



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Estudio químico y de potencial antimicrobiano del estípite de shiitake (*Lentinula edodes*) y su factibilidad de empleo como ingrediente nutraceútico en la preparación de alimento aviar

Janeth Rocío Rojas Luna

Universidad Nacional de Colombia
Facultad Ciencias, Departamento Química
Bogotá D.C., Colombia
2012

**Estudio químico y de potencial
antimicrobiano del estípite de shiitake
(*Lentinula edodes*) y su factibilidad de
empleo como ingrediente nutraceútico en la
preparación de alimento aviar**

Janeth Rocío Rojas Luna

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias-Química

Directora:

Dr. Sci. Ivonne Jeannete Nieto Ramírez

Línea de Investigación:

Productos Naturales

Grupo de Investigación:

Química de Hongos Macromicetos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad Ciencias, Departamento Química
Bogotá D.C., Colombia

2012

GRACIAS A DIOS PARA EL SEA SIEMPRE TODO EL HONOR Y LA GLORIA.

*PARA LO MEJOR QUE HAY EN MI VIDA MATILDE, HUMBERTO, HEIDI Y MARLON
MI FAMILIA..... GRACIAS*

Agradecimientos

A mi directora, Profesora Ivonne Nieto, por todo el conocimiento transmitido, por su confianza, por la oportunidad, por su apoyo siempre incondicional muchas gracias.

Al profesor Augusto Rivera, por su valioso consejo al momento de ingresar al programa de posgrado.

A Carolina Chegwin y Carolina Suarez, gracias por su apoyo en la parte experimental.

A Julián Guevara, gerente de “Fungita” por el material fúngico empleado para este estudio.

A Nancy Sánchez, gracias por su apoyo en el trabajo experimental. Laboratorio de Nutrición, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al profesor Pedro de Brito, Director del Laboratorio de Microbiología- Departamento de Química, por brindarme las instalaciones del laboratorio para realizar los primeros ensayos de actividad.

Al químico Jorge Daza, por su ayuda en los primeros ensayos de actividad.

A Gregorio Medina, técnico del Laboratorio de Control Microbiológico del ICTA, por brindarme las instalaciones del laboratorio para mi trabajo experimental.

A los profesores Leonardo Castellanos y Freddy Ramos. Por el préstamo de equipos que permitieron parte del desarrollo de este trabajo. Laboratorio de Productos Naturales Marinos- Departamento de Química.

Al profesor Gonzalo Díaz González. Director del Laboratorio de Toxicología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Gracias.

A la veterinaria Amparo Cortes Sierra. Laboratorio de Toxicología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Gracias.

Al profesor Jaime Fernando González. Director del Laboratorio de Toxicología Acuática Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Gracias.

A la Profesora Liliana Betancourt, gracias por su asesoría y amistad.

A la Química Sandra Liliana Molina, gracias por su ayuda. Laboratorio de Productos Naturales Marinos.

A mis amigos Carolina Montaña, Eliana Espitia, Diana Ochoa, Yenny Pinilla, Nhora Mora, Mario Muñoz. Gracias por toda su ayuda y sus palabras de apoyo.

A mi familia, Matilde, Humberto, Heidi, Marlon, por su amor incondicional, por estar siempre a mi lado y por ayudarme en momentos difíciles. Mil gracias.

Resumen

La fracción lipídica del estípite de Shiitake fue analizada por Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de Masas encontrándose que está constituida por ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos saturados e insaturados, siendo el mayoritario de ellos el ácido linoléico (25.52%), ácido palmítico(10.08%). En cuanto a los compuestos de carácter triterpenoide estos corresponden estructuralmente al núcleo ergostánico, dentro de los cuales se encuentran esteroides, epóxiesteroides y cetosteroides, siendo el mayoritario el ergosta-5,7,22-trien- β -ol (ergosterol) con un 39,52%, seguido del Ergosta-7-en-3 β -ol (8.21%), el Ergosta-7,22-dien-3 β -ol (3.29%) y el Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol (1.39%). Así mismo, se encuentra presente un triterpeno (Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno) en una proporción del 1.91%. La determinación de la actividad antibacteriana mostró que todos los esteroides, junto con el ácido linoléico exhiben actividad antimicrobiana frente a *S. enteritidis*, *Ps. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. enteritidis* y *E. coli*., indicando que son estos compuestos los responsables de la actividad antimicrobiana previamente reportada para el extracto clorofórmico del estípite de Shiitake.

Palabras clave: Estípite, Shiitake, triterpenoides, nutraceutico, análisis proximal, actividad antibacteriana.

Abstract

When we analyzed the lipid fraction the Shiitake stipe by gas chromatography coupled with mass spectrometry, we found that it was composed of methyl and ethyl esters of saturated and unsaturated fatty acids, of which the largest part were linoleic acid (25.52%), palmitic acid (10.08%). Triterpenoid compounds have ergostane cores placing them structurally in the larger group of molecules which includes sterols, epoxysterols and ketosteroids. The largest part are ergosta-5,7,22-trien- β -ol (ergosterol) with 39.52%, followed by ergosta-7-en-3 β -ol (8.21%), ergosta-7,22-dien-3 β -ol (3.29%), and ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol (1.39%). 1.91% of a triterpene - ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaene - is also present. Testing to determine antimicrobial activity showed that all sterols together with linoleic acid exhibit antibacterial activity against *S. enteritidis*, *Ps. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. enteritidis* and *E. coli*. This indicates that these compounds are responsible for the antibacterial activity previously reported for the chloroform extract of the Shiitake stipe.

Key words: Stipe, Shiitake, triterpenoids, antibacterial activity, nutraceutical, proximate composition.

Contenido

Resumen	VI
Abstract	VII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	XIII
Lista de diagramas	XVI
Lista de símbolos y abreviaturas	XVII
Capítulo 1. Estado del arte	1
1.1 Generalidades de los hongos.....	2
1.2 Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>).....	5
1.2.1 Valor nutricional del Shiitake.....	5
1.2.2 Valor medicinal del Shiitake	8
1.3 Planteamiento del problema.....	16
1.4 Bibliografía	17
Capítulo 2. Valor nutricional del estípite de Shiitake	26
2.1 Introducción.....	27
2.2 Materiales y métodos	28
2.2.1 Material fúngico	28
2.2.2 Análisis proximal	28
2.2.3 Análisis de minerales	28
2.2.4 Extracción de polisacáridos	28
2.2.5 Cuantificación de polisacáridos totales.....	29
2.2.6 Cuantificación de β -Glucanos	29
2.3 Resultados y discusión.....	30

2.4 Conclusiones.....	35
2.5 Bibliografía	35
Capítulo 3. Determinación de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos y compuestos triterpenoides del estípite de Shiitake.....	38
3.1 Introducción.....	39
3.2 Materiales y métodos	39
3.2.1 Material fúngico	39
3.2.2 Técnicas cromatografías utilizadas.....	39
3.2.3 Elección del disolvente de extracción.....	40
3.2.4 Extracción de los compuestos triterpenoides	40
3.2.5 Separación y purificación de los compuestos triterpenoides por cromatografía en columna (CC)	41
3.2.6 Purificación de las fracciones por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) con columna semipreparativa	43
3.3 Resultados y discusión.....	44
3.3.1 Elección del disolvente de extracción.....	44
3.3.2 Extracto clorofórmico crudo	45
3.3.4 Fracción de triterpenoides presentes en el extracto de estípite de Shiitake	53
3.3.5 Cuantificación relativa de los compuestos mayoritarios del extracto clorofórmico del estípite de Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>).....	67
3.3.6 Purificación de las fracciones por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) semipreparativa	68
3.4 Conclusiones.....	69
3.5 Bibliografía	70
Capítulo 4. Actividad antimicrobiana del estípite de Shiitake	73
4.1 Introducción.....	74
4.2 Materiales y métodos	74
4.2.1 Material fúngico	74
4.2.2 Compuestos utilizados en la actividad antimicrobiana.....	74
4.2.3 Microorganismos utilizados.....	75
4.2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	75
4.3 Resultados y discusión.....	75

4.3.1 Actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas.....	77
4.3.2 Actividad antimicrobiana del extracto crudo del estípite contra bacterias benéficas	85
4.4 Conclusiones.....	86
4.5 Bibliografía	87
5. Conclusiones generales y perspectivas	97
Anexo 1: Desviación estándar y coeficiente de variación	98

Lista de figuras

Figura 1-1:	Cuerpo fructifero de un Basidiomiceto <i>Amanita cesarea</i>	3
Figura 1-2:	Hongo Shiitake.....	5
Figura 1-3:	Estructura del lentinan	9
Figura 1-4:	Estructura de la eritadenina	10
Figura 2-1:	Curva de calibración de glucosa	33
Figura 2-2:	Curva de calibración de β -1,3-1,6 glucanos.....	34
Figura 3-1:	Cromatogramas de gases del extracto metanólico y clorofórmico del estípite de Shiitake.	44
Figura 3-2:	Cromatograma de gases del extracto clorofórmico crudo del estípite de Shiitake	46
Figura 3-3:	Cromatograma de gases de la fracción 17- 48	47
Figura 3-4:	Espectro de masas del compuesto 1	48
Figura 3-5:	Espectro de masas del compuesto 2	48
Figura 3-6:	Espectro de masas del compuesto 3	49
Figura 3-7:	Espectro de masas del compuesto 4	50
Figura 3-8:	Espectro de masas del compuesto 5	50
Figura 3-9:	Espectro de masas del compuesto 6	51
Figura 3-10:	Cromatograma de gases de la fracción 65-88	51
Figura 3-11:	Espectro de masas del compuesto 7	52
Figura 3-12:	Cromatograma de gases de la fracción 102-121	53

Figura 3-13:	Espectro de masas compuesto 1T	54
Figura 3-14:	Espectro de masas compuesto 2T	55
Figura 3-15:	Espectro de masas compuesto 3T	56
Figura 3-16:	Espectro de masas compuesto 4T	56
Figura 3-17:	Cromatograma de gases de la fracción 122-133	57
Figura 3-18:	Espectro de masas compuesto 5T	58
Figura 3-19:	Cromatograma de gases de la fracción 198-204	59
Figura 3-20:	Espectro de masas compuesto 7T	59
Figura 3-21:	Espectro de masas compuesto 8T	60
Figura 3-22:	Espectro de masas compuesto 10T	62
Figura 3-23:	Espectro de masas compuesto 11T	63
Figura 3-24:	Espectro de masas compuesto 11T	63
Figura 3-25:	Espectro de masas compuesto 12T	65
Figura 3-26:	Cromatograma CLAE de la fracción 102-121	68
Figura 3-37:	Cromatograma CLAE de la fracción 122-133	69

Lista de tablas

Tabla 1-1:	Composición proximal y de minerales del Shiitake	6
Tabla 1-2:	Composición de ácidos grasos del Shiitake	6
Tabla 1-3:	Composición de aminoácidos del Shiitake	7
Tabla 1-4:	Estudios de actividad antimicrobiana del Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>)	11
Tabla 1-5:	Compuestos triterpenoidales aislados del Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>).....	12
Tabla 1-6:	Compuestos triterpenoides con actividad antimicrobiana	15
Tabla 2-1:	Composición proximal del estípite de Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>).....	30
Tabla 2-2:	Comparación entre la Composición proximal del estípite de Shiitake y la de ingredientes básicos en la dieta de aves	30
Tabla 2-3:	Contenido de minerales del estípite de Shiitake, de maíz, de sorgo y de torta de soya	31
Tabla 3-1:	Componentes mayoritarios de la fracción grasa no triterpenoidal del estípite de Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>).....	52
Tabla 3-2:	Componentes mayoritarios de la fracción triterpenoidal del estípite de Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>).....	66
Tabla 3-3:	Componentes mayoritarios del extracto clorofórmico del estípite de Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>)	67
Tabla 4-1:	Actividad antimicrobiana del extracto clorofórmico del estípite de Shiitake...	77
Tabla 4-2:	Actividad antimicrobiana a menor concentración	81

Tabla 4-3: Actividad antimicrobiana de los compuestos aislados del extracto clorofórmico del estípite de Shiitake.....	80
Tabla 4-4: Actividades antimicrobianas reportadas para hongos Basidiomicetos	83
Tabla 4-5: Actividad antibacteriana de compuestos puros frente a <i>S. aureus</i>	85
Tabla 4-6: Actividad antimicrobiana del extracto crudo del estípite contra bacterias benéficas.....	86

Lista de diagramas

Diagrama 2-1:	Extracción de carbohidratos.....	29
Diagrama 3-1:	Obtención del extracto clorofórmico crudo	41
Diagrama 3-2:	Cromatografía en columna del extracto clorofórmico crudo.....	42
Diagrama 3-3:	Purificación de las fracciones por CLAE semipreparativa.....	43
Diagrama 3-4:	Fragmentaciones del compuesto 8T.....	61
Diagrama 3-5:	Fragmentaciones de los compuesto 11T-13T	64
Diagrama 3-6:	Fragmentaciones del compuesto 12T.....	66
Diagrama 4-1:	Método de difusión en agar.....	76

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviaturas	Término
AcOEt	Acetato de etilo
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CHCl ₃	Cloroformo
CL	Cadena lateral
CZ	ZnCl ₂ en metanol al 30%
LB	Liebermann-Burchard.
EM	Espectro de masa
M ⁺	Pico del ión molecular
m/z	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
min	Minutos
PM	Peso molecular
Tol	Tolueno
tr	Tiempo de retención en minutos para CG
uma	Unidad de masa atómica

Capitulo 1. Estado del arte

1.1 Generalidades de los hongos

Debido a la importancia que tienen los hongos dentro de la naturaleza tanto por su papel en la alimentación humana y en la prevención de enfermedades, como por su acción en el ecosistema y al hecho de que han estado ligados al hombre desde tiempos inmemoriales, los estudios realizados sobre estos organismos han permitido incrementar su conocimiento en aspectos taxonómicos, ecológicos, nutricionales, farmacológicos y bioquímicos (Guzmán, et al. 1992).

- **Qué son los hongos?**

Los hongos son organismos eucariotas, unicelulares o pluricelulares, que presentan nutrición heterotrófica y se reproducen por esporas asexuales y sexuales.

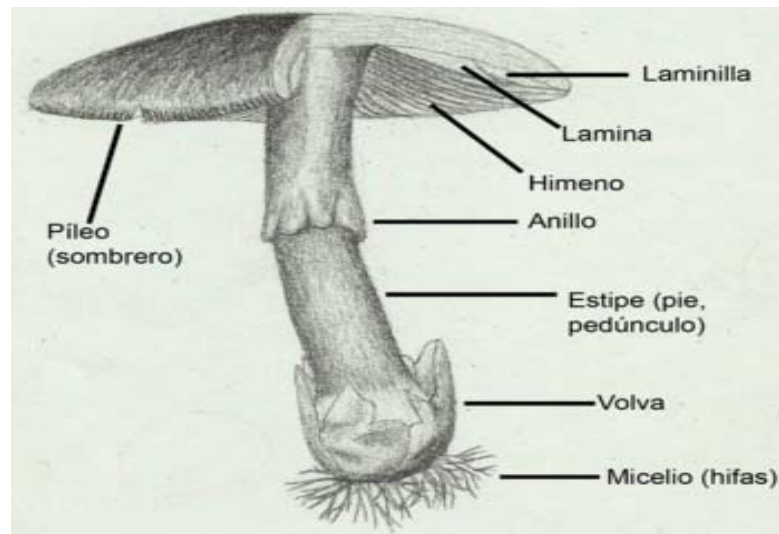
- **Qué importancia tienen los hongos?**

En la naturaleza su función principal es descomponer y transformar la materia orgánica en sustancias más simples y asimilables para ser utilizadas por otros seres vivos. Pero también pueden desarrollarse formando asociaciones de beneficio mutuo con las raíces de las plantas (micorrizas) y con algas dando origen a los líquenes.

En relación con el hombre, los hongos han jugado y juegan un papel muy importante en la medicina, la industria y la alimentación. La era de los antibióticos se inicia con el descubrimiento de la penicilina, obtenida a partir del hongo *Penicillium notatum*. Así mismo, algunos hongos son importantes en la industria de quesos, cerveza, vinos y otros en las cuales se utilizan para mejorar sus propiedades organolépticas y/o producir alimentos funcionales. Aunado a lo anterior, está la excelente fuente de vitaminas, proteínas, fibra y minerales que aportan los hongos comestibles (Miles, et al. 1999).

- **Clasificación de los hongos**

En la naturaleza es posible encontrar una gran variedad de hongos y los criterios utilizados para su clasificación se basa fundamentalmente en sus características morfológicas. Existen varias clasificaciones para los hongos una de ellas los agrupa en inferiores y superiores. Los inferiores son los que no se pueden ver a simple vista, teniendo que utilizar un microscopio para su observación, de ahí que se llamen también hongos microscópicos o micromicetos. Los superiores o macroscópicos (macromicetos), (figura 1.1) son las populares “setas” cuyo órgano productor de esporas es lo suficientemente grande para ser visto por el ojo humano y que se recolectan en bosques o en otros casos se cultivan. Dichas fructificaciones son a las que comúnmente se les llama “hongo”, sin embargo estas estructuras constituyen el fruto (cuerpo fructífero) del verdadero hongo, el cual vive y se desarrolla en el suelo o en el substrato en donde crece (Miles, et al. 1999).

Figura 1-1: Cuerpo fructífero de un Basidiomiceto *Amanita cesarea*

Fuente: Recuperado, abril 11 de 2012 en:

[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Amanita_Cesarea_\(diagrama\).png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Amanita_Cesarea_(diagrama).png)

Dentro del gran grupo de hongos macromicetos, también se puede hacer una clasificación sencilla de acuerdo a su comestibilidad. De allí se derivan dos grupos, los comestibles y los no comestibles. Es así como los basidiomicetos (pertenecientes a los macromicetos) incluyen especies venenosas como la *Amanita phalloides* y especies importantes por su comestibilidad y relación simbiótica con plantas como el caso de *Amanita caesarea* o por su valor nutritivo y características organolépticas como el *Agaricus bisporus* (champiñón de París) (Polese 2005).

Desde tiempos remotos en la historia primitiva del hombre, ya se conocían una gran variedad de especies de hongos comestibles, por lo que han jugado un papel muy importante en la dieta de muchos pueblos (Chang, et al. 1978). Los griegos Eurípides, Teofrasto y Plinio describieron el consumo de los hongos comestibles en su tiempo. Los romanos conocían varios hongos comestibles y venenosos, los japoneses aprendieron hace siglos la técnica para cultivar *Lentinula edodes*, conocido popularmente como "Shiitake" (Chang 1980, Chang, et al. 1978). Los hongos comestibles cultivados más antiguos son de las especies *Auricularia auricula*, con alrededor de 1400 años de antigüedad; *Flammulina velutipes* con alrededor de 1100 años; *Lentinula edodes* con aproximadamente 1000 años y *Volvariella volvacea* con 300 años, todos cultivados en China. *Agaricus bisporus* fue cultivado por vez primera en Francia por los años de 1650 y es actualmente el hongo con mayor desarrollo tecnológico y una gran producción a nivel mundial (Chang, et al. 2004).

El cultivo de los hongos comestibles es actualmente una actividad que se desarrolla ampliamente en diversas partes del mundo, como en Norte América, Europa y el sureste de Asia. En América Latina, a pesar de la potencialidad que existe en la región para

cultivar especies que se desarrollan de manera silvestre y de la enorme tradición etnomicológica que existe para el consumo de los hongos comestibles, el cultivo de estos se ha desarrollado muy poco (Martínez-Carrera, et al. 1998). En Colombia, hasta la mitad del siglo XX se consumían solamente champiñones (*Agaricus bisporus*) importados por estratos altos y no con mucha frecuencia. Precisamente a partir de 1950 se cultivo en la sabana de Bogotá el Champiñón (*Agaricus bisporus*) para abastecer un mercado nacional que demanda tantos champiñones frescos como enlatados, cultivo que se fue expandiendo en el país.

El mismo iniciador del cultivo de champiñón en Bogotá, Alfredo Beck, introdujo el cultivo del Shiitake (*Lentinula edodes*) sobre granos de cereales esterilizado, sin pasar de su etapa vegetativa solo con el propósito de producir micofarina. Recientemente se ensayo con mejores resultados el cultivo del Shiitake sobre desechos orgánicos agroindustriales como la zoca y la borra de café (Jaramillo, et al. 2001). Su potencial en el mercado interno depende mucho de la educación que reciba el consumidor y de la persuasión acerca de sus cualidades nutritivas.

Adicionalmente, estos hongos se han incorporado en el tratamiento de diversas enfermedades lo cual ha llevado a un incremento en su producción en las últimas décadas. Por ejemplo, el Shiitake, es el segundo hongo comestible mas cultivado, comprende cerca del 25% de la producción mundial, después del *Agaricus bisporus* (Chandra, et al. 2011). Los hongos comestibles en los últimos años han sido objeto de intensa comercialización por su valor nutritivo dada su importancia en la alimentación debido a su valor dietético (bajo contenido en grasas), significativo contenido de proteínas, minerales, ácidos grasos esenciales y vitaminas que los posiciona por encima de la mayoría de vegetales y frutas (Guzmán, et al. 1992).

- **Los hongos como alimento funcional**

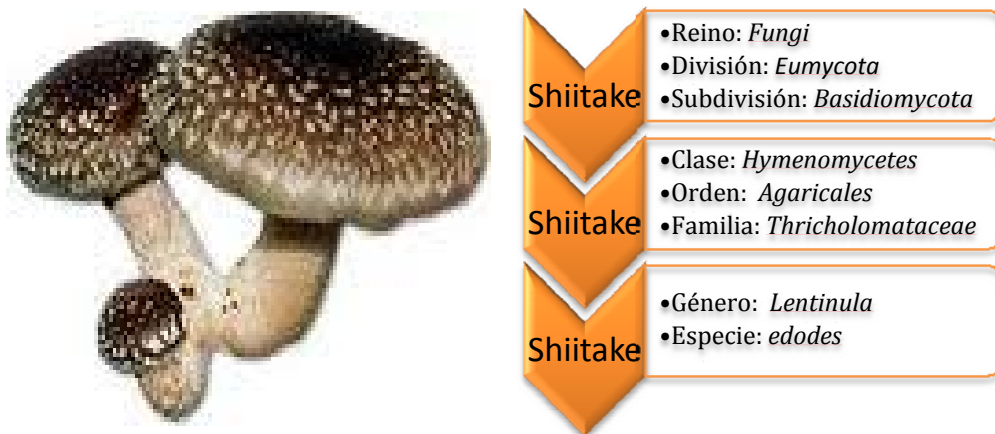
Un alimento funcional es todo aquel alimento que al ser consumido como parte de la dieta diaria, además de sus funciones nutricionales básicas, es capaz de producir efectos metabólicos o fisiológicos, útiles en el mantenimiento de una buena salud física, ayudando en la reducción del riesgo de enfermedades (Valencia, et al. 2004).

Basados en este concepto los hongos comestibles son considerados un excelente alimento funcional que proporcionan valores nutricionales altos y beneficios para la salud. Cuando se consumen como parte de una dieta normal nos podemos referir a ellos como nutracéuticos. Cuando su consumo se efectúa mediante la utilización de sus extractos o compuestos que han sido extraídos de sus fructificaciones y/o micelio se habla entonces de nutricéuticos y presentan un gran potencial tomados como suplementos nutricionales, los cuales sirven tanto para la prevención como para el tratamiento de varias enfermedades (Miles, et al. 1999).

1.2 Shiitake (*Lentinula edodes*).

- **Clasificación taxonómica**

Figura 1-2: Hongo Shiitake



Fuente: Recuperado, mayo 10 de 2012 en: <http://www.mdidea.com/products/new/new05911.html>

- **Generalidades**

El nombre Shiitake es tomado del idioma Japonés, donde “Shii” es un tipo de árbol donde crece naturalmente y “take” significa hongo. También se le conoce como “hongo negro del bosque” y “Shiang-gu”. El Shiitake es un hongo basidiomiceto cuyo nombre científico es “*Lentinula edodes*”, en su denominación latina hace referencia a su forma de lente “Lentínula” y “edodes” por ser comestible.

Crece de forma silvestre sobre residuos de lignina y celulosa, como la que contienen la madera y sus derivados, algunos tipos de bagazo, como el de caña de azúcar y de café. Y es precisamente el hecho de que este hongo se desarrolle sobre residuos agroindustriales lo que lo hace todavía más importante, ya que se pueden emplear para degradar materiales residuales que constituyen un problema ambiental, tanto en la agricultura como en las fuentes hídricas por la contaminación que ellos producen (Guzmán, et al. 1993).

1.2.1 Valor nutricional del Shiitake.

La composición nutricional del Shiitake (Tabla 1-1), indica que es una buena fuente de proteínas, valor que es ligeramente menor a la de alimentos como carne de res 24-31%, cerdo 23-24%, (Carvajal 2001) y mayor a cereales como el maíz 8.1 %, el trigo 14.5% y

leche 3-4% (Calderón, et al. 2006, Sauvant, et al. 2003) también tiene un alto contenido de fibra y concentraciones altas de minerales como potasio, magnesio, calcio, manganeso y cobre (Bisen, et al. 2010, Martínez-Carrera, et al. 2004).

Tabla 1-1: Composición proximal y de minerales del Shiitake / 100 g de muestra

Componentes	Concentración
Humedad	4.7 g
Proteína Cruda	22.8 g
Grasa Cruda	3.2 g
Cenizas	6.0 g
Carbohidratos y fibra	64.4 g
Fósforo	439 mg
Magnesio	200 mg
Calcio	127 mg
Zinc	4.3 mg
Manganeso	5.1 mg
Cobre	0.9 mg

*Valores expresados en base en materia seca

Fuente: (Bisen, et al. 2010, Longvah, et al. 1998)

Si bien el contenido de lípidos totales en el Shiitake es bajo 3.2%, al compararlo con cereales como maíz, trigo, avena, sorgo (Sauvant, et al. 2003), es importante destacar la presencia de ácidos grasos, de los cuales el 77.7% son insaturados (Tabla 1-2), proporcionándole al hongo un valor adicional ya que estos son esenciales y por ende requeridos en la dieta humana. El ácido linoléico es el ácido graso insaturado que se presenta en mayor proporción (68.88%), seguido del ácido palmítico (19.2%).

Tabla 1-2: Composición de ácidos grasos del Shiitake

Ácidos grasos	Concentración
C 16.0 Palmítico	19.2%
C 18.0 Esteárico	2.7%
C 20.0 Araquídico	0.4%
C18.1 Oleico	8.3%
C18.2 Linoléico	68.8%
C18.3 Linolénico	0.6%
Total de saturadas	22.3%
Total de insaturadas	77.7%

*Valores del porcentaje total de grasa

Fuente: (Bisen, et al. 2010, Longvah, et al. 1998)

Estudios realizados por Crisand y Sands (1978) citados por Miles y Chang (1999), muestran que el Shiitake posee solamente un 18% de proteína cruda. Si bien esta cantidad es baja si se la compara con la obtenida de la carne, en ella se encuentran todos los aminoácidos esenciales para el hombre, incluyendo leucina y lisina en grandes cantidades (Tabla 1-3), los cuales por lo general están ausentes en la mayoría de cereales y sus subproductos. Según Shu-Ting Chang, profesor de biología en la Universidad china de Hong Kong, y Dr. Philip G. Miles, profesor de biología en la Universidad del Estado de Nueva York, esta seta contiene los 9 aminoácidos esenciales en proporción similar a la ideal para nutrición humana. Además contiene cantidades significativas de vitaminas A, C, B1, B2, B6, B12, niacina, D, pro-vitamina D (Bisen, et al. 2010).

Tabla 1-3: Composición de aminoácidos del Shiitake

Aminoácidos	Concentración g/16g N
Treonina	3.2
Valina	6.7
Cisteina	1.4
Metionina	0.8
Isoleucina	4.9
Leucina	7.3
Tirosina	3.3
Fenilalanina	4.2
Lisina	6.4
Histidina	2.3
Arginina	8.0
Aspartato	9.9
Serina	5.3
Glutamato	12.6
Prolina	8.0
Glicina	5.1
Alanina	7.8
Total de amino ácidos esenciales	32.8
Total de amino ácidos	97.2

Fuente: (Bisen, et al. 2010, Longvah, et al. 1998)

Del análisis anterior se ve claramente que el Shiitake puede ser utilizado en la alimentación humana y animal, como una fuente de proteína, carbohidratos, grasas, fibra, vitaminas y minerales, con el valor agregado de que, estudios comparativos realizados con hongos de gran aceptación y consumo como son los típicos champiñones, indican que contiene cerca de dos veces el volumen de la fibra que éstos, siendo la fibra del Shiitake de un tipo particular que en estudios clínicos parece ser beneficiosa para el colon, atribuyéndole al consumo del hongo la baja incidencia de cáncer de colon en la población oriental (Smith, et al. 2002).

1.2.2 Valor medicinal del Shiitake

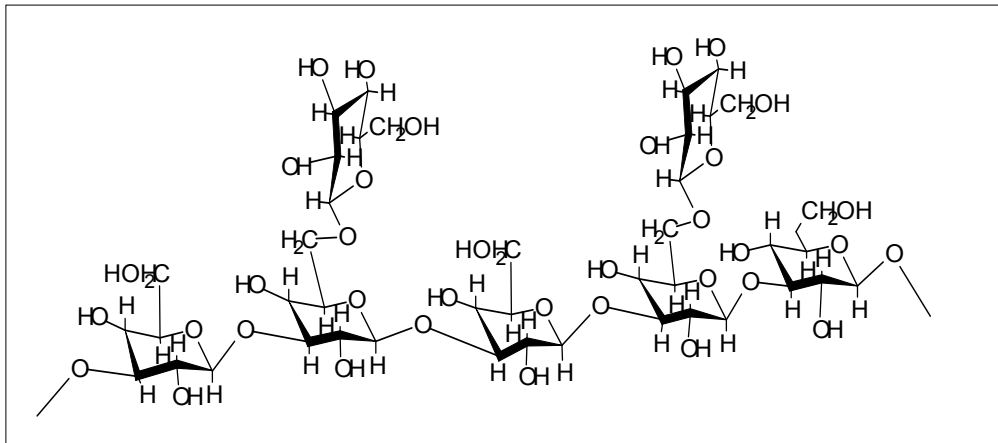
En la medicina oriental se ha empleado durante milenios principalmente en el tratamiento de la hipertensión y en la disminución del colesterol en sangre, así como para la prevención y el tratamiento de muchas afecciones al punto de ser conocido como el “elixir de la vida” (Liu 2004) y es conocido tradicionalmente en la culturas orientales como nutracéutico. Las investigaciones realizadas hasta el presente arrojaron como resultado que las propiedades medicinales son debidas a la producción de metabolitos secundarios, varios de los cuales han sido aislados y evaluados como compuestos con actividad farmacológica. Dentro de las bioacciones presentadas por ellos se destacan actividad antitumoral e inmoestimuladora, hipocolesterolemica, antioxidante y antibacterial (Bisen, et al. 2010, Hearst, et al. 2009, Lindequist, et al. 2005).

- **Actividad antitumoral e inmunomoduladoras**

Las propiedades antitumorales e inmunoestimuladoras reportadas se atribuyen a la presencia de polisacáridos de alto peso molecular como el “lentinan” que es el polisacárido más importante aislado del Shiitake, que corresponde a un β -1,3 glucano con ramificaciones glucopiranosidas β -1,6 y β -1,3, y de estructura de triple hélice (Figura 1-3), se encuentra formando parte de la pared celular de los hongos y se le atribuye propiedades antitumoral, antiviral y potencial antimicrobiano.

Como antitumoral la administración de este polisacárido produce reacciones biológicas inmediatas, específicas y no específicas, a nivel celular, inmunológico y complementario. El “lentinan” estimula la producción de células antitumorales naturales, tales como las células T, células N-K (natural-killer), macrófagos citotóxicos y anticuerpos, estimulando al máximo el sistema inmunológico de los pacientes (Bisen, et al. 2010, Lindequist, et al. 2005, Mizuno 1996, Rop, et al. 2009, Shah, et al. 2011, Wasser 2005).

El lentinan fue descubierto en Japón, donde es utilizado en asociación con la quimioterapia en el tratamiento de cáncer gástrico, colorrectal y de mama, prolongando eficazmente la sobrevivencia de pacientes. En países americanos y europeos, este producto es comercializado como suplemento dietético (nombre del producto Betaglucanos de levadura, contenido β -glucanos (1,3 y 1,6) de: *S. cerevisiae*, *L. edodes*; nombre del producto Shiitake y Maitake contenido Lentinan y *G. frondosa*) En todas las etiquetas se especifica que el propósito no es tratar, diagnosticar, curar o prevenir alguna enfermedad y que estos no han sido evaluados por la FDA (Llauradó, et al. 2011, Martínez-Carrera, et al. 2004).

Figura 1-25: Estructura del lentinan

Igualmente se encuentran en el hongo glicoproteínas como son el LEM (micelio *Lentinula edodes*), que se produce a partir de un extracto en polvo de los micelios del hongo y el LAP es un precipitado obtenido de una solución acuosa del micelio. El LEM y LAP contienen en común galactosa, arabinosa, xilosa, manosa y fructosa, adicionalmente el LEM incluye derivados de ácidos nucleicos, compuestos de vitamina B especialmente B1 (tiamina), B2(riboflavina) y ergosterol. Ambos extractos han demostrado tener fuerte actividad antitumoral al administrarse en animales y humanos, también sean utilizado para el tratamiento de hepatitis B. Del fraccionamiento del LEM se obtiene el EP3, sustancia inmunoactiva consistente en un complejo de lignina (80%), carbohidratos (10%) y proteína (10%)(Mizuno 1995, Wasser 2005). Del cultivo del micelio se obtiene también el KS-2, péptido α -manano, que contiene aminoácidos (serina, treonina, alanina y prolina) dentro de la cadena peptídica, el cual es capaz de inducir la producción de interferón, inhibiendo eficazmente el desarrollo del cáncer, particularmente del carcinoma de Ehrlich y del Sarcoma 180 (Martínez-Carrera, et al. 2004, Suzuki, et al. 1979, Yamashita, et al. 1983).

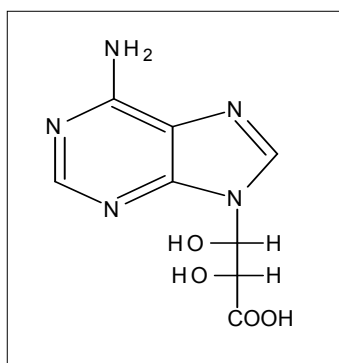
Tanto los β - glucanos como las glicoproteínas exhiben además actividad inmunoestimuladora o inmunopotenciadora, ya que son modificadores de la respuesta biológica de un organismo (MRB) debido a la estimulación del sistema inmunológico, lo que puede generar diferentes efectos terapéuticos (Wasser et al, 1999, Smith et al, 2002).

- **Actividad hipocolesterolemica**

La eritadenina (Figura 1-4) compuesto denominado también lentinacina o lenticina.tiene la capacidad de reducir el colesterol y lípidos en animales. Su modo de acción no inhibe la biosíntesis del colesterol sino que acelera la excreción del colesterol consumido y su

descomposición metabólica. Chivata, en 1969, adicionó 0.005% de eritadenina en el alimento para ratas, observando una disminución del 25% del colesterol total en tan sólo una semana. Rokujo y colaboradores en 1969 concluyeron que la actividad de la eritadenina es mayor si se tiene una dieta alta en grasas. Kimoto y colaboradores en 1976, así como Kabir y Kimura en 1989, llegaron a la conclusión de que una dieta alimenticia con Shiitake reduce el colesterol libre en el plasma sanguíneo, reduce la presión arterial y remueve los lípidos del sistema circulatorio (Wasser, et al. 1999).

Figura 1-3: Estructura de la eritadenina



- **Actividad antimicrobiana**

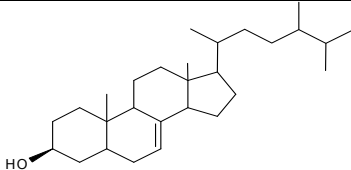
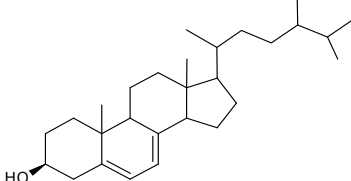
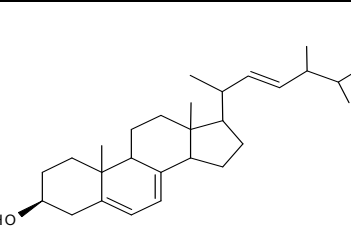
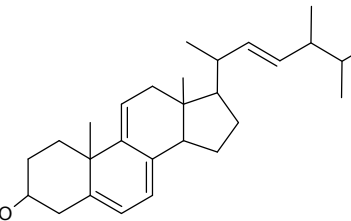
La actividad antimicrobiana de extractos de Shiitake reviste especial importancia en los últimos años dado la aparición de muchas cepas bacterianas multirresistentes, lo que se ha convertido según la OMS (Organización Mundial de la Salud) y algunos autores como la mayor emergencia y el problema de salud pública más importante en la actualidad (Hearst et al, 2009). La relevancia de este hongo en la búsqueda de nuevos compuestos antibióticos radica en que se ha considerado como una posible fuente natural de ellos (Kitzberge et al, 2007). Son varias las investigaciones que ponen de manifiesto el hecho de que los principios activos contenidos en los extractos clorofórmicos, acuoso y en acetato de etilo a partir del cuerpo fructífero del Shiitake exhiben actividad antibacteriana sobre un buen número de microorganismos (Tabla 1-4). Así mismo, se ha reportado dicha actividad en micelio y medio de cultivo proveniente de la fermentación en estado sumergido del Shiitake. Es importante anotar que la actividad antimicrobiana varía de acuerdo al tipo de extracto evaluado y que en algunos casos se atribuye la actividad de los mismos a compuestos tales como la lentinina, derivados disulfuros, ácido gálico y el lentinan.

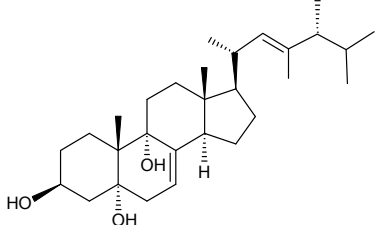
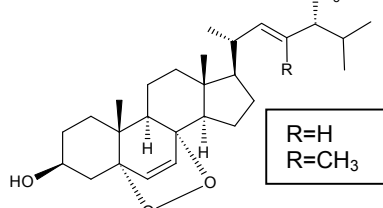
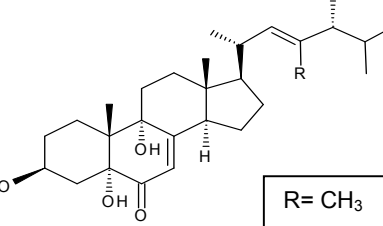
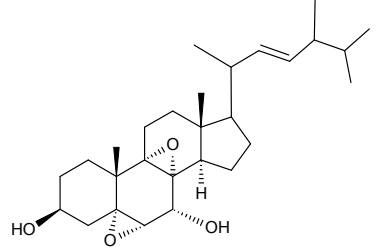
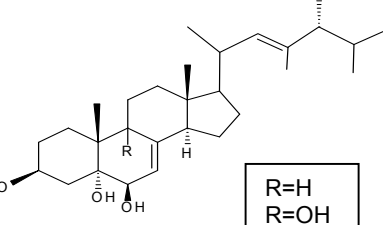
Tabla 1-4: Estudios de actividad antimicrobiana del Shiitake (*Lentinula edodes*)

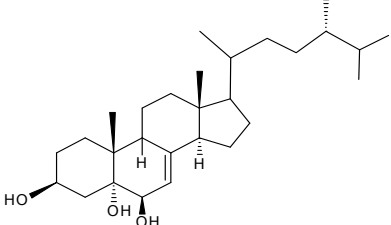
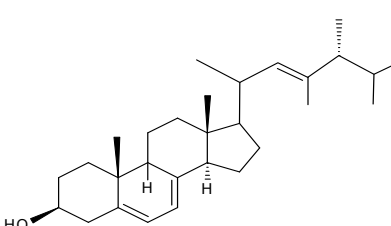
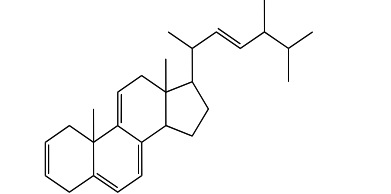
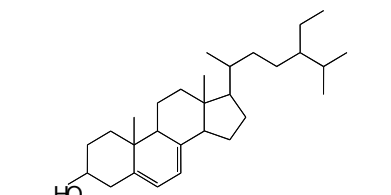
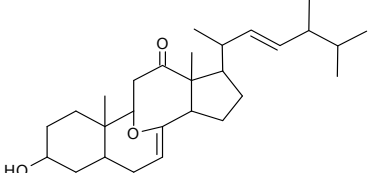
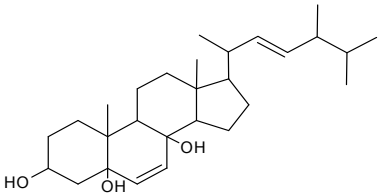
Material evaluado	Extracto	Microorganismo ensayado	Referencias
Carpóforo	Cloroformo	<i>Streptococcus spp.</i> , <i>Actinomyces spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Prevoytella spp.</i> , <i>Porphyromonas spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Sthaphylococcus spp.</i> , <i>Escherichia spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i> , y <i>Candida spp.</i>	(Hirasawa, et al. 1999)
	Acetato de etilo		
	Acuoso		
Micelio	Cloroformo Metanol (9:1)	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Sthaphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i>	(Hatvani 2001)
Micelio	Acuoso	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Sthaphylococcus aureus</i> , <i>Sthaphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus sobrimus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhymurium</i> , <i>Escherichia coli</i>	(De Carvalho, et al. 2007)
Carpóforo	Fluido supercrítico CO ₂ co-solventes Etanol Diclorometano Acetato de etilo	<i>Sthaphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> y <i>Candida albicans</i>	(Kitzberger, et al. 2007)
Carpóforo	Acuoso	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilis</i> , <i>Cupriavides sp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter sp.</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella erogenes</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Salmonella poona</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Serratia/Rapnella sp.</i> , <i>Sthaphylococcus aureus</i> , <i>Sthaphylococcus epidermidis</i> , <i>Sthaphylococcus sp.</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus fumigates</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Exophiala dermatitidis</i> <i>Penicillium sp.</i> , <i>Scedosporium apiospermum</i>	(Hearst, et al. 2009)
Carpóforo	Acuoso	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i>	(Pereira, et al. 2011)

Dado que extractos en disolventes como cloroformo y acetato de etilo presentan actividad antimicrobiana se puede inferir que compuestos de polaridad baja pueden ser responsables de la bioacción. Es bien conocido que compuestos triterpenoides forman parte de los metabolitos secundarios de los basidiomicetos. Dentro de los estudios químicos realizados en *Lentinula edodes* se encontraron esteroides como el ergosta-7-en-3 β -ol; ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol, esteroides polihidroxilados y epoxidados como: 5 α ,8 α -epidioxi-(22E,24R)-23-metilergosta-6,22-dien-3 β -ol; el (22E,24R)-23-metilergosta-7,22-dien-3 β ,5 α ,6 β -triol; cetoesteroides como la 3 β ,5 α ,9 α -trihidroxi-(22E,24R)-23-metilergosta-7,22-dien-6-ona, triterpenos como el ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno y compuesto como el estigmast-5,7-dien-3 β -ol; no comunes para esta seta, todos ellos con núcleo ergostano. (Tabla 1-5).

Tabla 1-5: Compuestos triterpenoidales asilados del Shiitake (*Lentinula edodes*)

Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>)	Compuesto	Referencia
Ergosta-7-en-3 β -ol		(Yokokawa, et al. 1981)
Ergosta-5,7-dien-3 β -ol		(Yokokawa, et al. 1981)
Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol		(Yokokawa, et al. 1981)
Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol		(Benavides 2004)

<p>Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>)</p>	<p>Compuesto</p>	<p>Referencia</p>
<p>(22E,24R)-23-metilergosta-7,22-dien-3β,5α,6β-triol</p>		<p>(Yahoita, et al. 1998)</p>
<p>5α,8α-epidioxi-(22E,24R)-23-metilergosta-6,22-dien-3β-ol 5α,8α-epidioxi-(22E,24R)-ergosta-6,22-dien-3β-ol</p>		<p>(Yahoita, et al. 1998)</p>
<p>3β,5α,9α-trihidroxi-(22E,24R)-23-metilergosta-7,22-dien-6-ona</p>		<p>(Yahoita, et al. 1998)</p>
<p>5α,6α,8α,9α-diepoxi-(22E,24R)-ergosta-22-en-3β,7α-diol</p>		<p>(Yahoita, et al. 1999)</p>
<p>22E,24R)-23-metilergosta-7,22-dien-3β,5α,6β-triol (22E,24R)-23-metilergosta-7,22-dien-3β,5α,6β,9α-tetrol</p>		<p>(Yahoita, et al. 1999)</p>

Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>)	Compuesto	Referencia
(24S)-ergosta-7-en-3 β ,5 α ,6 β -triol		(Yahoita, et al. 1999)
22E)-23-metilergosta-5,7,22-trien-3 β -ol		(Ohnuma, et al. 2000)
Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno		(Yahoita, et al. 1998)
Estigmast-5,7-dien-3 β -ol		(Cucaita 2007)
Tilopiol B		(Wu, et al. 2000)
(22E)-ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol		(Rivera, et al. 2009)

Con base en lo reportado en cuanto a actividad antimicrobiana de triterpenoides y en los estudios de extractos crudos de hongos, realizados por el grupo de Investigación de Química de Hongos Macromicetos (Jaramillo 2009, Mora 2010), los cuales arrojaron

como resultados que los compuestos triterpenoidales presentes tanto en el micelio como en el cuerpo fructífero de basidiomicetos son en parte responsables de la actividad antimicrobiana para bacterias Gram negativa y Gram positivas (Tabla 1-6) no se puede descartar que sean compuestos de esta clase los responsables de dicha actividad.

Tabla 1-6: Compuestos triterpenoides con actividad antimicrobiana

Hongos	Compuestos triterpenoidales	Referencia
<i>Ganoderma applanatum</i>	5 α -Ergosta-7-en-3 β -ol 5 α -ergosta- 7,22-dien-3 β -ol 5,8-epidioxi-5 α ,8 α -ergosta-6,22- dien-3 β -ol	(Zjawiony 2004) (Lindequist, et al. 2005)
<i>Stereum hirsutum</i>	5 α ,8 α -epoxi ergosterol, 24-demetil-5 α ,8 α -epoxi ergosterol	(Cateni, et al. 2007)
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Acido polyporenico C Acido 3 α -acetiloxilano-8,24 dien-21-oico Acido Pinicolico A Acido Trametenolico B Ácido Fomitopsico	(Zjawiony 2004)
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Ácido 3 α -acetiloxilano-8,24-dien-21-oico Acido pinicolico	(Petrova, et al. 2007)
<i>Fomitopsis rosea</i>	5 α ,8 α -epidioxi-24(ξ)-metilcolesta-6,22-dien-3 β -ol Ácido 3 α -Hidroxi-24-metilen-23-oxolanost-8-en-26-carboxilico Ácido 3 α -oxepanoquercinico C Ácido 3 α -carboxiacetoxiquercinico C Acido poliporenico C	(Popova, et al. 2009)
<i>Tricholomopsis rutilans</i>	Oleato-3 β ,5 α -dihidroxi-(22 <i>E</i> ,24 <i>R</i>)-ergosta-7,22-dien-6-il Oleato-3 β ,5 α -dihidroxi-(22 <i>E</i> ,24 <i>R</i>)-ergosta-22-en-7-one-6-il	(Zhong, et al. 2009)
<i>Agrocybe aegerita</i>	5 α ,8 α -epidioxi-(22 <i>E</i> ,24 <i>R</i>)-ergosta-6,22-dien-3 β -ol	(Zhong, et al. 2009)
<i>Ganoderma lucidum</i>	ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno, ergosta-2,,5,7,9(11),14,22-hexaeno, colesta-5,7,24-trien-3 β -ol ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol)	(Jaramillo 2009)
<i>Fomitopsis sp.</i>	Ergosta- 5,7,9(11),22-tetraen- 3 β -ol	(Mora 2010)

• Actividad antioxidante

Los estudios sobre esta actividad en hongos son escasos y muy generales, ya que la mayoría de los mismos hacen referencia a las propiedades antioxidantes de los extractos de las fructificaciones, sin precisar que compuestos son los responsables de dicha bioacción (Avila 2010, Elmastasa, et al. 2007). Así mismo, varias investigaciones permiten ver que la actividad antioxidante de los hongos comestibles es comparable con la reportada para diversos productos vegetales, lo cual los convierte en una excelente alternativa como fuente de antioxidantes. En el caso del Shiitake su porcentaje de actividad antioxidante (42.9 – 81.8) es comparable a la manzana (58.4–92.3) fruta aportante de antioxidantes por excelencia (Yang, et al. 2002). Igualmente se reporta que el extracto metanólico del cuerpo fructífero de esta seta muestra una moderada actividad

antioxidante evidenciada por su porcentaje de peroxidación de lípidos (Kitzberger, et al. 2007).

1.3 Planteamiento del problema

La proteína es esencial en las dietas ya que para satisfacer los elevados requerimientos nutricionales de los animales se necesitan altos niveles de ella. La harina de pescado por ejemplo es considerada la fuente primaria de proteína, en los alimentos balanceados para los animales, siendo ampliamente utilizada en dietas para aves (Lesson, et al. 2000). Debido a que el alimento representa el mayor costo de producción de cualquier producto avícola, existe la necesidad permanente de investigar nuevas y diferentes fuentes de alimentación y de reevaluar los ingredientes comúnmente usados. Al revisar los trabajos publicados en los últimos años, se observa que la evaluación de ingredientes ocupa la mayor parte de la investigación en nutrición aviar práctica y las compañías que elaboran alimentos para aves deben estar al tanto del potencial que representan estos nuevos ingredientes (Lesson, et al. 2000). La industria avícola consume una importante parte de la producción total de alimentos concentrados en el mundo. A menudo ciertos “ingredientes nuevos” no lo son en realidad, sino que no habían sido considerados como tales en una determinada región geográfica. Un claro ejemplo lo constituye el trigo, alimento considerado como “nuevo” en muchas partes de Norteamérica cuando en otros países se ha empleado desde hace 20 – 30 años (Leeson et al, 2000).

La necesidad sentida de contribuir en la búsqueda de estos ingredientes, que sean económicos y de fácil consecución y que además cumplan los requerimientos nutricionales propios de los animales a que van dirigidos y siendo los macrohongos y dentro de ellos el Shiitake, los nutraceuticos por excelencia, lo que los posicionan como aportantes a la dieta de un muy buen contenido de proteína de alta calidad (aminoácidos esenciales) así como vitaminas, minerales y ácidos orgánicos (Bisen, et al. 2010, Longvah, et al. 1998), permiten pensar en ellos como posibles “ingredientes nuevos” para introducirlos en la alimentación aviar. En este orden de ideas y dado que la producción de hongos comestibles se ha incrementado significativamente en nuestro país, dando como resultado la generación de desechos que pueden ser utilizados como posibles fuentes de proteína. Tal es el caso particular del hongo Shiitake, en cuyo ciclo de comercialización se presenta una pérdida de un 15 a 20% de la eficiencia biológica, correspondiente a la mayor parte del estípote, que por sus características fibrosas no es aceptado por el consumidor debido a su baja palatabilidad. El no aprovechamiento de este desecho se ve reflejado en pérdida económica para los fungicultores. Es por esto que el Grupo de Investigación de Química de Hongos Macromicetos, ha iniciado el desarrollo de proyectos de investigación interdisciplinaria enfocados a la bioprospección de los macrohongos, buscando, entre otros aspectos darles utilización en el desarrollo de nuevos productos y en este trabajo en particular en su posible utilización como componente de un alimento aviar.

Esta investigación tiene como finalidad el explorar, con base en el estudio químico y farmacológico, el potencial de utilización del estípote del Shiitake en la producción de un alimento nutraceutico para la dieta de pollos de engorde, dando así una solución a los

fungicultores al utilizar un desecho del cultivo y utilizar sus propiedades medicinales para prevenir enfermedades de origen bacterial que pueden atacar a los pollos durante su crecimiento, aportando así no sólo al desarrollo de “nuevos ingredientes” que puedan ayudar a disminuir costos en la alimentación aviar, sino en la posible disminución de la cantidad de antibióticos que las aves deben recibir durante su crecimiento.

1.4 Bibliografía

Aida, F. M. N. A.; Shuhaimi, M.; Yazid, M.; Maaruf, A. G. Mushrooms as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2009. 20: 567-565.

Akindahunsi, A. A.; Oyetayo, F. L. Nutrient and antinutrient distribution of edible mushroom, *Pleurotus tuber-regium* (fries) singer. *LWT- Food Science and Technology*. 2006. 39: (5). 548-553.

Avila, M. Estudio de los compuestos polifenolicos con énfasis en flavonoides del hongo *Lentinula edodes* y determinación de la actividad antioxidante. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá. 2010.

Benavides, O. Estudio químico de la fracción insaponificable del hongo macromiceto *Lentinula edodes*. Bogotá. 2004.

Benavides, O. Estudio químico de la fracción insaponificable del hongo macromiceto *Lentinula edodes* (shiitake). Bogotá. 2004.

Betancourt, L. L. Evaluación de aceites esenciales de orégano en la dieta de pollo de engorde. Bogotá. 2012.

Bisen, P. S.; Baghel, R. K.; Sanodiya, B. S.; Thakur, G. S.; Prasad, G. B. K. S. *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities. *Current Medicinal Chemistry*. 2010. 17: 2419-2430.

Brizuela, M. A.; García, L.; Pérez, L.; Mansur, M. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología*. 1998. 15: 69-74.

Buwjoom, T.; Tangataweewipat, S.; Thongwittaya, N.; Yamauchi, K. Chemical composition, nutrient digestibility and metabolizable energy of shiitake mushroom stalk meal. *J Poultry Sci*. 2004. 41: 322-328.

Buwjoom, T.; Yamauchi, K. Effects of shiitake mushroom stalk meal on growth performance, carcass yield and blood composition in broilers. *Journal of Poultry Science*. 2005. 42: 283-290.

Calderón, A.; García, F.; Martínez, G. Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones d Colombia. *Rev. MVZ Córdoba*. 2006. 11: (1). 725-737.

- Carvajal, G. Valor nutricional de la carne de: res, cerdo y pollo. 2001. Corporación de Fomento Ganadero.
<http://www.corfoga.org/images/public/documentos/pdf/Corfoga2001.pdf>
- Coy, E.; Nieto, I. J. Sterol composition of the macromycte. *Chemistry of Natural Compounds*. 2009. 45: (2). 193-196.
- Cuca, M.; De La Rosa, G.; Pró, A.; Baeza, J. Disponibilidad del fósforo del la pasta de soya y sorgo-glúten de maíz, adicionadas con fitasa en pollos de engorda en iniciación. *Técnica Pecuaria en México*. 2003. 41: (3). 295-306.
- Cucaita, E. Estudio químico comparativo de metabolitos secundarios de los hongos comestibles *Laccaria laccatta* y *Lentinula edodes* y determinación de su variación respecto al estadio del hongo. Bogotá. 2007.
- Chandra, L.; Smith, B.; Clarke, S.; Marlow, D.; D'Offay, J.; Kuvibidila, S. Differential effects of shiitake- and white button mushroom-supplemented diets on hepatic steatosis in C57BL/6 mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2011. 49: 3074-3080.
- Chang, S. T. Mushrooms as Human Food. *Bio Science*. 1980. 30: (6). 399-401.
- Chang, S. T.; Hayes, W. A. *The biology and cultivation of edible mushrooms*. 1978. New York. Academic press.
- Chang, S. T.; Miles, P. G. *Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. 2004. Florida. CRC Press.
- Chegwin, C. Estudio de la influencia del sustrato en la cantidad y clase de triterpenoides de *Pleurotus ostreatus* así como en el contenido de estatinas si dicho hongo las presenta. Bogotá. 2007.
- Cheng, C.-W.; Chen, C.-K.; Chang, C.-J.; Chen, L.-Y. Effect of colour LEDs on mycelia growth of *Aspergillus ficuum* and phytase production in photo-fermentations. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2011. 106: (5). 81-86.
- De Carvalho, M. P.; Van Der Sand, S. T.; Ribeiro Rosa, E. A.; Germani, J. C.; Kazue Ishikawa, N. Investigation of the antibacterial activity of Basidiomycetes *Lentinula boryana* and *Lentinula edodes*. *BIOCIÊNCIAS*. 2007. 15: (2). 173-179.
- Desbois, A. P.; Smith, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2010. 85: 1629-1642.
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 1956. 28: (3).
- Dulgera, B.; Cem Ergul, C.; Gucin, F. Antimicrobial activity of the macrofungus *Lepista nuda*. *Fitoterapia*. 2002. 73: 695-697.

Elmastasa, M.; Isildaka, O.; Turkekulb, I.; Temur, N. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007. 20: 337-345.

Gezer, K.; Duru, M.; Kivrak, I.; Turkoglu, A.; Mercan, N.; Turkoglu, H.; Gulcan, S. Free-radical scavenging capacity and antimicrobial activity of wild edible mushroom from Turkey *African Journal of Biomedical Research*. 2006. 5: (20). 1924-1928.

Guarner, F.; Malagelada, J. R. Gut flora in health and disease-review. *Lancet*. 2003. 361: 512-519.

Guzmán, G.; Mata, G.; Salmones, D.; Soto-Velazco, C.; Guzmán-Dávalos, L. El cultivo de los hongos comestibles. 1992. México. Instituto Politecnico Nacional.

Guzmán, G.; Mata, G.; Salomonos, D.; Soto Velasco, L.; Guzman Dávalos, L. El cultivo de los hongos comestibles con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos agrícolas y residuos agroindustriales 1993. México. CECODES.

Hatvani, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinula edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001. 17: 71-74.

Hatvani, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001. 17: 71-74.

Hearst, R.; Nelson, D.; McCollum, G.; Millar, B.; Maeda, Y.; Goldsmith, C.; Rooney, P.; Loughrey, A.; Rao, J. R.; Moore, J. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. 2009. 15: 5-7.

Higuera, E. A.; Rugeles, M. T.; Montoya, C. J. Actividad inmunomoduladora y anti-VIH de las estatinas. *Infectio*. 2011. 15: (2). 108-117.

Hirasawa, M.; Shouji, N.; Neta, T.; Fukushima, K.; Takada, K. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinula edodes* (Berk.) Sing.(Shiitake, an edible mushroom). *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1999. 11: 151-157.

Iñiguez-Palomares, C. I.; Acedo-Félix, E. Mecanismos de adhesión al tracto intestinal y antagonismo de *Bifidobacterium*. *Salud Pública y Nutrición*. 2006. 7: (2).

Jaramillo, L.; Rodriguez, V. N. Cultivo de shiitake en subproductos de café. *CENICAFE*. 2001. 287: 1-4.

Jaramillo, M. Determinación estructural y antimicrobiana de los intra y exo metabolitos secundarios triterpenoidales en *Ganoderma lucidum* obtenido en cultivo sumergido. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá. 2009.

Johnsy, G.; Kaviyarasana, V. Antimicrobial and antioxidant properties of *Trametes gibbosa* (pers) Fr. *Journal of Pharmacy Research*. 2011. 4: (11). 3939-3942.

Jonathan, S. G.; Fasidi, I. O. Antimicrobial activities of two Nigerian edible macro-fungi *Lycoperdon pusillum* (Bat. Ex) and *Lycoperdon giganteum* (Pers.). African Journal of Biomedical Research. 2003. (6). 85-90.

Kalyoncu, F.; Oskay, M. Antimicrobial Activities of Four Wild Mushroom Species Collected from Turkey. . Proceeding of the 6th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. 2008. 31-35.

Kim, D. S.; Baek, N. I.; Oh, S. R.; Jung, Y. K.; Lee, S. I.; J., K. H.; Lee, H. K. Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassignment of NRM data. Archives of Pharmacal Research. 1997. 20: (3). 201-205.

Kitzberger, C.; Smânia, A.; Curi, R.; Salvador, S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. Journal of Food Engineering. 2007. 80: 631-638.

Lee, H. K.; Lee, H. B.; Kim, C. S.; Ahn, Y. J. Anti-Helicobacter pylori activity of methanol extracts from Korean native plant species in Jelu island. Agricultural Chemistry and Biotechnology. 2004. 47: (2). 91-96.

Lesson, S.; Summers, J. D.; Díaz, G. J. Nutrición Aviar Comercial. 2000. 356.

Lindequist, U.; Niedermeyer, T. J. H.; Jülich, W.-D. The pharmacological potential of mushrooms. eCAM. 2005. 2: (3). 285-299.

Liu, J.-K. N-containing compounds of macromicetes. Chemical reviews. 2004. 105: (7). 2724-2744.

Longvah, T.; Dosthale, Y. G. Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. Food Chem. 1998. 63: 331-334.

Llauradó, G.; Morris, H. J.; Albear, J. M.; Castán, L.; Bermúdez, R. C. Plantas y hongos comestibles en la modulación del sistema inmune. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2011. 30: (4). 511-527.

Manzi, P.; Pizzoferrato, L. Beta-glucans in edible mushrooms. Food Chemistry. 2000. 68: (3). 315-318.

Martínez-Carrera, D.; Sobal, M.; Morales, P.; Martínez, W.; Martínez, M.; Mayett, Y. Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales, y su contribución a la alimentación mexicana: el Shiitake. 2004. México.

Martínez-Carrera, D.; Soto, C.; Morales, P.; Guzmán, G. Cultivo de los hongos comestibles. Ciencia. 1998. 39: 217-221.

Mateos, G.; Martín, F.; Latorre, M.; Vicente, B.; Lázaro, R. Inclusion of oat hulls in diets for young pigs based on cooked maize or cooked rice. Animal Science. 2006. 82: 57-63.

Mattila, P.; Suonp, K.; Piironen, V. Functional properties of edible mushrooms. Nutrition. 2000. 16: 694-696.

Miles, P. G.; Changa, S.-T. *Biología de las setas*. 1999. Santafé de Bogotá. Instituto Zeri para Latinoamérica.

Mizuno, T. Development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. *Food and Food Ingredient Japanese Journal*. 1996. 167: 69-87.

Mizuno, T. Shiitake, *lentinus edodes*: Functional properties for medicinal and food purposes. *Food Reviews International*. 1995. 11: (1). 109-128.

Mizuno, T.; Minato, K.; Kawakami, S.; Tatsuoka, S.; Denpo, Y.; Tsuchida, H. Contents of anti-tumor polysaccharides in certain mushrooms and their immunomodulating activities. *Food Science and Technology Research*. 2001. 71: (1). 31-34.

Mora, M. A. Determinación estructural de los metabolitos secundarios triterpenoidales en búsqueda de antimicrobianos de un hongo silvestre *Aphylophoral* Colombiano. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá. 2010.

Mutai, C.; Bii, C.; Vagias, C.; Abatis, D.; Roussis, V. Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009. 123: 143-148.

Nieto, I. J.; Cucaita, E. Ácidos grasos, ésteres y esteroides del cuerpo fructífero del hongo *Laccaria laccata* Revista Colombiana de Química. 2007. 36: (3). 227-284.

Nieto, I. J.; Chegwin, C. Triterpenoids and fatty acids identified in the edible mushrooms *Pleurotus sajor-cajù*. *Journal the Chilean chemical society*. 2008. 53: (2). 1515-1517.

Nitschke, J.; Modick, H.; Busch, E.; Rekowski, R.; Altenbach, H.-J.; Mölleken, H. A new colorimetric method to quantify B-1,3-1,6-glucans in comparison with total B-1,3-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*. 2011. 127: 791-796.

Ohnuma, H.; Amemiya, K.; Kakuda, R.; Yaoita, Y.; Machida, K.; Kikuchi, M. Sterol constituents from two edible mushrooms, *Lentinula edodes* and *Tricholoma matsutake*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2000. 48: (5). 749-751.

Ozturk, M.; Emin Duru, M.; Kivrak, S.; Mercan-Dogan, N.; Turkoglu, A.; Ozler, M. A. In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology*. 2011. 49: 1356-1360.

Pereira, K. B.; Megumi, M. C.; Dantas, M. C. Antimicrobial activity and mineral composition of shiitake mushrooms cultivated on agricultural waste. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2011. 54: (5). 991-1002.

Pérez Guitierrez, R. M. Actividad antimicrobiana de los ácidos grasos aislados de *Tubifex tubifex*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2005. 36: (1). 1-9.

Petrova, A.; Popov, S.; Gjosheva, M.; Bankova, V. A new triterpenic alcohol from *Fomitopsis pinicola* 2007. 21: (5). 401-405.

Phillips, K.; Ruggio, D.; Horst, R.; Minor, B.; Simon, R.; Feeney, M.; Byrdwell, W.; Haytowitz, D. Vitamin D sterol composition of 10 types of mushrooms from retail suppliers in the United States. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 2011. 59: 7841-7853.

Polese, J.-M. *Miniguía setas*. 2005. Barcelona. KONEMANN.

Popova, M.; Trusheva, B.; Gyosheva, M.; Tsvetkova, I.; Bankova, V. Antibacterial triterpenes from the threatened wood-decay fungus *Fomitopsis rosea*. *Fitoterapia*. 2009. 80: (5). 263-266.

Pottgüter, R. Fibre in layer diets. *Lohmann Information*. 2008. 43: (2). 22-31.

Ramesh, C.; Pattar, M. G. Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. *Pharmacognosy Research*. 2010. 2: (2). 107-112.

Rao, J.; Millar, B.; Moore, J. Antimicrobial properties of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*). *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009. 33: 591-592.

Ravi Subbiah, M. T.; Abplanalp, W. Ergosterol (major sterol of baker's and brewer's yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and the potential role of its oxidation products. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*. 2003. 73: (1). 19-23.

Rivera, A.; Benavides, O.; Rios-Motta, J. (22E)-ergosta-6,22dien-3 β ,5a,8a-triol: A new polyhydroxysterol isolated from *Lentinula edodes* (Shiitake). *Natural Product Research*. 2009. 23: (3). 293-300.

Rivera, A.; Laverde, C.; Rios-Motta, J.; Nieto, I. J.; Osorio, H. J. Dehidroergosterol: un artefacto generado durante el proceso de extracción de esteroides en el hongo *Pleurotus sajor-caju*. *Revista Colombiana de Química*. 2005. 34: (2). 117-125.

Rivera, A.; Nieto, I.; Valencia, M. Composición y cuantificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción esterólica de once hongos Colombianos. *Revista Colombiana de Química*. 2002. 31: (2). 95-102.

Rop, O.; Mlcek, J.; Jurikova, T. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews*. 2009. 67: (11). 624-631.

Rosa, L.; Gomez, K.; Jacob, C.; Capelari, M.; Rosa, C.; Zani, C. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003. 98: (7). 967-974.

Rosa, L. H.; Gomes Machado, K.; Jacob, C. C.; Capelari, M.; Rosa, C. A.; Zani, C. L. Screening of Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003. 98: (7). 967-974.

Ruseler-Van Embden, J. G. H.; Van Lieshout, L. M. C.; Gosselink, M. J.; Marteau, P. Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1995. 30: (7). 675-680.

Sauvant, D.; Pérez, J.-M.; Tran, G. Tablas de composición y de valor nutritivo de las materias primas destinadas a los animales de interés ganadero. 2003. España. Ediciones Mundi-Prensa.

Shah, S. K.; Walker, P. A.; Moore-Olufemi, S. D.; Sundaresan, A.; Kulkarni, A. D.; Andrassy, R. J. An evidence-based review of a *Lentinula edodes* mushroom extract as complementary therapy in the surgical oncology patient. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2011. 35: (4). 449-458.

Smania, A. J.; Delie Monache, F.; Albino Smania, E.; Cuneo, R. S. Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (*Aphyllorphoromycetideae*) fruit body. *International Journal for Medicinal Mushrooms*. 1999. 4: 325-330.

Smith, J. E.; Rowan, N. K.; Sullivan, R. Medicinal Mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. 2002. University of Strathclyde Cancer Research. UK. <http://www.fruiting-bodies.co.uk/cancer-research/cr-index.htm>.

Stainer, R.; Ingraham, J.; Wheelis, M.; Painter, P. Microbiología. 1992. Barcelona. REVERTÉ S. A.

Suzuki, F.; Suzuki, C.; Shimomura, E.; Maeda, H.; Fujii, T.; N., I. Antiviral and interferon-inducing activities of a new peptidomannan, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *Journal of antibiotics* (Tokyo). 1979. 32: (12). 1336-1345.

Teichmanna, A.; Duttab, P. C.; Staffasc, A.; Jägerstad, M. Sterol and vitamin D2 concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effects of UV irradiation. *LWT-Food and Technology*. 2007. 40: (5). 815-822.

Turkoglu, A.; Kivrak, I.; Mercan, N.; Duru, M.; Gezer, K.; Turkoglu, H. Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers. *African Journal of Biomedical Research*. 2006. 5: (11). 1146-1150.

Turlo, J.; Gutkowska, B.; Krzyczkowski, W.; Blazewicz, A.; Kocjan, R. Optimizing vitamin B12 biosynthesis by micelial cultures of *Lentinula edodes* (Berk). *Enzyme and Microbial Technology*. 2008. 369-374.

Valencia, F.; Román, M. La fibra dietaria como alimento funcional. *VITAE*. 2004. 11: (2). 12-17.

Valencia, M.; Nieto, I. J. Esteroles, ácidos grasos e hidrocarburos de los cuerpos fructíferos de *Ganoderma australe*. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. 2002. 47: (4). 511-516.

Vergara, P.; Ferrando, C.; Jimenez, M.; Fernandez, E.; Gonalons, E. Factors determining gastrointestinal transit time of several markers in the domestic fowl. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. 1989. 74: 867-864.

Wasser, S. P. Dekker, M., Shiitake (*Lentinus edodes*) 2005. 653-664.

Wasser, S. P.; Weis, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives International Journal of Medicinal Mushrooms. 1999. 1: 47-55.

Weete, J. D. Sterols of the fungi: distribution and biosynthesis. Phytochemistry. 1973. 12: 1843-1864.

Yahoita, Y.; Amemiya, K.; Ohnuma, H.; Furumura, K.; Masaki, A.; Matsuki, T.; Kikuchi, M. Sterol constituents from five edible mushrooms. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1998. 46: (6). 944-950.

Yahoita, Y.; Endo, M.; Tani, Y.; Machida, K.; Amemiya, K.; Furumura, K.; Kikuchi, M. Sterol constituents from seven mushrooms. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1999. 47: (6). 847-851.

Yaltirak, T.; Aslim, B.; Ozturk, S.; Alli, H. Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. Food and Chemical Toxicology. 2009. 47: 2052-2056.

Yamashita, A.; Ohtsuka, H.; Maeda, M. Intestinal absorption and urinary excretion of antitumor peptidomannan KS-2 after oral administration in rats. Immunopharmacology. 1983. 5: (3). 209-220.

Yang, J.-H.; Lin, H.-C.; Mau, J.-L. Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. Food Chemistry. 2001. 72: 465-467.

Yang, J.-H.; Lin, H.-S.; Mau, J.-L. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. Food Chemistry. 2002. 77: 229-235.

Yap, A.-T.; Ng, M.-L. An Improved Method for the Isolation of Lentinan from the Edible and Medicinal Shiitake Mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetidae). International Journal of Medicinal Mushrooms. 2001. 3: (1).

Yen, M.-T.; Mau, J.-L. Selected physical properties of chitin prepared from shiitake stipe. LWT. 2007. 40: 558-563.

Yokokawa, H.; Mitsuhashi, T. The sterol composition of mushrooms. Phytochemistry. 1981. 20: (6). 1349-1351.

Yue, J.-M.; Chen, S.-M.; Lin, Z.-W.; Sun, H.-D. Sterols from the fungus *Lactarium volemus*. Phytochemistry. 2001. 56: 801-806.

Zhenga, C. J.; Yooa, J.-S.; Leeb, T.-G.; Choc, H.-Y.; Kimd, Y.-H.; Kima, W.-G. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. FEBS Letters. 2005. 579: (23). 5157-5162.

Zhong, J.-J.; Xiao, J.-H. Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction. Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology. 2009. 113: 79-150.

Zhou, Z.-Y.; Tan, J.-W.; Liu, J.-K. Two new polyols and a new phenylpropanoid glycoside from the basidiomycete *Lactarius deliciosus*. Fitoterapia. 2011. 82: 1309-1312.

Zjawiony, J. K. Biologically active compounds from *Aphylophorales* (Polypore) Fungi. *Journal of Natural Products*. 2004. 67: (2). 300-310.

Capítulo 2. Valor nutricional del estípite de Shiitake

2.1 Introducción

En Colombia el consumo de hongo Shiitake se está posicionando con fuerza por las características particulares que presenta como son su excelente sabor, aroma, textura. Sin embargo, es muy poco conocido su gran potencial como alimento funcional. Si bien la principal función de la dieta es aportar los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades nutricionales de las personas, existen cada vez más pruebas científicas que apoyan la hipótesis de que ciertos alimentos, así como algunos de sus componentes tienen efectos tanto físicos como farmacológicos beneficiosos, gracias al aporte de los nutrientes básicos y de algunos metabolitos con acción biológica. Hoy en día, la ciencia de la nutrición ha evolucionado a partir de conceptos clásicos, como evitar las deficiencias de nutrientes y la suficiencia nutricional básica, a los conceptos de nutrición "positiva" u "óptima". Las investigaciones han pasado a centrarse más en la identificación de componentes biológicamente activos en los alimentos, que ofrezcan la posibilidad de mejorar las condiciones físicas y mentales, así como de reducir el riesgo a contraer enfermedades. En este orden de ideas los hongos comestibles son alimentos funcionales por excelencia ya que proporcionan beneficios nutricionales y medicinales.

Actualmente la producción de setas (denominación dada a los hongos comestibles) en nuestro país es cerca de dos toneladas mensuales en cultivos de Bogotá, Medellín, Huila y Cauca (Bioasetas Andinas). Estos cultivos vienen acompañados de generación de desechos que no sólo producen pérdidas a los fungicultores sino que aumentan la contaminación ambiental. En vista de lo anterior se crea la necesidad de buscar alternativas para emplear estos contaminantes ya que ellos pueden ser utilizables, como es el caso particular del hongo Shiitake (*Lentinula edodes*) el cual es conocido tradicionalmente en la culturas orientales como nutraceutico por sus propiedades nutricionales, antioxidantes, antitumorales y antimicrobianas.

En el ciclo de comercialización del Shiitake se descartan los estípite que por su textura fibrosa no son aceptados por el consumidor. Esta parte del hongo es cerca de un 25 a 30% de la biomasa total, y ocasiona sobre el medio ambiente contaminación por detritos y malos olores (Buwjoom, et al. 2004, Yen, et al. 2007).

Los estudios que sobre el cuerpo fructífero del Shiitake se han realizado, desde el punto de vista nutricional, ponen de manifiesto que es una buena fuente de carbohidratos, proteína y aminoácidos esenciales, bajo contenido de grasas, alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, cantidades importantes de vitaminas C, B1, B2, B12, niacina, vitamina D y minerales (Bisen, et al. 2010, Mattila, et al. 2000, Turlo, et al. 2008). Adicionalmente los extractos de Shiitake tienen varias propiedades como antitumorales, hipocolesterolemico, antimicrobiana y antioxidante que han sido intensamente investigadas.

Con base en lo anterior y partiendo del hecho de que el estípite debe contener los mismos componentes que el cuerpo fructífero aunado a la necesidad de contribuir en la búsqueda de nuevos ingredientes que sean económicos y de fácil consecución que puedan emplearse en la dieta aviar, que además cumplan los requerimientos

nutricionales propios de los animales a que van dirigidos se plantea el evaluar el valor nutricional del estípite del Shiitake con el fin de explorar su posible empleo como ingrediente “nutraceútico” en la producción de un alimento en la dieta de pollos de engorde, aportando al desarrollo de “nuevos ingredientes” al utilizar un componente de excelente contenido proteico, de bajo costo y con el valor agregado que aporta metabolitos que proporcionarían a los animales protección contra bacterias patógenas.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Material fúngico

El estípite de Shiitake, fue proporcionado por la empresa Fungitá. El material fresco, se cortó en láminas delgadas, se secó a una temperatura de 35°C por 36 horas, para posteriormente ser sometido a proceso de pulverización.

2.2.2 Análisis proximal

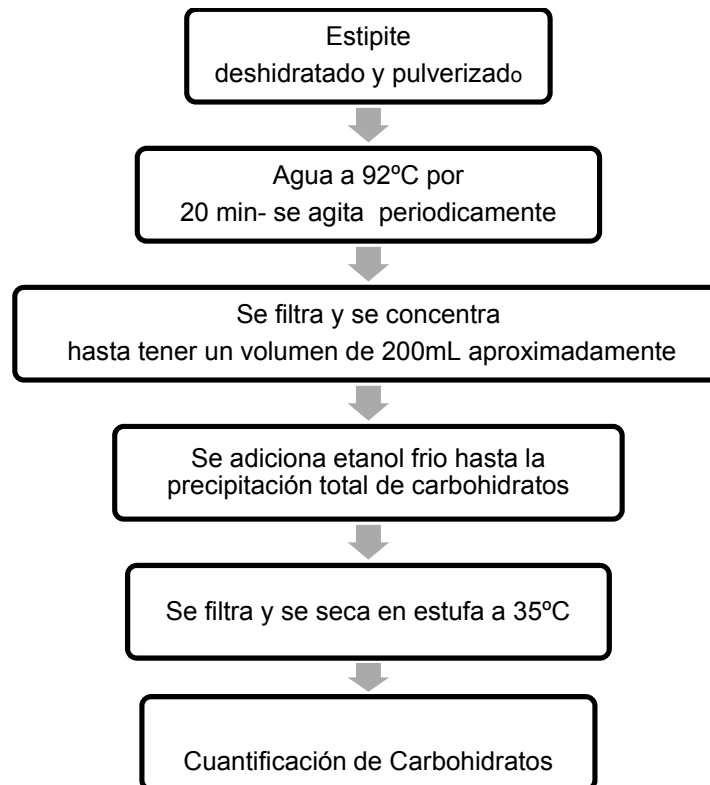
El análisis proximal se realizó siguiendo los métodos oficiales de la AOAC (2006). El factor de conversión de nitrógeno utilizado para la proteína fue de 4.38 (Yang, et al. 2001). Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

2.2.3 Análisis de minerales

La determinación de minerales se hizo por espectroscopía de absorción atómica y su determinación se realizó siguiendo los métodos oficiales de la AOAC (2006).

2.2.4 Extracción de polisacáridos

Los estípites deshidratados y pulverizados, se sometieron a extracción sucesivas con agua a 92°C durante 20 min. Los extractos se reunieron, se filtraron y se concentraron hasta un volumen de 200 mL, al cual se le adicionó, previa refrigeración, etanol frío con la finalidad de precipitar los polisacáridos (Yap, et al. 2001). Los polisacáridos precipitados fueron filtrados y secados a 40°C, para su posterior cuantificación (Diagrama 2-1).

Diagrama 2-1: Extracción de carbohidratos

2.2.5 Cuantificación de polisacáridos totales

La cuantificación de polisacáridos totales se realizó por el método colorimétrico de Dubois (Dubois, et al. 1956), la cuantificación se hizo a partir de una solución de carbohidratos a una concentración de 1.03 mg/mL, se utilizó un espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 490 nm y empleando una curva de calibración de 0 µg/ml a 100 µg/mL de glucosa.

2.2.6 Cuantificación de β -Glucanos

La cuantificación de β -1,3-1,6-glucanos se hizo siguiendo el método empleado por (Nitschke, et al. 2011), el cual fue modificado de la siguiente manera: la extracción de los β -Glucanos se realizó en agua y la cuantificación se hizo a partir de una solución de 2.5 mg/mL en NaOH 0.1M, la solución buffer del rojo congo a un pH=5.6, se utilizó un espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 523 nm. Para medir la cantidad de

β -1,3-1,6-glucanos presentes en la muestra se realizó una curva de calibración de 50 $\mu\text{g/ml}$ a 250 $\mu\text{g/ml}$, empleando como patrón una disolución β -glucanos de un producto comercial derivado de hongos comestibles (Maitake, *Grifola frondosa* 160 mg Now Beta-1,3/1,6-D- Glucan).

2.3 Resultados y discusión

Siendo uno de los objetivos del estudio el evaluar el valor nutricional del estípite para determinar su implementación como ingrediente en alimento aviar, se compararon los valores obtenidos en el análisis proximal (Tabla 2-1) con los valores reportados para maíz, torta de soya y sorgo materias primas que son las más utilizadas en dietas para aves (Tabla 2-2). El anexo 1 muestra, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Tabla 2-1: Composición proximal del estípite de Shiitake (*Lentinula edodes*)

Muestra	*Materia seca	*Cenizas	*Grasas	*Fibra Cruda	**FDN	*Proteína
Estípite <i>Lentinula edodes</i>	89.65 %	5.15%	0.72%	30.60%	46.57%	14.45%

*Los valores expresados en porcentaje en base seca, los porcentajes corresponden al promedio de tres determinaciones.

** FDN: fibra en detergente neutro.

Tabla 2-2: Comparación entre la Composición proximal del estípite de Shiitake y la de ingredientes básicos en la dieta de aves

Ingrediente	Materia seca	Ceniza	Grasa	Fibra Cruda	Proteína
Estípite <i>Shiitake</i>	89.65	5.15	0.72	30.60	14.45
*Torta de soya	89.00	6.40	0.50	7.00	44.00
*Maíz Amarillo	86.80	1.31	3.80	2.50	8.60
*Sorgo	87.62	2.30	2.50	2.70	9.00

*Los valores están expresados en porcentajes con base en materia seca (Lesson, et al. 2000)

• Proteína

El porcentaje de proteína cruda requerido en una dieta de pollos de engorde varía durante el crecimiento entre un 22 % en la etapa de iniciación y un 19% en la etapa de finalización (Lesson, et al. 2000). Para cumplir con este requerimiento es necesario incluir en la misma, como principal fuente de proteína, ingredientes como torta de soya, leguminosa utilizada por la calidad de la proteína, harina de pescado o de carne y cereales (maíz, sorgo). Al comparar los resultados obtenidos para la proteína cruda en el estípite el porcentaje es mayor que en el maíz y el sorgo, pero menor que en la torta

de soya. Cabe anotar aquí que la calidad de la proteína está en función primordialmente de su composición en aminoácidos esenciales y que en este aspecto el maíz, y el sorgo los contienen todos a diferencia del Shiitake que presenta ausencia del triptófano. Sin embargo, al ser mayor el porcentaje de proteína en el estípite, mayor es la proporción de aminoácidos, razón por la cual el estípite podría suplir a estos dos cereales en la formulación de un alimento aviar. (Bisen, et al. 2010, Longvah, et al. 1998), ya que un gramo de estípite proporcionaría más cantidad de aminoácidos esenciales que un gramo de maíz o sorgo.

- **Grasa**

El contenido de grasa cruda en las dietas de pollo de engorde cambia dependiendo de la etapa de crecimiento del ave entre 6.5% a un 7% (Betancourt 2012). La grasa es una fuente de energía, para cumplir con este requerimiento en las dietas de aves se incluyen grasas como aceite de palma, aceite de coco, aceites vegetales, sebo, etc. Estas grasas también contienen cantidades variables de ácido linoléico un nutriente esencial en la dieta de aves ya que todas las dietas deben contener 1% como mínimo. La grasa del sorgo contiene 1.1% de ácido linoléico y la de maíz 1.9% (Lesson, et al. 2000). En estípite el porcentaje de grasa es menor y el contenido de ácido linoléico también es menor y corresponde a (0.18%). De acuerdo a lo anterior el estípite presentaría una desventaja frente a cereales como el maíz y el sorgo, ya que su contenido tanto de grasa como de ácido linoléico es menor. Sin embargo, la influencia de esta desventaja en el potencial del estípite sólo se podría determinar, en su real dimensión, considerando todos los demás aspectos. El porcentaje de grasa del estípite es similar al de la torta de soya, ingrediente valorado por su proteína más que por su porcentaje de grasa.

- **Minerales**

El contenido de minerales en las dietas de pollos de engorde varía con el crecimiento. Los minerales que requiere del ave en mayor cantidad son el calcio entre 15g/kg – 17g/kg, el fósforo entre 14g/kg-15g/kg y el sodio entre un 2g/kg a 4g/kg. Para suplir con estos niveles se adiciona a la formulación carbonato de calcio, fosfato de calcio, y cloruro de sodio. En las dietas también se incluye minerales trazas en la siguiente proporción manganeso 70mg/kg, hierro 80 mg/kg, cobre 10mg/kg, zinc 80 mg/kg, selenio 0.30 mg/kg, yodo 0.40 mg/kg (Lesson, et al. 2000).

Tabla 2-3: Contenido de minerales del estípite de Shiitake, de maíz, de sorgo y de torta de soya

Minerales	Ca	P	Na	Mg	K	Cu	Mn	Fe	Zn
Estipite de Shiitake mg/Kg	773	8136	101	1363	2149	3	13	20	70
*Maiz mg/Kg	483	2996	100	1079	3248	4	7	28	24
*Sorgo mg/Kg	300	3500	100	1500	3500	4	11	52	18
*Torta de soya mg/Kg	290	6100	200	2700	2610	13	33	120	48

Valores en base seca *(Sauvant, et al. 2003)

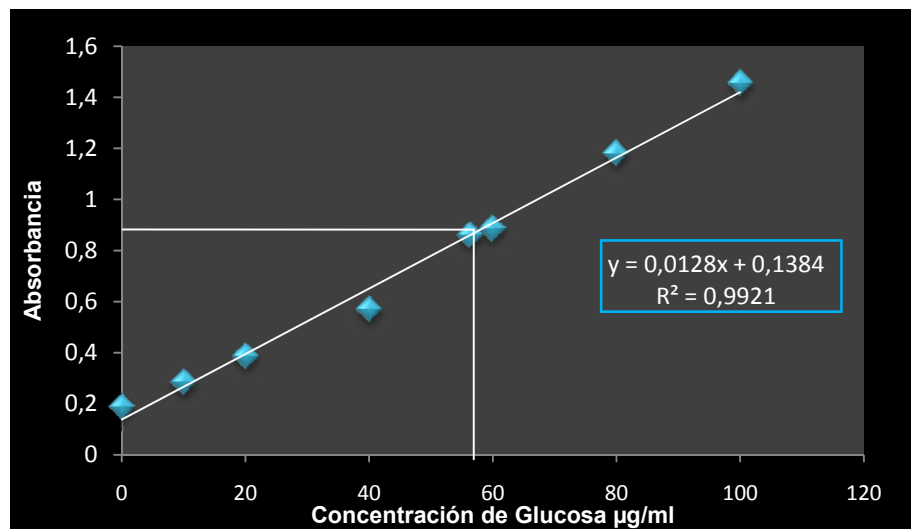
La tabla 2-3 presenta la comparación entre el contenido de minerales en el estípite y los ingredientes usualmente empleados, en donde se vé que el contenido de Ca en el estípite es mayor que en el maíz, el sorgo y la torta de soya. Si bien el contenido de calcio en el estípite no supe el requerimiento de la dieta, su inclusión como ingrediente en formulaciones para pollos de engorde, disminuiría el porcentaje de suplementación con carbonato de calcio y por ende el precio de la dieta.

En cuanto al contenido de fósforo éste también es mayor, resultado que reviste importancia si se tiene en cuenta que tanto en el maíz y el sorgo como en la torta de soya entre el 60-70% del total de este elemento se encuentra como ácido fítico, forma en que cereales, frutos secos y legumbres almacenan el fósforo, y siendo un compuesto que no se hidroliza por las enzimas endógenas de los pollos, solo 30 a 40% del fósforo está disponible, por lo que la dieta de las aves debe ser suplementada con fósforo inorgánico aumentando el costo de la misma (Cuca, et al. 2003). De los pocos estudios realizados sobre el contenido de ácido fítico en basidiomicetos se ha determinado que la concentración de este compuesto es mucho menor que la que se encuentra en plantas y granos (Akindahunsi, et al. 2006), de manera tal que el incluir el estípite en la dieta proporcionaría más fósforo disponible y por lo tanto la cantidad empleada en la suplementación sería menor, lo que llevaría a una disminución del costo del alimento. Cabe anotar aquí que la adición de este ingrediente fúngico a la formulación del alimento aviar aportaría además fitasas, enzimas que hidrolizan el ácido fítico en los cereales incrementando la biodisponibilidad de nutrientes (Cheng, et al. 2011), lo que se vería reflejado en el buen desarrollo de las aves.

Con relación a los demás minerales sus variaciones con respecto a los ingredientes empleados en dietas de pollos no son muy grandes de manera que podría eventualmente reemplazar a cualquiera de ellos.

• **Determinación de carbohidratos**

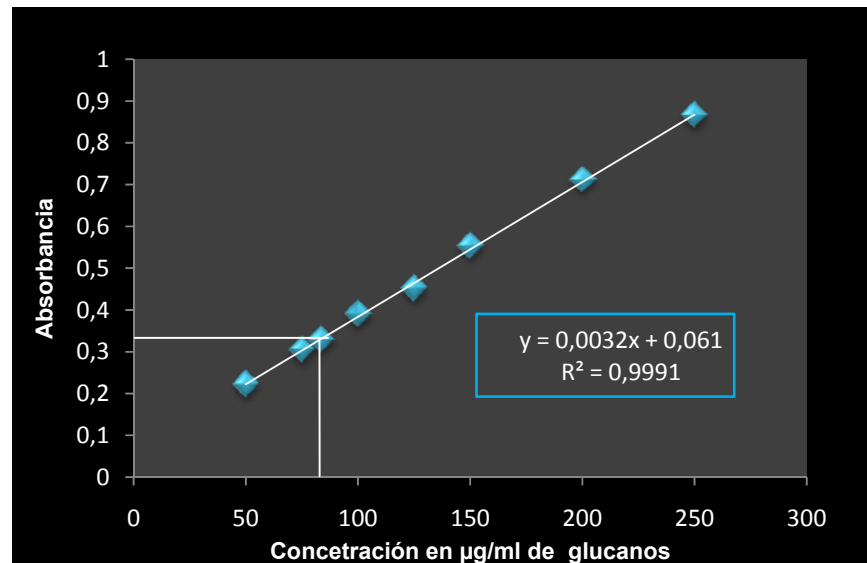
De la aplicación del método de Dubois, y hacer la respectiva cuantificación mediante la curva estándar de glucosa (Figura 2.1), se determinó que el total de carbohidratos del estípite de Shiitake es de 27.28% (valor correspondiente al promedio de cinco replicas) contenido que es menor al reportado para el carpóforo de Shiitake el cual se encuentra entre 59.2% y 64% por (Martínez-Carrera, et al. 2004) y (Bisen, et al. 2010) respectivamente.

Figura 2-1: Curva de calibración de glucosa

Con base en que el contenido de carbohidratos totales en el estípite es 27.28% menor al de sorgo y el maíz y que al realizar el cálculo de extracto libre de nitrógeno o extracto no nitrogenado, para el caso del Shiitake ese valor sería del 22,76%, resultado que proporciona el valor aproximado de los carbohidratos digeribles se puede concluir que el estípite de Shiitake no es una buena fuente de energía, ya que su contenido carbohidratos es principalmente fibra insoluble. Los cereales como el maíz, y el sorgo contienen 73% y 70.7% de carbohidratos respectivamente más el contenido de aceite, por eso son las principales fuentes energéticas de los alimentos concentrados. El contenido energético del maíz y sorgo lo aporta el endospermo el cual está compuesto principalmente de almidón, y constituye la mayor parte de los carbohidratos presentes en el maíz 87% y del sorgo cerca del 75% aproximadamente (Lesson, et al. 2000) (FAO).

- **Determinación de β -1,3-1,6 glucanos**

Mediante el empleo de la curva de calibración de β -1,3-1,6 glucanos (Figura 2-2) se determinó que el contenido de β -1,3-1,6-glucanos en el estípite es de 9.33 g/100 g en base seca. La importancia de esta clase de polisacáridos radica en que los de β -glucanos presentes en los hongos exhiben actividad anticancerígena, inmunoestimuladora, antiviral, antimicrobiana (Lindequist, et al. 2005, Mizuno, et al. 2001, Wasser, et al. 1999), siendo las dos primeras las más importantes y que no las presentan los glucanos de los cereales y de las leguminosas.

Figura 2-2: Curva de calibración de β -1,3-1,6 glucanos

- **Fibra cruda**

Los niveles adecuados de fibra cruda en la dieta de pollos de engorde varían entre 2.4% en la etapa de iniciación, 2.8% etapa de levante y 2.5 % etapa de finalización (Lesson, et al. 2000). Al comparar los resultados del análisis proximal se observa un mayor porcentaje de fibra cruda en el estípite que en el maíz, el sorgo y la harina de soya. La fibra proveniente del estípite está constituida por polisacáridos de cadenas largas como quitina, hemicelulosa, mananos y β -glucanos, estrechamente relacionados a la pared celular (Manzi, et al. 2000).

La presencia de los β -1,3-1,4 glucanos (estructura lineal) en cereales como avena, cebada y trigo es desfavorable en las dietas avícolas porque el ave es incapaz de digerirlos lo cual ocasiona una mayor viscosidad del contenido intestinal y de las excretas. El aumento de la viscosidad disminuye el contacto con las enzimas digestivas y también afecta el transporte y la absorción de nutrientes a través de la mucosa intestinal. Para contrarrestar este efecto en las dietas que incluyen avena donde el contenido de β -glucanos es del 3-7% o cebada del 4-9%, se adicionan enzimas β -glucanasa sintéticas o antibióticos como la neomicina para solucionar este problema en las dietas (Lesson, et al. 2000). Sin embargo, el tipo de β -1,3-1,6 glucanos presentes en el estípite de Shiitake son diferentes en estructura, (presencia de ramificaciones y estructura de triple hélice) lo cual podría llevar a una acción diferente a la de los β -1,3-1,4 glucanos de los cereales. Hasta el momento no hay un reporte en literatura que indique que los β -1,3-1,6 glucanos, puedan ser perjudiciales en las dietas para pollos de engorde.

Si bien algunos autores consideran que un porcentaje alto de fibra cruda en la dieta de pollos de engorde traería un efecto negativo sobre la digestibilidad de los nutrientes, se aumentaría el número de deposiciones en el ave y tendría influencia sobre la productividad del animal debido a la disminución en el consumo de alimento (Vergara, et al. 1989), es de destacar que en estudios como el realizado por (Pottgüter 2008) se indica que si bien el maíz y la harina de soya se consideran en todo el mundo como los ingredientes estándar de materias primas para las dietas de aves existen regiones donde estos ingredientes no están disponibles o no son rentables para los avicultores y se utiliza como alternativa otras materias primas, que llevan a un mayor contenido de fibra en la dieta, cuyo empleo dio como resultado que la productividad es por lo menos igual y en algunos casos incluso es superior. En este mismo sentido (Mateos, et al. 2006) indica que hoy en día no se considera la fibra como un solo factor antinutricional ya que dependiendo del tipo y la cantidad incorporada puede afectar de forma positiva la salud y la productividad del animal. Con base en esto se realizó un estudio con el empleo de harina de estípite de Shiitake, donde se concluye que se pueden incluir niveles de 2.5 % hasta 5% sin ser afectado el rendimiento de la canal en los pollos de engorde (Buwjoom, et al. 2005).

2.4 Conclusiones

La harina de estípite de Shiitake puede ser considerada como un ingrediente alternativo a ser incluido en las dietas de pollos de engorde.

Un beneficio que podría aportar la harina de estípite de Shiitake se basa en el hecho de que al ser incluida en las dietas de pollos de engorde permitiría minimizar costos no sólo porque su valor comercial, al ser actualmente un desecho, es inferior al de maíz y el sorgo, sino que por la cantidad de algunos de sus nutrientes disminuiría los gastos producidos por la suplementación de las mismas.

La posible presencia de fitasas en el estípite del Shiitake le proporcionaría un valor agregado al alimento aviar, ya que hidrolizan el ácido fítico en los cereales incrementando la biodisponibilidad de nutrientes.

El estípite del Shiitake tiene un gran contenido de fibra dietaria, fibra de alto valor por su contenido de β -1,3-1,6 glucanos que, dada sus acciones biológicas, permitiría proporcionar un valor nutracéutico a la dieta aviar al emplearlo como ingrediente en formulaciones.

2.5 Bibliografía

Akindahunsi, A. A.; Oyetayo, F. L. Nutrient and antinutrient distribution of edible mushroom, *Pleurotus tuber-regium* (fries) singer. LWT- Food Science and Technology. 2006. 39: (5). 548-553.

Betancourt, L. L. Evaluación de aceites esenciales de orégano en la dieta de pollo de engorde. Bogotá. 2012.

Bisen, P. S.; Baghel, R. K.; Sanodiya, B. S.; Thakur, G. S.; Prasad, G. B. K. S. *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities. *Current Medicinal Chemistry*. 2010. 17: 2419-2430.

Buwjoom, T.; Tangataweewipat, S.; Thongwittaya, N.; Yamauchi, K. Chemical composition, nutrient digestibility and metabolizable energy of shiitake mushroom stalk meal. *J Poultry Sci*. 2004. 41: 322-328.

Buwjoom, T.; Yamauchi, K. Effects of shiitake mushroom stalk meal on growth performance, carcass yield and blood composition in broilers. *Journal of Poultry Science*. 2005. 42: 283-290.

Cuca, M.; De La Rosa, G.; Pró, A.; Baeza, J. Disponibilidad del fósforo de la pasta de soya y sorgo-glúten de maíz, adicionadas con fitasa en pollos de engorda en iniciación. *Técnica Pecuaria en México*. 2003. 41: (3). 295-306.

Cheng, C.-W.; Chen, C.-K.; Chang, C.-J.; Chen, L.-Y. Effect of colour LEDs on mycelia growth of *Aspergillus ficuum* and phytase production in photo-fermentations. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2011. 106: (5). 81-86.

Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 1956. 28: (3).

Lesson, S.; Summers, J. D.; Díaz, G. J. *Nutrición Aviar Comercial*. 2000. Colombia. Le' Print Club Express Ltda. 359p.

Lindequist, U.; Niedermeyer, T. J. H.; Jülich, W.-D. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM*. 2005. 2: (3). 285-299.

Longvah, T.; Dosthale, Y. G. Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food Chem*. 1998. 63: 331-334.

Manzi, P.; Pizzoferrato, L. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*. 2000. 68: (3). 315-318.

Martínez-Carrera, D.; Sobal, M.; Morales, P.; Martínez, W.; Martínez, M.; Mayett, Y. Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales, y su contribución a la alimentación mexicana: el Shiitake. 2004. México.

Mateos, G.; Martín, F.; Latorre, M.; Vicente, B.; Lázaro, R. Inclusion of oat hulls in diets for young pigs based on cooked maize or cooked rice. *Animal Science*. 2006. 82: 57-63.

Mattila, P.; Suonp, K.; Piironen, V. Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition*. 2000. 16: 694-696.

Mizuno, T.; Minato, K.; Kawakami, S.; Tatsuoka, S.; Denpo, Y.; Tsuchida, H. Contents of anti-tumor polysaccharides in certain mushrooms and their immunomodulating activities. *Food Science and Technology Research*. 2001. 71: (1). 31-34.

Nitschke, J.; Modick, H.; Busch, E.; Rekowski, R.; Altenbach, H.-J.; Mölleken, H. A new colorimetric method to quantify B-1,3-1,6-glucans in comparison with total B-1,3-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*. 2011. 127: 791-796.

Pottgüter, R. Fibre in layer diets. *Lohmann Information*. 2008. 43: (2). 22-31.

Sauvant, D.; Pérez, J.-M.; Tran, G. Tablas de composición y de valor nutritivo de las materias primas destinadas a los animales de interés ganadero. 2003. España. Ediciones Mundi-Prensa.

Turlo, J.; Gutkowska, B.; Krzyczkowski, W.; Blazewicz, A.; Kocjan, R. Optimizing vitamin B12 biosynthesis by micelial cultures of *Lentinula edodes* (Berk). *Enzyme and Microbial Technology*. 2008. 369-374.

Vergara, P.; Ferrando, C.; Jimenez, M.; Fernandez, E.; Gonalons, E. Factors determining gastrointestinal transit time of several markers in the domestic fowl. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. 1989. 74: 867-864.

Wasser, S. P.; Weis, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1999. 1: 47-55.

Yang, J.-H.; Lin, H.-C.; Mau, J.-L. Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*. 2001. 72: 465-467.

Yap, A.-T.; Ng, M.-L. An Improved Method for the Isolation of Lentinan from the Edible and Medicinal Shiitake Mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2001. 3: (1).

Yen, M.-T.; Mau, J.-L. Selected physical properties of chitin prepared from shiitake stipe. *LWT*. 2007. 40: 558-563.

Capítulo 3. Determinación de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos y compuestos triterpenoides del estípite de Shiitake

3.1 Introducción

Los basidiomicetos producen un gran número de metabolitos secundarios biológicamente activos que abarca desde agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, antioxidantes, anticancerígenos y aromas hasta compuestos con actividad anti VIH (Brizuela, et al. 1998, Higuera, et al. 2011).

Dentro de estos metabolitos secundarios se encuentran los compuestos terpenoides, que no solo están presentes en vegetales, sino que también se encuentran en hongos y tienen importancia puesto que exhiben actividad farmacológica. Dentro de este grupo se hallan los triterpenoides, compuestos biosintetizados por los hongos que han sido objeto de estudio por su actividad biológica. Entre los más ampliamente distribuidos en el reino se encuentra el ergosterol que presenta actividad antitumoral y antiviral (Ravi Subbiah, et al. 2003, Rivera, et al. 2002)

Los estudios químicos realizados en Shitake han arrojado como resultado el aislamiento de triterpenoides tales como los esteroides ergosta-7-en-3 β -ol; ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol, esteroides polihidroxilados y epoxidados como: 5 α ,8 α -epidioxi-(22E,24R)-23-metilergosta-6,22-dien-3 β -ol; el (22E,24R)-23-metilergosta-7,22-dien-3 β ,5 α ,6 β -triol; cetoesteroides como la 3 β ,5 α ,9 α -triidroxi-(22E,24R)-23-metilergosta-7,22-dien-6-ona y triterpenos como el ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno (Benavides 2004, Cucaita 2007, Ohnuma, et al. 2000, Yahoita, et al. 1998, Yahoita, et al. 1999, Yokokawa, et al. 1981).

En este capítulo se presenta el estudio químico de compuestos triterpenoides, tetracíclicos del extracto clorofórmico del estípite de Shiitake, así como la cuantificación de los mismos.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Material fúngico

El shiitake, fue proporcionado por la empresa Fungitá. El estípite fresco, se cortó en láminas delgadas, se secó a una temperatura de 35°C por 36 horas, para posteriormente ser sometido a proceso de pulverización.

3.2.2 Técnicas cromatografías utilizadas

- **Cromatografía de gases acoplada a un espectro de masas (CG-EM)**

Cromatógrafo marca Hewlett Packard 6890 columna capilar HP 5 de 30 m, 0.33 mm de diámetro interno y 25 μ m de espesor, gas de arrastre helio de 4.5 con un flujo de

1ml/min, modo Split 1:10 temperatura desde 90 °C hasta 300 °C a 5°C/ min. Acoplado a un espectrómetro de masas 5973 con una fuente de ionización de 70eV.

- **Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)**

Cromatógrafo marca Hitachi con detector UV-VIS a longitud de onda de 210nm, columna RP-18 de 25 cm x 10mm (5 µm), temperatura ambiente, flujo 2.0 ml/min, fase móvil metanol: agua (95:5) en modo isocrático.

- **Cromatografía en columna (CC)**

Como fase estacionaria se utilizó Sílica Gel Macherey-Nagel (0.063 - 0.200mm de diámetro de partícula), con elución en gradiente y empacadas en suspensión con el disolvente menos polar dependiendo del sistema de elución seleccionado.

- **Cromatografía en capa delgada (CCD)**

Cromatofolios de aluminio de silicalgel 60 F254 (10-12µm), se utilizó como revelador universal luz ultravioleta a 254 nm - 366nm y como revelador específico $ZnCl_2$ al 30% en metanol.

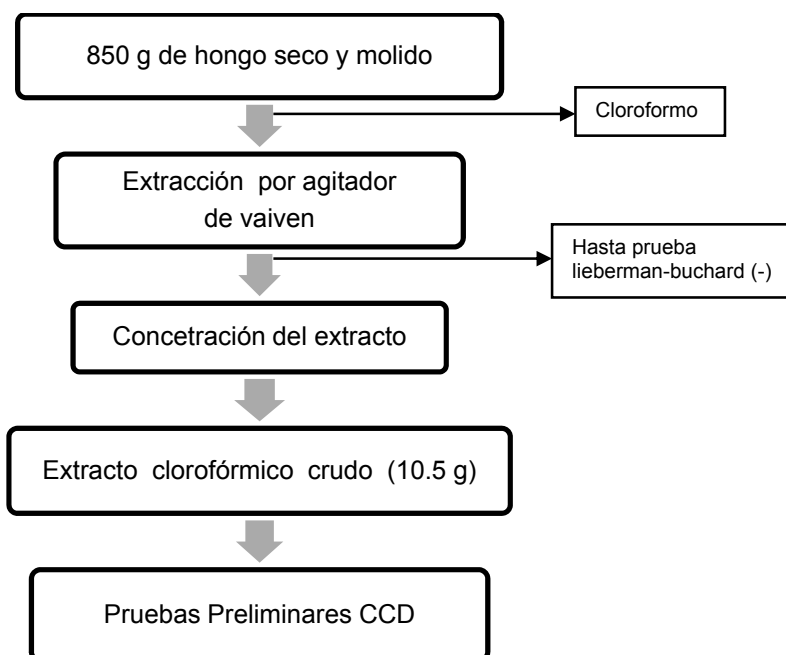
3.2.3 Elección del disolvente de extracción

Para determinar cuál sería el mejor solvente para la extracción, se realizó un ensayo preliminar, en el cual se pesaron dos muestras de 60 gramos de estípite en frascos schott, se adicionó a la primera muestra 150 ml de metanol y 150 ml de cloroformo para la segunda muestra, se colocaron en agitador de vaivén por 24 horas con remoción diaria de solvente, hasta obtener resultado negativo para la prueba de Lieberman-Buchard. Los extractos obtenidos se concentraron al vacío hasta sequedad en un rotavapor y se analizaron por CG-EM.

3.2.4 Extracción de los compuestos triterpenoides

Elegido el disolvente de extracción para los compuestos de interés, se obtuvo el extracto clorofórmico crudo, para lo cual se pesaron 850 gramos de estipe seco y molido y se le

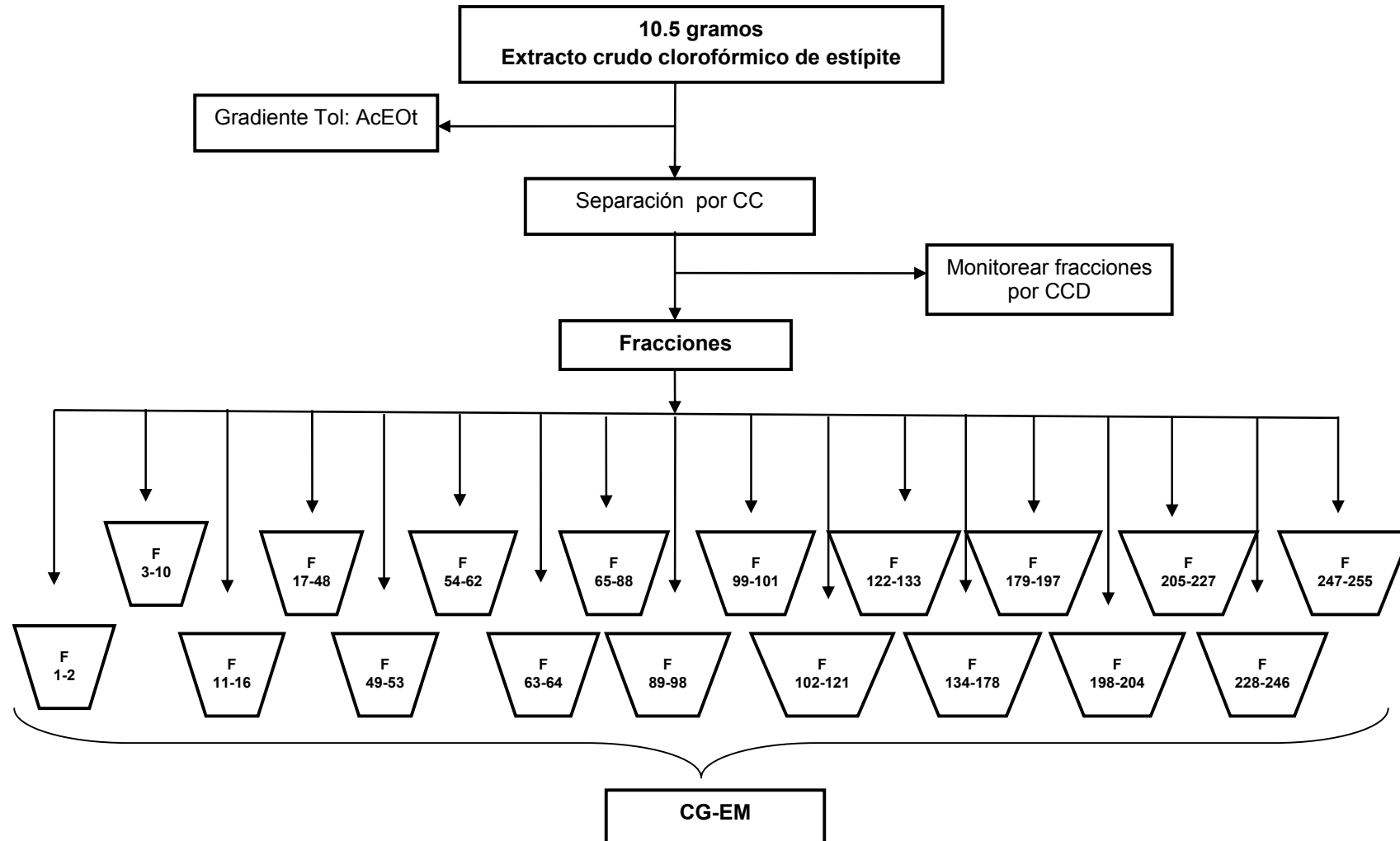
adicionó cloroformo. La mezcla agitó durante 24 horas removiendo diariamente el disolvente, hasta agotamiento de los compuestos objeto de estudio. El extracto se concentró obteniéndose 10.5 gramos que corresponden a un rendimiento de 1.23% (Diagrama 3-1).

Diagrama 3-1: Obtención del extracto clorofórmico crudo

3.2.5 Separación y purificación de los compuestos triterpenoides por cromatografía en columna (CC)

Utilizando diferentes solventes se procedió a la determinación por CCD el mejor para realizar la separación de los compuestos presentes en el extracto clorofórmico por cromatografía en columna, encontrándose que el mejor solvente es tolueno:acetato de etilo (7:3).

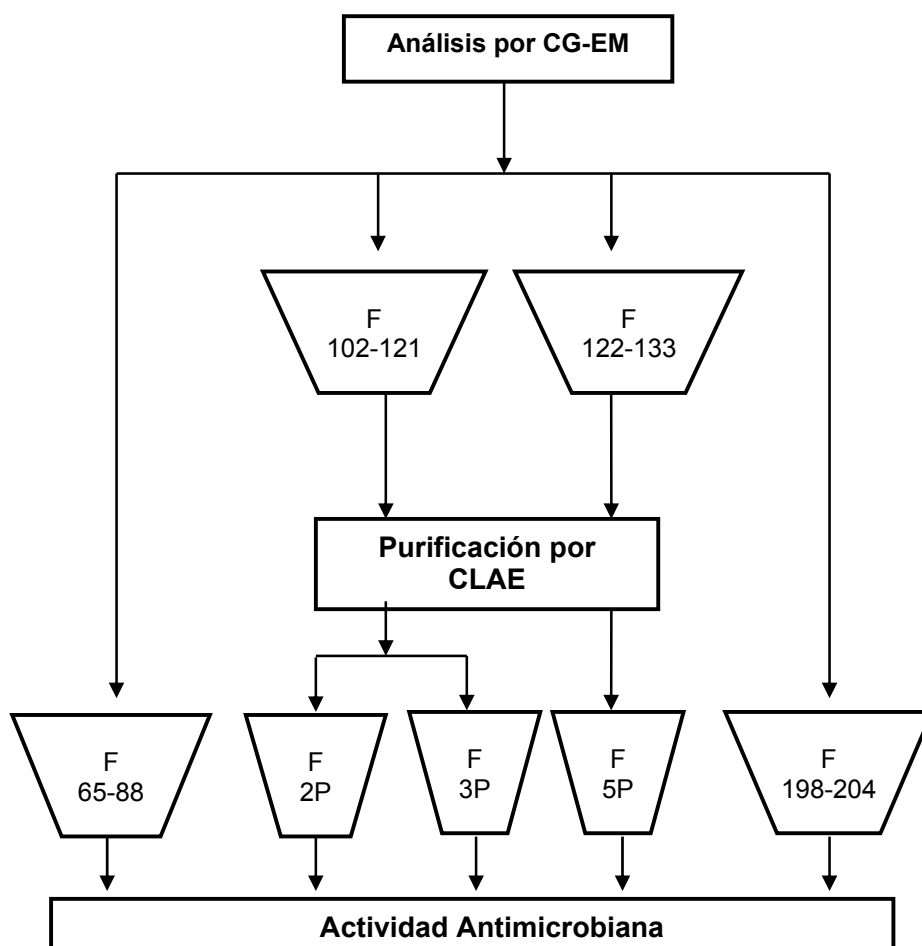
Del extracto clorofórmico se tomaron 10.4 gramos para la separación por CC, se usó una relación de 1 gramo de extracto de CHCl_3 por 36 gramos silica, con un gradiente de elución de tolueno y acetato de etilo (Tol:AcOEt), desde 0% hasta 100% AcOEt. El volumen de las fracciones recolectadas fue de 30 ml cada una, las cuales fueron monitoreadas por CCD utilizando Tol: AcOEt (7:3), los cromatogramas se revelaron con solución de ZnCl_2 como se mencionó inicialmente. Se recogieron 255 fracciones y se unieron aquellas fracciones que tenían R_f similares, dando como resultado 18 nuevas fracciones que se analizaron por CG-EM (Diagrama 3-2). El rendimiento de la columna cromatográfica fue de 73.52%.

Diagrama 3-2: Cromatografía en columna del extracto clorofórmico crudo

3.2.6 Purificación de las fracciones por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) con columna semipreparativa

Una vez realizado el análisis de CG-EM, se eligieron las fracciones (F 102-121, F 122-133), donde los compuestos triterpenoides eran mayoritarios, para proceder a purificarlos por CLAE semipreparativa. De cada una de estas fracciones se pesaron 150 mg y se disolvieron en 1 mL de metanol. El rendimiento de la columna preparativa fue de 57% (F 102-121), 56.31% (F 122-133). (Diagrama 3-3).

Diagrama 3-3: Purificación de las fracciones por CLAE semipreparativa

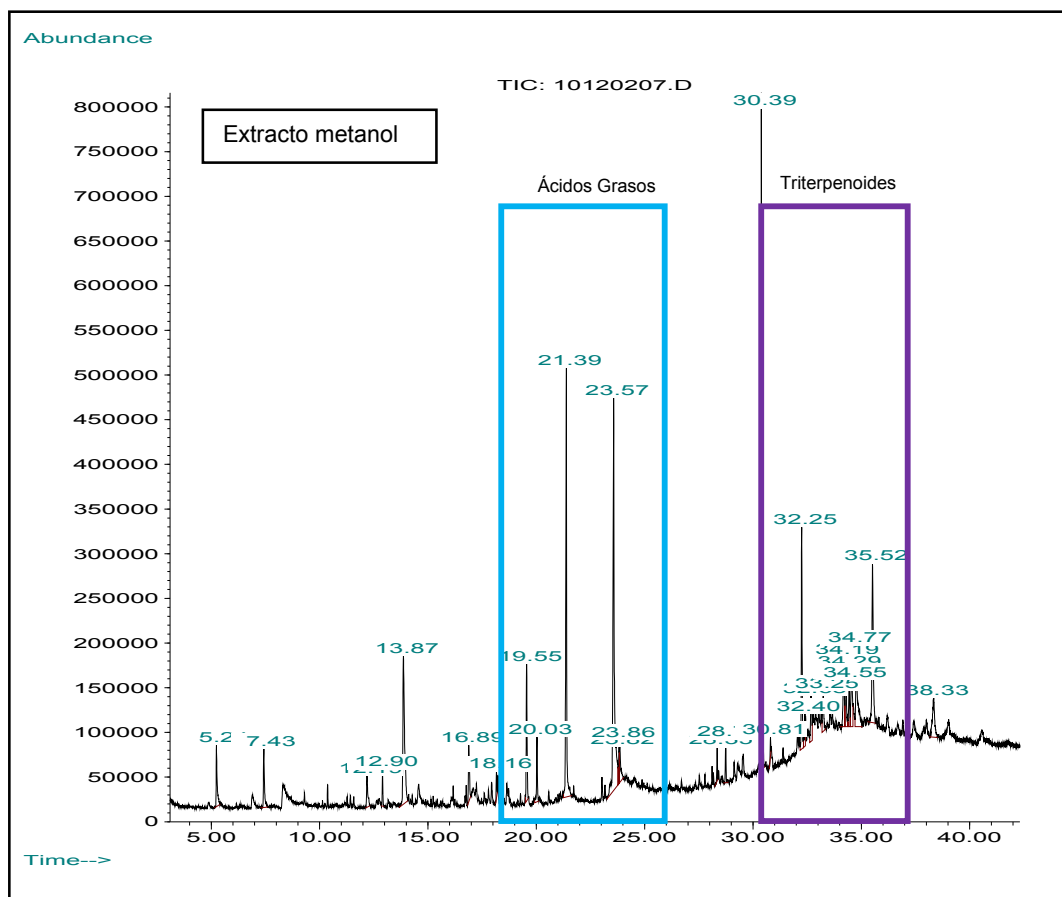


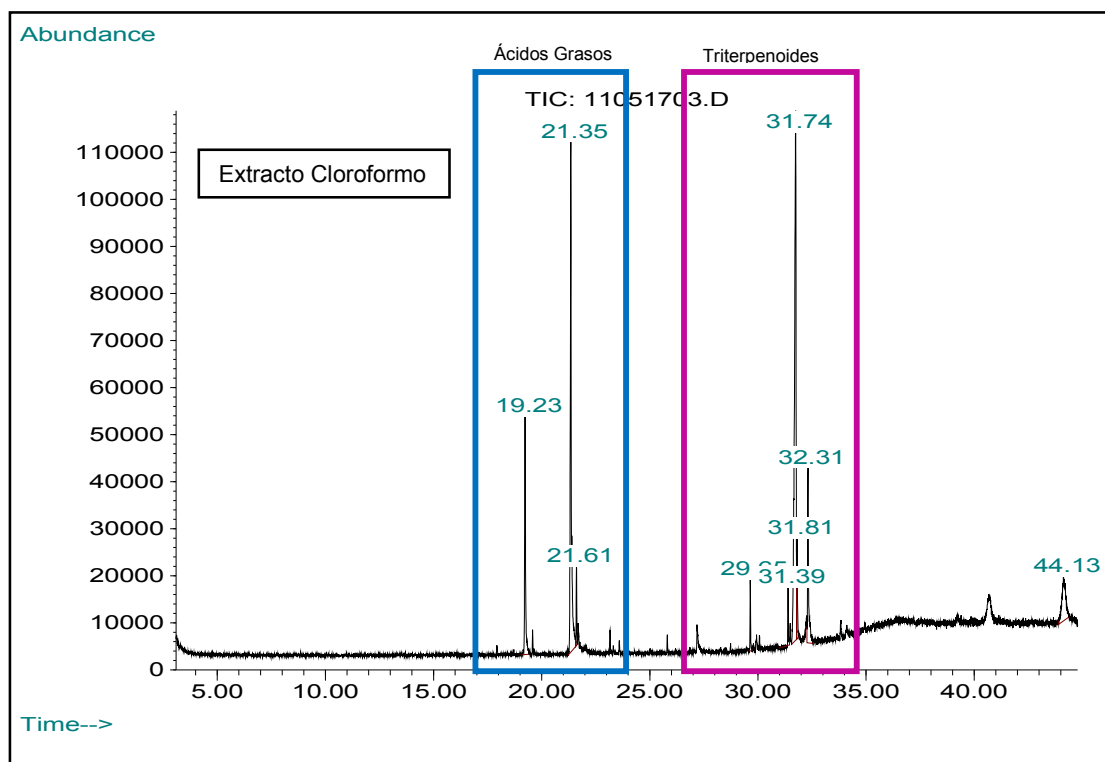
3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Elección del disolvente de extracción

Los extractos obtenidos se analizaron por CG-EM (Figura 3-1). Los resultados permitieron seleccionar como disolvente extractante al cloroformo, puesto que el análisis cromatográfico indicó que permite la extracción más selectiva de los compuestos de interés para el estudio.

Figura 3-1: Cromatograma de gases del extracto metanólico y clorofórmico del estípite de Shiitake.

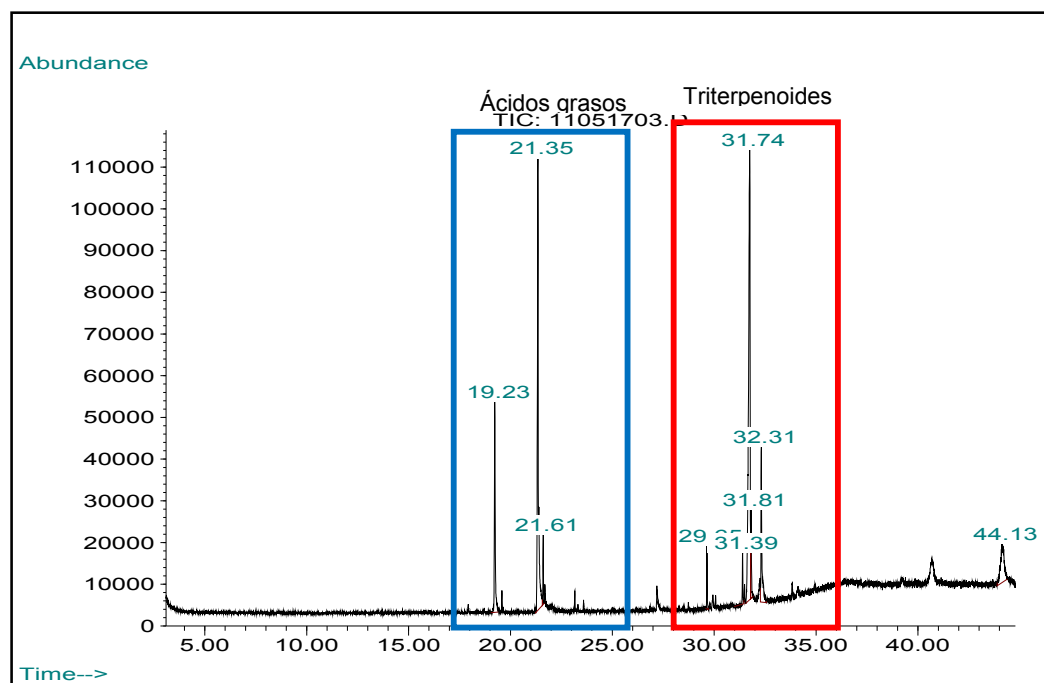




3.3.2 Extracto clorofórmico crudo

El análisis del perfil cromatográfico del extracto clorofórmico se enfocó especialmente en las dos zonas de interés para nuestro trabajo. La primera que comprende un rango de tiempos de retención entre 19-25 minutos que corresponde a la fracción de ácidos grasos y el segundo rango entre 29-38 minutos que corresponde a la fracción de compuestos triterpenoides (Figura 3-2).

Figura 3-2: Cromatograma de gases del extracto clorofórmico crudo del estípite de Shiitake (*Lentinula edodes*)



Como se observa en el cromatograma, la elección de hacer la extracción con cloroformo permitió obtener los metabolitos de interés sin tener compuestos que interfieran en su detección e identificación y con una buena relación entre ácidos grasos y compuestos triterpenoides, lo que es muy importante ya que cuando esta relación es muy grande, se tiene como comportamiento general en los macromicetos dificultad en la detección de los triterpenoides.

Con la finalidad de separar los componentes del extracto clorofórmico crudo se procedió a realizar cromatografía en columna obteniéndose 255 fracciones. Aquellas que presentaron el mismo comportamiento cromatográfico en CCD se reunieron, concentraron y se analizaron por CG-EM, de las cuales se seleccionaron aquellas donde se encontraba la mayor proporción de compuestos triterpenoides y ácidos grasos para la determinación estructural de sus componentes mediante el análisis de sus espectros de masas y comparación con literatura y posteriormente evaluar su actividad antibacteriana.

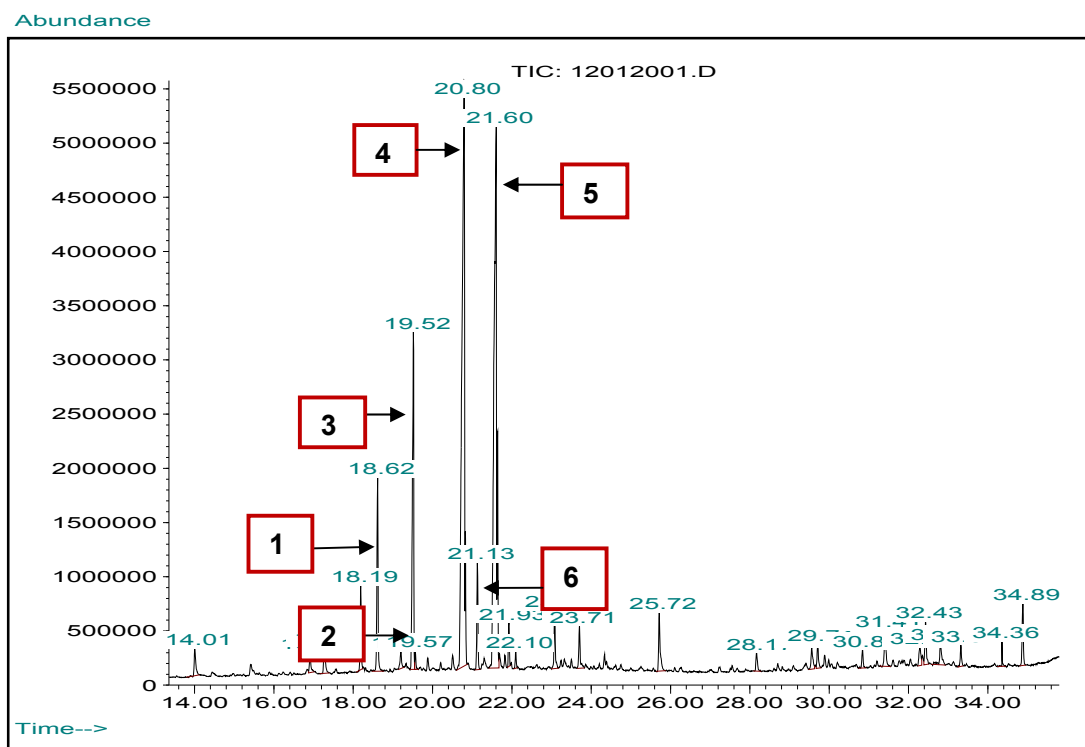
3.3.3 Determinación de los constituyentes de la fracción grasa no triterpenoidal del extracto clorofórmico del estípite de Shiitake

Para la determinación de los compuestos no triterpenoides se seleccionaron las fracciones donde estos compuestos se encontraban en mayor proporción.

- **Fracción 17- 48**

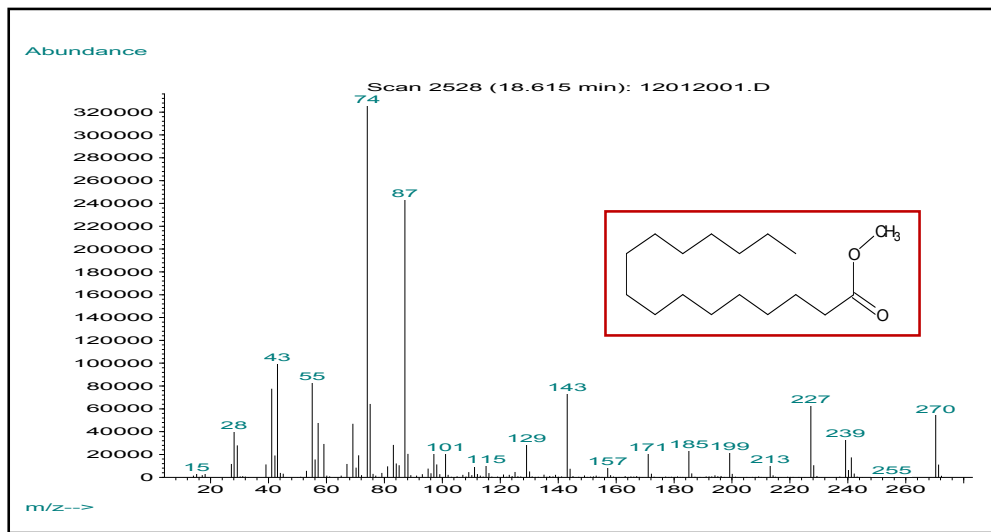
El cromatograma de esta fracción (Figura 3-3), mostró la presencia de cinco compuestos con tiempos de retención correspondientes a ácidos grasos de los cuales los compuestos 3 y 5 son los mayoritarios.

Figura 3-3: Cromatograma de gases de la fracción 17- 48



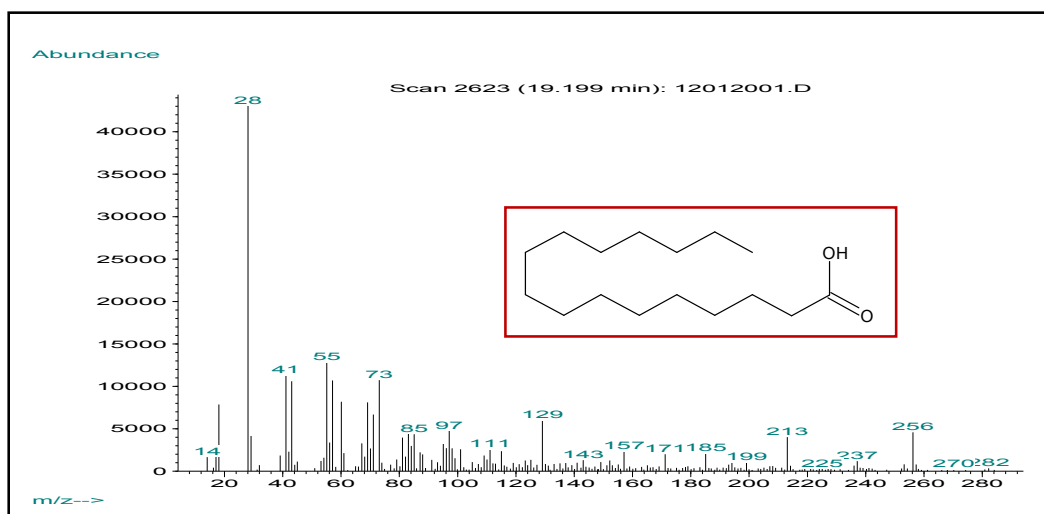
- **Compuesto 1**

En el espectro de masas (Figura 3.4), este compuesto presentó un pico de ion molecular a m/z 270 uma, concordante con la fórmula molecular $C_{17}H_{34}O_2$ y cuyas fragmentaciones corresponden a ésteres de ácidos grasos, con picos a m/z 255 $[M - CH_3]^+$, 239 $[M - OCH_3]^+$, 227 $[M - C_3H_7]^+$, 213 $[M - C_4H_9]^+$, 199 $[M - C_5H_{11}]^+$, 185 $[M - C_6H_{13}]^+$, 171 $[M - C_7H_{15}]^+$, 157 $[M - C_8H_9]^+$, 143 $[M - C_9H_{19}]^+$, 129 $[M - C_{10}H_{21}]^+$, 115 $[M - C_{11}H_{23}]^+$, 87 $[M - C_{13}H_{27}]^+$, 74 $[M - C_{14}H_{29}]^+$. Así mismo, aparece un ion correspondiente al rearrreglo de Mc. Lafferty a m/z 74 y pérdidas consecutivas de 14 uma, típicas de cadenas alifáticas largas. Según el análisis anterior y lo encontrado en literatura el compuesto corresponde al hexadecanoato de metilo, el cual ha sido reportado en *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes* (Shiitake) (Cucaita 2007, Chegwin 2007).

Figura 3-4: Espectro de masas del compuesto 1

• Compuesto 2

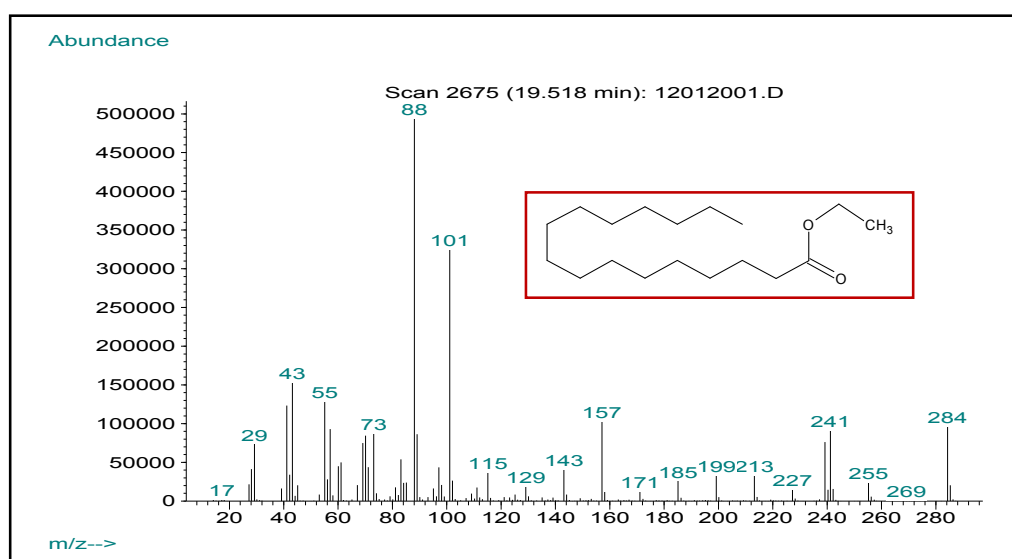
Este compuesto presenta en su espectro de masas (Figura 3-5), un ion molecular a m/z 256 una, concordante con la fórmula $C_{16}H_{32}O_2$ y los picos correspondientes a pérdidas sucesivas de 14 uma a m/z 213 $[M - CH_3]^+$, 199 $[M - OCH_3]^+$, 185 $[M - C_6H_{13}]^+$, 171 $[M - C_7H_{15}]^+$, 157 $[M - C_8H_9]^+$, 143 $[M - C_9H_{19}]^+$, 129 $[M - C_{10}H_{21}]^+$, 115 $[M - C_{11}H_{23}]^+$, características de compuestos alifáticos de cadena larga para ácidos carboxílicos alifáticos. Por comparación con literatura y teniendo en cuenta previos resultados en el grupo de investigación de Química de Hongos Macromicetos (Chegwin 2007) puede identificarse el compuesto como el ácido hexadecanoico (ácido palmítico), (Longvah, et al. 1998).

Figura 3-5: Espectro de masas del compuesto 2

- **Compuesto 3**

Su espectro de masas (Figura 3-6) presenta un pico de ión molecular a m/z 284 uma, que concuerda con la fórmula molecular $C_{18}H_{36}O_2$. Aparecen fragmentaciones típicas para ésteres, a m/z 269 $[M - CH_3]^+$, 255 $[M - C_2H_3]^+$, 241 $[M - C_3H_7]^+$, 227 $[M - C_4H_9]^+$, 213 $[M - C_5H_{11}]^+$ y el pico a m/z 88 debido al rearrreglo de Mc Lafferty. Con base en lo anterior y comparación con literatura el compuesto se identificó como el hexadecanoato de etilo (Chegwin 2007, Valencia, et al. 2002).

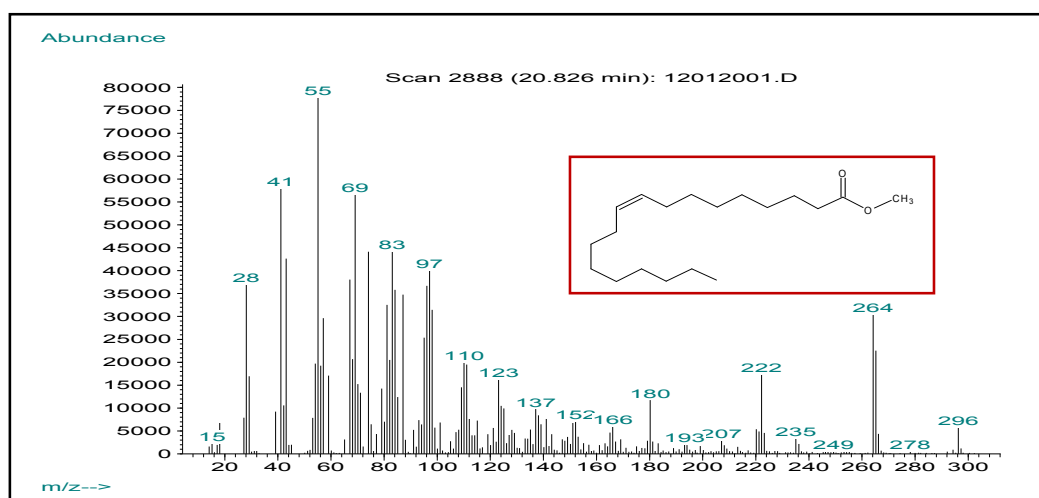
Figura 3-6: Espectro de masas del compuesto 3



- **Compuesto 4**

El compuesto presenta en su EM (Figura 3-7) un ion molecular a m/z 296 uma, que corresponde a la fórmula molecular $C_{19}H_{36}O_2$. Así mismo, iones característicos de ésteres de cadena alifática larga, como el ion a m/z 74 producido por el rearrreglo de Mc. Lafferty, pérdidas sucesivas de 14 uma y un ion a m/z 264 producido por el fragmento $[M - OCH_3]^+$. Del análisis anterior y por comparación con reportes en la literatura (Cucaita 2007, Mora 2010), el compuesto es el 9-octadecenoato de metilo.

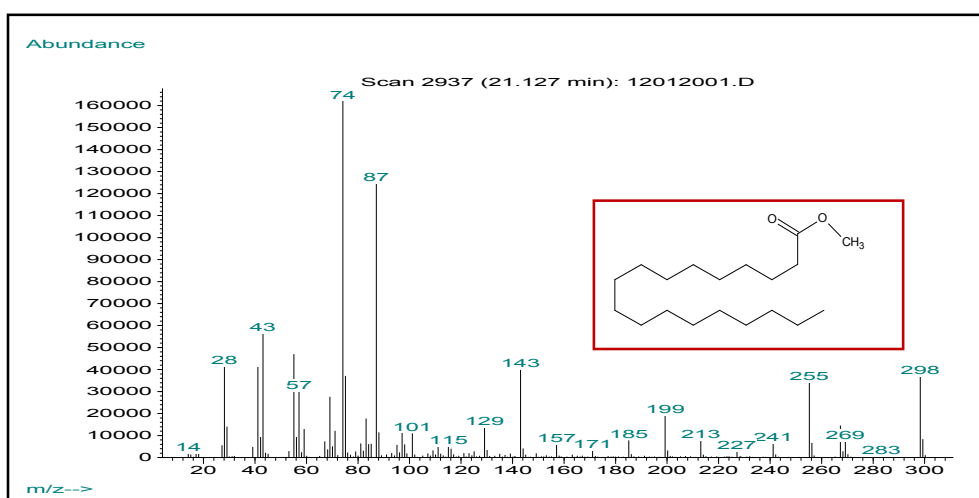
Figura 3-7: Espectro de masas del compuesto 4



- **Compuesto 5**

El EM del compuesto 5 (Figura 3-8), presenta un ion molecular a m/z 298 que concuerda con la fórmula molecular $C_{19}H_{38}O_2$. Los picos significativos se observaron a m/z 270 $[M - C_2H_5]^+$, 255 $[M - C_3H_7]^+$, 241 $[M - C_4H_9]^+$, 227 $[M - C_5H_{11}]^+$, como el ion a m/z 74 producido por el rearrreglo de Mc. Lafferty y pérdidas sucesivas de 14 uma. Estos fragmentos indican la presencia de un éster metílico con cadena lineal saturada. La similitud del espectro con literatura permitió identificarlo como el octadecanoato de metilo ya reportado en los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Fomitopsis sp.* (Chegwin 2007, Mora 2010).

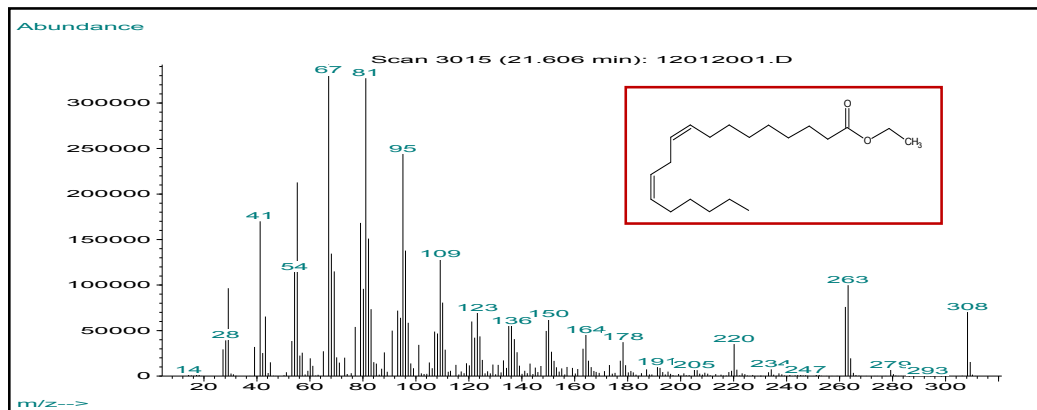
Figura 3-8: Espectro de masas del compuesto 5



- **Compuesto 6**

El espectro para el compuesto (Figura 3-9), muestra un pico de ion molecular a m/z 308 una, concordante con la fórmula molecular $C_{20}H_{36}O_2$ y pérdidas sucesivas de 14 unidades de masa características de compuestos alifáticos de cadena larga, así como pérdida de 263 $[M - O C_2H_5]^+$. Además, exhibe los picos a m/z 74 y m/z 88 rearrreglo de McLafferty para ésteres de cadena alifática larga. El análisis anterior y la comparación con reportes previos (Coy, et al. 2009), permitió deducir que la estructura corresponde al 9,12-octadecadienoato de etilo.

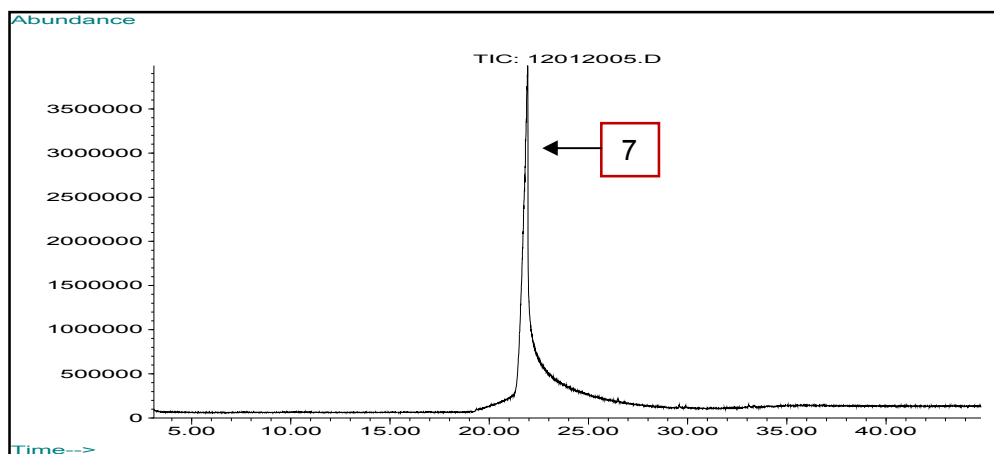
Figura 3-9: Espectro de masas del compuesto 6



- **Fracción 65-88**

El cromatograma de la fracción 65-88, mostro un solo compuesto mayoritario, en la zona de ácidos grasos (Figura 3-10) el cual se denominó compuesto 7.

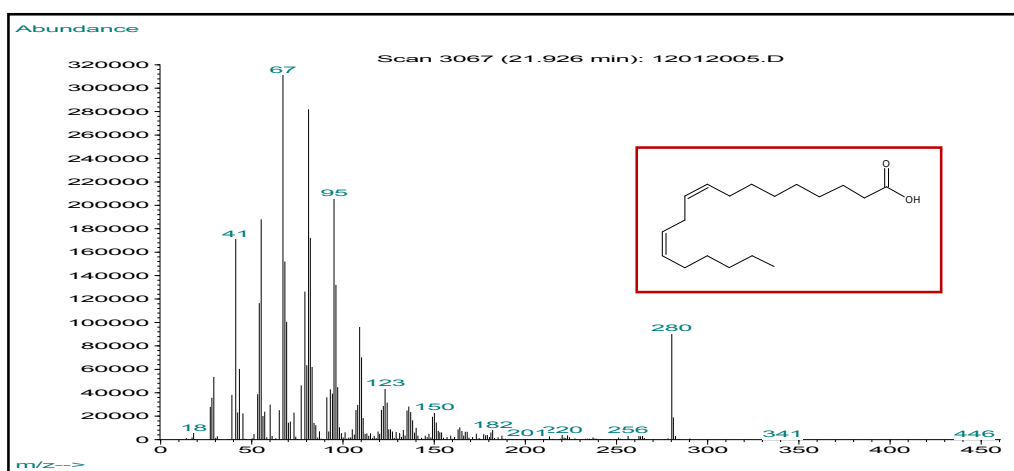
Figura 3-10: Cromatograma de gases de la fracción 65-88



• Compuesto 7

El espectro del compuesto 7 (Figura 3-11), muestra un pico de ion molecular a m/z 280 una que se ajusta a la fórmula molecular $C_{18}H_{32}O_2$. Presenta a su vez picos correspondientes a pérdidas sucesivas de 14 unidades de masa (cadena alifática larga) y pico a m/z 60 típico del rearrreglo de McLafferty para ácidos carboxílicos alifáticos. De acuerdo con las fragmentaciones anteriores y comparación con literatura el compuesto 6 es el ácido 9,12-octadecadienóico ya identificado en Shiitake (Benavides 2004, Cucaita 2007).

Figura 3-11: Espectro de masas del compuesto 7



Con base en los resultados anteriores, los compuestos mayoritarios de la fracción grasa no triterpenoidal del extracto clorofórmico del estípite de Shiitake (Tabla 3-1), corresponden a ésteres metílicos y/o etílicos de ácidos grasos saturados e insaturados y ácidos grasos, resultado que coincide con lo reportado en estudios previos realizados en hongos basidiomicetos por el grupo de Química de Hongos Macromicetos Colombianos (Cucaita 2007, Chegwin 2007, Mora 2010, Nieto, et al. 2008)

Tabla 3-1: Componentes mayoritarios de la fracción grasa no triterpenoidal del estípite de Shiitake (*Lentinula edodes*)

Formula	M ⁺	IDH	Nombre
$C_{17}H_{34}O_2$	270	1	Hexadecanoato de metilo
$C_{16}H_{32}O_2$	256	1	Ácido palmítico
$C_{18}H_{36}O_2$	284	1	Hexadecanoato de etilo
$C_{19}H_{36}O_2$	296	2	9-octadecaonato de metilo
$C_{19}H_{38}O_2$	298	1	Octadecanoato de metilo
$C_{20}H_{36}O_2$	308	3	9,12-octadecadienoato de etilo
$C_{18}H_{32}O_2$	280	3	Ácido linoléico

Cabe aquí anotar que la proporción relativa del ácido linoléico en el cromatograma de gases es alta coincidiendo con lo encontrado en los carpóforos del Shiitake, donde este ácido graso insaturado se encuentra como componente mayoritario (Bisen, et al. 2010, Longvah, et al. 1998, Martínez-Carrera, et al. 2004). Este resultado es una característica importante para el valor nutraceútico del estípite de Shiitake ya que no solamente el ácido linoléico se considera esencial para la dieta de humanos y animales haciendo necesario su consumo para la buena salud sino que también brinda protección frente a enfermedades cardiovasculares, disminuye el colesterol y la presión arterial, además de presentar actividad antibacteriana (Zhenga, et al. 2005).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente y con base en que el ácido linoléico es un componente mayoritario del extracto clorofórmico, se tomó la fracción 65-88, donde este compuesto se encuentra como único componente, para determinar su actividad antibacteriana (Capítulo 4).

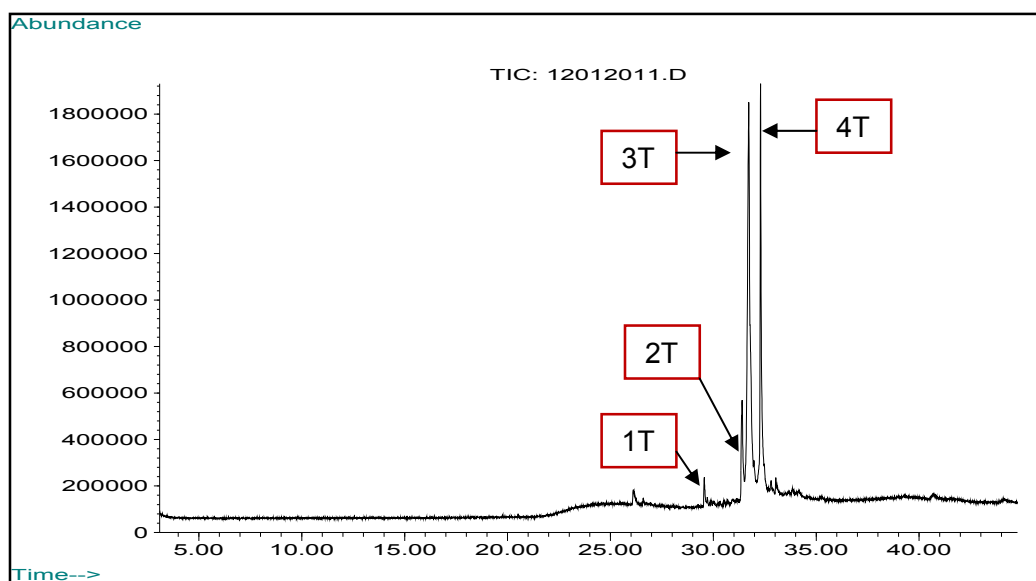
3.3.4 Fracción de triterpenoides presentes en el extracto de estípite de Shiitake

Para la determinación de los compuestos triterpenoides se seleccionaron las fracciones donde estos compuestos se encontraban en mayor proporción.

- **Fracción 102-121**

El cromatograma de gases de esta fracción (Figura 3-12), muestra 4 compuestos de los cuales dos son mayoritarios.

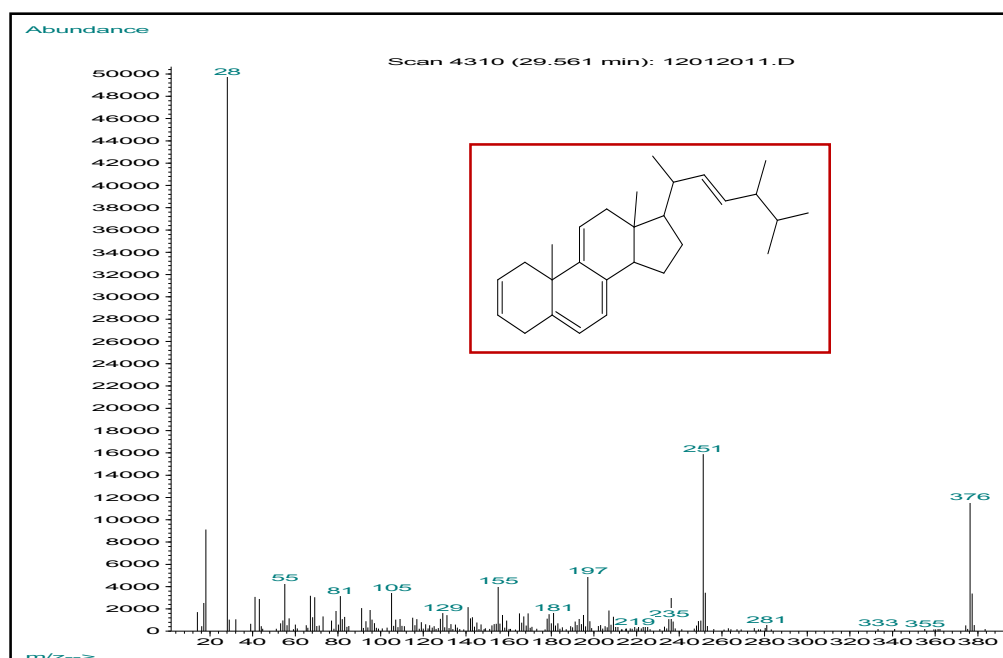
Figura 3-12: Cromatograma de gases de la fracción 102-121



• Compuesto 1T

Con un tiempo de retención de 29.56 min. presenta en su espectro de masas un ion molecular $[M]^+ = 376$ uma (Figura 3-13), el cual concuerda con la fórmula molecular $C_{28}H_{40}$, con un IDH = 9, dado por el cierre de los cuatro anillos y cinco dobles enlaces ubicados en la molécula. Los fragmentos característicos se dan a m/z 361 $[M - CH_3]^+$, 251 $[M - \text{cadena lateral}]^+$ intenso, el cual es diagnóstico para esteroides $\Delta^{5,7,9(11)}$, 236 $[M - \text{Cadena lateral} - CH_3]^+$, 209 $[\text{Fisión anillo D} - 2H]^+$, 197 $[\text{Fisión D} - CH_3]^+$, 157 $[\text{Fisión anillo C}]^+$ y 141 $[\text{Fisión anillo C} - CH_3]^+$. Con base en sus fragmentaciones y a lo reportado en literatura el compuesto se identificó como ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno aislado de *Pleurotus sajor-caju* (Rivera, et al. 2005), *Pleurotus ostreatus* (Chegwin 2007) *Fomitopsis* sp. (Mora 2010), *Lentinula edodes* (Yahoita, et al. 1998).

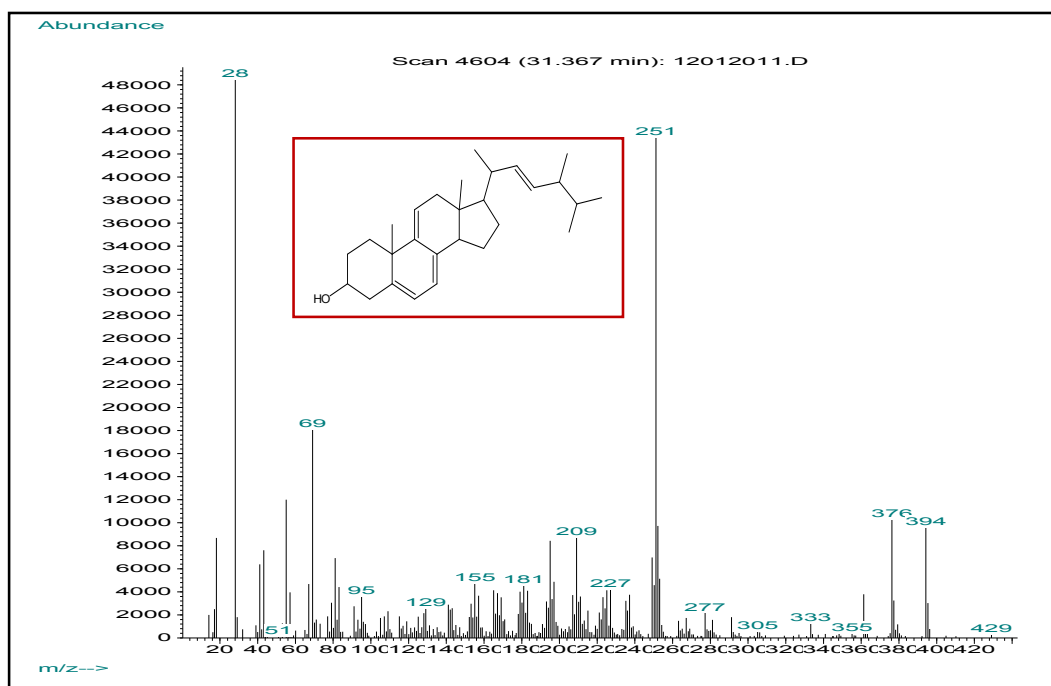
Figura 3-13: Espectro de masas compuesto 1T



• Compuesto 2T

El espectro de masas del compuesto 2T (Figura 3-14), presenta un tiempo retención de 31.36 min, un ion molecular $[M]^+ = m/z$ 394 que es consistente con la fórmula condensada $C_{28}H_{42}O$. Entre los fragmentos característicos se encuentran m/z 376 $[M - H_2O]^+$, 361 $[M - CH_3 - H_2O]^+$, 269 $[M - \text{cadena lateral}]^+$; 251 $[M - \text{cadena lateral} - H_2O]^+$, 209 $[\text{Fisión anillo D} - H_2O]^+$, 141 $[\text{Fisión anillo C} - H_2O - CH_3 - 2H]^+$. El espectro coincide para el compuesto ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol, reportado previamente en *Laetiporus sulphureus*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* (Coy, et al. 2009, Cucaita 2007, Chegwin 2007, Nieto, et al. 2007)

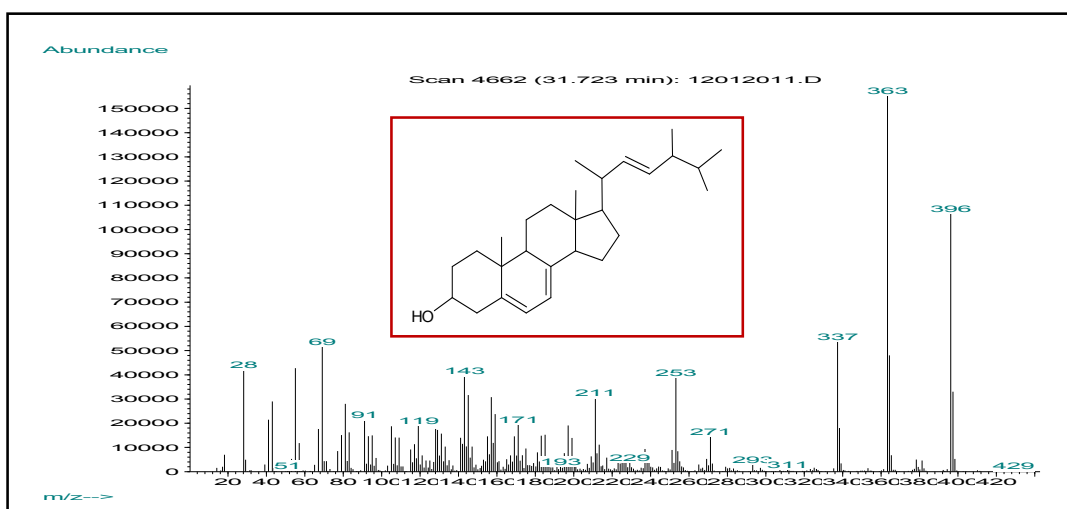
Figura 3-14: Espectro de masas compuesto 2T



- **Compuesto 3T**

Presenta un ion molecular $[M]^+ = 396$ uma (Figura 3-15), consecuente con una fórmula molecular condensada $C_{28}H_{44}O$, con un IDH = 7, indicando la presencia de 7 insaturaciones, de las cuales 4 se atribuyen al cierre de los anillos y las tres restantes a la presencia de tres dobles enlaces en la molécula. Su fragmentos característicos se presentan a: m/z 376 $[M - H_2O]^+$ 363 $[M - CH_3 - H_2O]^+$, 271 $[M - \text{cadena lateral}]^+$, 253 $[M - \text{cadena lateral} - H_2O]^+$, 229 $[\text{Fisión anillo D}]^+$, 211 $[\text{Fisión de anillo D} - H_2O]^+$, 143 $[\text{Fisión anillo C} - H_2O - CH_3]^+$. De acuerdo al espectro de masas y comparación con datos bibliográficos se determinó que el compuesto corresponde al ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol (Ergosterol), el cual es el esteroil más abundante en hongos superiores y ha sido reportado en basidiomicetos por (Kitzberger, et al. 2007, Nieto, et al. 2007, Yokokawa, et al. 1981)

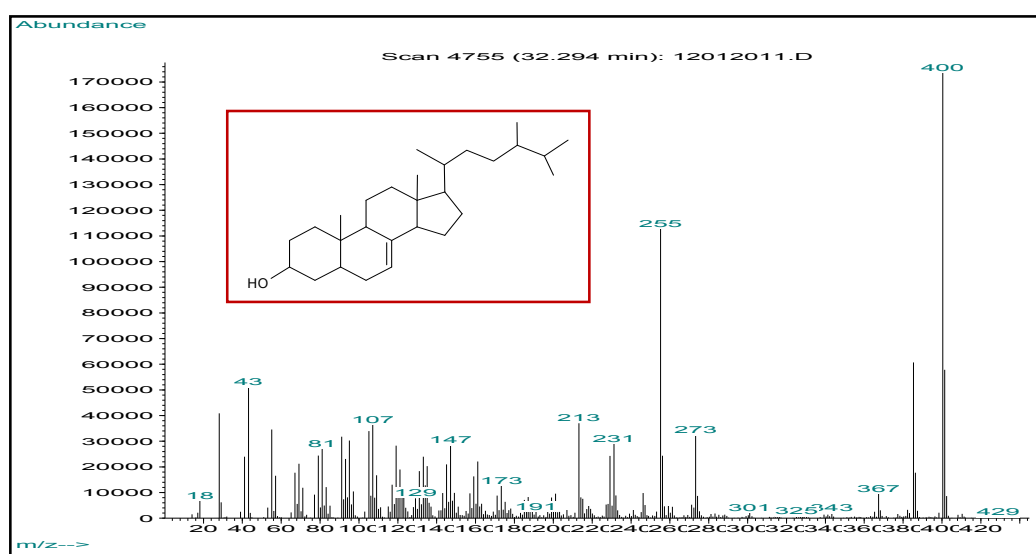
Figura 3-15: Espectro de masas compuesto 3T



- **Compuesto 4T**

Este compuesto (Figura 3-16), exhibe un ion molecular $[M]^+ = 400$ uma, que corresponde a una fórmula molecular $C_{28}H_{48}O$ con IDH = 5. Presenta fragmentos a m/z 382 $[M - H_2O]^+$, 367 $[M - H_2O - CH_3]^+$, 273 $[M - \text{cadena lateral}]^+$, 255 $[M - \text{cadena lateral} - H_2O]^+$, 246 [Fisión anillo D] $^+$, 231 [Fisión de anillo D - CH_3] $^+$, 213 [Fisión de anillo D - H_2O], 145 [Fisión anillo C - CH_3] $^+$, entre los más importantes. Por comparación con literatura se identifica el compuesto como ergosta-7-en-3 β -ol, previamente para *Lentinula edodes*, *Ganoderma australe* reportado por (Cucaita 2007, Valencia, et al. 2002, Yokokawa, et al. 1981)

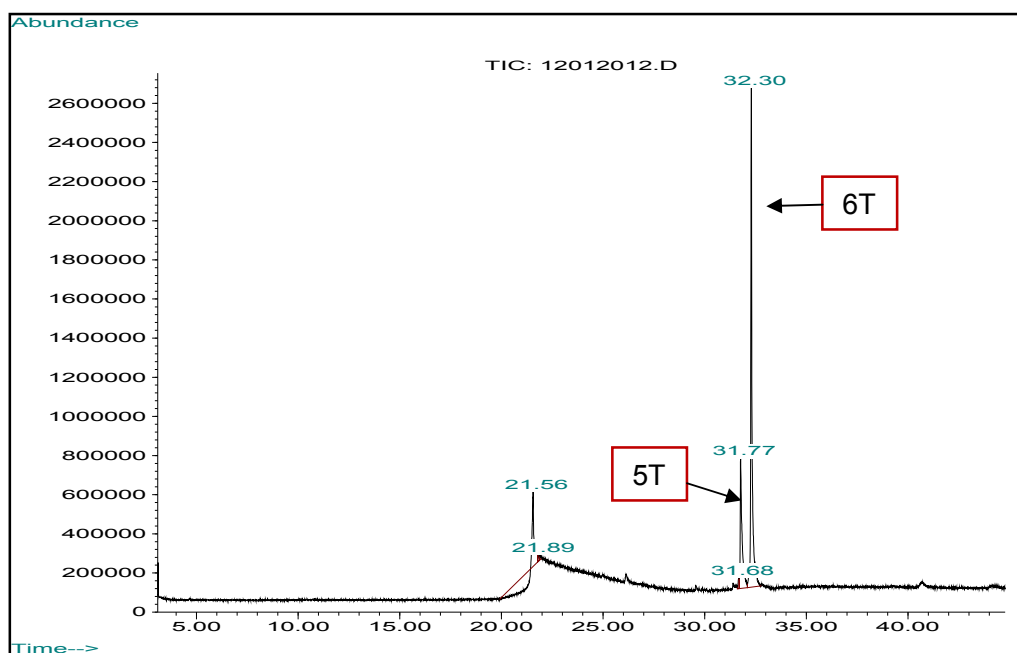
Figura 3-16: Espectro de masas compuesto 4T



- **Fracción 122-133**

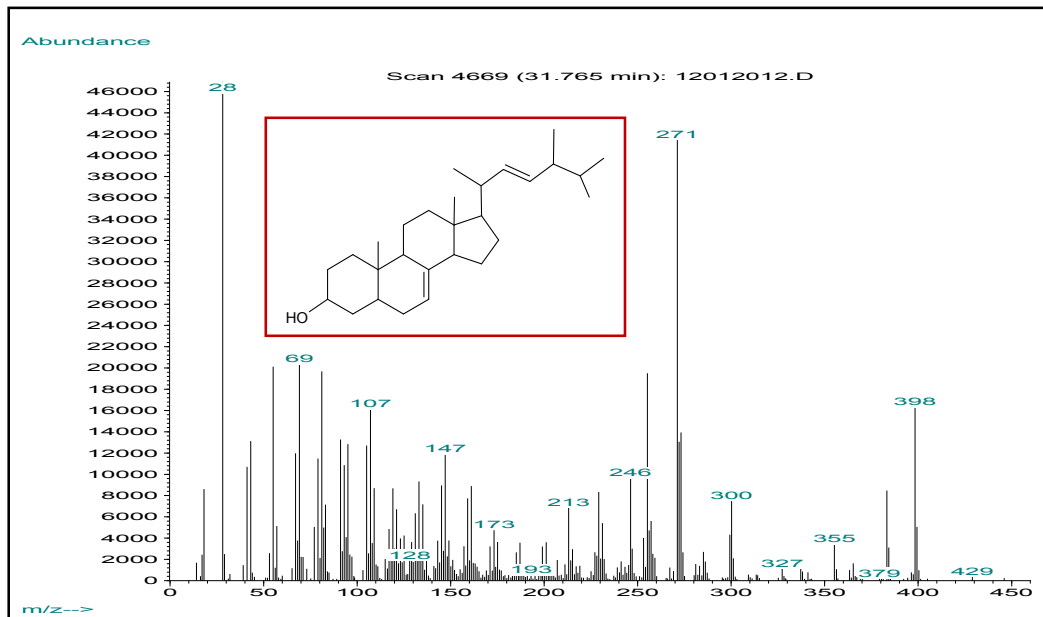
El cromatograma de gases de esta fracción muestra 2 compuestos mayoritarios (Figura 3-17) y se denominaron 5T y 6T.

Figura 3-17: Cromatograma de gases de la fracción 122-133



- **Compuesto 5T**

Su espectro de masas presenta un ion molecular $[M]^+ = 398$ u.m.a (Figura 3-18), que corresponde a la fórmula $C_{28}H_{46}O$ con IDH= 6, muestra los siguientes iones: m/z 383 $[M - CH_3]^+$, 365 $[M + -CH_3-H_2O]^+$, 300 $[M - C_3H_7]^+$, 271 $[M + - cadena lateral - 2H]^+$, 255 $[M + - cadena lateral - H_2O]^+$, 229 $[M + - Fisión D - cadena lateral - H]^+$, 145 $[M - Fisión C - CH_3 - H_2O]^+$. Del análisis anterior y por comparación con lo reportado, el compuesto se identificó como ergosta-7,22-dien-3 β -ol, previamente aislado de hongos basidiomicetos *Lentinula edodes*, *Pleurotus sajor-cajú* (Cucaita 2007, Nieto, et al. 2008, Yokokawa, et al. 1981)

Figura 3-18: Espectro de masas compuesto 5T

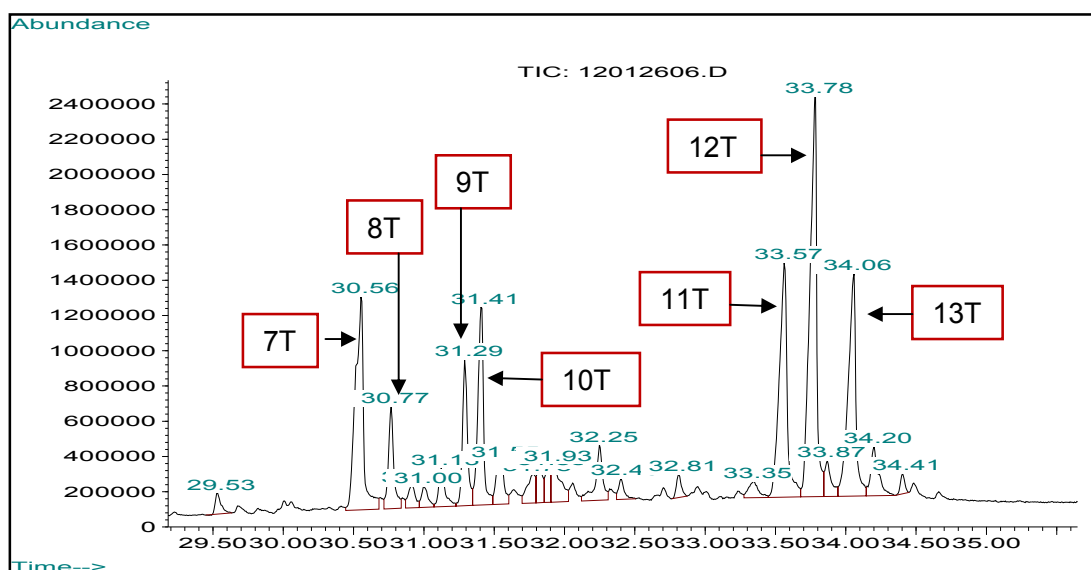
- **Compuesto 6T**

Este compuesto presenta un espectro de masas idéntico al compuesto 4T de la fracción 102-121 y que se identificó como el ergosta-7-en-3 β -ol.

- **Fracción 198-204**

El cromatograma de gases de esta fracción (Figura 3-19) muestra 7 compuestos (7T-13T) de los cuales tres son compuestos mayoritarios.

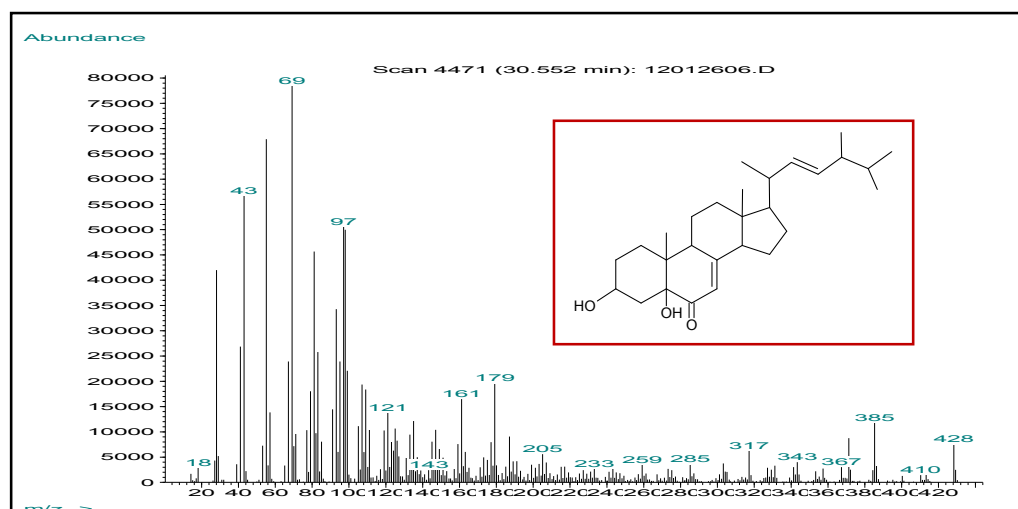
Figura 3-19: Cromatograma de gases de la fracción 198-204



- **Compuesto 7T**

El espectro de masas de este compuesto (Figura 3.20), presenta ión molecular $[M]^+ = 428$ una consistente con una fórmula molecular $C_{28}H_{44}O_3$ con $IDH = 7$, así como los iones con m/z 410 $[M - H_2O]^+$, 400 $[M - C - O]^+$, 385 $[M - CO - CH_3]^+$ 303 $[M - \text{cadena lateral}]^+$, 285 $[M - \text{cadena lateral} - H_2O]^+$. Este espectro coincide con lo reportado por (Benavides 2004, Cucaita 2007, Rivera, et al. 2009) quienes lo identificaron en el carpóforo del shiitake como ergosta-7,22-dien-3,5-diol-6-ona.

Figura 3-20: Espectro de masas compuesto 7T



- **Compuesto 8T**

Con un tiempo de retención de 30.76min (Figura 3-21), el compuesto presenta una ion molecular $[M]^+=428$ uma, con fórmula molecular $C_{30}H_{52}O$, con IDH=5, y los iones m/z 410 $[M-H_2O]^+$, 385 $[M-C_3H_7]^+$, 357 $[M-C_2H_4]^+$, 303 $[M\text{-cadena lateral}]^+$, 285 $[M\text{-cadena lateral}-H_2O]^+$, 261 $[M\text{-fisión anillo D}]^+$. De acuerdo a lo anterior y a lo reportado por se planteó como posible compuesto al 4,4-dimetil-ergosta-24-en-3 β -ol (Coy, et al. 2009). Las fragmentaciones del compuesto se presentan en el (Diagrama 3-4).

Figura 3-21: Espectro de masas compuesto 8T

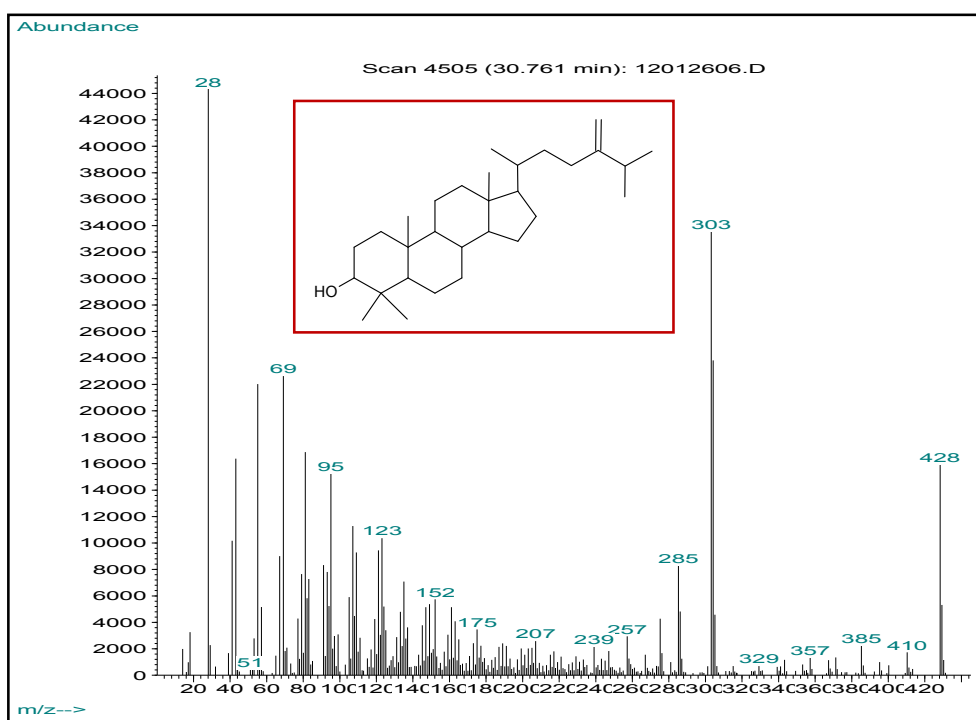
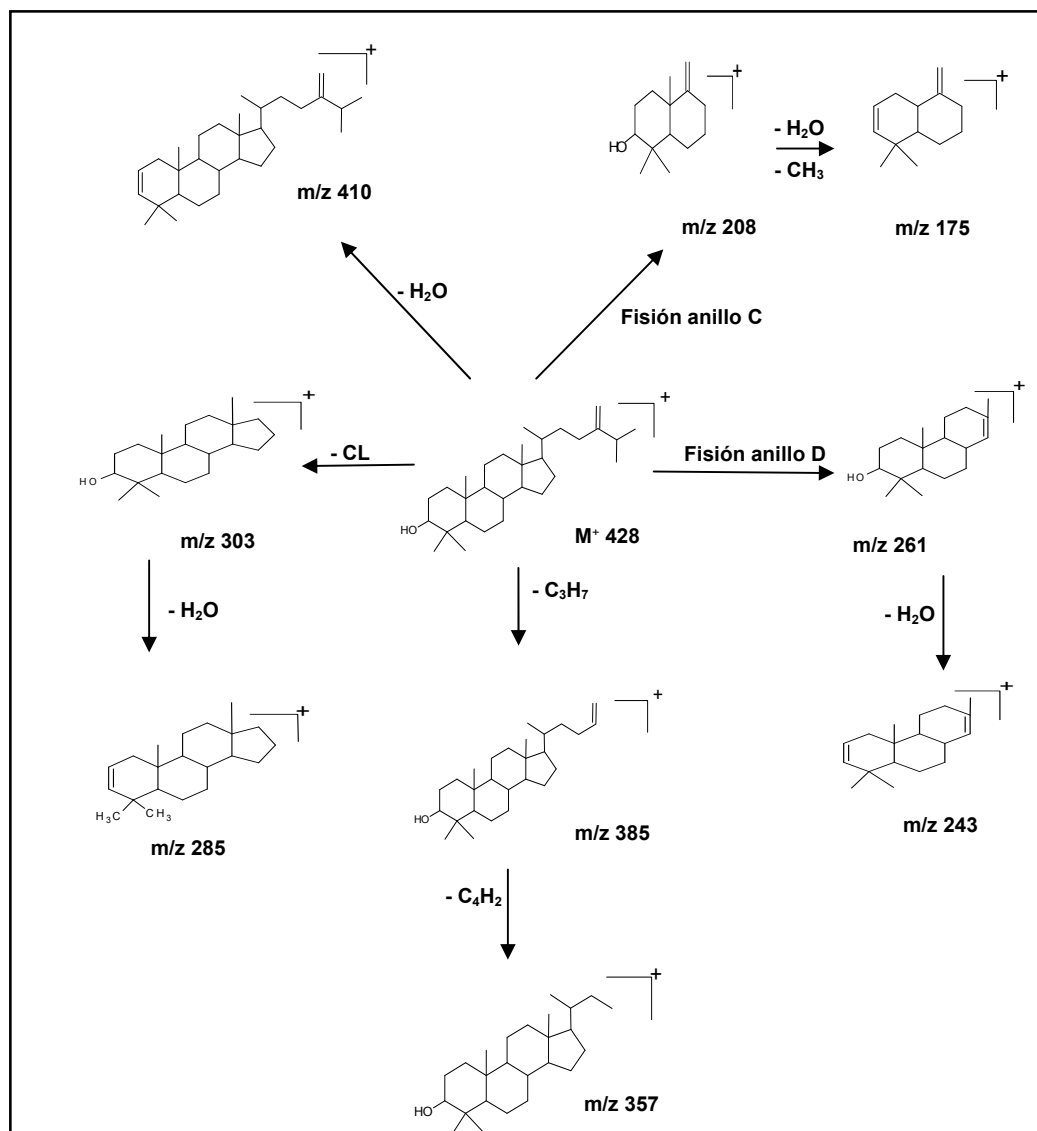


Diagrama 3-4: Fragmentos del compuesto 8T



- **Compuesto 9T**

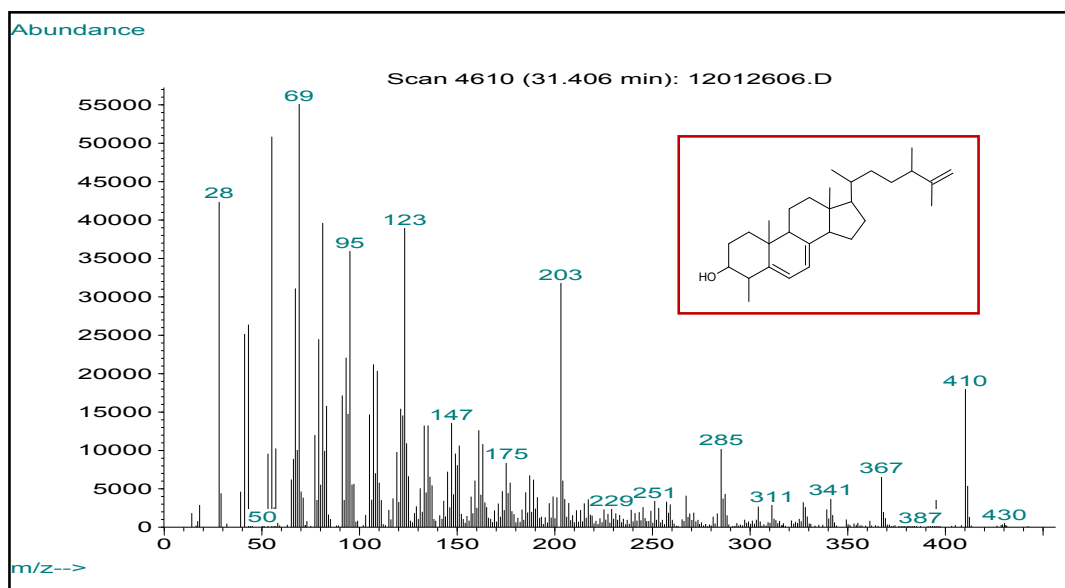
El compuesto corresponde al ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol ya identificado en la fracción 102-121 (compuesto 2T).

- **Compuesto 10T**

Presenta en su espectro de masas (Figura 3-22) un ion molecular $[M]^+=410$ uma, concordante con una fórmula molecular $C_{29}H_{46}O$ con un IDH = 7, indicando la presencia de 7 insaturaciones, de las cuales cuatro se atribuyen al cierre de los anillos y las tres

restantes a dobles enlaces presentes en la molécula. Entre los fragmentos característicos se presentan: m/z 392 $[M - H_2O]^+$, 367 $[M - C_3H_7]^+$, 285 $[M^+ - \text{cadena lateral}]^+$, 251 $[M - \text{cadena lateral} - H_2O - H - CH_3]^+$, 203 $[M - \text{Fisión anillo C}]^+$, 161 $[M - \text{Fisión anillo C} - CH_2]^+$. Del análisis anterior se propone como estructura para el compuesto el 4-metil-ergosta-5,7,25-trien-3 β -ol, previamente reportado (Coy, et al. 2009, Weete 1973).

Figura 3-22: Espectro de masas compuesto 10T



• Compuesto 11T y Compuesto 13T

Estos compuestos tienen un tiempo de retención de 33.56 min (Figura 3-23) y 34.06 min (Figura 3-24). En sus espectros de masas presentan un ión molecular $[M]^+ = 428$ uma, pero con una baja abundancia relativa, en cambio se observa, una fragmentación a m/z 410 $[M - H_2O]^+$ que corresponde, una fórmula molecular de $C_{28}H_{44}O_3$ con IDH = 7. Como los espectros de estos dos compuestos tienen el mismo patrón de fragmentación que se demuestra por la presencia de los mismos iones, es posible plantear que estos dos compuestos sean isómeros.

Entre los fragmentos característicos se presentan: m/z 410 $[M - H_2O]^+$, 392 $[M - 2H_2O]^+$, 377 $[M - CH_3 - 2H_2O]^+$, 285 $[M - \text{cadena lateral} - H_2O]^+$, 349 $[M - C_3H_7 - H_2O]^+$, 267 $[M - \text{cadena lateral} - 2H_2O]^+$, 185 $[M - \text{Fisión del anillo C} - 2H_2O]$ (Diagrama 3.5). Del análisis anterior se propone como posibles estructuras para los compuestos 11T y 13T el 5,6-epoxi-ergosta-8,22-dien-3 β ,7-diol y 5,6-epoxi-ergosta-8,(14)22-dien-3 β ,7-diol reportado por (Yahoita, et al. 1999, Yue, et al. 2001, Zhou, et al. 2011).

Figura 3-23: Espectro de masas compuesto 11T

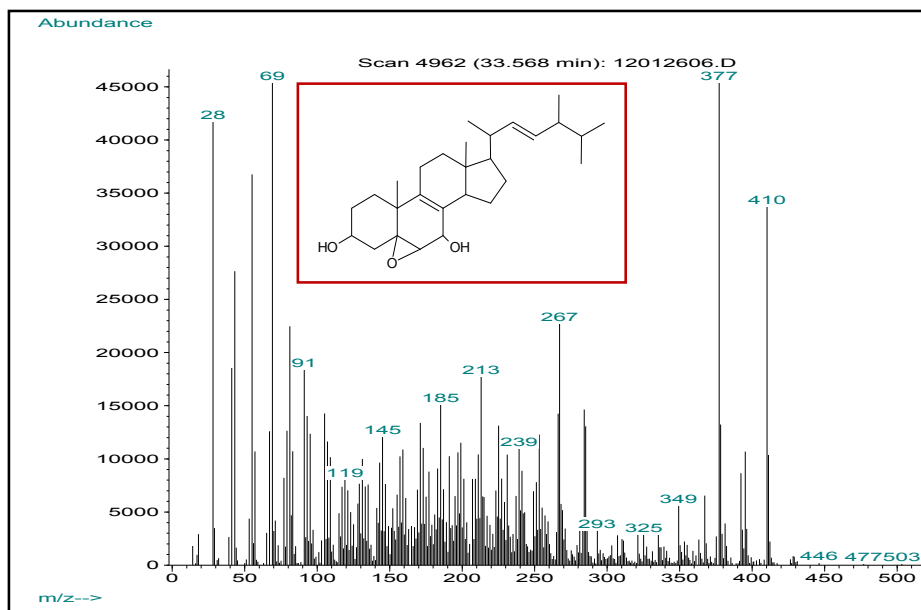


Figura 3.24: Espectro de masas compuesto 11T

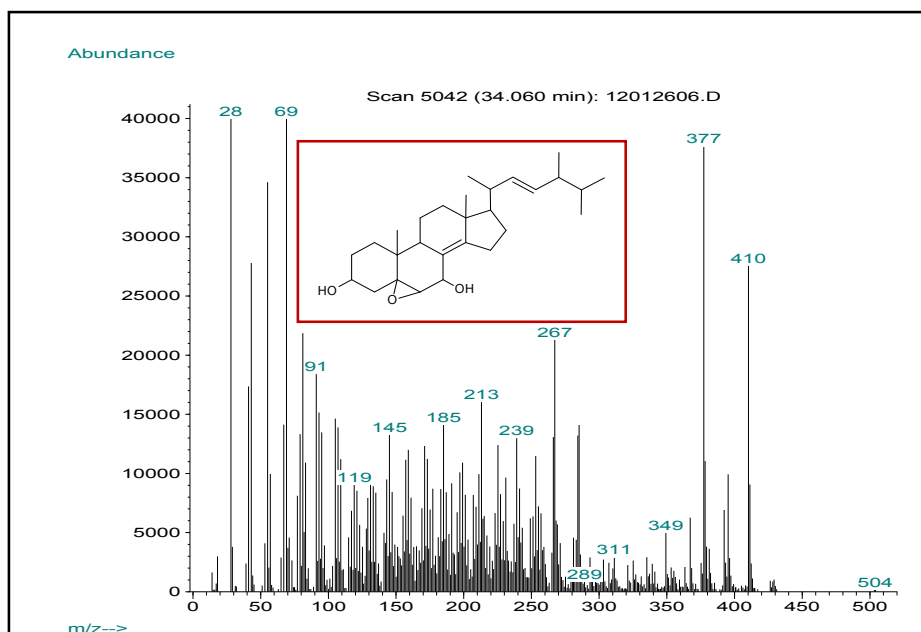
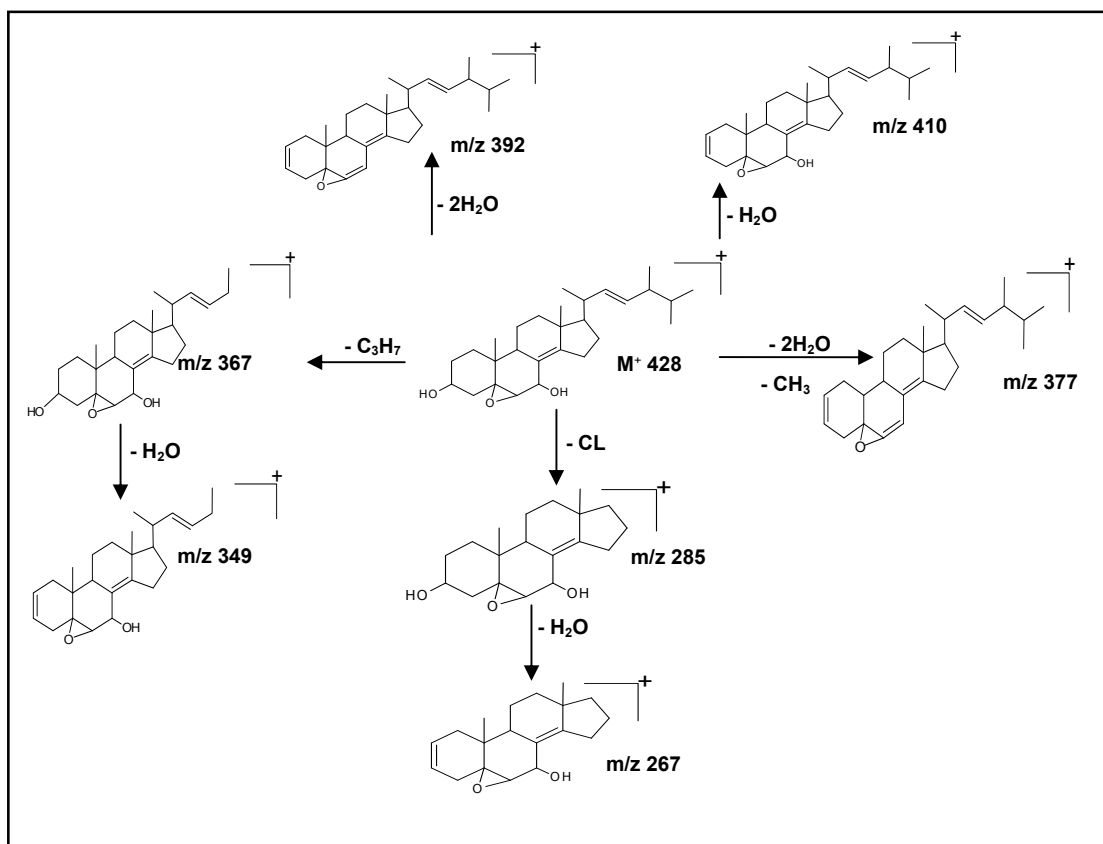
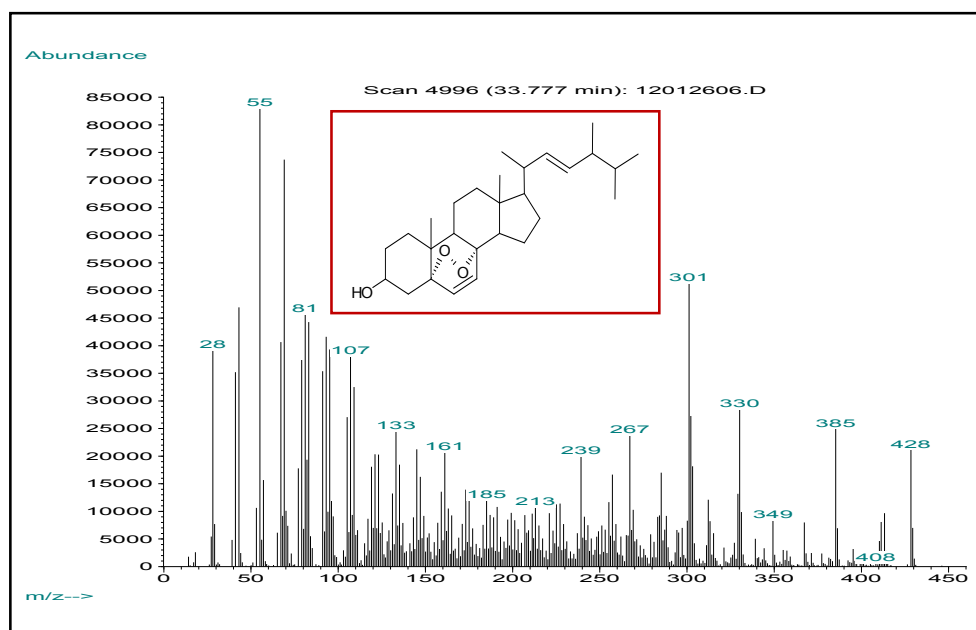


Diagrama 3-5: Fragmentos de los compuesto 11T-13T



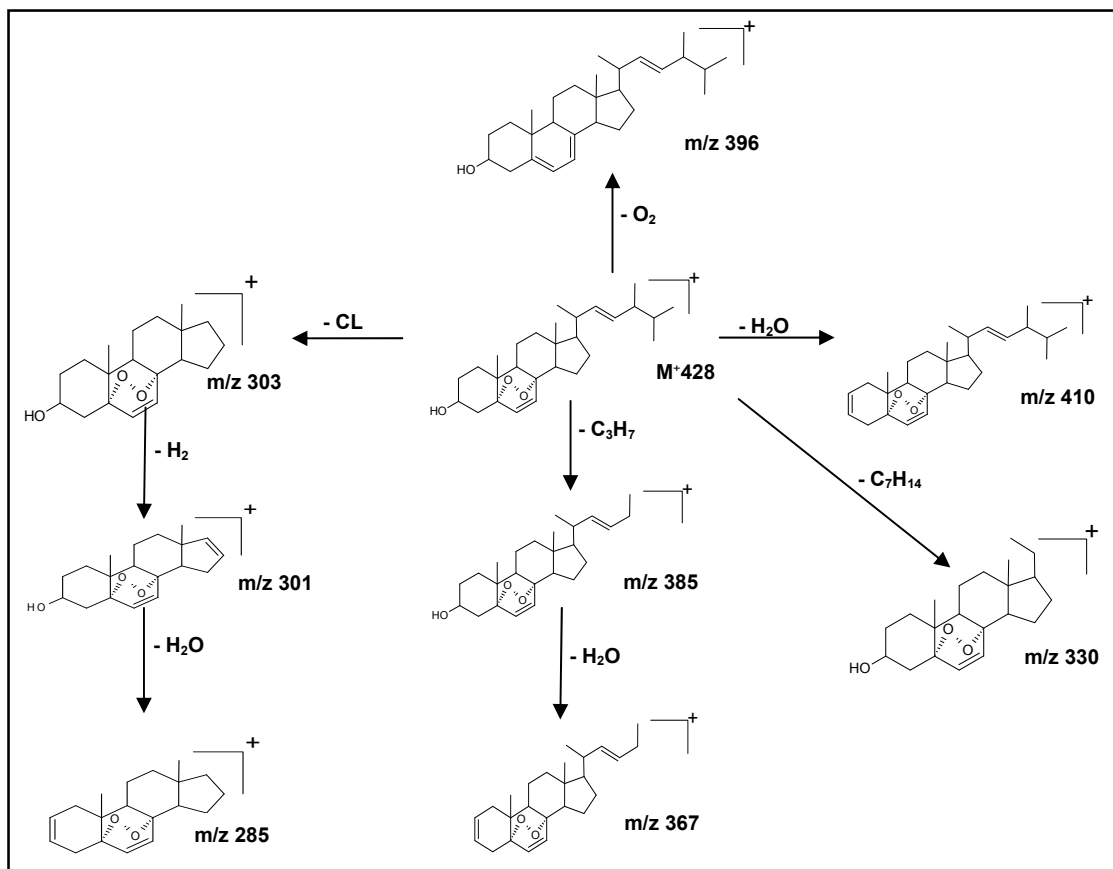
• Compuesto 12T

El espectro de masas de este compuesto (Figura 3-25), presenta ión molecular $[M]^+=428$ uma con la fórmula molecular $C_{28}H_{44}O_3$. Los fragmentos característicos se dan a: m/z 410 $[M-2H_2O]^+$, 396 $[M-O_2]^+$, 385 $[M-C_3H_7]^+$, 349 $[M-C_3H_7-2H_2O]^+$, 330 $[M-C_7H_{14}]^+$, 303 $[M-cadena\ lateral-2H]^+$, 285 $[M-cadena\ lateral-H_2O]^+$. De acuerdo a lo anterior y a lo reportado por (Coy, et al. 2009, Chegwin 2007, Kim, et al. 1997), se identifico como probable compuesto al ergosta-5,8-epidioxi-6,22-dien-3 β ol (Diagrama 3-6).

Figura 3-25: Espectro de masas compuesto 12T

Del análisis anterior se determinó que los compuestos mayoritarios de la fracción de triterpenoides presentes en el extracto clorofórmico de estípite de Shiitake (Tabla 3-2), corresponde a núcleo ergostano, Las estructuras coinciden con lo reportado para esteroides aislados del shiitake por (Phillips, et al. 2011, Teichmann, et al. 2007, Yokokawa, et al. 1981). También se encontraron compuestos con mayor grado de oxigenación de tipo epóxiesteroides y cetoesteroides, previamente reportados en hongos *Lentinula edodes* (Shiitake), *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, *Pholiota nameko*, *Hypsizygus marmoreus*, *Lactarius piperatus*, *Tricholoma portentosum*, *Lactarius deliciosus*, *Lactarium volemus* (Rivera, et al. 2009, Yahoita, et al. 1998, Yahoita, et al. 1999, Yue, et al. 2001). y con aquellos. Aislados e identificados de basidiomicetos por el grupo de Química de Hongos Macromicetos (Coy, et al. 2009, Cucaita 2007, Chegwin 2007, Jaramillo 2009, Mora 2010).

Diagrama 3-6: Fragmentos del compuesto 12T

Tabla 3-2: Componentes mayoritarios de la fracción triterpenoidal del estípite de Shiitake (*Lentinula edodes*)

Compuesto	Formula	M ⁺	IDH	Nombre
1T	C ₂₈ H ₄₀	376	9	Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno
2T- 9T	C ₂₈ H ₄₂ O	394	8	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol
3T	C ₂₈ H ₄₀ O	396	7	Ergosta-5,7,22-trien-3β-ol
4T- 6T	C ₂₈ H ₄₈ O	400	5	Ergosta-7-en-3β-ol
5T	C ₂₈ H ₄₆ O	398	6	Ergosta-7,22-dien-3β-ol
7T	C ₂₈ H ₄₄ O ₃	428	7	Ergosta -7,22-dien- 3,5-diol-6-ona
8T	C ₂₈ H ₄₄ O ₃	428	7	4,4-dimetil-ergosta-24-en-3β-ol
10T	C ₂₉ H ₄₆ O	410	7	4-metil-ergosta-5,7,25-trien-3β-ol
11T-13T	C ₂₈ H ₄₄ O ₃	428	7	5,6-epoxi-ergosta-8,22-dien-3β,7-diol 5,6-epoxi-ergosta-8(14),22-dien-3β,7-diol
12T	C ₂₈ H ₄₆ O ₃	428	5	Ergosta-5,8-epidioxi-6,22-dien-3βol

3.3.5 Cuantificación relativa de los compuestos mayoritarios del extracto clorofórmico del estípite de Shiitake (*Lentinula edodes*)

La cuantificación de los compuestos presentes en el estípite, se hizo por áreas relativas (Tabla 3-3), encontrándose el mayoritario es el ergosta-5,7,22-trien- β -ol (ergosterol) 39,52%, compuesto de mayor abundancia en hongos macromicetos, resultado que coincide con lo reportado en carpóforo tanto para Shiitake como para *Pleurotus ostreatus* (Cucaita 2007, Chegwin 2007). Cabe aquí anotar que en el estudio realizado por (Kitzberger, et al. 2007), se reporta un menor porcentaje de ergosterol (3.7%,) para el carpóforo de Shiitake. Los siguientes compuestos mayoritarios en el extracto crudo del estípite son el ácido linoléico y el ácido palmítico reportados también en el carpóforo de Shiitake en los estudios realizados por (Bisen, et al. 2010, Longvah, et al. 1998).

Los compuestos ergosta-7-en-3 β -ol y ergosta-7,22-dien-3 β -ol presenta un porcentaje de 8.21%, y 3.29% en el extracto clorofórmico del estípite estos compuestos han sido aislados del carpóforo de Shiitake por (Ohnuma, et al. 2000, Yahoita, et al. 1998), en los estudios realizados por el grupo de Química de Hongos Macromicetos (Benavides 2004, Cucaita 2007), también se reportaron para el carpóforo. Sin embargo, en la cuantificación del extracto, estos compuestos no se encuentran como mayoritarios. En cuanto al triterpeno Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno en el estípite se encuentra en menor proporción 1.91 %, comparado con lo reportado para el carpóforo 8.8% por (Cucaita 2007), en la literatura este compuesto se identificó en el carpóforo de Shiitake en estudios realizados por (Yahoita, et al. 1999).

Tabla 3-3: Componentes mayoritarios del extracto clorofórmico del estípite de Shiitake (*Lentinula edodes*)

Tiempo de retención	Porcentaje relativo	Compuesto
19.23	10.08	Ácido palmítico
21.34	25.52	Ácido linoleico
29.64	1.91	Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno
31.39	1.39	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol
31.74	39.52	Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol
31.81	3.29	Ergosta-7,22-dien-3 β -ol
32.31	8.21	Ergosta-7-en-3 β -ol

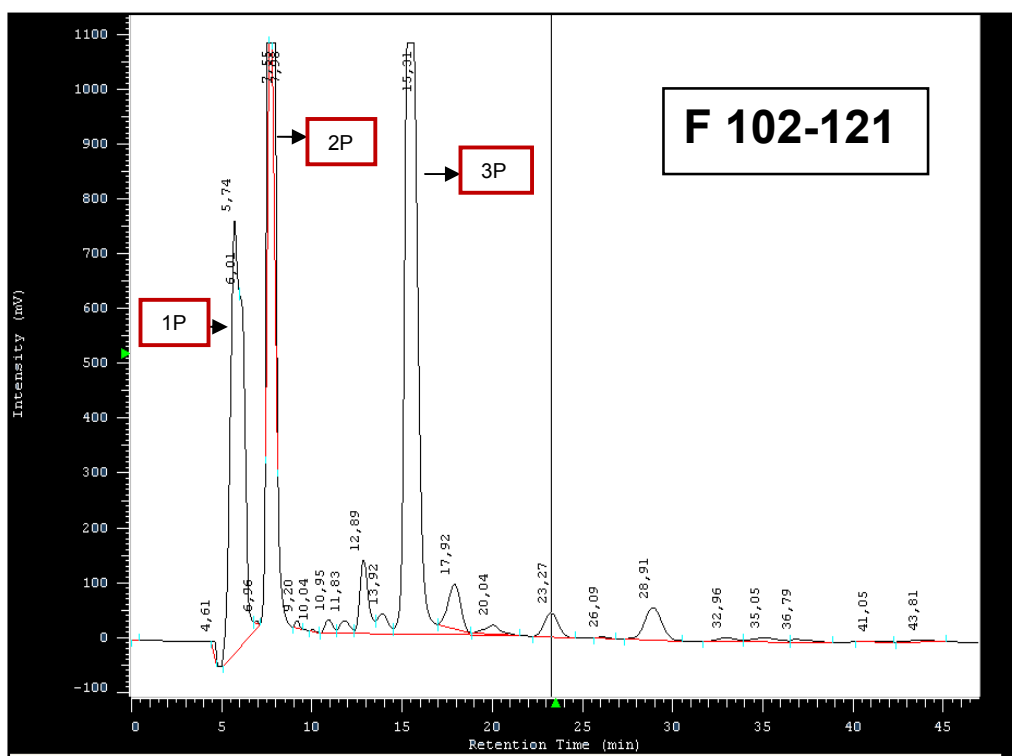
3.3.6 Purificación de las fracciones por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) semipreparativa

Con base en los resultados anteriores las fracciones 102-121 y 122-133 se sometieron a CLAE semipreparativa como se indicó previamente, con el fin de obtener de forma pura los compuestos triterpenoidales.

- **Fracción 102-121**

Como se muestra en el cromatograma (Figura 3-26) esta fracción está constituida por siete compuestos de los cuales los mayoritarios son los denominados 1P, 2P y 3P. Se separaron las fracciones correspondientes a ellos y se analizaron de nuevo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas arrojando como resultado que el 1P no corresponde a un compuesto de tipo triterpeno. Los compuestos 2P y 3P corresponden a los esteroides ergosta-7-en-3 β -ol y ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol respectivamente.

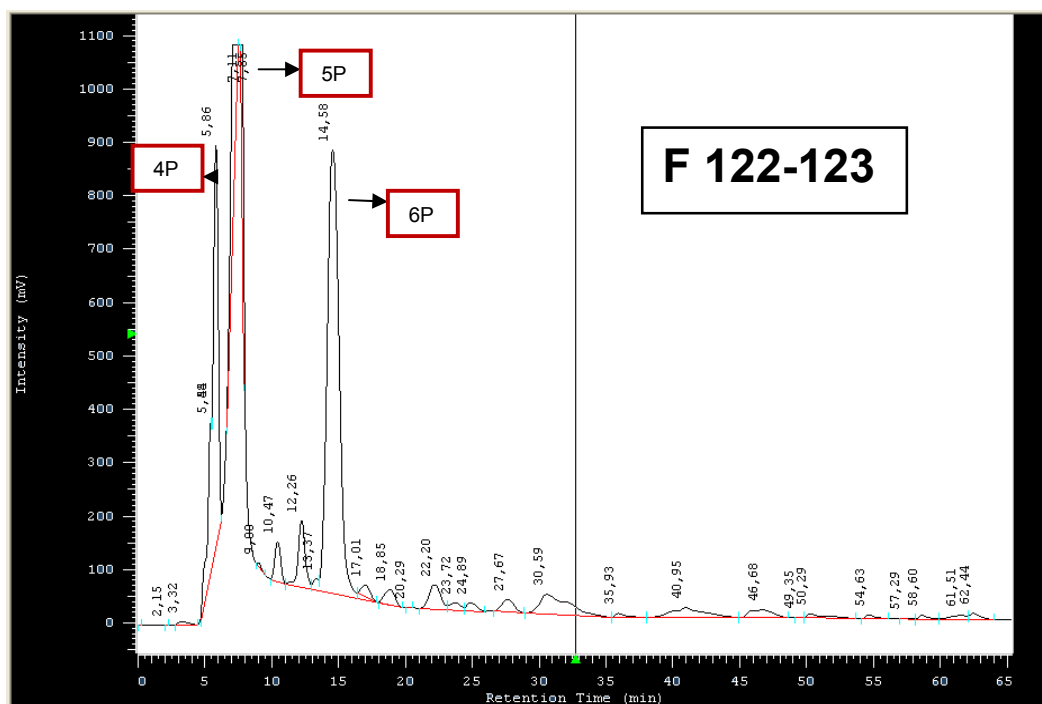
Figura 3-26: Cromatograma CLAE de la fracción 102-121



- **Fracción 122-133**

Esta fracción está constituida por dos compuestos triterpenoides mayoritarios (5P y 6P) que después de su separación y posterior análisis por CG-EM se corroboró su identidad correspondiendo a ergosta-7-en-3 β -ol y ergosta-7,22-dien-3 β -ol respectivamente (Figura 3-27).

Figura 3-27: Cromatograma CLAE de la fracción 122-133



Con base en los resultados anteriores, se seleccionaron los compuestos puros 2P, 3P, 5P y 6P junto con las fracciones 65-88 y 198-204 obtenidas de la CC, para realizar la determinación de la actividad antibacteriana, de acuerdo a lo expuesto en el (Diagrama 3-2).

3.4 Conclusiones

De la fracción grasa no esterólica, se identificaron siete compuestos que corresponden a cinco ésteres de ácidos grasos y dos ácidos grasos (ácido palmítico y ácido linoléico) ácidos grasos que han sido identificados también para el carpóforo de Shiitake

De la fracción de triterpenoides, se identificaron 11 compuestos mayoritarios con núcleo ergostano, que corresponden a 6 esteroides, 1 cetosteroides, 3 epoxisteroides, y 1 triterpeno, las estructuras coinciden con lo reportado en literatura para esteroides aislados de hongos basidiomicetos.

De los 11 compuestos identificados en el estípite de Shiitake, 9 han sido reportados en el carpoforo del hongo que corresponden a cuatro esteroides ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol; ergosta-5,7,22-trien- β -ol; ergosta-7-en-3 β -ol; ergosta-7,22-dien-3 β -ol; un triterpeno ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno; un cetosterol ergosta-7,22-dien-3,5-diol-6-ona y tres epoxiesteroides 5,6-epoxi-ergosta-8,22-dien-3 β ,7-diol; 5,6-epoxi-ergosta-8(14),22-dien-3 β ,7-diol y ergosta-5,8-epidioxi-6,22-dien-3 β ol.

De los resultados encontrados en cuanto al valor nutricional y a la determinación de la presencia de ácidos grasos insaturados como el ácido linoléico, ácido palmítico que son considerados esenciales aunado a compuestos triterpenoidales con posible actividad biológica, se puede concluir que el estípite de Shiitake proporcionaría beneficios nutraceúticos al ser empleado como suplemento alimenticio.

3.5 Bibliografía

Benavides, O. Estudio químico de la fracción insaponificable del hongo macromiceto *Lentinula edodes*. Bogotá. 2004.

Benavides, O. Estudio químico de la fracción insaponificable del hongo macromiceto *Lentinula edodes* (shiitake). Bogotá. 2004.

Bisen, P. S.; Baghel, R. K.; Sanodiya, B. S.; Thakur, G. S.; Prasad, G. B. K. S. *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities. *Current Medicinal Chemistry*. 2010. 17: 2419-2430.

Brizuela, M. A.; García, L.; Pérez, L.; Mansur, M. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología*. 1998. 15: 69-74.

Coy, E.; Nieto, I. J. Sterol composition of the macromycete. *Chemistry of Natural Compounds*. 2009. 45: (2). 193-196.

Cucaita, E. Estudio químico comparativo de metabolitos secundarios de los hongos comestibles *Laccaria laccata* y *Lentinula edodes* y determinación de su variación respecto al estadio del hongo. Bogotá. 2007.

Chegwin, C. Estudio de la influencia del sustrato en la cantidad y clase de triterpenoides de *Pleurotus ostreatus* así como en el contenido de estatinas si dicho hongo las presenta. Bogotá. 2007.

Higueta, E. A.; Rugeles, M. T.; Montoya, C. J. Actividad inmunomoduladora y anti-VIH de las estatinas. *Infectio*. 2011. 15: (2). 108-117.

Jaramillo, M. Determinación estructural y antimicrobiana de los intra y exo metabolitos secundarios triterpenoidales en *Ganoderma lucidum* obtenido en cultivo sumergido. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá. 2009.

Kim, D. S.; Baek, N. I.; Oh, S. R.; Jung, Y. K.; Lee, S. I.; J., K. H.; Lee, H. K. Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassignment of NRM data. *Archives of Pharmacal Research*. 1997. 20: (3). 201-205.

Kitzberger, C.; Smânia, A.; Curi, R.; Salvador, S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*. 2007. 80: 631-638.

Longvah, T.; Dosthale, Y. G. Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food Chem*. 1998. 63: 331-334.

Martínez-Carrera, D.; Sobal, M.; Morales, P.; Martínez, W.; Martínez, M.; Mayett, Y. Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales, y su contribución a la alimentación mexicana: el Shiitake. 2004. México.

Mora, M. A. Determinación estructural de los metabolitos secundarios triterpenoidales en búsqueda de antimicrobianos de un hongo silvestre *Aphylophoral* Colombiano. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá. 2010.

Nieto, I. J.; Cucaita, E. Ácidos grasos, ésteres y esteroides del cuerpo fructífero del hongo *Laccaria laccata* Revista Colombiana de Química. 2007. 36: (3). 227-284.

Nieto, I. J.; Chegwin, C. Triterpenoids and fatty acids identified in the edible mushrooms *Pleurotus sajor-cajú*. *Journal of the Chilean chemical society*. 2008. 53: (2). 1515-1517.

Ohnuma, H.; Amemiya, K.; Kakuda, R.; Yaoita, Y.; Machida, K.; Kikuchi, M. Sterol constituents from two edible mushrooms, *Lentinula edodes* and *Tricholoma matsutake*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2000. 48: (5). 749-751.

Phillips, K.; Ruggio, D.; Horst, R.; Minor, B.; Simon, R.; Feeney, M.; Byrdwell, W.; Haytowitz, D. Vitamin D sterol composition of 10 types of mushrooms from retail suppliers in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011. 59: 7841-7853.

Ravi Subbiah, M. T.; Abplanalp, W. Ergosterol (major sterol of baker's and brewer's yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and the potential role of its oxidation products. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*. 2003. 73: (1). 19-23.

Rivera, A.; Benavides, O.; Rios-Motta, J. (22E)-ergosta-6,22dien-3 β ,5 α ,8 α -triol: A new polyhydroxysterol isolated from *Lentinula edodes* (Shiitake). *Natural Product Research*. 2009. 23: (3). 293-300.

Rivera, A.; Laverde, C.; Rios-Motta, J.; Nieto, I. J.; Osorio, H. J. Dehidroergosterol: un artefacto generado durante el proceso de extracción de esteroides en el hongo *Pleurotus sajor-cajú*. *Revista Colombiana de Química*. 2005. 34: (2). 117-125.

Rivera, A.; Nieto, I.; Valencia, M. Composición y cuantificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción esteróica de once hongos Colombianos. *Revista Colombiana de Química*. 2002. 31: (2). 95-102.

Teichmanna, A.; Duttab, P. C.; Staffasc, A.; Jägerstad, M. Sterol and vitamin D2 concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effects of UV irradiation. *LWT-Food and Technology*. 2007. 40: (5). 815-822.

Valencia, M.; Nieto, I. J. Esteroles, ácidos grasos e hidrocarburos de los cuerpos fructíferos de *Ganoderma australe*. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. 2002. 47: (4). 511-516.

Weete, J. D. Sterols of the fungi: distribution and biosynthesis. *Phytochemistry*. 1973. 12: 1843-1864.

Yahoita, Y.; Amemiya, K.; Ohnuma, H.; Furumura, K.; Masaki, A.; Matsuki, T.; Kikuchi, M. Sterol constituents from five edible mushrooms. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1998. 46: (6). 944-950.

Yahoita, Y.; Endo, M.; Tani, Y.; Machida, K.; Amemiya, K.; Furumura, K.; Kikuchi, M. Sterol constituents from seven mushrooms. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1999. 47: (6). 847-851.

Yokokawa, H.; Mitsuhashi, T. The sterol composition of mushrooms. *Phytochemistry*. 1981. 20: (6). 1349-1351.

Yue, J.-M.; Chen, S.-M.; Lin, Z.-W.; Sun, H.-D. Sterols from the fungus *Lactarium volemus*. *Phytochemistry*. 2001. 56: 801-806.

Zhenga, C. J.; Yooa, J.-S.; Leeb, T.-G.; Choc, H.-Y.; Kimd, Y.-H.; Kima, W.-G. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Letters*. 2005. 579: (23). 5157-5162.

Zhou, Z.-Y.; Tan, J.-W.; Liu, J.-K. Two new polyols and a new phenylpropanoid glycoside from the basidiomycete *Lactarius deliciosus*. *Fitoterapia*. 2011. 82: 1309-1312.

Capitulo 4. Actividad antimicrobiana del estípite de Shiitake

4.1 Introducción

Desde el descubrimiento y la explotación de agentes antibióticos en el siglo XX, su toxicidad selectiva ha permitido su uso amplio y eficaz para combatir infecciones. Sin embargo la aparición de patógenos resistencia a múltiples fármacos, representa un desafío mundial para la medicina humana y animal. Actualmente es reconocida la necesidad que existe de encontrar nuevos antibióticos para reducir al mínimo la amenaza de la resistencia a los antimicrobianos (Hearst, et al. 2009).

Basados en este enfoque, los basidiomicetos han sido en los últimos años objeto de atención como potencial fuente de nuevas clases de antibióticos. De hecho, aún antes del auge de búsqueda de nuevos antibióticos, varios compuestos que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos ya se habían obtenido de estos hongos, tal es el caso de la pleuromutilina, diterpeno, aislado de *Pleurotus mutilis* y *Pl. passeckerianus*, el cual es empleado para tratamiento de infecciones por micoplasma en animales y se convierte en el primer antibiótico de uso comercial a partir de basidiomicetos (Rosa, et al. 2003).

Formando parte de los basidiomicetos se encuentra el Shiitake (*Lentinula edodes*), hongo comestible cuyo estudio ha tomado gran interés no solo por su valor nutricional sino también por su valor medicinal, ya que se reporta que este hongo presenta actividad antitumoral, antiviral, hipocolesterolemica, antioxidante y antibacteriana. Esta última actividad, presentada tanto por los extractos del micelio como de los cuerpos fructíferos, ha sido ya comprobado frente a una gran variedad de microorganismos (Bisen, et al. 2010, Rao, et al. 2009).

En el presente trabajo se evaluó la actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas y Gram positivas de los extractos clorofórmicos del estípite de Shiitake con la finalidad de explorar la posibilidad de utilizar esta parte del hongo, actualmente desechada, como posible fuente de compuestos antibacterianos.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Material fúngico

El Shiitake, fue proporcionado por la empresa Fungitá. El estípite fresco, se cortó en láminas delgadas, se secó a una temperatura de 35°C por 36 horas, para posteriormente ser sometido a proceso de pulverización.

4.2.2 Compuestos utilizados en la actividad antimicrobiana

Los ensayos de la actividad se realizaron con el extracto clorofórmico crudo del estípite de Shiitake, constituido por ácido hexadecanoico, ácido linoléico, ergosta-2,5,7,9(11),22-

pentaeno; ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol; ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol; ergosta-7,22-dien-3 β -ol; ergosta-7-en-3 β -ol, así como con los compuestos puros obtenidos de la columna preparativa (ácido linoléico; ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol; ergosta-7,22-dien-3 β -ol; ergosta-7-en-3 β -ol). Igualmente, se evaluó la actividad con la fracción enriquecida en compuestos triterpenoides (Ergosta-7,22-dien-3,5-diol-6-ona; 22E,24R-5 α -6 α -epoxiergosta-8,22-dien-3 β ,7 α -diol; 22E-ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,7 α ,8 α -triol; 22E,24R-5 α -6 α -epoxiergosta-8,(14)22-dien-3 β ,7 α -diol).

4.2.3 Microorganismos utilizados

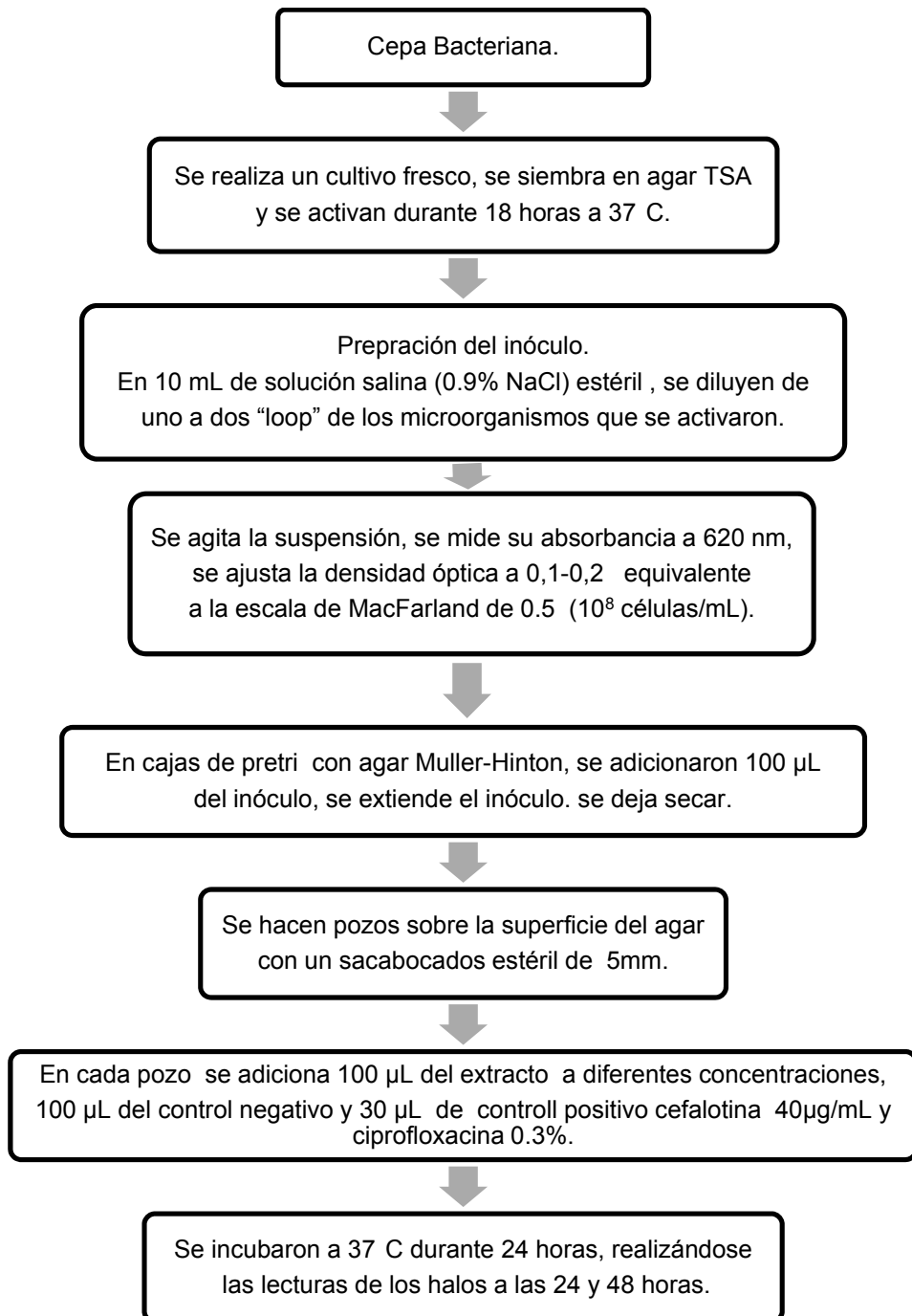
Los microorganismos de ensayo seleccionados fueron tres especies de bacterias Gram negativas: *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), y una especie de bacteria Gram positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29923), que son las que comúnmente atacan a los pollos de engorde. Igualmente, se empleó la bacteria benéfica Gram-positivas: *Bifidobacterium bifidus*, con el fin de determinar si el estípite es activo o no frente a estas bacterias de la microflora intestinal de las aves de corral.

4.2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para evaluar la sensibilidad de estos microorganismos a los triterpenoides, se empleó el método de difusión en agar en pozo, utilizando agar Mueller–Hinton. Esta técnica está fundamentada en el conocido método de Kirby-Bauer (Diagrama 4-1) y se basa en la formación de un halo de inhibición de crecimiento de los microorganismos cuando ellos son efectivos contra el microorganismo probado. El tamaño de la zona de inhibición indica la actividad de la sustancia evaluada.

4.3 Resultados y discusión

Las zonas de inhibición fueron medidas y el grado de actividad determinado mediante la escala normalmente empleada (Lee, et al. 2004), que catalogan la actividad según el diámetro de la zona de inhibición en respuesta muy fuerte para un halo mayor de 30mm, respuesta fuerte para 21-29 mm, respuesta moderada entre 16-20mm, respuesta leve entre 10-15mm y respuesta pequeña menor de 10mm.

Diagrama 4.1: Método de difusión en agar

4.3.1 Actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas

Los datos obtenidos en el extracto crudo (Tabla 4-1) indican que a concentraciones menores de 8 mg/mL no hay inhibición probablemente debido a que las concentraciones de los posibles compuestos activos son muy bajas a esos niveles y no les permite la expresión de su actividad, la cual se hace evidente en el rango de 8 a 20 mg/mL, notándose además que la misma es concentración dependiente.

Tabla 4-1: Actividad antimicrobiana del extracto clorofórmico del estípote de Shiitake

Extracto crudo del estípote de Shiitake				
Concentración	Bacterias Gram negativas			Bacterias Gram positivas
	<i>Ps. Aeruginosa</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
0,5 mg/mL	N. I	N. I	N. C	N. I
1 mg/mL	N. I	N. I	N. C	N. I
8 mg/mL	10 mm	8 mm	N. C	15 mm
10 mg/mL	12 mm	10 mm	N. C	16 mm
12 mg/mL	16 mm	12 mm	N. C	16 mm
15 mg/mL	18 mm	12 mm	N. C	20 mm
20 mg/mL	20 mm	14 mm	N. C	22 mm
*Cefalotina		40 mm	35 mm	38 mm
*Ciprofloxacina	45 mm			

Halos medidos en milímetros (mm). * Control positivo. N.I no inhibe. N.C no creció

Los resultados obtenidos indican la presencia de compuestos con actividad antibacteriana en el extracto crudo contra bacterias de tipo Gram negativas, con una respuesta leve para *S. enteritidis*, *Ps. aeruginosa* y para bacterias Gram positivas con una respuesta moderada para *S. aureus*. Este resultado coincide con lo reportado tanto por (Hirasawa, et al. 1999) y (Hatvani 2001), quienes encontraron respectivamente que los extractos clorofórmicos del Shiitake presentan una mejor actividad frente a bacterias de tipo Gram positivas y con una mejor actividad frente a *S. aureus*. Esta diferencia en la actividad probablemente está relacionada con la diferencia que existe entre la pared celular de los dos grupos de bacterias. La pared celular de las bacterias Gram negativas está compuesta por dos capas, una primera capa muy fina de peptidoglucano y una capa externa adicional denominada membrana externa que les permite tener más resistencia a algunas sustancias. Las bacterias Gram positivas tienen solo una capa gruesa de peptidoglucano como pared celular y esto hace que la membrana celular sea más permeable que las Gram negativas permitiendo el paso de los compuestos a su interior (Stainer, et al. 1992).

Así mismo, el extracto clorofórmico del estípite no exhibe actividad para *E. coli*, resultado concordante con las investigaciones realizadas por (Hatvani 2001, Kitzberger, et al. 2007), quienes reportan no actividad frente a esta bacteria. El resultado anterior junto con el obtenido en la presente investigación contrasta con el de (Hearst, et al. 2009, Hirasawa, et al. 1999), que reportan actividad de los extractos del Shiitake frente *E.coli*. Cabe aquí anotar que en el ensayo con el extracto clorofórmico del estípite no hubo crecimiento de *E.coli*, lo que permitiría inferir, en primera instancia, que las concentraciones utilizadas podrían ser muy altas para este microorganismo ejerciendo acción bactericida a estos niveles de concentración.

En cuanto *Ps. aeruginosa*, solo hay un estudio realizado en extractos de Shiitake (Hearst, et al. 2009) que reporta actividad contra esta bacteria y que coincide con los datos de actividad obtenidos en la presente investigación, pero siendo la concentración en que exhibe la actividad (1mg/ μ L) mayor a la del estípite (0.02mg/ μ L), lo que indica una mayor actividad contra *Ps. aeruginosa* de los compuestos presentes en el extracto crudo. En lo referente a la actividad frente a *S. enteritidis* hasta la fecha no hay información en literatura convirtiendo este resultado en el primer reporte de la actividad de extractos de Shiitake para este microorganismo. Estos resultados son importantes ya que ponen de manifiesto que los extractos del estípite de Shiitake son una buena fuente natural de compuestos antibacterianos.

Con base en la respuesta presentada por el extracto clorofórmico y con miras a la posible determinación del(los) compuesto(s) responsable(s) de la acción antibacteriana se realizó el ensayo con los compuestos puros obtenidos de la columna preparativa, así como una fracción enriquecida en compuestos triterpenoides.

Los resultados (Tabla 4-2) ponen de manifiesto que en el caso del ácido linoléico (18:2) este compuesto presenta actividad leve contra *Ps. aeruginosa* y moderada contra *S. aureus*, lo cual indica que la acción presentada por el extracto podría ser debida en parte a este ácido graso conjugado confirmando que los ácidos grasos de cadena mediana y larga son más activos frente a bacterias Gram-positivas que a Gram-negativas y que específicamente el ácido linoléico presenta actividad comprobada frente a las primeras (Desbois, et al. 2010, Zhenga, et al. 2005). Si bien no hay estudios sobre actividad antibacterial de ácidos grasos aislados de los hongos, investigaciones realizadas en plantas y animales, como la reportada por (Pérez Guitierrez 2005) en *Tubifex tubifex*, indican que los ácidos grasos (ácido linoléico) presentan actividad antibacteriana para *Staphylococcus aureus* (15mm), *Escherichia coli* (12mm), a concentraciones de 1 a 4.5 mg/mL, resultado que para el *S. aureus* es similar al obtenido en esta investigación.

Con relación a los compuestos Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol, Ergosta-7-en-3 β -ol, Ergosta-7,22-dien-3 β -ol, mostraron actividad contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Todos los compuestos mostraron actividad para *S. aureus*, la respuesta fue de leve a moderada, presentado la mejor actividad contra este microorganismo el compuesto Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol con halos de inhibición entre 10mm-20mm.

La actividad de los compuestos contra *S. entritidis*, se registra también entre leve y moderada pero los compuestos que presentaron mejor actividad para dicha bacteria son el Ergosta-7-en-3 β -ol y el Ergosta-7,22-dien-3 β -ol con halos de inhibición muy similares (12-20mm), a las concentraciones ensayadas. Igualmente los compuestos exhibieron actividad frente a *Ps. aeruginosa*, y *E. coli*, con respuesta de moderada a fuerte y de pequeña a moderada respectivamente, siendo el Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol y el Ergosta-7-en-3 β -ol los más activos para *Ps. aeruginosa*, y el Ergosta-7-en-3 β -ol para *E. coli*.

Tabla 4-2: Actividad antimicrobiana de los compuestos aislados del extracto clorofórmico del estípite de Shiitake

Compuesto	Microorganismos ensayados	Concentraciones						Control positivo	
		0,1 mg/mL	0,25 mg/mL	0,5 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL	Ciprofloxacina	Cefalotina
Ácido Linoléico	<i>S. aureus</i>	N. I	N. I	15 mm	16mm	16mm	20mm		38mm
	<i>S. enteritidis</i>	N. C	N. C	N. C	N. C	N. creció	N. C		40mm
	<i>Ps. Aeruginosa</i>	7mm	8mm	10mm	12mm	16mm	18mm	45mm	
	<i>E. coli</i>	N. C	N. C	N. C	N. C	N. creció	N. C		35mm
Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol	<i>S. aureus</i>	10mm	10mm	12mm	18mm	20mm	20mm		38mm
	<i>S. enteritidis</i>	N. C	N. C	N. C	N. C	N. C	N. C		40mm
	<i>Ps. Aeruginosa</i>	16mm	18mm	18mm	20mm	25mm	25mm	45mm	
	<i>E. coli</i>	6mm	10mm	14mm	16mm	18mm	22mm		35mm
Ergosta-7-en-3 β -ol	<i>S. aureus</i>	---	---	10mm	16mm	---	---		38mm
	<i>S. enteritidis</i>	---	---	12mm	20mm	---	---		40mm
	<i>Ps. Aeruginosa</i>	---	---	18mm	20mm	---	---	45mm	
	<i>E. coli</i>	---	---	15mm	18mm	---	---		35mm
Ergosta-7,22-dien-3 β -ol	<i>S. aureus</i>	---	---	10mm	12mm	---	---		38mm
	<i>S. enteritidis</i>	---	---	15mm	20mm	---	---		40mm
	<i>Ps. Aeruginosa</i>	---	---	12mm	18mm	---	---	45mm	
	<i>E. coli</i>	---	---	6mm	8mm	---	---		35mm
Ergosta-7,22-dien-3,5-diol-6-ona	<i>S. aureus</i>	8mm	10mm	11mm	12mm	14mm	15mm		38mm
5,6-epoxi-ergosta-8,22-dien-3 β ,7-diol	<i>S. enteritidis</i>	N. C	N. C	N. C	N. C	N. C	N. C		40mm
Ergosta-6,22-dien-3 β ,5,8-triol	<i>Ps. Aeruginosa</i>	6mm	6mm	8mm	8mm	10mm	10mm	45mm	
5,6-epoxi-ergosta-8,(14)22-dien-3 β ,7-diol	<i>E. coli</i>	N. C	N. C	N. C	N. C	N. C	N. C		35mm

----- No fue evaluado. N.C no creció

Los resultados de la actividad antibacteriana del estípite del Shiitake son concordantes con lo hallado en trabajos previos realizados por el grupo de Química de Hongos Macromicetos (Jaramillo 2009, Mora 2010), en los cuales se concluye que los compuestos de tipo triterpenoidal presentan efecto antibacteriano. Cabe anotar aquí, que en la literatura dentro de los muy pocos estudios que hacen referencia a la actividad antibacteriana de extractos conteniendo esteroides, sólo la investigación realizada por (Smania, et al. 1999) a los compuestos purificados, aislados del *Ganoderma applanatum*, indica que el 5 α -ergosta-7en-3 β -ol y el 5 α -ergosta-7,22-dien-3 β -ol mostraron actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas como *S. aureus* y Gram negativas como *E. coli*, y *Ps aeruginosa*, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.003 a 2.0 mg/mL y de 1.0 a 4.0 mg/mL respectivamente, resultados que guardan relación con los aquí presentados.

Con base en lo anterior y para confirmar o rechazar la hipótesis anterior se realizaron pruebas de actividad para *S. enteritidis* y *E. coli* con menores concentraciones obteniéndose como resultado el crecimiento de estas bacterias, lo que permite concluir que a concentraciones de 0.25 mg/mL a 4mg/mL, estos compuestos tienen probablemente un efecto bactericida (Tabla 4-3).

Tabla 4-3: Actividad antimicrobiana a menor concentración

Compuestos	Microorganismos	Concentraciones		
		0.025 mg/mL	0.050mg/mL	0.10 mg/mL
Acido linoléico	<i>S. enteritidis</i>	6mm	6mm	8mm
	<i>E. coli</i>	6mm	6mm	7mm
Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol	<i>S. enteritidis</i>	10mm	10mm	12mm
	<i>E. coli</i>	6mm	7mm	7mm
Ergosta-7,22-dien-3,5-diol-6-ona 22, 24-5,6-epoxi ergosta-8,22-dien-3 β ,7-diol 22E-ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol 22, 24-5,6-epoxi ergosta-8,(14)22-dien-3 β ,7-diol	<i>S. enteritidis</i>	7mm	8mm	8mm
	<i>E. coli</i>	7mm	7mm	7mm

De forma general, al comparar los resultados de la actividad antimicrobiana del extracto y de los compuestos puros del estípite del Shiitake con lo reportado en literatura para hongos Basidiomicetos (Tabla 4.4), se ve claramente que lo presentado por el hongo en estudio es concordante, en cuanto a extractos crudos se refiere, a lo exhibido frente a *S. aureus* y *Ps. Aeruginosa*, por *Ganoderma lucidum*, hongo reconocido por su propiedades antimicrobianas.

Es de anotar que en el caso de la actividad antibacteriana reportada para los extractos acuosos de *Lentinula edodes* ésta es mayor y debe ser debida a compuestos polares y no a los triterpenoides. En relación a la fracción constituida por polihidroxiesteroides, epoxiesteroides y cetoesteroides, ésta presentó también inhibición frente a los microorganismos ensayados, pero con menor inhibición para *S. aureus* y *Ps.aureginosa*,

comparada con los compuestos anteriores, disminución debida probablemente a su menor concentración en el extracto crudo.

Tabla 4-4: Actividades antibacterianas reportadas para hongos Basidiomicetos

Hongos	Extracto	Concentración	Bacterias Gram negativas			Bacterias Gram positivas	Referencia
			<i>Ps. Aeruginosa</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
<i>Lentinula edodes</i>	Acuoso	1 mg/μL	9mm	N. E	9mm	12mm	(Hearst, et al. 2009)
<i>Lentinula edodes</i>	Acuoso	-----	N. I	N. E	N. Inhibe	25mm	(De Carvalho, et al. 2007)
<i>Lentinula boryana</i>	Acuoso	-----	N. I	N. E	N. Inhibe	15mm	
<i>Lepista nuda</i>	Metanol	25 mg/mL	14mm	N. E	14mm	16mm	(Dulgera, et al. 2002)
<i>Lycoperdon pusillum</i>	Metanol	20 mg/mL	N. I	N. E	20mm	14mm	(Jonathan, et al. 2003)
<i>Lycoperdon giganteum</i>	Metanol	20 mg/mL	10mm	N. E	16mm	11mm	
<i>Irpex lacteus</i>	Acetato de etilo	1 mg/mL	N. I	N. E	12mm	Menor a 12mm	(Rosa, et al. 2003)
<i>Nothopanus hygrophanus</i>	Acetato de etilo	1 mg/mL	N. I	N. E	N. I	Menor a 12mm	
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Acetato de etilo	1 mg/mL	N. I	N. E	N. I	Menor a 12mm	
<i>Clitocybe geotropa</i>	Etanol	5 mg/mL	N. E	N. E	10 mm	13mm	(Kalyoncu, et al. 2008)
<i>Meripilus giganteus</i>	Cloroformo	8 mg/mL	N. E	N. E	12mm	N. I	
<i>Sparassis crispa</i>	Etanol	15 mg/mL	N. E	N. E	8mm	11mm	
<i>Armillaria mellea</i>	Etanol	12 mg/mL	N. E	N. E	10mm	10mm	
	Cloroformo	12 mg/mL	N. E	N. E	N. I	N. I	
<i>Fomitopsis sp.</i>	Metanol	2 a 4mg/mL	N. I	N. I	N. I	9mm	(Mora 2010)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Diclorometano micelio	20mg/mL	25mm	20mm	N. I	25mm	(Jaramillo 2009)
	Diclorometano Medio agotado	20mg/mL	20mm	20mm	N. I	20mm	
<i>Morchella conica</i>	Etanol	20mg/mL	N. I	4mm	N. I	13mm	(Turkoglu, et al. 2006)
<i>Ramaria flava</i>	Etanol	20mg/mL	N. I	4 mm	N. I	8mm	(Gezer, et al. 2006)
<i>Agaricus bisporus</i>	Metanol	-----	N. I	N. I	N. I	N. Inhibe	(Ozturk, et al. 2011)
<i>Agaricus bitorquis</i>	Metanol	-----	N. I	N. I	N. I	12mm	
<i>Agaricus essettei</i>	Metanol	-----	N. I	N. I	N. I	11mm	
<i>Russula delica</i>	Etanol	-----	9mm	7mm	7mm	10mm	(Yaltirak, et al. 2009)

Hongos	Extracto	Concentración	Bacterias Gram negativas			Bacterias Gram positivas	Referencia
			<i>Ps. Aeruginosa</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
<i>Lycoperdon perlatum</i>	Metanol	10 mg/mL	10mm	N. E	19mm	18mm	(Ramesh, et al. 2010)
<i>Cantharellus cibarius</i>	Metanol	10 mg/mL	13mm	N. E	15mm	12mm	
<i>Clavaria vermiculris</i>	Metanol	10 mg/mL	19mm	N. E	18mm	16mm	
<i>Ramaria Formosa</i>	Metanol	10 mg/mL	15mm	N. E	13 mm	16mm	
<i>Marasmius oreades</i>	Metanol	10 mg/mL	15mm	N. E	19mm	19mm	
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Metanol	10 mg/mL	19mm	N. E	12mm	18mm	
<i>Trametes gibbosa</i>	Metanol	25 a 50µg/mL	7mm	N. E	5mm	10mm	(Johnsy, et al. 2011)
	Acuoso	25 a 50µg/mL	6mm	N. E	3mm	4mm	

----- No reporta concentración. N.E no evaluado. N.I no inhibe

De la comparación entre la actividad antibacteriana del extracto y los esteroides puros se observa que estos últimos son más activos que el extracto. Al realizar un análisis preliminar de la relación estructura - actividad, tomando la bioacción frente a *S. aureus* (Tabla 4-5), los valores de halo de inhibición permiten deducir que a medida que aumenta el número de insaturaciones en la molécula aumenta la actividad, convirtiendo esto en un posible requerimiento estructural. El hecho de que el Ergosta-7,22-dien-3 β -ol y el Ergosta-7-en-3 β -ol presenten idéntica acción parece indicar que la insaturación en C-22 no sería indispensable para que la acción antibacteriana se presente.

Tabla 4-5: Actividad antibacteriana de compuestos puros frente a *S. aureus*

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	
	0.5 mg/mL	1.0mg/mL
Ergosta-7-en-3 β -ol	10mm	16mm
Ergosta-7,22-dien-3 β -ol	10mm	12mm
Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol	12mm	18mm

Así mismo, siendo la diferencia estructural entre los esteroides antes nombrados y el Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol la presencia de un doble enlace en C-5 y dado que la concentración que presenta un halo de inhibición de la misma magnitud es cinco veces menor se puede inferir que es esta característica estructural la responsable de la mayor actividad exhibida por el compuesto. Esto mismo se aplica para *Ps. Aeruginosa*.

Si bien se ha reportado que la actividad requiere de la presencia de un hidroxilo en el Carbono 3 (Mutai, et al. 2009) y aunque el extracto crudo contiene dentro de sus componentes un triterpeno (Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno), su pequeña proporción impidió la separación y obtención del compuesto puro y por tanto la determinación de su actividad antibacteriana, impidiendo a la vez la confirmación de este requerimiento estructural. Sin embargo, los resultados obtenidos dentro del grupo de investigación sobre la actividad de los triterpenos ergostánicos, permitieron determinar que dichos compuestos no contribuyen a la acción antibacteriana (Mora 2010).

4.3.2 Actividad antimicrobiana del extracto crudo del estípite contra bacterias benéficas

Siendo el objetivo de esta investigación el de evaluar la factibilidad de empleo del estípite de Shiitake como ingrediente nutracéutico en la preparación de alimento aviar y conociendo ya su actividad antibacteriana sobre las bacterias que usualmente atacan a los pollos de engorde se hace necesario determinar que los compuestos presentes en el extracto crudo del estípite no sean activos contra bacterias benéficas, *Lactobacilos* y *Bifidobacterias*, ya que sería una respuesta indeseable. La microflora del tracto intestinal juega un papel importante en procesos tanto de digestión y absorción de nutrientes como inmunológicos (Guarner, et al. 2003). Las especies del género *Bifidobacterium* forman parte de esta microflora normal y su importancia reside en proporcionar

resistencia a infecciones de tipo gastrointestinal. La presencia de las distintas especies varía con la especie de animal, con el individuo, la edad y alimentación (Iñiguez-Palomares, et al. 2006).

Para tal fin se realizó la determinación de la actividad del extracto crudo contra *bifidobacterias* en agar MRS, de las cuales se seleccionó la bacteria *Bifidobacterium bifidus*, dado que estudios realizados sobre ella arrojan como resultado que produce glicosidasas que degradan los carbohidratos asociados a las mucinas intestinales, lo que es benéfico al inhibir la adhesión de microorganismos patógenos gracias a la destrucción de los receptores (Ruseler-Van Embden, et al. 1995).

El bioensayo se efectuó con las mismas concentraciones empleadas en los ensayos de actividad contra bacterias patógenas (8, 10, 15 y 20 mg/mL) y se incubaron por 48 horas en condiciones anaeróbicas (Tabla 4-6).

Tabla 4-6: Actividad antimicrobiana del extracto crudo del estípite contra bacterias benéficas

Estípite de Shiitake	Microorganismos	Concentraciones			
		8 mg/mL	10 mg/mL	15 mg/mL	20 mg/mL
Extracto crudo Clorofórmico	<i>Bifidobacterium bifidus</i>	N. I	N. I	N. I	N. I

N.I no inhibe.

Este resultado es muy importante debido a la necesidad de introducir en los alimentos suplementos o aditivos que ayuden a mantener la microflora intestinal para un adecuado funcionamiento del tracto digestivo (Aida, et al. 2009).

4.4 Conclusiones

El estípite del hongo comestible Shiitake contiene compuestos de carácter triterpenoidal con actividad antibacteriana frente a *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*.

Todos los compuestos triterpenoidales aislados del estípite del Shiitake exhiben actividad para *S. aureus* con respuesta leve a moderada.

Los esteroides Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol, Ergosta-7-en-3 β -ol, Ergosta-7,22-dien-3 β -ol, mostraron actividad contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

El Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol presenta la mejor actividad contra *S. aureus*.

Todos los compuestos exhiben actividad contra *S. enteritidis*, con respuesta entre leve y moderada, siendo los más activos el Ergosta-7-en-3 β -ol y el Ergosta-7,22-dien-3 β -ol.

La respuesta de los compuestos frente a *Ps. aeruginosa*, y *E. coli* fue de moderada a fuerte y de pequeña a moderada respectivamente.

Los compuestos puros, mostraron mayor efecto contra *Ps. aeruginosa*.

La fracción constituida por esteroides con un mayor grado de oxigenación presenta una actividad antimicrobiana mucho menor que la exhibida por los esteroides simples.

Parece ser, en primera instancia, que la presencia de un doble enlace en C-5 aumenta la acción antibacteriana de los esteroides y que la insaturación en el C-22 no es requerimiento estructural para dicha acción.

Al igual que los compuestos de carácter triterpenoidal el ácido linoléico presenta actividad antibacteriana frente a las bacterias antes mencionadas, siendo así las dos clases de compuestos los que le proporcionan al estípite del Shiitake dicha actividad.

Los compuestos antibacterianos del estípite del Shiitake no presentan actividad frente a la bacteria benéfica *Bifidobacterium bifidus*.

La unión de la actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas y benéficas convierte al estípite del Shiitake en un ingrediente con excelente potencial para ser empleado en formulaciones de alimentos para aves.

4.5 Bibliografía

Aida, F. M. N. A.; Shuhaimi, M.; Yazid, M.; Maaruf, A. G. Mushrooms as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2009. 20: 567-565

Akindahunsi, A. A.; Oyetayo, F. L. Nutrient and antinutrient distribution of edible mushroom, *Pleurotus tuber-regium* (fries) singer. *LWT- Food Science and Technology*. 2006. 39: (5). 548-553

Avila, M. Estudio de los compuestos polifenólicos con énfasis en flavonoides del hongo *Lentinula edodes* y determinación de la actividad antioxidante. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá. 2010

Benavides, O. Estudio químico de la fracción insaponificable del hongo macromiceto *Lentinula edodes*. Bogotá. 2004

Benavides, O. Estudio químico de la fracción insaponificable del hongo macromiceto *Lentinula edodes* (shiitake). Bogotá. 2004

Betancourt, L. L. Evaluación de aceites esenciales de orégano en la dieta de pollo de engorde. Bogotá. 2012

Bisen, P. S.; Baghel, R. K.; Sanodiya, B. S.; Thakur, G. S.; Prasad, G. B. K. S. *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities. *Current Medicinal Chemistry*. 2010. 17: 2419-2430

Brizuela, M. A.; García, L.; Pérez, L.; Mansur, M. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología*. 1998. 15: 69-74

Buwjoom, T.; Tangataweewipat, S.; Thongwittaya, N.; Yamauchi, K. Chemical composition, nutrient digestibility and metabolizable energy of shiitake mushroom stalk meal. *J Poultry Sci*. 2004. 41: 322-328

Buwjoom, T.; Yamauchi, K. Effects of shiitake mushroom stalk meal on growth performance, carcass yield and blood composition in broilers. *Journal of Poultry Science*. 2005. 42: 283-290

Calderón, A.; García, F.; Martínez, G. Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones d Colombia. *Rev. MVZ Córdoba*. 2006. 11: (1). 725-737

Carvajal, G. Valor nutricional de la carne de: res, cerdo y pollo. 2001. Corporación de Fomento Ganadero.
<http://www.corfoga.org/images/public/documentos/pdf/Corfoga2001.pdf>

Coy, E.; Nieto, I. J. Sterol composition of the macromycte. *Chemistry of Natural Compounds*. 2009. 45: (2). 193-196

Cuca, M.; De La Rosa, G.; Pró, A.; Baeza, J. Disponibilidad del fósforo del la pasta de soya y sorgo-glúten de maíz, adicionadas con fitasa en pollos de engorda en iniciación. *Técnica Pecuaria en México*. 2003. 41: (3). 295-306

Cucaita, E. Estudio químico comparativo de metabolitos secundarios de los hongos comestibles *Laccaria laccatta* y *Lentinula edodes* y determinación de su variación respecto al estadio del hongo
Bogotá. 2007

Chandra, L.; Smith, B.; Clarke, S.; Marlow, D.; D'Offay, J.; Kuvibidila, S. Differential effects of shiitake- and white button mushroom-supplemented diets on hepatic steatosis in C57BL/6 mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2011. 49: 3074-3080

Chang, S. T. Mushrooms as Human Fodd. *Bio Science*. 1980. 30: (6). 399-401

Chang, S. T.; Hayes, W. A. *The biology and cultivation of edible mushrooms*. 1978. New York. Academic press

Chang, S. T.; Miles, P. G. *Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. 2004. Florida. CRC Press

- Chegwin, C. Estudio de la influencia del sustrato en la cantidad y clase de triterpenoides de *Pleurotus ostreatus* así como en el contenido de estatinas si dicho hongo las presenta. Bogotá. 2007
- Cheng, C.-W.; Chen, C.-K.; Chang, C.-J.; Chen, L.-Y. Effect of colour LEDs on mycelia growth of *Aspergillus ficuum* and phytase production in photo-fermentations. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2011. 106: (5). 81-86
- De Carvalho, M. P.; Van Der Sand, S. T.; Ribeiro Rosa, E. A.; Germani, J. C.; Kazue Ishikawa, N. Investigation of the antibacterial activity of Basidiomycetes *Lentinula boryana* and *Lentinula edodes*. *BIOCIÊNCIAS*. 2007. 15: (2). 173-179
- Desbois, A. P.; Smith, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2010. 85: 1629-1642
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 1956. 28: (3).
- Dulgera, B.; Cem Ergul, C.; Gucin, F. Antimicrobial activity of the macrofungus *Lepista nuda*. *Fitoterapia*. 2002. 73: 695-697
- Elmastasa, M.; Isildaka, O.; Turkekulb, I.; Temur, N. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007. 20: 337-345
- Gezer, K.; Duru, M.; Kivrak, I.; Turkoglu, A.; Mercan, N.; Turkoglu, H.; Gulcan, S. Free-radical scavenging capacity and antimicrobial activity of wild edible mushroom from Turkey *African Journal of Biomedical Research*. 2006. 5: (20). 1924-1928
- Guarner, F.; Malagelada, J. R. Gut flora in health and disease-review. *Lancet*. 2003. 361: 512-519
- Guzmán, G.; Mata, G.; Salmones, D.; Soto-Velazco, C.; Guzmán-Dávalos, L. El cultivo de los hongos comestibles. 1992. México. Instituto Politecnico Nacional
- Guzmán, G.; Mata, G.; Salomones, D.; Soto Velasco, L.; Guzman Dávalos, L. El cultivo de los hongos comestibles con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos agrícolas y residuos agroindustriales 1993. México. CECODES
- Hatvani, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinula edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001. 17: 71-74
- Hatvani, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001. 17: 71-74

Hearst, R.; Nelson, D.; McCollum, G.; Millar, B.; Maeda, Y.; Goldsmith, C.; Rooney, P.; Loughrey, A.; Rao, J. R.; Moore, J. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. 2009. 15: 5-7

Higuera, E. A.; Rugeles, M. T.; Montoya, C. J. Actividad inmunomoduladora y anti-VIH de las estatinas. *Infectio*. 2011. 15: (2). 108-117

Hirasawa, M.; Shouji, N.; Neta, T.; Fukushima, K.; Takada, K. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinula edodes* (Berk.) Sing.(Shiitake, an edible mushroom). *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1999. 11: 151-157

Iñiguez-Palomares, C. I.; Acedo-Félix, E. Mecanismos de adhesión al tracto intestinal y antagonismo de *Bifidobacterium*. *Salud Pública y Nutrición*. 2006. 7: (2).

Jaramillo, L.; Rodriguez, V. N. Cultivo de shiitake en subproductos de café. *CENICAFE*. 2001. 287: 1-4

Jaramillo, M. Determinación estructural y antimicrobiana de los intra y exo metabolitos secundarios triterpenoidales en *Ganoderma lucidum* obtenido en cultivo sumergido. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá. 2009

Johnsy, G.; Kaviyarasana, V. Antimicrobial and antioxidant properties of *Trametes gibbosa* (pers) Fr. *Journal of Pharmacy Research*. 2011. 4: (11). 3939-3942

Jonathan, S. G.; Fasidi, I. O. Antimicrobial activities of two Nigerian edible macro-fungi *Lycoperdon pusillum* (Bat. Ex) and *Lycoperdon giganteum* (Pers.). *African Journal of Biomedical Research*. 2003. (6). 85-90

Kalyoncu, F.; Oskay, M. Antimicrobial Activities of Four Wild Mushroom Species Collected from Turkey. . *Proceeding of the 6th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*. 2008. 31-35

Kim, D. S.; Baek, N. I.; Oh, S. R.; Jung, Y. K.; Lee, S. I.; J., K. H.; Lee, H. K. Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassessment of NRM data. *Archives of Pharmacal Research*. 1997. 20: (3). 201-205

Kitzberger, C.; Smânia, A.; Curi, R.; Salvador, S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*. 2007. 80: 631-638

Lee, H. K.; Lee, H. B.; Kim, C. S.; Ahn, Y. J. Anti-*Helicobacter pylori* activity of methanol extracts from Korean native plant species in Jelu island. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 2004. 47: (2). 91-96

- Lesson, S.; Summers, J. D.; Díaz, G. J. *Nutrición Aviar Comercial*. 2000. 356
- Lindequist, U.; Niedermeyer, T. J. H.; Jülich, W.-D. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM*. 2005. 2: (3). 285-299
- Liu, J.-K. N-containing compounds of macromicetes. *Chemical reviews*. 2004. 105: (7). 2724-2744.
- Longvah, T.; Dosthale, Y. G. Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food Chem*. 1998. 63: 331-334
- Llauradó, G.; Morris, H. J.; Albear, J. M.; Castán, L.; Bermúdez, R. C. Plantas y hongos comestibles en la modulación del sistema inmune. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2011. 30: (4). 511-527
- Manzi, P.; Pizzoferrato, L. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*. 2000. 68: (3). 315-318
- Martínez-Carrera, D.; Sobal, M.; Morales, P.; Martínez, W.; Martínez, M.; Mayett, Y. Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales, y su contribución a la alimentación mexicana: el Shiitake. 2004. México.
- Martínez-Carrera, D.; Soto, C.; Morales, P.; Guzmán, G. Cultivo de los hongos comestibles. *Ciencia*. 1998. 39: 217-221
- Mateos, G.; Martín, F.; Latorre, M.; Vicente, B.; Lázaro, R. Inclusion of oat hulls in diets for young pigs based on cooked maize or cooked rice. *Animal Science*. 2006. 82: 57-63
- Mattila, P.; Suonp, K.; Piironen, V. Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition*. 2000. 16: 694-696
- Miles, P. G.; Changa, S.-T. *Biología de las setas*. 1999. Santafé de Bogotá. Instituto Zeri para Latinoamérica
- Mizuno, T. Development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. *Food and Food Ingredient Japanese Journal*. 1996. 167: 69-87
- Mizuno, T. Shiitake, *lentinus edodes*: Functional properties for medicinal and food purposes. *Food Reviews International*. 1995. 11: (1). 109-128
- Mizuno, T.; Minato, K.; Kawakami, S.; Tatsuoka, S.; Denpo, Y.; Tsuchida, H. Contents of anti-tumor polysaccharides in certain mushrooms and their immunomodulating activities. *Food Science and Technology Research*. 2001. 71: (1). 31-34

Mora, M. A. Determinación estructural de los metabolitos secundarios triterpenoidales en búsqueda de antimicrobianos de un hongo silvestre *Aphylophora* Colombiano. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá. 2010

Mutai, C.; Bii, C.; Vagias, C.; Abatis, D.; Roussis, V. Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009. 123: 143-148

Nieto, I. J.; Cucaita, E. Ácidos grasos, ésteres y esteroides del cuerpo fructífero del hongo *Laccaria laccata* *Revista Colombiana de Química*. 2007. 36: (3). 227-284

Nieto, I. J.; Chegwin, C. Triterpenoids and fatty acids identified in the edible mushrooms *Pleurotus sajor-cajú*. *Journal of the Chilean chemical society*. 2008. 53: (2). 1515-1517.

Nitschke, J.; Modick, H.; Busch, E.; Rekowski, R.; Altenbach, H.-J.; Mölleken, H. A new colorimetric method to quantify B-1,3-1,6-glucans in comparison with total B-1,3-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*. 2011. 127: 791-796

Ohnuma, H.; Amemiya, K.; Kakuda, R.; Yaoita, Y.; Machida, K.; Kikuchi, M. Sterol constituents from two edible mushrooms, *Lentinula edodes* and *Tricholoma matsutake*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2000. 48: (5). 749-751

Ozturk, M.; Emin Duru, M.; Kivrak, S.; Mercan-Dogan, N.; Turkoglu, A.; Ozler, M. A. In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology*. 2011. 49: 1356-1360

Pereira, K. B.; Megumi, M. C.; Dantas, M. C. Antimicrobial activity and mineral composition of shiitake mushrooms cultivated on agricultural waste. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2011. 54: (5). 991-1002

Pérez Guitierrez, R. M. Actividad antimicrobiana de los ácidos grasos aislados de *Tubifex tubifex*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2005. 36: (1). 1-9

Petrova, A.; Popov, S.; Gjosheva, M.; Bankova, V. A new triterpenic alcohol from *Fomitopsis pinicola* 2007. 21: (5). 401-405

Phillips, K.; Ruggio, D.; Horst, R.; Minor, B.; Simon, R.; Feeney, M.; Byrdwell, W.; Haytowitz, D. Vitamin D sterol composition of 10 types of mushrooms from retail suppliers in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011. 59: 7841-7853

Polese, J.-M. *Miniguía setas*. 2005. Barcelona. KONEMANN

- Popova, M.; Trusheva, B.; Gyosheva, M.; Tsvetkova, I.; Bankova, V. Antibacterial triterpenes from the threatened wood-decay fungus *Fomitopsis rosea*. *Fitoterapia*. 2009. 80: (5). 263-266
- Pottgüter, R. Fibre in layer diets. *Lohmann Information*. 2008. 43: (2). 22-31
- Ramesh, C.; Pattar, M. G. Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. *Pharmacognosy Research*. 2010. 2: (2). 107-112
- Rao, J.; Millar, B.; Moore, J. Antimicrobial properties of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*). *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009. 33: 591-592
- Ravi Subbiah, M. T.; Abplanalp, W. Ergosterol (major sterol of baker's and brewer's yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and the potential role of its oxidation products. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*. 2003. 73: (1). 19-23
- Rivera, A.; Benavides, O. L.; Rios-Motta, J. (22E)-ergosta-6,22dien-3 β ,5a,8a-triol: A new polyhydroxysterol isolated from *Lentinula edodes* (Shiitake). *Natural Product Research*. 2009. 23: (3). 293-300
- Rivera, A.; Laverde, C.; Rios-Motta, J.; Nieto, I. J.; Osorio, H. J. Dehidroergosterol: un artefacto generado durante el proceso de extracción de esteroides en el hongo *Pleurotus sajor-caju*. *Revista Colombiana de Química*. 2005. 34: (2). 117-125
- Rivera, A.; Nieto, I.; Valencia, M. Composición y cuantificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción esteróide de once hongos Colombianos. *Revista Colombiana de Química*. 2002. 31: (2). 95-102
- Rop, O.; Mlcek, J.; Jurikova, T. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews*. 2009. 67: (11). 624-631
- Rosa, L.; Gomez, K.; Jacob, C.; Capelari, M.; Rosa, C.; Zani, C. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003. 98: (7). 967-974
- Rosa, L. H.; Gomes Machado, K.; Jacob, C. C.; Capelari, M.; Rosa, C. A.; Zani, C. L. Screening of Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003. 98: (7). 967-974
- Ruseler-Van Embden, J. G. H.; Van Lieshout, L. M. C.; Gosselink, M. J.; Marteau, P. Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1995. 30: (7). 675-680

Sauvant, D.; Pérez, J.-M.; Tran, G. Tablas de composición y de valor nutritivo de las materias primas destinadas a los animales de interés ganadero. 2003. España. Ediciones Mundi-Prensa

Shah, S. K.; Walker, P. A.; Moore-Olufemi, S. D.; Sundaresan, A.; Kulkarni, A. D.; Andrassy, R. J. An evidence-based review of a *Lentinula edodes* mushroom extract as complementary therapy in the surgical oncology patient. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2011. 35: (4). 449-458

Smania, A. J.; Delie Monache, F.; Albino Smania, E.; Cuneo, R. S. Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (*Aphyllphoromycetideae*) fruit body. *International Journal for Medicinal Mushrooms*. 1999. 4: 325-330

Smith, J. E.; Rowan, N. K.; Sullivan, R. Medicinal Mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. 2002. University of Strathclyde Cancer Research.UK. <http://www.fruiting-bodies.co.uk/cancer-research/cr-index.htm>

Stainer, R.; Ingraham, J.; Wheelis, M.; Painter, P. Microbiología. 1992. Barcelona. REVERTÉ S. A.

Suzuki, F.; Suzuki, C.; Shimomura, E.; Maeda, H.; Fujii, T.; N., I. Antiviral and interferon-inducing activities of a new peptidomannan, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *Journal of antibiotics* (Tokyo). 1979. 32: (12). 1336-1345

Teichmanna, A.; Duttab, P. C.; Staffasc, A.; Jägerstad, M. Sterol and vitamin D2 concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effects of UV irradiation. *LWT-Food and Technology*. 2007. 40: (5). 815-822

Turkoglu, A.; Kivrak, I.; Mercan, N.; Duru, M.; Gezer, K.; Turkoglu, H. Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers. *African Journal of Biomedical Research*. 2006. 5: (11). 1146-1150

Turlo, J.; Gutkowska, B.; Krzyczkowski, W.; Blazewicz, A.; Kocjan, R. Optimizing vitamin B12 biosynthesis by micelial cultures of *Lentinula edodes* (Berk). *Enzyme and Microbial Technology*. 2008. 369-374

Valencia, F.; Román, M. La fibra dietaria como aliento funcional. *VITAE*. 2004. 11: (2). 12-17

Valencia, M.; Nieto, I. J. Esteroles, ácidos grasos e hidrocarburos de los cuerpos fructíferos de *Ganoderma australe*. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. 2002. 47: (4). 511-516

- Vergara, P.; Ferrando, C.; Jimenez, M.; Fernandez, E.; Gonalons, E. Factors determining gastrointestinal transit time of several markers in the domestic fowl. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. 1989. 74: 867-864
- Wasser, S. P. Dekker, M., Shiitake (*Lentinus edodes*) 2005. 653-664.
- Wasser, S. P.; Weis, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1999. 1: 47-55
- Weete, J. D. Sterols of the fungi: distribution and biosynthesis. *Phytochemistry*. 1973. 12: 1843-1864
- Yahoita, Y.; Amemiya, K.; Ohnuma, H.; Furumura, K.; Masaki, A.; Matsuki, T.; Kikuchi, M. Sterol constituents from five edible mushrooms. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1998. 46: (6). 944-950
- Yahoita, Y.; Endo, M.; Tani, Y.; Machida, K.; Amemiya, K.; Furumura, K.; Kikuchi, M. Sterol constituents from seven mushrooms. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1999. 47: (6). 847-851
- Yaltirak, T.; Aslim, B.; Ozturk, S.; Alli, H. Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. *Food and Chemical Toxicology*. 2009. 47: 2052-2056
- Yamashita, A.; Ohtsuka, H.; Maeda, M. Intestinal absorption and urinary excretion of antitumor peptidomannan KS-2 after oral administration in rats. *Immunopharmacology*. 1983. 5: (3). 209-220
- Yang, J.-H.; Lin, H.-C.; Mau, J.-L. Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*. 2001. 72: 465-467
- Yang, J.-H.; Lin, H.-S.; Mau, J.-L. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*. 2002. 77: 229-235
- Yap, A.-T.; Ng, M.-L. An Improved Method for the Isolation of Lentinan from the Edible and Medicinal Shiitake Mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2001. 3: (1).
- Yen, M.-T.; Mau, J.-L. Selected physical properties of chitin prepared from shiitake stipe. *LWT*. 2007. 40: 558-563
- Yokokawa, H.; Mitsuhashi, T. The sterol composition of mushrooms. *Phytochemistry*. 1981. 20: (6). 1349-1351

Yue, J.-M.; Chen, S.-M.; Lin, Z.-W.; Sun, H.-D. Sterols from the fungus *Lactarium volemus*. *Phytochemistry*. 2001. 56: 801-806

Zhenga, C. J.; Yooa, J.-S.; Leeb, T.-G.; Choc, H.-Y.; Kimd, Y.-H.; Kima, W.-G. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Letters*. 2005. 579: (23). 5157-5162

Zhong, J.-J.; Xiao, J.-H. Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction. *Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology*. 2009. 113: 79-150

Zhou, Z.-Y.; Tan, J.-W.; Liu, J.-K. Two new polyols and a new phenylpropanoid glycoside from the basidiomycete *Lactarius deliciosus*. *Fitoterapia*. 2011. 82: 1309-1312

Zjawiony, J. K. Biologically active compounds from *Aphylllophorales* (Polypore) Fungi. *Journal of Natural Products*. 2004. 67: (2). 300-310

5. Conclusiones generales y perspectivas

El análisis nutricional, químico y de actividad antibacteriana realizado al estípite de Shiitake permitió ver que esta parte del hongo, que en la actualidad constituye desecho en su producción, presenta un gran potencial para ser empleado en formulaciones de alimento aviar, bien sea incluyéndolo como ingrediente adicional o, en aquellas dietas con más de dos cereales, reemplazando al tercero total o parcialmente, manteniendo los niveles de nutrientes y posiblemente disminuyendo antinutrientes como el ácido fítico. Así mismo, dada su composición de ácidos grasos y esteroides antimicrobianos, su inclusión en la dieta aviar aportaría protección contra bacterias patógenas sin inhibir la acción de las benéficas, mejorando el desarrollo de las aves. Dado que la proporción de estos bioactivos es relativamente baja y su actividad moderada, no se puede pensar en la eliminación del uso de los antibióticos, pero si en una posible disminución de la cantidad empleada. Esto, aunado al hecho de que se trata de un desecho reduciría costos a los avicultores, aumentaría utilidades a los fungicultores y produciría un impacto positivo al medio ambiente.

Se hace necesario, para la aplicación de los resultados obtenidos, evaluar en futuros trabajos, el efecto de la inclusión del estípite de Shiitake en la dieta de pollos de engorde sobre la digestibilidad de nutrientes, desempeño productivo y disminución de enfermedades causadas por bacterias, así como la posibilidad de su utilización como alternativa al uso de antibióticos promotores de crecimiento (APC), sin dejar de lado profundizar en los β -1,3-1,6- glucanos, cuya concentración en el estípite es apreciable, ya que los mismos podrían ser empleados como prebióticos.

Si bien, la investigación realizada se enfocó a su utilización en alimentación animal, los resultados dan pauta para iniciar estudios sobre la posibilidad de incluir al estípite de Shiitake en la elaboración de alimentos funcionales para consumo humano por su alto contenido de fibra y su proporción de β -1,3-1,6- glucanos, ya que la actividad anticancerígena e inmunoestimuladora que presentan ayudaría en gran medida a disminuir la incidencia de cáncer de colon.

Anexo 1: Desviación estándar y coeficiente de variación

	Materia seca	Cenizas	Grasas	Fibra Cruda	**FDN	*Proteína
	89.52	5.16	0.69	30.03	45.58	14.48
	89.64	5.12	0.71	31.04	46.44	14.35
	89.78	5.17	0.73	30.75	47.65	14.32
Promedio	89.71	5.16	0.72	30.67	46.56	14.35
σ	0.13	0.02	0.02	0.52	1.29	0.08
C. Variación	0.14	0.51	2.81	1.69	2.78	0.59

	Ca	P	Mg	K	Na	Fe	Mn	Cu	Zn
	770.89	8139.33	1358.73	2148.07	100.87	19.45	13.04	3.17	71.3
	773.79	8132.88	1367.12	2149.46	99.99	20.80	13.56	2.98	70.05
	774.56	8136.78	1363.65	2150.36	102.76	19.76	14.09	3.22	69.89
Promedio	773.08	8136.33	1363.16	2149.96	101.20	20.00	13.56	3.12	70.41
σ	1.93	3.24	4.21	1.15	0.88	0.70	0.52	0.12	0.77
C. Variación	0.25	0.04	0.30	0.05	0.87	3.53	3.87	4.05	1.09

	Carbohidratos	β-1,3-1,6-glucanos
	26.1	9.91
	28.3	8.81
	26.3	9.29
	28.1	
	27.2	
Promedio	27.26	9.33
σ	0.91	0.55
C. Variación	3.35	5.90