiene un efecto en el intercambio de aire entre los espacios del sustrato dentro de la bolsa con el exterior.

*Pleurotus djamor* también se ha cultivado sobre otros sustratos, por ejemplo: Vega, Mata, Salmones & Caballero (2006), estudiaron el cultivo de 14 cepas silvestres de *P. djamor*, utilizando como sustrato paja de arroz y pulpa de café pasteurizados por inmersión en agua caliente. En paja de arroz, la eficiencia biológica fluctuó entre 19.0 y 61.3%, el rendimiento entre 6.7 y 21.9%, y la tasa de producción de 0.4 y 1.4%. Mientras que en pulpa de café los parámetros oscilaron entre 43.5 y 93.5% de eficiencia biológica, 10.1 y 21.7% de rendimiento y tasa de producción de 0.9 y 1.8%.

Benítez et al. (1998) evaluaron 18 cepas de *Pleurotus djamor* sobre pulpa de café, obteniendo eficiencias biológicas altas de 125.17% y bajas de 49,51% y tasas de producción de 7,33% a 5,85%. En estos dos estudios se demuestra que la pulpa de café es un buen sustrato para el cultivo de *P. djamor* obteniendo eficiencias biológicas altas en el mismo. Los valores de eficiencia biológica total, es decir; todas las cosechas, en los cultivos en las que existió más de una, se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Porcentajes de Eficiencia biológica, tasa de producción y rendimiento

Sustrato	EB%	TP%	R%
Bagazo de caña 5mm (100%)	11,16	0,19	6,8
Tallo de plátano 5mm (100%)	22,98	0,51	8,9
Bagazo de caña 5mm (50%)-Tallo de plátano 2,5cm (50%)	23	0,42	9
Tallo de plátano 2,5cm (100%)	5,60	0,15	3,90

Fuente: Autora

Otras especies que se han cultivado sobre bagazo de caña son *P. pulmonarius* y *P. ostreatus*. Garzón & Cuervo (2008) reportaron eficiencias biológicas de 20,8% para *P. ostreatus*, en donde el tamaño de partícula del sustrato fue de 6 a 8 cm, en donde se utilizó micelio del hongo sobre semilla de trigo, además se observó que en los tratamientos que no contenían bagazo de caña, no existió colonización en el interior, mientras que en aquellos tratamientos que si lo contenían, la colonización fue completa y más rápida.

El primer paso y el más importante es elegir un buen sustrato y posteriormente procesarlo correctamente. El bagazo de caña es uno de los sustratos más aceptables en el cultivo de hongos del género *Pleurotus*, lo cual se demuestra en muchas investigaciones en las cuales en este sustrato se presentan los más altos valores de eficiencia biológica, de manera que la productividad es mayor en comparación con otros sustratos. Otro de los sustratos en el cual también se obtienen altos valores de eficiencia biológica y rendimiento es la pulpa de café.

### 3.3. Rendimiento de extractos

#### 3.3.1. Extracto de basidiocarpos.

Se obtuvo el extracto de los basidiocarpos de ocho cosechas en distintas fechas, en los sustratos: bagazo de caña de azúcar, tallo de plátano y en sustrato combinado (bagazo de caña-tallo de plátano) cuyos datos están detallados en la Tabla 9. La maceración se realizó a partir de un peso seco total de 11,4749 g, colocados en acetona, se obtuvo un extracto de 85,7

mg, de coloración amarillenta, de aspecto pulverulento, pegajoso al tacto; cuya solubilidad fue total en metanol y parcial en cloroformo. El rendimiento del extracto fue de 0,75% p/p.

**Tabla 9.** Pesos fresco y seco de los basidiocarpos cosechados

Cosecha	Nº de basidiocarpos cosechados <sup>†</sup>	Sustrato	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
1	9	BC	4,7251 g	0,6121 g
2	2	BC	6,2157 g	1,2243 g
3	3	TP	4,9240 g	0,6217 g
			5,4418 g	0,6827 g
			2,0075 g	0,2368 g
4	1	TP	13,7665 g	1,6326 g
5	1	BC-TP	1,3147 g	0,1978 g
6	1	TP	9,8888 g	2,5003 g
7	2	BC-TP	9,2992 g	1,4204 g
			7,0691 g	1,0014 g
8	3	BC-TP	5,6634 g	0,7771 g
			2,7389 g	0,3436 g
			1,6843 g	0,2241 g
<b>Peso total de basidiocarpos frescos</b>			<b>74,7390 g</b>	
<b>Peso total de basidiocarpos secos</b>			<b>11,4749 g</b>	

<sup>†</sup>Basidiocarpos de *Pleurotus djamor* cosechados en distintas fechas y diferentes sustratos

Fuente: Autora

### 3.3.2. Extracto de micelio.

Del cultivo de *Pleurotus djamor* en medio YNPD de 1 mes, tiempo en cual el hongo alcanza el crecimiento máximo y la invasión completa del medio, se filtró la biomasa al vacío y el peso fresco fue de 6,1248 g, luego del secado se obtuvo un peso seco de 3,2313 g, se añadió acetona y se llevó a maceración. Se obtuvo un peso de 41,9 mg de extracto de biomasa, de coloración blanco amarillento, de apariencia granulosa y de consistencia pulverulenta. El extracto fue soluble en metanol y parcialmente soluble en cloroformo. El rendimiento del extracto fue de 1,29% p/p.

### 3.3.3. Extracto de medio de cultivo agotado.

De los 500 ml de medio de cultivo agotado, del cual anteriormente se filtró el micelio, se filtró a través de resina de absorción Diaion® HP-20 (Supelco, USA), la misma que se extrajo con

acetona y se obtuvo un peso de extracto de 1,2161 g, de color café oscuro, de apariencia acaramelada y de consistencia viscosa, con solubilidad total en agua y metanol. El rendimiento del mismo fue de 0,24% p/v.

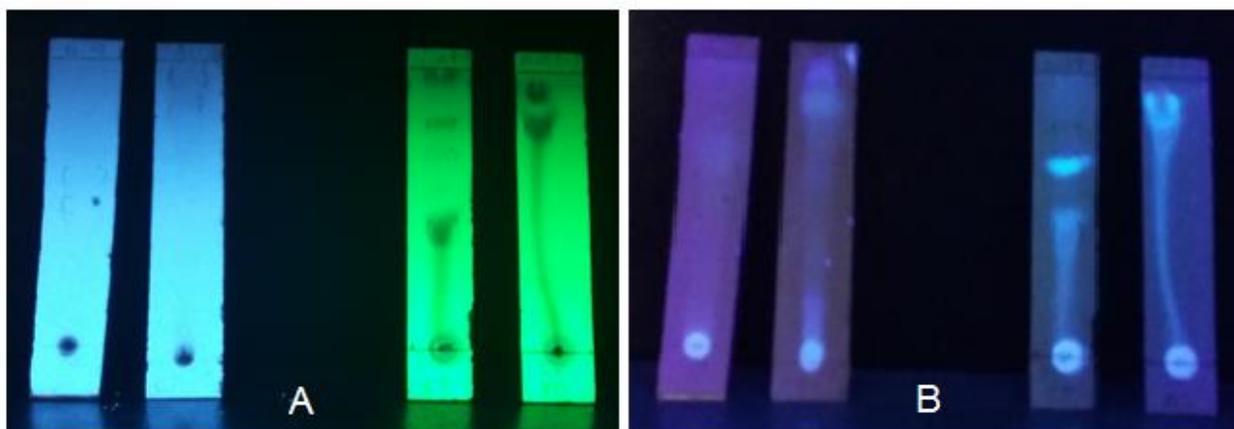
El extracto que presentó mayor rendimiento fue el de micelio (1,29%), seguido del extracto de basidiocarpos (0,75%) y el extracto de medio de cultivo agotado (0,24%).

### 3.4. Cromatografía en capa fina (CCF)

Se realizó cromatografía en capa fina de los tres extractos obtenidos: basidiocarpos (E1), micelio desarrollado en medio líquido (E2) y medio de cultivo agotado (E3). Se observó la separación de los compuestos mediante CCF fase directa e inversa y se observaron bajo luz UV (a UV254 y a UV365).

En las placas, en primer lugar se puede observar diferencias en la composición de cada extracto y, en segundo lugar la presencia de una variedad de compuestos en cada uno de ellos.

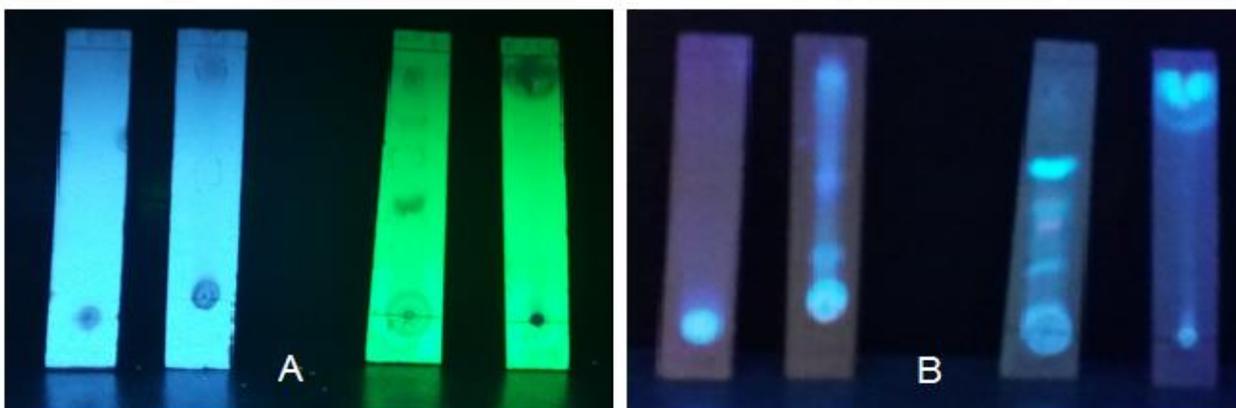
Es así que el extracto E2, obtenido a partir de micelio desarrollado en medio líquido es el que contiene mayor cantidad de metabolitos (Figura 32), seguido del extracto E1 (Figura 31) y finalmente E3 con una mínima presencia de compuestos (Figura 33).



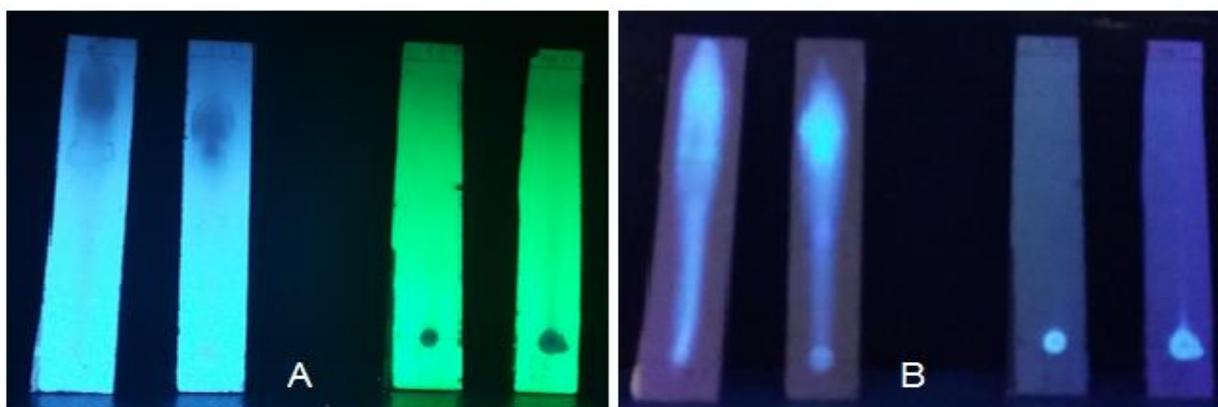
**Figura 31.** CCF del extracto obtenido de basidiocarpos

(A) Fase inversa a la izquierda (MeOH-H<sub>2</sub>O 6:4 y 9:1) y fase directa a la derecha (Hex-AcOEt 9:1 y 1:1), observadas con luz UV a 254 nm; (B) Fase inversa a la izquierda (MeOH-H<sub>2</sub>O 6:4 y 9:1) y fase directa a la derecha (Hex-AcOEt 9:1 y 1:1), observadas con luz UV a 365 nm.

**Fuente:** Autora



**Figura 32.** CCF del extracto obtenido de micelio  
**(A)** Fase inversa a la izquierda (MeOH-H<sub>2</sub>O 6:4 y 9:1) y fase directa a la derecha (Hex-AcOEt 9:1 y 1:1), observadas con luz UV a 254 nm; **(B)** Fase inversa a la izquierda (MeOH-H<sub>2</sub>O 6:4 y 9:1) y fase directa a la derecha (Hex-AcOEt 9:1 y 1:1), observadas con luz UV a 365 nm.  
**Fuente:** Autora



**Figura 33.** CCF del extracto obtenido de medio de cultivo agotado  
**(A)** Fase inversa a la izquierda (MeOH-H<sub>2</sub>O 6:4 y 9:1) y fase directa a la derecha (Hex-AcOEt 9:1 y 1:1), observadas con luz UV a 254 nm; **(B)** Fase inversa a la izquierda (MeOH-H<sub>2</sub>O 6:4 y 9:1) y fase directa a la derecha (Hex-AcOEt 9:1 y 1:1), observadas con luz UV a 365 nm.  
**Fuente:** Autora

El extracto E2 presentó mayor riqueza metabólica que los extractos E1 y E3. El micelio se obtuvo mediante fermentación líquida o fermentación sumergida que es aquella en la cual hay por lo menos la misma concentración de agua y de sustrato sólido (nutrientes) en el proceso, es decir, que hay una solución de los nutrientes (Fazenda, Seviour, McNeil & Harvey, 2008; Rodríguez-Couto & Sanromán, 2006).

En este tipo de cultivo, los microorganismos se desarrollan flotando en el medio de cultivo y en el caso de los hongos, pueden formar pequeñas esferas de micelio denominadas *pellets* cuando

hay agitación, de otra forma, en estado de reposo crecen en la superficie. En la fermentación líquida el desarrollo del microorganismo se presenta de una forma típica, dando origen a una fase de latencia, una de crecimiento (fase logarítmica), una fase estacionaria y, la última, la fase de muerte (Cruger & Cruger, A., 1993).

Guzmán, M., et al. (2009) realizó el estudio químico de *P. djamor* recolectado en Córdoba-México, obteniendo el extracto etanólico crudo del material fúngico recolectado, el mismo que fue purificado mediante cromatografía en columna hasta obtener una fracción esterólica, la cual fue purificada por el mismo procedimiento y fue monitoreada mediante CCF, con longitudes de onda de 254 y 366 nm, y solución de ácido fosfomolibdico al 5% en etanol con posterior calentamiento como revelador y, mediante cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas reportaron por primera vez 13 compuestos esteroidales con posible actividad antioxidante.

Se han realizado estudios de otras especies de *Pleurotus*, en las cuales se han reportado la presencia de  $\beta$ -glucanos, por ejemplo, Carbonero, Gracher, Smiderle & Rosado (2006), aislaron  $\beta$ -glucanos de basidiocarpos de *P. eryngii* y de *P. ostreatus*. En el fraccionamiento se encontró que los principales componentes de las fracciones solubles en agua contienen glucosa, manosa, galactosa y 3-O-metil-galactosa, mientras que las fracciones insolubles contienen glucosa como componente principal.

En cuanto al análisis fitoquímico mediante CCF para medios de cultivo agotados, no se han reportado estudios, pero dado a que en cualquier tipo de medio, los nutrientes son consumidos en su totalidad al finalizar el cultivo, no se va a presentar una cantidad significativa de compuestos, salvo aquellos que forman parte del micelio y que en la fase de filtración no fueron retenidos.

### **3.5. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)**

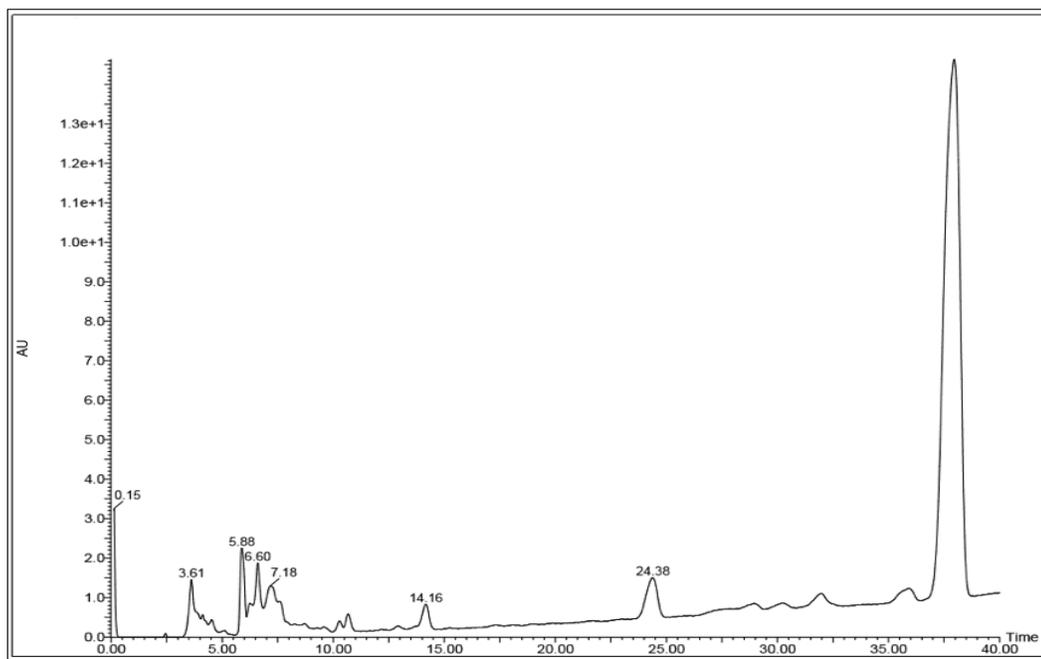
Este análisis se realizó con el fin de valorar cualitativamente la riqueza metabólica de los tres extractos acetónicos obtenidos de *P. djamor* y corroborar la información extraída de la cromatografía de capa fina. Se utilizó el equipo HPLC (Waters serie 2695 LC), equipado con un detector de arreglo de diodos DAD (Waters 996 PDA) ajustado para realizar un barrido de 200 a

600 nm (se extrajeron cromatogramas de cada extracto a 254 nm y 360 nm, los mismos que se muestran en el Anexo 4).

Los *cromatogramas* son la representación de la respuesta o señal del sistema de detección continuo o discontinuo en función del tiempo, volumen del eluyente o distancia en el lecho cromatográfico. Contienen la información analítica relativa a la muestra (complejidad, número de picos, detección cualitativa y/o cuantitativa de uno o varios componentes) o del funcionamiento del sistema cromatográfico (Hernández & González, 2002).

### 3.5.1. Extracto de basidiocarpos (E1).

En el *cromatograma* de barrido general de 200 nm a 600 nm (Figura 34) se observó la presencia de 6 compuestos a los tiempos de retención 3.61, 5.88, 6.60, 7.18, 14.16 y 24.38 min. Además se observa la presencia de compuestos no polares a partir del minuto 37 lo cual puede ser evidencia de la presencia de ácidos grasos o esteroides tipo ergosterol.



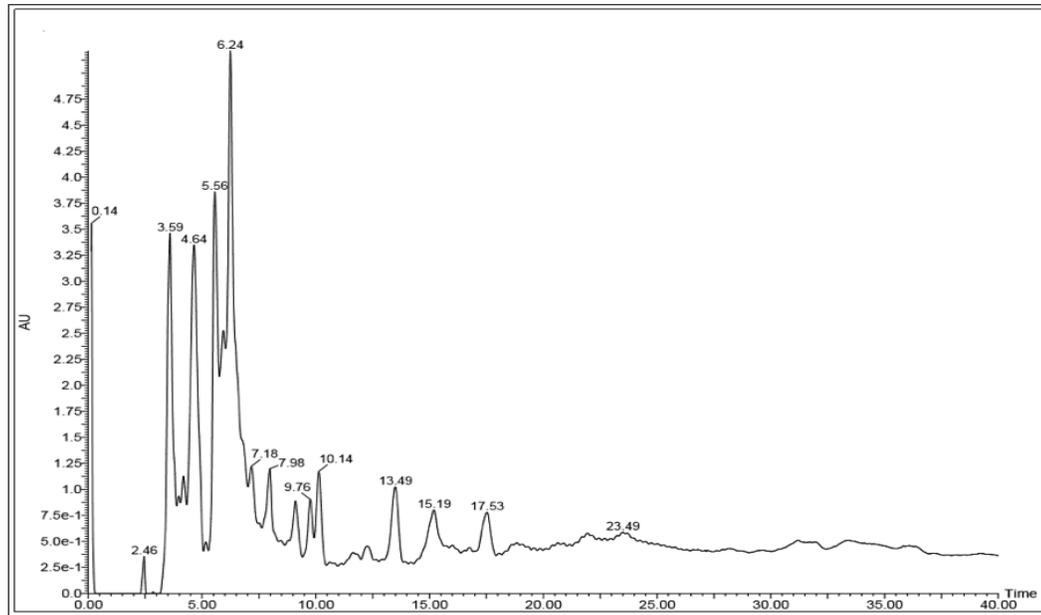
**Figura 34.** Cromatograma del extracto acetónico de basidiocarpos  
DAD<sub>max</sub> 200 nm a 600 nm. Concentración: 1 mg/mL. Volumen de inyección: 20 µl.  
**Fuente:** Autora

Benítez, Colmenares & Montoya (2012), en su estudio evaluaron las fructificaciones de *P. djamor* rosado, cuyo inóculo fue realizado sobre semillas de sorgo e inoculado en tallos y hojas

de plátano, maíz, sorgo y caña de azúcar. De la fracción del extracto etanólico de la biomasa, obtenida por CLAR, en la cual utilizaron como fase móvil acetonitrilo-agua (AcCN:H<sub>2</sub>O) 7:3, volumen de inyección 20 µl, flujo de 1 mL/min, temperatura de 40°C y límite de detección en un rango de 200-300nm por detector con arreglo de diodos SPD-M20A, se obtuvo un extracto que se llevó a Cromatografía de Gases acoplada a Espectro de Masas (GC-MS), el cual generó un cromatograma en donde observaron la presencia de una familia de dipéptidos cíclicos derivados de 2,5-dicetopiperazina.

### 3.5.2. Extracto de micelio (E2).

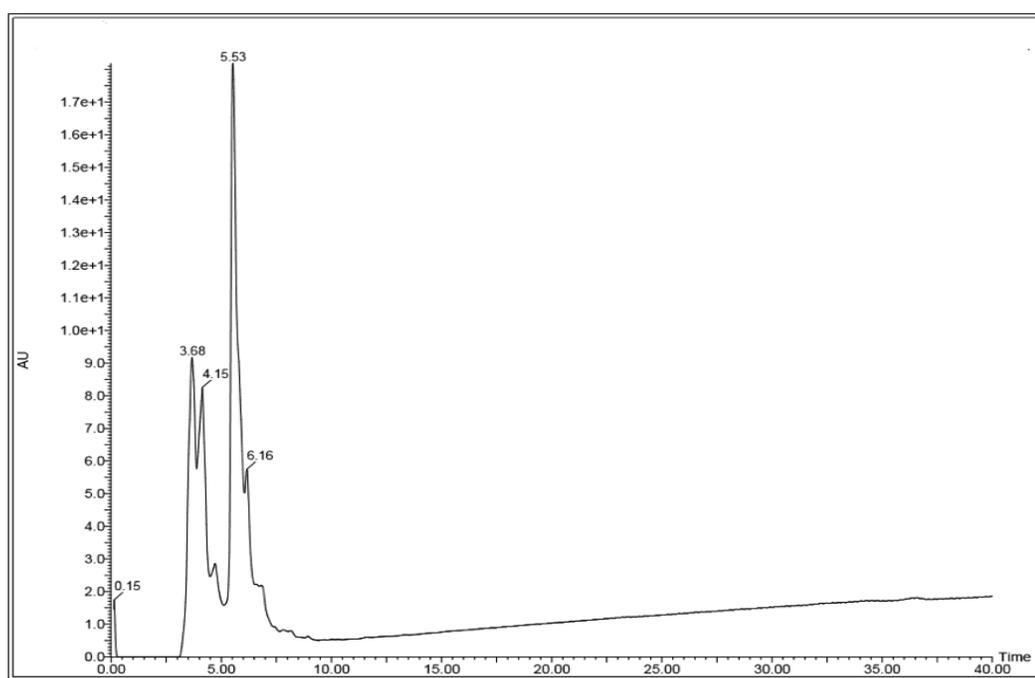
El cromatograma del extracto de micelio de *P. djamor* obtenido en medio líquido, por barrido general 200 nm a 600 nm, se muestra en la Figura 35. Se presentaron 12 picos bien definidos a los tiempos de retención 2.46, 3.59, 4.64, 5.56, 6.24, 7.18, 7.98, 9.76, 10.14, 13.49, 15.19 y 17.53 minutos. El cultivo en medio líquido ofrece un gran potencial de producción de metabolitos secundarios gracias a que es una técnica mucho más rápida donde las condiciones de cultivo son fácilmente reproducibles e independientes de las variaciones climáticas (Suárez & Nieto, 2013).



**Figura 35.** Cromatograma del extracto acetónico de micelio  
DAD<sub>max</sub> 200 nm a 600 nm. Concentración: 1 mg/mL. Volumen de inyección: 20 µl.  
**Fuente:** Autora

### 3.5.3. Extracto de medio de cultivo agotado (E3).

En la Figura 36 se muestra el Cromatograma obtenido a partir del extracto de medio de cultivo agotado, en donde se observa la presencia de 5 picos definidos en los tiempos de retención 0.15, 3.68, 4.15, 5.53 y 6.16 min. No se han reportado estudios en los que se evalué extractos obtenidos a partir de medios de cultivo agotados de hongos de este género, pero probablemente los picos que se observan en el cromatograma, representen a aquellos compuestos que no fueron retenidos durante la fase de filtración al separar el micelio del hongo del medio de cultivo.



**Figura 36.** Cromatograma del extracto acetónico de medio de cultivo agotado  
DAD<sub>max</sub> 200 nm a 600 nm. Concentración: 1 mg/mL. Volumen de inyección: 20 µl.  
**Fuente:** Autora

### 3.6. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria se define según Andrews (2001) como la concentración más baja de una sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación.

Se evaluó la actividad biológica antibacteriana de los extractos obtenidos: basidiocarpos (E1), micelio (E2) y medio de cultivo agotado (E3). Los resultados se muestran en la Tabla 10:

**Tabla 10.** Resultados CMI de los extractos

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA							
Extractos	Bacterias Gram positivas		Bacterias Gram negativas				
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427
E1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E2	500 µg/ml	1000 µg/ml	NA	NA	NA	NA	NA
E3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

CMI de los extractos: **E1:** Basidiocarpos; **E2:** Micelio y **E3:** Medio de cultivo agotado. **NA:** No Activo.

**Fuente:** Autora

El extracto E2 obtenido a partir del micelio de *P. djamor* desarrollado en medio líquido presentó actividad antibacteriana contra las bacterias gram positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) con una concentración de 1000 µg/ml y 500 µg/ml respectivamente, mientras que no fue activo frente a ninguna de las bacterias patógenas gram negativas.

Los extractos E1 y E3 provenientes de basidiocarpos y medio de cultivo no presentaron actividad antibacteriana contra ninguna de las bacterias patógenas gram positivas y gram negativas estudiadas, es decir, no inhibieron el crecimiento bacteriano de ninguno de estos microorganismos.

Holetz et al. (2002) clasifica la actividad antibacteriana de la siguiente manera:

- Inactiva: > 1000 µl/mL.
- Débil: 500 a 1000 µl/mL.
- Moderada: 100 a 500 µl/mL.
- Buena: < 100 µl/mL.

Según estos parámetros de clasificación y considerando que la CMI mide la capacidad del agente antimicrobiano para inhibir la multiplicación de un microorganismo (Bailey, Finegold & Baron, 1991), el extracto de biomasa presenta una CMI débil frente a *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, lo que indica su importancia dentro del campo investigativo y clínico para tratar patologías causadas por estas bacterias. Ankle (1989) y Brizuela et al. (1998),

reportaron que la actividad antibacteriana de hongos del género *Pleurotus* se debe a compuestos de tipo acetileno.

Valencia del toro et al. (2008), evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos hexánicos de los basidiocarpos de cuatro cepas de *P. djamor* (variedades blanca y rosa) contra las bacterias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter agglomerans*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella rhinoescleromatis* y *K. pneumoniae* mediante la técnica de difusión en disco de Kirby Bauer, con una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL y luego de 16-18 h de incubación, las cepas variedad blanca presentaron mayor actividad bacteriana contra todas las bacterias, tanto gram positivas como gram negativas, que la variedad rosa y reportaron halos de inhibición con diámetros de 12 a 25,6 mm y de 8,3 a 22,6 mm, respectivamente. Cabe recalcar que las condiciones de cultivo, las cepas bacterianas, el tipo de solvente usado para la obtención de los extractos y la técnica utilizada para la determinación de la actividad antibacteriana es diferente, por lo tanto los resultados, en comparación con los nuestros, son distintos.

Se ha evaluado la CMI de otras especies de *Pleurotus*, por ejemplo, en un estudio realizado por Oyelade & Fagade (2009) cuantificaron la CMI de los extractos etanólicos de basidiocarpos de *Pleurotus florida*, obteniendo una CMI de 1000 mg/mL para la bacteria gram negativa *K. pneumoniae* y de 750mg/mL para la bacteria gram positiva *S. aureus*. Por otro lado, Gbolagade et al. (2007) determinó la CMI de los extractos metanólicos purificados de basidiocarpos de *P. florida* en la cual reportaron una CMI de 6 mg/mL para *S. aureus* y de 7,75 mg/mL para *K. pneumoniae*; mientras que con los extractos de *Pleurotus tuber regium* se obtuvo una CMI de 6,25 mg/mL para *K. pneumoniae*.

## CONCLUSIONES

- La mayor velocidad de crecimiento de la biomasa se obtuvo en medio extracto de malta inoculado a partir de micelio desarrollado en placa, en el cual alcanza su máximo a las 72 horas con un valor de 0,091 g/Lh, en cual existe una mayor producción de biomasa.
- Bajo las condiciones propuestas el mejor sustrato para el cultivo de *Pleurotus djamor* fue la combinación de bagazo de caña de azúcar y tallo de plátano, dado por los más altos valores de eficiencia biológica 23%, tasa de producción 0,42% y rendimiento 9%.
- Mediante el uso de cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (DAD), el extracto acetónico con mayor riqueza metabólica fue el extracto de micelio (E2).
- El extracto E2 presentó una CMI débil frente a las bacterias patógenas *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), con una concentración de 1000 µl/ml y 500 µl/ml respectivamente.

## RECOMENDACIONES

- Usar bagazo de caña y tallo de plátano para la producción de basiocarpos de *Pleurotus djamor*.
- Desarrollar el cultivo de *P. djamor* mediante la utilización de otros residuos agrícolas como por ejemplo, pulpa de café o paja de arroz en la cual se han obtenido valores altos de eficiencia biológica y rendimiento.
- Emplear otras técnicas de Química analítica, como espectrofotometría de masas y resonancia magnética nuclear, con el fin de analizar si los extractos de los basidiocarpos y micelio de *P. djamor* contienen compuestos aun no reportados.
- Fomentar el cultivo de hongos comestibles ya que nuestro país cuenta con los recursos necesarios para producir grandes cantidades y poder consumir estos productos naturales que crecen en nuestro medio ya que aportan un alto valor nutritivo, como proteínas y fibra.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, D. & Andrews, R. (1970). Introducción a la cromatografía.
- Alexopolus, C. & Mins, C. (1985). Introducción a la Micología. Ediciones Omega. Barcelona, España.
- Álvarez, M. & Vega, A. (2013). Aceptación y apreciación de hongos comestibles *Pleurotus djamor* por expertos de cocina internacional y su perspectiva de comercialización en restaurantes de hoteles de Panamá Año 2010. *Ridtec*. 9(1), 43-49.
- Anastasi, A., Prigione, V. & Varese, G. (2010). Industrial dye degradation and detoxification by basidiomycetes belonging to different eco-physiological groups. *J Hazard Mater*. 177-260.
- Andrews, J. (2001). Determination of Minimum Inhibitory Concentration, *J Antimicrob Chemother*. 48(31), 5.
- Ankle, T. (1989). Basidiomycetes: A source for new bioactive secondary metabolites. *Prog Ind Microbiol*. . 27, 51-66.
- Ardón, L. (2007). Producción de hongos comestibles. Tesis de maestría en docencia universitaria con especialidad en evaluación educativa. Universidad San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Arnáiz, C., Isac, L. & Lebrato, J. (2000). Determinación de la biomasa en procesos biológicos. España.
- Atsumi, S., Umezawa, K., Iinuma, H., Naganawa, H., Nakamura, H., Iitaka, Y. & Takeuchi, T. (1990). Production, isolation and structure determination of a novel  $\beta$ -glucosidase inhibitor, cyclophellitol, from *Phellinus* sp. *J Antibiot*. 43(1), 49-53.
- Bailey, S., Finegold, S. & Baron, E. (1991). Diagnostico microbiológico. 7ª edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Bates, R., & Schaefer, J. (1977). Técnicas de investigación en química orgánica. Prentice-Hall Internacional.

- Benítez, C., Colmenares, A. & Montoya, J. (2012). Derivados naturales de 2,5-Dicetopiperazina a partir de la biomasa del hongo *Pleurotus djamor*, nativo del nor-occidente del pacífico colombiano. *Rev Asoc Colomb. Cienc.* 24, 39-52.
- Benítez, F., Huerta, G. & Sánchez, J. (1998). Producción de 18 cepas de *Pleurotus djamor* del Soconusco, Chiapas. *Quehacer científico en Chiapas.* 1(2), 25-36.
- Brizuela, M., García, L., Pérez, L. & Mansur, M. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol.* 15, 69-74.
- Carbonero, E., Gracher, P., Smiderle, R. & Rosado, F. (2006). A  $\beta$ -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. *Carbohydrate Polymers.* (66), 252-257.
- Casselton, L. (1978). Dikarion formation in higher basidiomycetes. In: J.E., Smith y R. Berry (Eds). The filamentous fungi. Volume III. *Dev mycology.* 275- 297.
- Castillo, W. & Rodas, E. (2007). Propuesta de evaluación de la cinética de fermentación para la obtención de vitamina B12 utilizando la cepa del género *Propionibacterium freudenreichii*. Tesis de Licenciado en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador, El Salvador.
- Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T. & Fukuoka, F. (1969). Inhibition of mouse sarcoma-180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature* (Lond.). 222, 687-688.
- Cos, P., Vlietinck, A., Vanden Berghe, D. & Maes, L. (2006). Antiinfective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro proof of concept, *Ethnopharmacology.* 106, 290.
- Cruger, W. & Cruger, A. (1993). Biotecnología: Manual de Microbiología. Industrial. Zaragoza: Ed. Acribia.
- Fazenda, M., Seviour, R., McNeil, B. & Harvey, L. (2008). Submerged culture fermentation of higher fungi: the macrofungi. *Adv Appl Microbiol.* 63, 33–92.
- Fierro, A. (2005). Evaluación de cinco sustratos agrícolas en la preparación de inóculos de *Pleurotus ostreatus* var. florida para uso industrial. Tesis de Dra. en Bioquímica y

Farmacia. Escuela superior Politécnica de Chimborazo; Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba.

- Flores, J. & Arias, N. (2006). Efecto de microorganismos eficaces (EM) sobre la producción del hongo ostra *Pleurotus ostreatus* (Agaricales: Tricholomataceae) a partir de remanentes agrícolas. Tesis de ingeniero agrónomo. Universidad Earth, Costa Rica.
- Fujii, T., Saito, K., Matsunaga, K., Oguchi, Y., Ikuzawa, M., Furusho, T. & Taguchi, T. (1995). Prolongation of the survival period with the biological response modifier PSK in rats bearing N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary gland tumors. *In-vivo*. 9(1), 55-58.
- Gaitán, H., Salmenes, D., Pérez, R. & Mata, G. (2006). Manual práctico del cultivo de setas aislamiento, siembra y producción. Instituto de ecología. México.
- Garzón, J. & Cuervo, J. (2008). Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia. *NOVA*. 6(10), 101-236.
- Gil, M., Manú, M., Martínez, V., González, A., Encio, I., Arteaga, C. & Miglaccio, M. (1999). Nuevos agentes antineoplásicos: diseño, síntesis y determinación experimental. *ANALES*. 22(3), 85.
- Granda, Mejía & Jiménez, (2005). Utilización de residuos de plátano para la producción de metabolitos secundarios por fermentación en estado sólido con el hongo *Lentinus crinitus*. *Vitae*, Revista de la facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, Colombia.
- Griffin, D. (1994). *Fungal Physiology*. Wiley-Liss. New York.
- Gross, B. & Asther, M. (1989). Aromes de basidiomycetes: caracteristiques, analyses et productions. *Sciences des Aliments*. 9, 427-454
- Guarín, J. & Ramírez, A. (2004). Estudio de la factibilidad técnico – financiera de un cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Guzmán, G. (1977). Identificación de hongos comestibles, venenosos y alucinantes. México, Limusa, 21-22.

- Guzmán, M., Zúñiga, N., Santafé, G., Torres, O. & Angulo, A. (2009). Actividad antioxidante y estudio químico del hongo *Pleurotus djamor* recolectado en Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 7(2).
- Harris, D. (2001). Análisis químico cuantitativo. Segunda edición. Editorial Reverte, S. A. Barcelona.
- Hammond, C. (1999). Experimental organic techniques. USA.
- Hernández, L. & González, C. (2002). Introducción al análisis instrumental. 1ra edición. Editorial Ariel, S. A. Barcelona.
- Herrera, T. & Ulloa, M. (1990). El reino de los hongos. Micología básica aplicada. UNAM FCE. 552.
- Holetz, F., Pessini, G., Sanches, N., Cortez, D., Nakamura, C. & Dias, B. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97, 1027-1031.
- Ito, H., Hidaka, H. & Sugiura, M. (1979). Effects of Coriolan, an antitumor polysaccharide, produced by *Coriolus versicolor* Iwade. *Jap J Pharmacol*. 29, 953-957.
- Kirk, P., Cannon, P., David, J. & Stalpers, J. (2001). Dictionary of the fungus. CABI Publishing. 9na edición. New York.
- Kong, W. (2005). Mushroom Growers Handbook 1. Oyster Mushroom Cultivation. *MushWorld-Heineart Inc*. Seoul, Corea.
- Langfield, R., Scarano, F., Heitzman, M., Kondo, M., Hammond, G. & Neto, C. (2004). Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galiodes*, *J. Ethnopharmacology*. 94(2-3), 279.
- Leal, L. (1985). La utilización microbiológica de desperdicios lignocelulósicos. Potencialidades y perspectivas. En Quirarte R. R., Compilador. Perspectiva de la Biotecnología en México. Fundación Javier Barros Sierra. CONACY. 93-144.
- Lucas, R., Robles, A., Gálvez, A., García, T., Pérez, R. & Álvarez, G. (2001). Biodegradación de la celulosa y la lignina. Universidad de Jaen.

- Martínez-Carrera, D. (1998). Oyster mushrooms. *Yearbook of Science & Technology* (1999). McGrawHill, Inc., Nueva York. 242-245.
- Martínez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M. & Martínez, W. (2007). México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. Capítulo 20. En *El Cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. Sánchez, Martínez-Carrera, Mata, y Leal (Ed). ECOSUR CONACYT. México, D.F.
- Martínez, D. (2014). Producción de tres especies de *Pleurotus* spp. utilizando diferentes sustratos. Tesis de Ingeniero agrónomo con énfasis en cultivos tropicales en el grado académico de licenciado. Universidad Rafael Landívar. Facultad de Ciencias ambientales y agrícolas, Guatemala.
- Matsui, S., Yoshima, Y. & Taniguchi, T. (1986). Novel bilirubin oxidase, its production and use. *US Patent*. 4, 600-689.
- Michel, A., Otero, M. & Díaz, E. (2010). Manual producción de hongos comestibles *Pleurotus* spp.
- Molina, A. (2013). Producción de polisacáridos de extractos crudos de basidiocarpos de *Pleurotus* spp. y su evaluación biológica. Tesis de Maestro en Ciencias en Bioprocesos. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, México.
- Motato, K., Mejía, A. & León, A. (2006). Evaluación de los residuos agroindustriales de plátano (*Musa paradisiaca*) y aserrín de abarco (*Cariniana piriformes*) como sustratos para el cultivo del hongo *Pleurotus djamor*. *VITAE*. 13(1), 24-29.
- Oyelade, A. & Fagade, (E. 2009). A comparative study of the antibacterial activities of some wood\_decay fungi to synthetic antibiotic discs. *J Agr Food Chem*. 8(3):184-188.
- Prosser, J. I. (1995). Kinetics of filamentous growth and branching. *In*: N.A.R. Gow y G.M. Gadd (eds). *The Growing Fungi*. Chapman and Hall. 301-318.
- Quimio, T. (1986). Guide to low-cost mushroom cultivation in the tropics. University of the Philippines at Los Banos. 73.

- Quimio, T., Chang, S. & Royse, D. (1990). Technical guidelines for mushroom growing in the tropics. FAO Plant Production and Protection Paper 106. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Roma.
- Rajarathnam, S. & Bano, Z. (1989). *Pleurotus* mushrooms. Part III. Biotransformations of natural lignocellulosic wastes: Commercial applications and implications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 28(1), 31-113.
- Ramos, G. (2007). *Pleurotus ostreatus* cultivado en residuos de palma aceitera como importante fuente proteica para la dieta humana. Tesis de Ingeniero en Biotecnología Ambiental. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Riobamba.
- Ríos, J. & Recio, M. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Ethnopharmacology*. 100, 80.
- Rodríguez-Couto, S. & Sanromán, M. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *J Food Eng*. 76, 291–302.
- Sánchez, J. & Royse, D. (2001). La Biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. 1a. Edición. México: Edit. Noriega Editores.
- Sánchez, M. (1997). Desarrollo de la producción de caña de azúcar en la república mexicana. Colegio de Postgraduados, Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. 143.
- Sarkanen, K. (1990). Chemistry of solvent pulping. *TAPPI Journal*. 73, 215-219.
- Savoie, J., Delpech, P., Billette, C. & Mata, G. (2000). Inoculum adaptation changes the outcome of the competition between *Lentinula edodes* and *Trichoderma* spp. during shiitake cultivation on pasteurized wheat straw. *Mushroom Science*. 15, 667-674.
- Sihuanca, D. (2011). Desarrollo de un proceso biotecnológico para la producción de variedades especiales de hongos comestibles (*Pleurotus*, *Lentinula*, *Hypsizygus*), empleando bagazo de caña de azúcar y otros subproductos agrícolas y forestales como sustrato de cultivo. Tesis de doctor en ciencias, Colegio de postgraduados, México.

- Skoog, D., West, D. & Holler, F. (2001). Química analítica. 7ª edición. Editorial Mc Graw Hill. España.
- Suárez, C. & Nieto, I. (2013). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutracéuticos. *Rev Iberoam Micol.* 30(1), 1-8.
- Toyota, M. & Hostettmann, K. (1990). Antifungal diterpenic esters from the mushroom *Boletinus cavipes*. *Phytochemistry.* 29, 1485-1489.
- Valcárcel, M. (1988). Técnicas analíticas de separación. Editorial Reverté. Barcelona.
- Valencia del Toro, G., Garín, M., Téllez, M. & Durán, E. (2008). Actividad antibacteriana de extractos hexánicos de cepas de *Pleurotus djamor*. *Rev Mex Micol.* 28, 119-123.
- Vega, A., Mata, G., Salmones, D. & Caballero, R. (2006). Cultivo de cepas nativas de *Pleurotus djamor* en Panamá, en paja de arroz y pulpa de café. *Rev Mex Micol.* 23, 93-97.
- Webster, J. (1986). Introduction to fungi. 2 ed. Cambridge University Press. 669.
- Wilkinson, J. (2007). Methods for Testing the Antimicrobial Activity of Extracts, *Modern Phytomedicine.* 157-171.
- Wood, W., Deshazer, D. & Largent, D. (1988). The identity and metabolic fate of volatiles responsible for the odor of *Hydnellum suaveolens*. *Mycologia.* 80, 252-255.
- Xu, X., Yan, H., Chen, J. & Zhang, X. (2011). Bioactive proteins from mushrooms. *Biotech Adv.*, (29), 667-674.
- Zhang, M., Cui, S., Cheung, P. & Wang, Q. (2007). Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology.* (18), 4-19.
- Zhang, R., Li, X. & Fadel, J. (2011). Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw, *Biorsource Technology.* 82, 277-284

## **ANEXOS**

## ANEXO 1. Preparación de Medios de cultivo

- **Medio líquido YNPD**

Preparación para 1 L:

Glucosa	10 g
Extracto de malta	10 g
Peptona	2 g
Extracto de levadura	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g
Vitamina	10 mL

Disolver en 1000 ml de agua destilada.

- **Medio Extracto de malta (MEM)**

Preparación para 1 L:

Extracto de malta	30 g
Peptona	5 g

Disolver en 1000 ml de agua destilada.

## ANEXO 2. Determinación de humedad

$$Hm = \frac{(m1 - m2)}{(m1 - m)} \times 100$$

**Donde:**

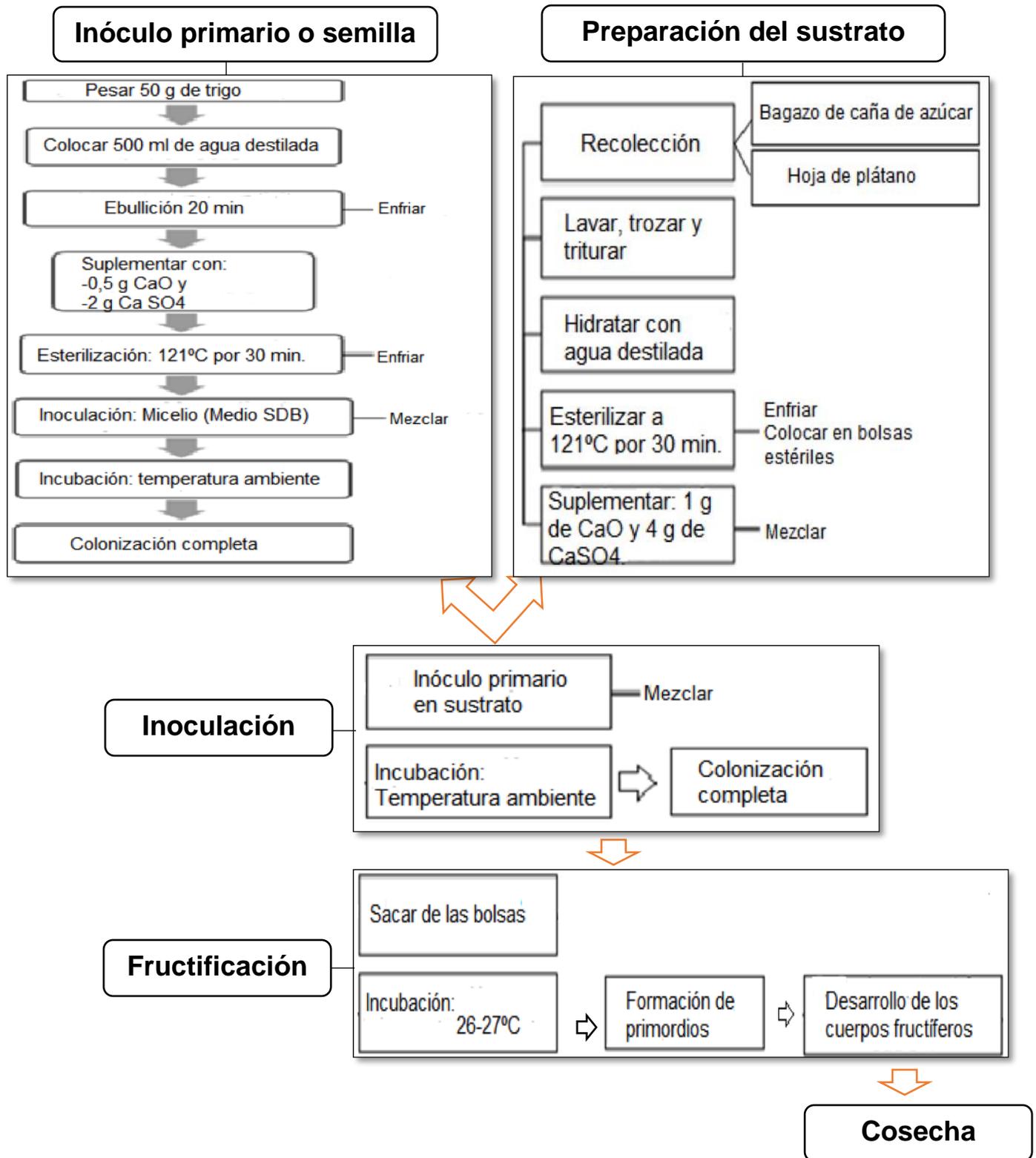
**Hm**= porcentaje de humedad

**m**= peso de la cápsula vacía (g)

**m1**= peso de cápsula + muestra a analizar (g)

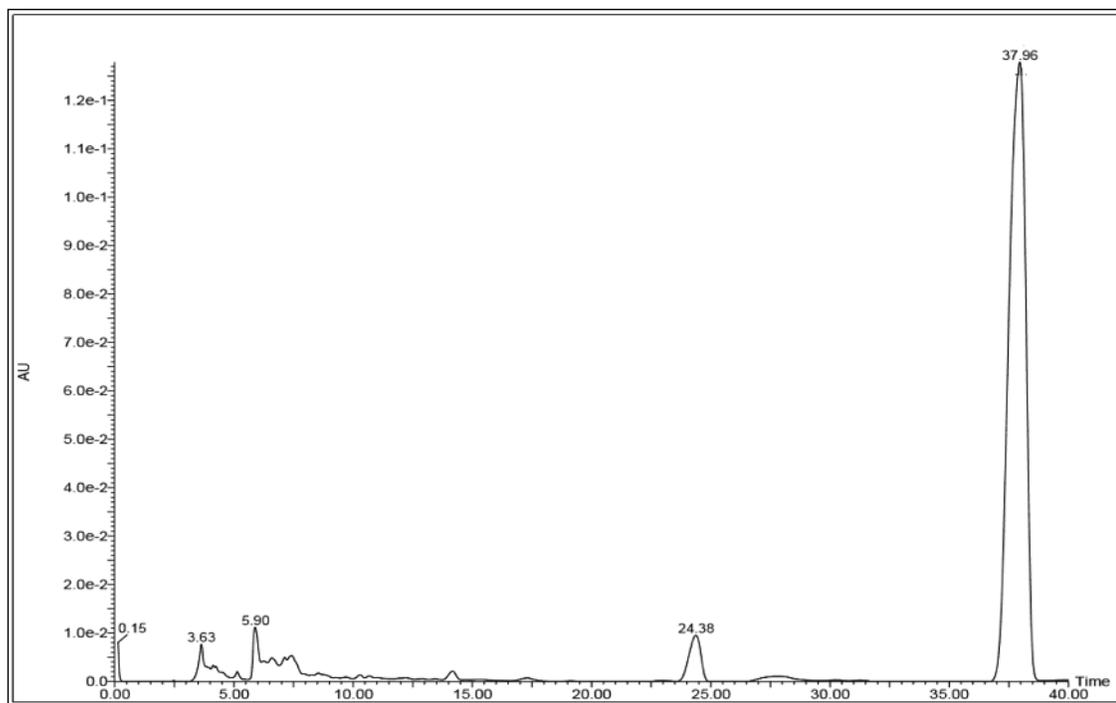
**m2**= peso de la cápsula + muestra seca (g)

**ANEXO 3. Diagrama del proceso de Fructificación de *Pleurotus djamor***

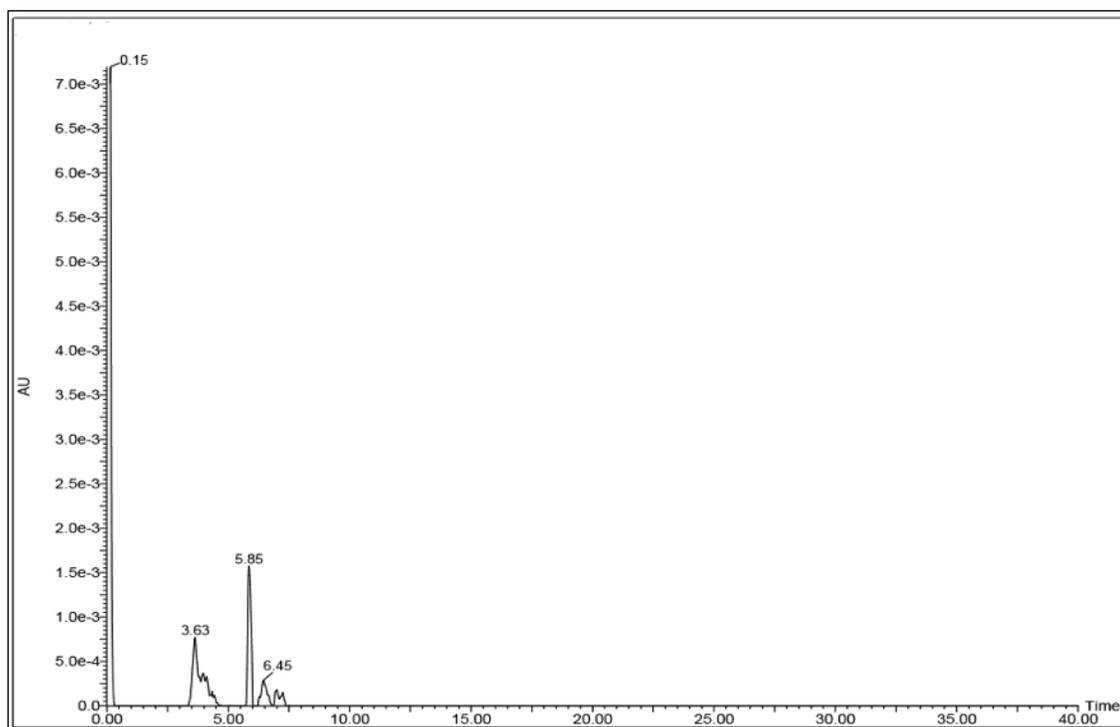


## ANEXO 4. Cromatogramas obtenidos de los extractos a 254 nm y 360 nm

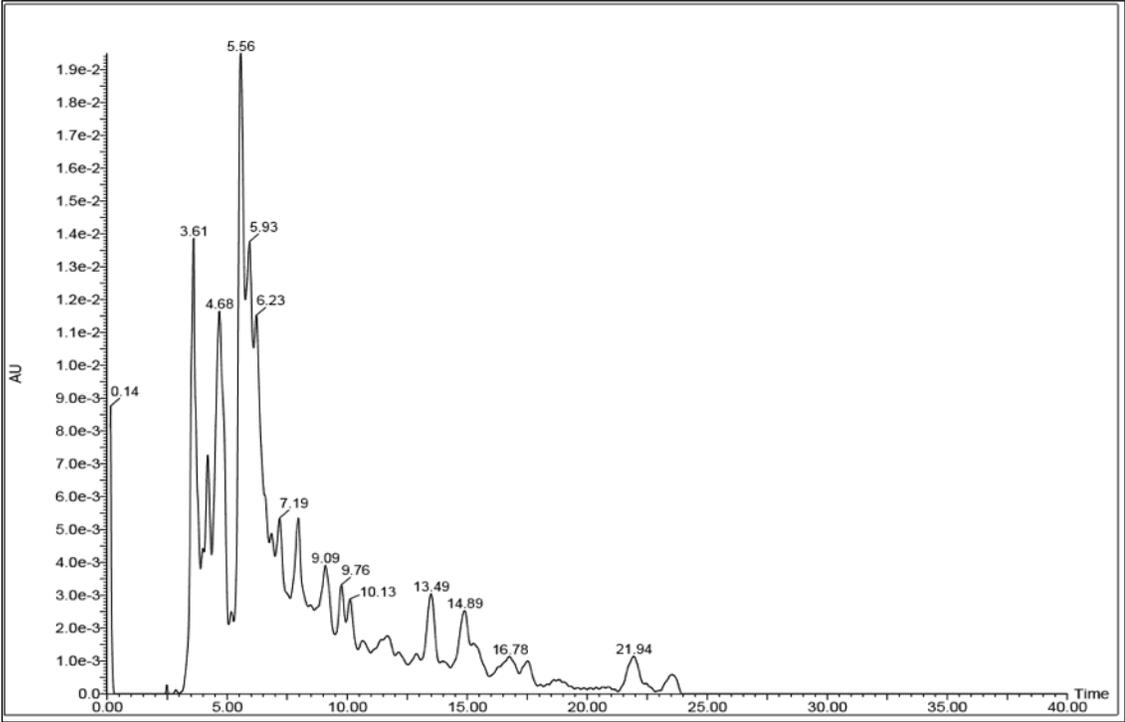
### Extracto E1-254 nm



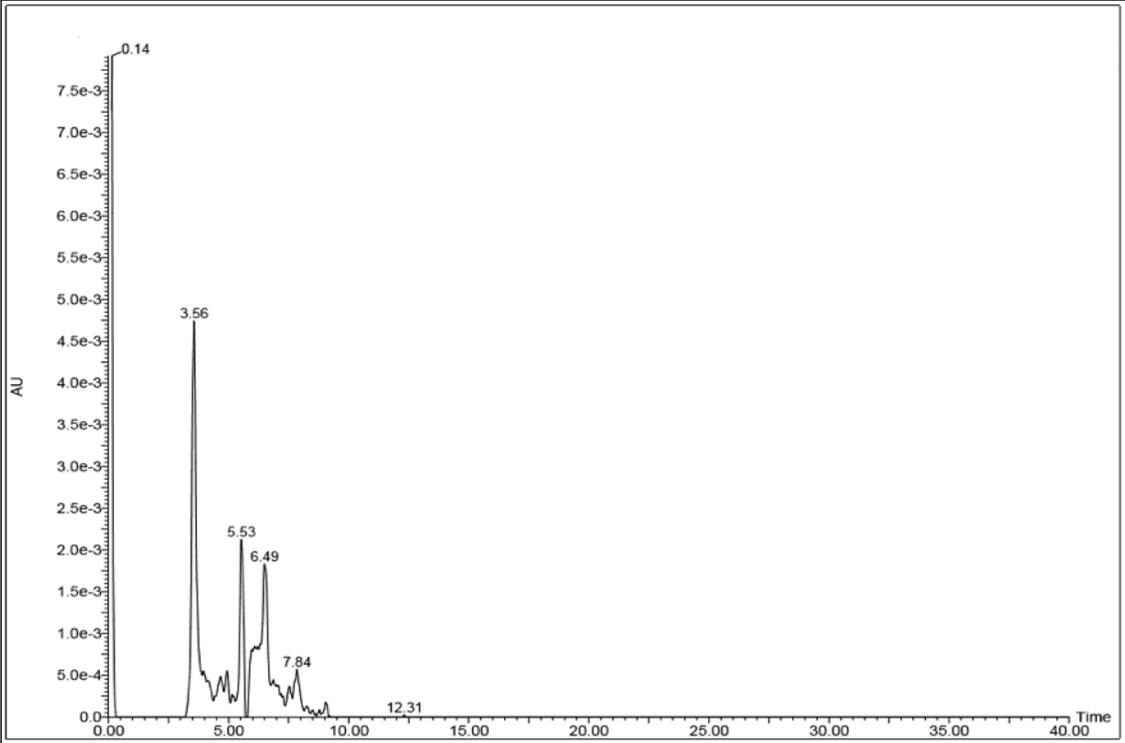
### Extracto E1-360 nm



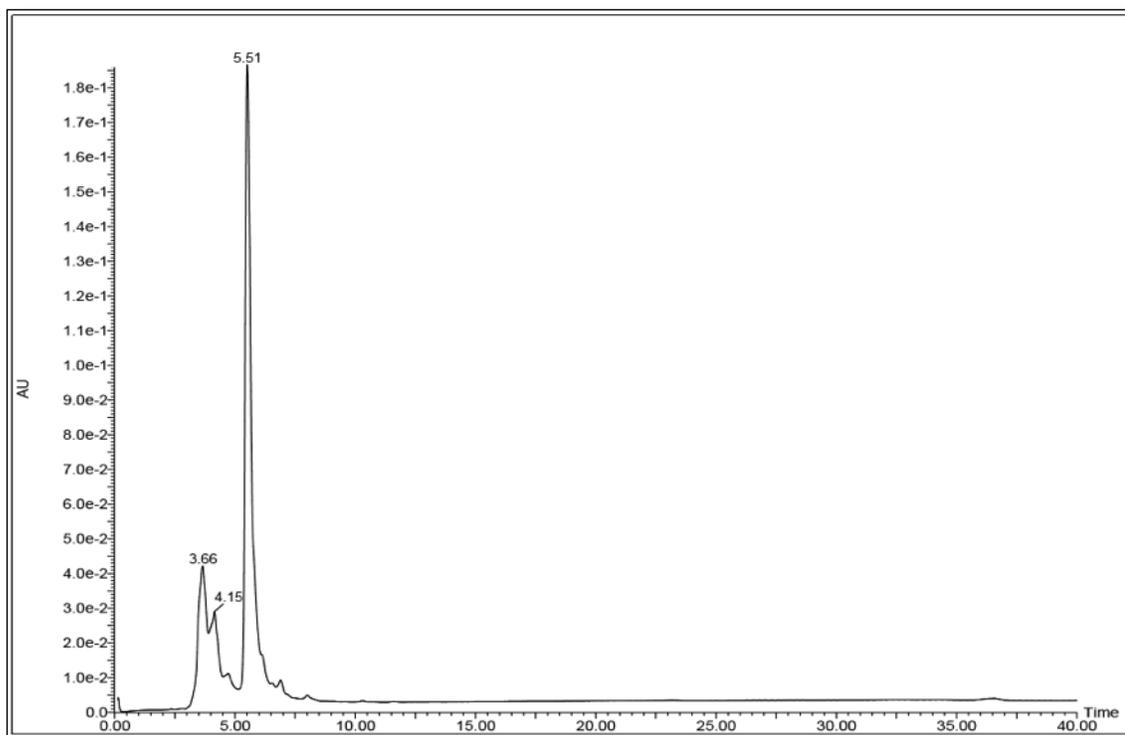
**Extracto E2-254 nm**



**Extracto E2-360 nm**



### Extracto E3-254 nm



### Extracto E3-360 nm

