



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE *Lentinula edodes* (BERK) PEGLER. (SHIITAKE) EN LA REGULACIÓN DE LA GLICEMIA.

Que para obtener el título de

BIÓLOGO

P R E S E N T A

NANCY EIZAYADÉ RESÉNDIZ AGUILERA

Director de Tesis

BIÓL. VÍCTOR MANUEL ESPARZA MARTÍNEZ



Los Reyes Iztacala; Edo. De México, 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDIATORIAS

Índice de Contenido

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Antecedentes.....	6
Justificación.....	9
Objetivos.....	10
Materiales y Métodos.....	11
Propagación de micelio de <i>Lentinula edodes</i>	12
Obtención de extractos.....	12
Prueba de tolerancia oral a la glucosa.....	13
Actividad inhibitoria sobre α -glucosidasa.....	14
Análisis estadístico.....	14
Resultados y Discusión.....	15
Propagación de la cepa.....	15
Producción de micelio en medio líquido.....	16

Obtención de extractos etanólico y acuoso.....	20
Curva de tolerancia a la glucosa.....	21
Actividad inhibitoria sobre α -glucosidasa.....	25
Conclusiones.....	31
Referencias bibliográficas.....	32

Índice de Figuras

Figura 1. Diseño metodológico.....	11
Figura 2. Invasión total de la cepa <i>L. edodes</i> en medio PDA a 15 días de incubación.....	16
Figura 3. Crecimiento de micelio en medio líquido de glucosa y maltosa a la 2 ^{da} Y 5 ^a semana de incubación.....	18
Figura 4. Micelio obtenido húmedo (A) y seco (B).....	19
Figura 5. Obtención de extractos con equipo Soxhlet.....	19
Figura 6. Variación de % del rendimiento de extractos en peso seco.....	20
Figura 7. Efecto de los extractos EM y AF sobre las curvas de tolerancia a glucosa.....	22
Figura 8. Efecto de los extractos EF y AM sobre las curvas de tolerancia a glucosa.....	23
Figura 9. Inhibición de α -glucosidasa por acarbosa con IC ₅₀ 0.31 mg/mL.....	27
Figura 10. Inhibición de α -glucosidasa por extracto EF con IC ₅₀ 01.4 mg/mL.....	28
Figura 11. Inhibición de α -glucosidasa por extracto AM.....	28

Resumen

El hongo *Lentinula edodes* se cultiva por sus propiedades nutraceuticas y medicinales que se han popularizado por diversos extractos utilizados para aprovechar las sustancias activas que contiene. Es por eso que en el presente trabajo se evaluó el efecto de los extractos de *L. edodes* sobre la regulación de la glicemia. Se obtuvo el cuerpo fructífero y cepa del hongo en la Planta Piloto y Laboratorio para la Enseñanza en la Producción de Hongos Comestibles y Medicinales Cultivados FESI propagándose la cepa en medio de cultivo sólido de agar destroxa papa y para la producción de micelio se empleó medio líquido de maltosa y glucosa. Se realizaron extractos etanólico y acuoso de C. fructífero y micelio para evaluar su efecto sobre la glucosa en sangre en ratas Wistar normoglucémicas a través de curvas de tolerancia a la glucosa, los datos se analizaron mediante un examen de varianza (ANOVA de dos factores) y posteriormente una prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con un valor de $p < 0.05$ para establecer diferencia significativa. Los resultados muestran que el extracto etanólico de micelio (EM) demostró una tendencia análoga en las tomas de glucosa postprandial a grupo control glibenclamida cuyo mecanismo de acción es estimular la secreción de insulina por células β del páncreas. En el caso del extracto acuoso de micelio (AM) y etanólico de cuerpo fructífero (EF) tuvieron un efecto similar al no alterar la glucosa basal después de una carga de glucosa, infiriéndose un patrón antihiper glucémico. Con base a estos resultados se midió la actividad inhibitoria de los extractos sobre la α -glucosidasa, el extracto EF mostró un IC50 de 1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con respecto a la acarbosa de 0.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados obtenidos apoyan la idea de que los extractos de *L. edodes* pueden ser reguladores de glicemia como estimulador pancreático y como inhibidores de la actividad de α -glucosidasa.

Abstract

The *Lentinula edodes* mushroom is cultivated for its nutraceutical and medicinal properties that have been made popular by various extracts used to harness the active substances it contains. That is why in this study the effect of the *L. edodes* extracts on the regulation of glycemia was evaluated. The fruiting bodies and fungal strain was obtained in the Planta Piloto y Laboratorio para la Enseñanza en la Producción de Hongos Comestibles y Medicinales Cultivados FESI propagating the strain on potato dextrose agar solid medium and for the production of mycelia maltose and glucose liquid medium was used. Ethanolic and aqueous extracts from the mycelium and fruiting Bodies were conducted to assess their effect on blood glucose in normoglycemic Wistar rats through a glucose tolerance curve, the data was analyzed by a variance test (two-way ANOVA) and then a Tukey multiple comparisons test, with a value of $p < 0.05$ to establish significant difference. The results show that the ethanol extract of mycelium (EM) showed a similar trend in postprandial glucose samples to glibenclamide control group whose mechanism of action is to stimulate insulin secretion by pancreatic β cells. In the case of aqueous extract of mycelium (AM) and the ethanol extract of the fruiting body (EF) both had a similar effect by not altering the basal glucose after a glucose load, inferring an antihyperglycemic pattern. Based on these results the inhibitory activity of the extracts on the α -glucosidase was measured, the EF extract showed an IC_{50} of 1.4 $\mu\text{g/mL}$, relative to 0.31 $\mu\text{g/mL}$ from acarbose. The results support the idea that *L. edodes* extracts can be used as pancreatic glucose regulators stimulator and as inhibitors of α -glucosidase activity.

Introducción

El consumo de alimentos naturales no sólo de buen sabor, sino también inocuos, nutritivos y con propiedades benéficas para la salud, representa la gran tendencia mundial de la alimentación humana en el siglo XXI (Martínez.*et al.*, 2007). Gracias al estudio químico de productos naturales, los hongos comestibles han sido considerados como alimentos funcionales importantes en la prevención de enfermedades, como por su acción en el ecosistema y al hecho de que han estado ligados al hombre, los estudios realizados sobre estos organismos han permitido incrementar su conocimiento en aspectos taxonómicos, ecológicos, nutricionales, farmacológicos y bioquímicos (Rojas, 2012).

La importancia inicial de los hongos en el consumo humano reside en su valor dietético por los bajos contenidos de carbohidratos y grasas, así como un contenido significativo de proteínas y vitaminas. También por ser un complemento agradable en las comidas por sus propiedades organolépticas. Constituyen un grupo muy variable y polimórfico, pues son organismos que nacen de esporas y se reproducen sexual o asexualmente, con un cuerpo generalmente formado por filamentos muy ramificados llamados hifas, los cuales en conjunto forman el micelio, este último en forma de masas algodonosas de forma radial y que almacenan su energía en polisacáridos como el glucógeno, polímero de la glucosa que los animales utilizan para almacenar energía por corto tiempo (Carrillo, 2003).

Dentro de las especies comestibles con mayor producción en México se encuentran los géneros *Agaricus*, *Pleurotus* y *Lentinula*, donde el 95.35% corresponde a los Champiñones, seguido por las setas con 4.62% y Shiitake con 0.038%; estimándose que los volúmenes de producción ascienden a más de 47,468 toneladas anuales de hongos frescos, siendo México el país con mayor producción en Latinoamérica (Martínez. *et al.*, 2007).

El hongo *Lentinula edodes* conocido como Shiitake, de origen asiático, pertenece a la clase *Basidiomycetes*, familia *Tricholomataceae*, género *Lentinula* y especie *edodes*, se caracteriza por no tener anillo, con un píleo marrón oscuro de 5 a 20 cm de diámetro, de forma convexa, con laminillas que son planas y blancas y un estípite de 8 a 13 mm de grosor y 3 a 5 cm de largo que crece de forma silvestre sobre residuos de lignina (García, 2003). Se cultiva por su exquisito sabor y por sus propiedades nutraceuticas y medicinales; como antiinflamatoria, antitumoral, antiviral, antibacterial, antiparasitaria, regulador de la presión sanguínea y de los niveles de colesterol, inmunomodulador y antidiabético. La medicina tradicional mexicana atribuye propiedades hipoglicemiantes a numerosas especies vegetales y en el caso de los hongos se han realizado investigaciones en *Coprinus comatus*, no solo como un gran complemento de aplicación en tratamientos de diabetes tipos I y II, sino como un importante complemento alimenticio para todos aquellos pacientes que presenten hiperglicemia (Han *et al.*, 2006).

También, estudios anteriores han demostrado que la ingesta del hongo Maitake o algunos de sus extractos, influye en el metabolismo de glucosa, probablemente a través de la mejora de la sensibilidad a la insulina (Manohar *et al.*, 2002). Además de sus propiedades, tienen gran valor debido a que son un buen recurso de vitaminas B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina) y D, también contiene todos los aminoácidos esenciales, fibra dietaria, alto valor calórico y la cantidad de proteína es comparable con la del pollo y el cerdo pero con más fibra que dichas carnes, además contiene altos niveles de minerales como hierro, potasio y fosforo (Rivera, 2010).

En la actualidad existen en el mercado diferentes empresas que se encargan de la extracción de componentes activos de productos naturales, y que son comercializados como suplementos dietarios, productos nutraceuticos, aditivos alimenticios, medicinas naturales y productos farmacéuticos. En el campo de los hongos hay un gran historial de

productos medicinales obtenidos a partir de estos y usados con gran frecuencia en nuestra sociedad, estos procedimientos de extracción sirven para mejorar notablemente la calidad del producto deseado, aprovechando las sustancias activas del extracto (González, 2004). Gracias al desarrollo de la química de los productos naturales y al enfoque sobre el estudio de los metabolitos fúngicos (Piqueras, 2004), los hongos comestibles se reconocen como funcionales por la presencia de compuestos como polisacáridos, triterpenos, flavonoides, esteroides y ácidos grasos entre otros (Rivera, 2010).

Antecedentes

- Martínez Carrera *et al.* 2004, consideraron las propiedades del hongo comestible Shiitake en la alimentación mexicana, ya que se trata de un alimento natural que se ha utilizado a través de diversos extractos o concentrados como suplementos alimenticios a nivel mundial, para fortalecer el sistema inmunológico, reducir la hipertensión, prevenir y tratar el cáncer, la diabetes, entre otros.
- Nieto Ramírez *et al.* 2012 evaluaron el estípite de Shiitake como un alimento con propiedades nutraceuticas. Observaron que tiene alto contenido de fibra dietaria, ácidos grasos insaturados y proteína de alta calidad, además de que aporta adicionalmente β -glucanos ramificados, compuestos anticancerígenos e inmunostimuladores.
- Lo Hui Chen y Wasser P. 2011 escriben el panorama en que se encuentra la diabetes mellitus y la eficacia de la utilización de hongos medicinales que contienen componentes activos, como los polisacáridos y fibra dietética, extraídos de los cuerpos fructíferos o micelio y que han sido reportados como hongos con propiedades hipoglucémicas; sin embargo, recomiendan un mejor diseño y más ensayos controlados para comprobar la bioactividad en pacientes diabéticos.
- Saritha *et al.* 2009 evaluaron el efecto hipoglucémico de *P. ostreatus* en 3 grupos de ratas diabéticas durante 45 días, con dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg de extracto etanólico. Se observó una disminución dependiente de la dosis en el nivel de glucosa en la sangre, todos los grupos mostraron una baja de triglicéridos y nivel

de glucógeno, siendo el grupo con dosis de 1000 mg/kg el más significativo al mostrar mayor disminución de estos y de colesterol sérico.

- Ávila Castañeda 2009 realizó un estudio químico con énfasis en flavonoides del hongo *L. edodes* y determinó su actividad antioxidante, utilizando extractos con equipo Soxhlet empleando como disolvente metanol acidificado, que resultó ser un método conveniente para la obtención de compuestos polifenólicos, además de que la actividad antioxidante del extracto crudo fue superior en comparación con otros hongos, infiriendo que tiene mayor valor nutracéutico.

- Garza *et al.* 2006 evaluaron la citotoxicidad, actividad antioxidante e inmunomoduladora de extractos acuosos del micelio de cuatro especies de macromicetos del noreste de México: *Lentinus lepideus*, *Armillaria tabescens*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*, se encontró que contienen sustancias con actividad antioxidante, pero el extracto acuoso de *Lentinus lepideus* tiene, además, compuestos con potencial actividad inmunomoduladora.

- Salvo Miranda 2008 trabajó con hongos de la División Basidiomycota, por el alto interés en las últimas décadas ya que tienen polisacáridos, metabolitos con un amplio espectro de actividad biológica. Evaluó in vitro el efecto antiproliferativo de extractos a diferentes concentraciones de polisacáridos aislados desde el micelio de *A. aegerita* y *H. erinaceum*, sobre dos líneas celulares tumorales. Los resultados obtenidos en cuantificación de proliferación celular se mantiene en alto porcentaje, con concentraciones bajas de extracto de polisacárido, sin embargo, a altas concentraciones se observa una disminución significativa.

- Murillo *et al.* 2006 evaluaron la actividad hipoglicemiante de los extractos etanólico y acuoso de las hojas y corteza de *Bauhinia kalbreyeri*. La diabetes se indujo en ratones normoglicémicos mediante la administración de aloxano en dosis de 75 mg/Kg. Los ratones fueron asignados a diferentes grupos para ser sometidos a tratamiento con el extracto (1.000 mg/Kg). La dosis única de 1.000 mg/Kg no disminuyó los niveles de glucosa sanguínea en ratones con diabetes tipo I; no obstante, los extractos etanólicos y acuosos de hoja y corteza de la planta mostraron capacidad atrapadora de radicales libres, comparable al ácido ascórbico, la actividad antioxidante de los extractos podría estar relacionada con el uso de la planta como antidiabético dado en la etnobotánica, y ser consecuencia de la abundante cantidad de metabolitos tipo fenólico encontrados.

- Manohar *et al.* 2002 determinaron si un extracto soluble en agua de hongo Maitake, que contiene β -glucano, que parece ser antidiabético, podría influir en la glucosa circulante, aumentando la sensibilidad a la insulina en un modelo de ratón resistente a la insulina de la diabetes tipo 2. Los ratones se trataron con una dosis única de concentraciones variables del extracto (35-140 mg) y otros con una sola dosis de una concentración del fármaco hipoglicemiante oral, Glipizide, la insulina en suero se estimó mediante un radioinmunoensayo (RIA). A una dosis de 140 mg del extracto observaron disminución de las concentraciones de glucosa y de insulina, la reducción aproximada del 25% de la concentración original, concluyendo que el hongo Maitake influye favorablemente en el metabolismo de la glucosa mediante la mejora de la sensibilidad periférica a la insulina.

Justificación

México es uno de los principales países que se dedica a la producción del hongo *Lentinula edodes*, pero a un bajo porcentaje de cultivo, aun así, la ingesta de hongos no es una práctica común y extensiva de nuestro país, además el conocimiento que tiene la población en general sobre los beneficios del consumo de hongos es escaso, se cree que simplemente sirven como aderezo de comidas en general, gracias a su delicioso sabor característico. En la actualidad puede ser utilizado como un suplemento alimenticio gracias a las propiedades medicinales, que le han adjudicado empíricamente y a sus componentes biológicos activos que han sido de utilidad en tratamientos benéficos para muchos padecimientos, entre ellos, la regulación de glucosa en sangre. Debido a la importancia y eficiencia de la obtención de estos componentes activos por medio de extractos y la falta de protocolos para evaluar la calidad del producto, que son todavía problemas en la producción y aplicación de hongos medicinales, se pretende hacer la producción de micelio de *L. edodes*, así como la obtención de extractos para su aplicación y poder determinar el efecto que tienen sobre la regulación de la glicemia.

Objetivo General

- Evaluar el efecto de los extractos de *Lentinula edodes* sobre la regulación de la glicemia.

Objetivos particulares

- Propagación de micelio de *L. edodes*. en medio sólido Agar destroxa papa
- Producción de micelio de *L. edodes* en medio líquido.
- Obtención de extractos etanólico y acuoso de *L. edodes* del micelio y cuerpo fructífero.
- Evaluación de los extractos en un bioensayo de curva de tolerancia a la glucosa.

Materiales y Método

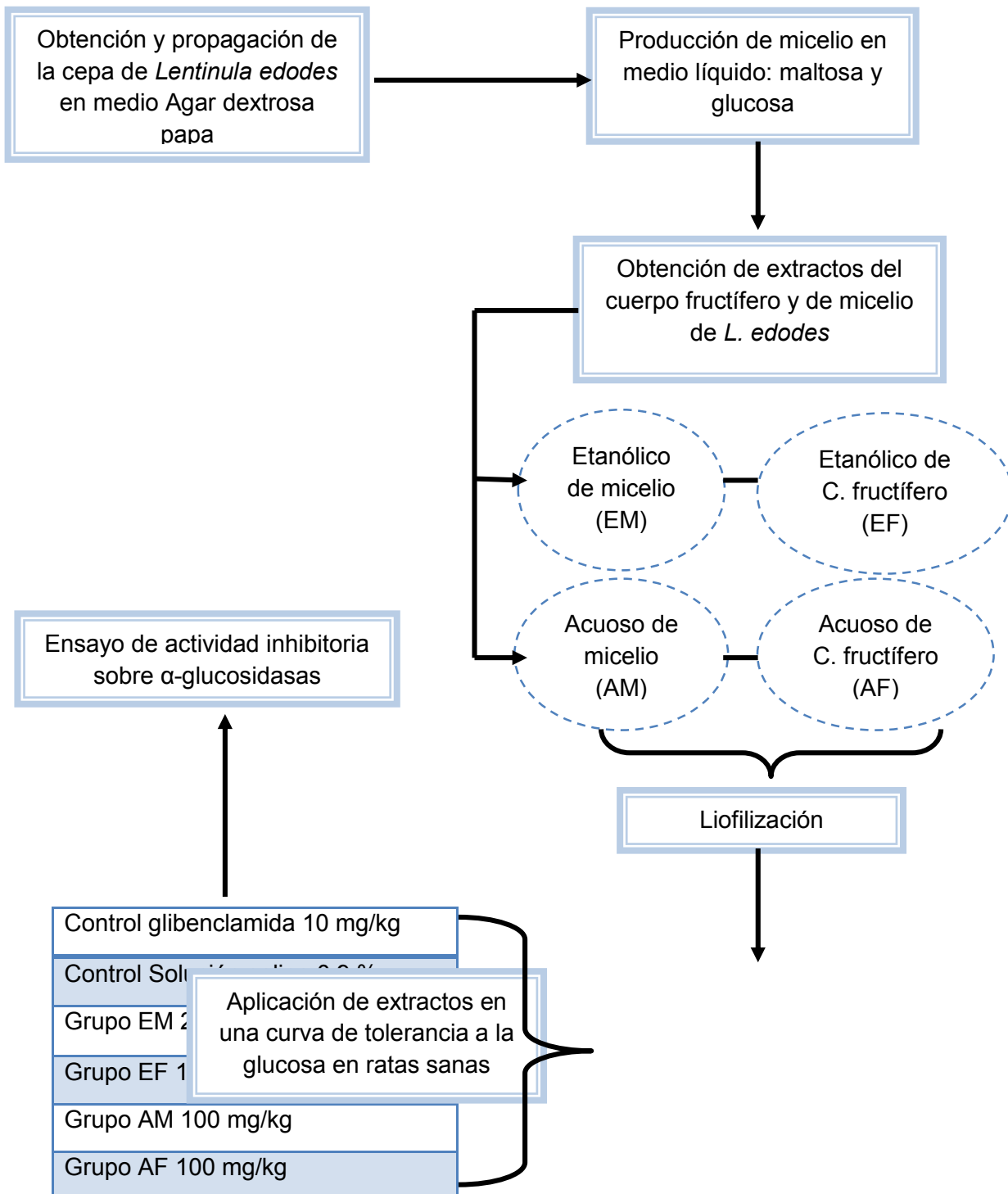


Figura 1- Diseño metodológico.

Propagación de micelio de *Lentinula edodes*

La cepa en medio sólido y del cuerpo fructífero se proporcionaron por la Planta Piloto y Laboratorio para la Enseñanza en la Producción de Hongos Comestibles y Medicinales Cultivados, el micelio se propagó en cajas Petri con medio Agar dextrosa papa (PDA). En condiciones estériles se realizaron cortes de 2 x 2 cm del cultivo y cada porción se agregó a una nueva caja con PDA, se selló y rotuló, incubándolo a 22°C durante 15 días, se evaluó el crecimiento de micelio cualitativamente al observar la invasión total de la caja Petri, después se guardó para su utilización en la producción de micelio en medio líquido.

La producción en medio líquido se realizó en 6 lotes de 10 frascos de 500 ml agregando 250 ml de agua destilada con 5 g de glucosa y 2 g de maltosa, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min. Posteriormente se inoculó el micelio de una caja Petri, se sellaron y rotularon los frascos y se colocaron en la cámara de incubación a 22 °C; después de 4 semanas se tomaron medidas de peso húmedo y peso seco después de su deshidratación y se guardó para su uso.

Obtención de extractos

La materia prima desecada del cuerpo fructífero que se obtuvo de la Planta Piloto y Laboratorio para la Enseñanza en la Producción de Hongos Comestibles y Medicinales Cultivados y del micelio obtenido, se trituró a temperatura ambiente. Los extractos etanólico y acuoso se obtuvieron mediante el equipo Soxhlet, empleando como disolventes 200 ml de etanol al 70% y 200 ml de agua destilada, respectivamente, y utilizando cartuchos de 4g de micelio y 4g de cuerpo fructífero secos, para cada extracción; quedando 4 extractos de la siguiente manera: etanólico (EM) y acuoso (AM) de micelio, etanólico (EF) y acuoso (AF) del Cuerpo fructífero. Posteriormente se concentraron los extractos por liofilización para conservar el producto y obtener el peso seco.

Prueba de tolerancia oral a la glucosa

Con los extractos que se obtuvieron se realizó un ensayo para la evaluación de tolerancia a la glucosa. Se trabajó con ratas Wistar normo-glicémicas, macho de 235-276 g de peso, en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala U.N.A.M. Los procedimientos involucrados en los animales y su cuidado se basaron con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Para la aplicación de la prueba las ratas fueron colocadas en grupos de 4 bajo condiciones de laboratorio a una temperatura de 22-24 °C.

Todas las administraciones de los extractos se suspendieron en solución salina al 0.9 %. Se utilizó glibenclamida (10 mg/kg) como medicamento control positivo y un control de solución salina, los cuatro extractos y estos dos grupos se administraron a las ratas por vía intragástrica, calculando la dosis en función del peso, 250 mg /kg de EM, y 100 mg/kg para los extractos EF, AM y AF. Se tomaron en total 5 muestras sanguíneas para glucosa a través de la sangre obtenida de una vena caudal realizando una pequeña incisión, la determinación de mg/dL de glucosa se realizó con un glucómetro (Accu-Check) la primera en tiempo 0 y enseguida se les administró una carga de glucosa de 1.5 g/kg, después a los tiempos 15, 30, 60 y 120 minutos para tomar el registro de glucosa sanguínea.

Actividad inhibitoria sobre α -glucosidasa

El ensayo para medir la inhibición de la actividad α -glucosidasa de los extractos AM y EF de *L. edodes* se realizó en microplacas utilizando α -glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae* 1U/mL, y amortiguador de fosfatos 0.1M pH 6.8, el extracto se evaluó a concentraciones 0.2-2mg/mL y se usó acarbosa como control positivo en el rango de concentración del extracto, registrándose lecturas de absorbancia a 405 nm mediante un lector de microplacas Multiskan Ascent[®]. Después se adicionó como sustrato *p*-nitrofenil α -D glucopiranosido, esta mezcla fue incubada por 35 min a 30 °C y la absorbancia fue determinada nuevamente a 405 nm.

Se calculó la concentración requerida para inhibir la actividad enzimática al 50% (IC₅₀), para esto se procedió a calcular el porcentaje de actividad para cada concentración de la siguiente manera:

$$\% \text{ Actividad} = \left(\left[\frac{A_{405}^{\text{Control}} - A_{405}^{\text{Extracto}}}{A_{405}^{\text{Control}}} \right] \right) \times 100$$

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un examen de varianza (ANOVA de dos factores) y posteriormente una prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con un valor de $p < 0.05$ para establecer diferencia significativa.

Resultados y Discusión

Propagación de la cepa

La propagación de la cepa en caja Petri se mantuvo en un total de 5 lotes de 10 cajas, se incubaron por 15 días a una temperatura promedio de 22°C. La cepa obtenida en cada lote fue a invasión total (100%) como se observa en la figura 2, no se reportó alguna contaminación, lo que proporcionó buenas condiciones para continuar el trabajo. El aislamiento y crecimiento exitoso del micelio puro se debe a las condiciones nutricionales dadas por el medio PDA, como registró Suárez en 2010, como uno de los medios de cultivo mayormente utilizados para la manutención y preservación de los hongos; ya que incluye todos los componentes nutritivos para que éstos se desarrollen, el extracto de papa proporciona almidón, algo de lignina y otros minerales que ayudan a que los hongos se desarrollen e inhiban el crecimiento de bacterias, la dextrosa (D-glucosa) es la fuente de carbono principal para los hongos y el agar es adicionado como agente gelificante. El tiempo de crecimiento de *L. edodes* en medio sólido se ha observado a partir de los 0 días de incubación hasta los 14 días para su invasión en caja (Villegas *et. al.* 2007). El total de cajas utilizadas para la propagación de micelio en medio líquido fueron 27 y las demás se usaron para conservar la cepa dentro del Laboratorio.



Figura 2.- Invasión total de la cepa *L. edodes* en medio PDA a 15 días de incubación.

Producción de Micelio en Medio Líquido

El micelio obtenido de los 6 lotes en peso fresco fue de 712.5 g y un peso seco de 41.2 g, teniendo una pérdida de agua del 94.2%. Los resultados descritos en la tabla 1 varían en la cantidad obtenida de peso húmedo y seco en casi todos los lotes, esto puede deberse a dos factores importantes que describe Aguilar en 2007, el primero es que en un cultivo en medio líquido la aireación es un factor de amplia necesidad, ya que influye en el crecimiento del hongo y esto pudo intervenir como una de las causas a esta inestabilidad de datos obtenidos. También cuando los medios líquidos se mantienen en reposo el micelio crece sólo en la superficie, pero si el medio es permanentemente agitado, puede crecer en todo el volumen donde se encuentra el medio.

La producción total de micelio de *L. edodes* se vio favorecida al complementar el medio con glucosa y extracto seco de malta. Esta última se elabora a partir de la cebada, la cual es sometida a un proceso de malteo, se compone de azúcares, dextrinas y proteínas y es utilizada como nutriente para las levaduras de panificación. Contribuye al óptimo crecimiento del micelio, tal como lo menciona Rivera en 2010, quién indica que para el desarrollo del micelio se requieren fuentes externas de carbono; como glucosa, almidón, celulosa y lignina, algunos minerales y vitaminas como fósforo, hierro y tiamina que se encuentran presentes en las papas (figuras 3 y 4).

Es importante resaltar que el lote número 6 se dejó en incubación por 10 semanas, observándose un continuo crecimiento de micelio, pues la biomasa húmeda y seca de este lote es mayor al doble que los que se dejaron en incubación por 4 semanas, lo cual nos dice que el suplemento nutricional es suficiente para obtener más biomasa a largo plazo de incubación con la misma cantidad de material y medio de cultivo líquido, beneficiando la baja demanda de costos en la producción.

Durante las 4 semanas en incubación del micelio, los factores físicos de crecimiento se mantuvieron a 22 °C y sin incidencia de luz; ya que la irradiación luminosa tiene una función importante en el proceso de crecimiento del cuerpo fructífero, pero tiene un efecto inhibitorio en el desarrollo de micelio, éstas condiciones caen dentro del rango reportado por García, 2003, que va desde arriba de 10°C hasta 40°C, siendo la temperatura óptima alrededor de 23°C.

Lotes de micelio	T °C	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	Pérdida de agua %
1	22	98,3	6,1	93,7
2	23	60,3	6,2	89,71
3	23	100,8	6	94,04
4	22	107,7	4,3	96
5	22	99,4	5	94,9
6	22	246	13,6	55,2
Total		712,5	41,2	
\bar{X}	22,33	13,75	0,8	87,25
DE	0,516	8,66	0,63	15,84

Tabla 1.- Micelio total obtenido en peso húmedo y seco de los 6 lotes producidos, así como el % de pérdida de agua. Se presenta la media y desviación estándar de 10 frascos por lote.

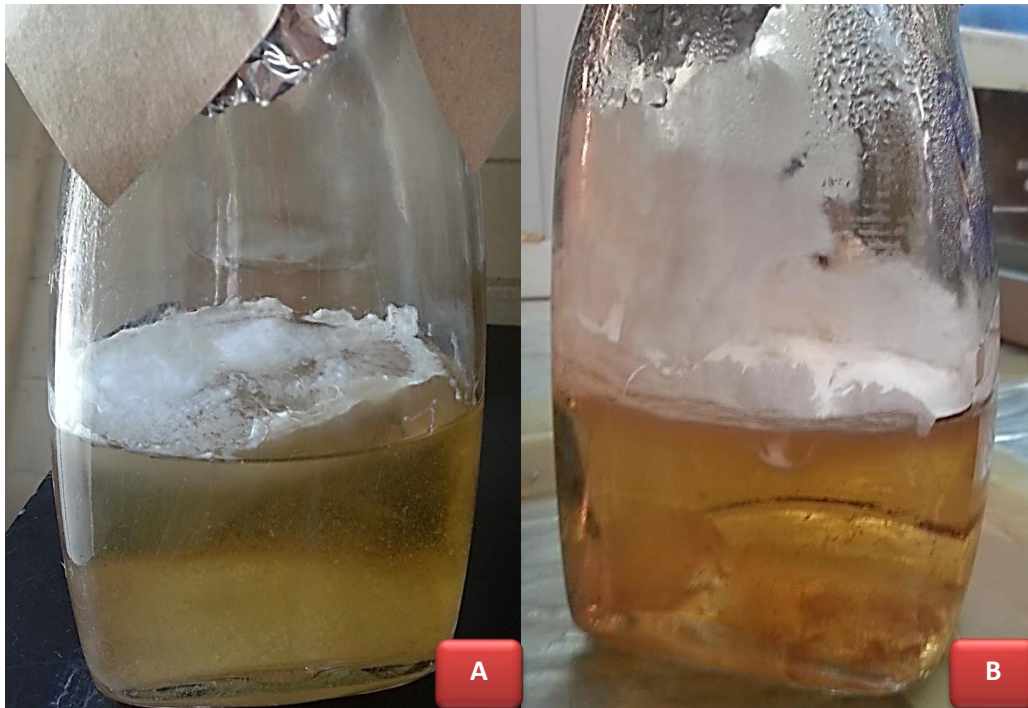


Figura 3.- Crecimiento de micelio en medio líquido de glucosa y maltosa a la 2^{da}(A) y 5^{ta} (B) semana de incubación.



Figura 4.- Micelio obtenido húmedo (A) y seco (B).



Figura 5.- Obtención de extractos con equipo Soxhlet

Obtención de extractos etanólico y acuoso

De cada extracto realizado en este estudio, se presentó un mayor rendimiento en el extracto etanólico de micelio (EM), como se observa en la figura 6 con 11.62%, lo que equivale a 0.465 mg de extracto en peso seco, seguido del extracto acuoso de *C. fructífero* (AF) con 0.258 mg (6.45%), 0.254 mg (6.35%) de acuoso de micelio (AM) y por último con 2.6% de rendimiento para el extracto etanólico de *C. fructífero* equivalente a 0.104 mg.

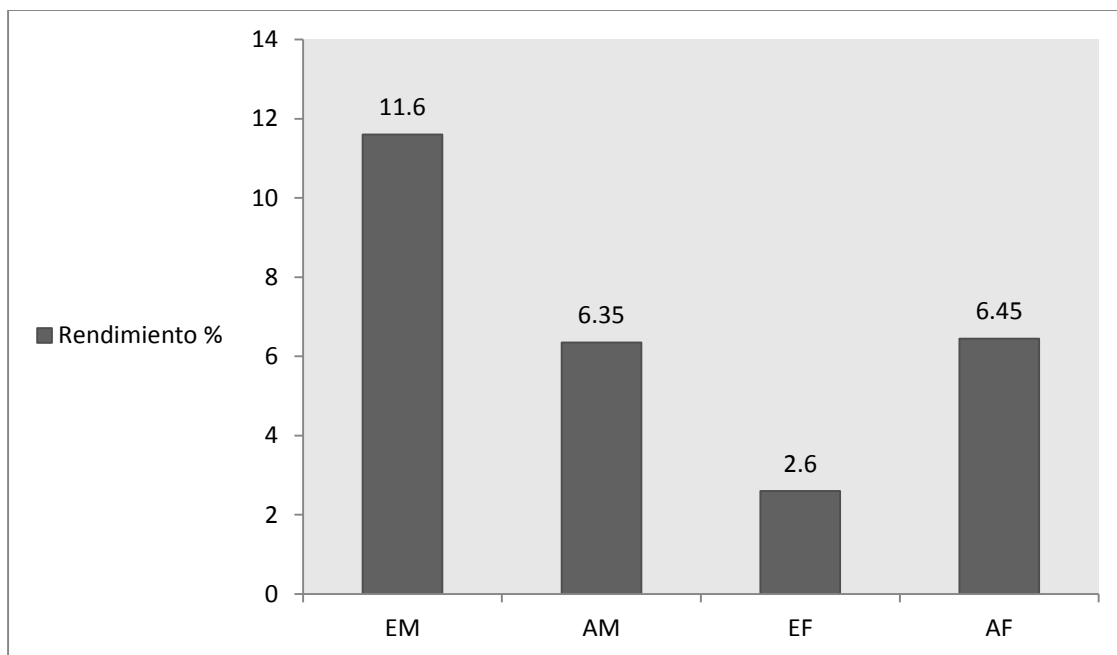


Figura 6.- Rendimiento de cada extracto en peso seco.

Curva de tolerancia a la glucosa

Los resultados del ensayo en la aplicación de los extractos y grupos controles se detallan en la tabla 2, el tiempo (min) y la variación de glicemia en mg/dl y en la figura 7 y 8 se

presentan las curvas de tolerancia a la glucosa bajo la acción de EM, AF, EF, AM, control y glibenclamida en % de Variación de glicemia para detallar y comparar el efecto de cada uno sobre la regulación de la glicemia. El resultado de ANOVA de dos factores indica que hay diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.05$). El procedimiento de comparaciones múltiples de Tukey muestra diferencias significativas entre glibenclamida con EF, AM, EM Y AF.

Tratamientos mg/kg	Tiempo 0 mg/dl	Tiempo 1 15 min mg/dl	Tiempo 2 30 min mg/dl	Tiempo 3 60 min mg/dl	Tiempo 4 120 min mg/dl
Control	86 ± 5.6	131 ± 15	119.5 ± 30	112.5 ± 13.4	93 ± 9.9
Glib 10	86.5 ± 0.7	118 ± 7.1	100 ± 1.4	78 ± 8.5	51 ± 7.1
EM 250	98.5 ± 7.2	133 ± 17.1	115 ± 10	96.5 ± 7	92.25 ± 0.5
AF 100	88 ± 6.2	124.5 ± 22.2	113.7 ± 17.3	109.75 ± 24	95 ± 10.9
EF 100	92 ± 7.7	114.5 ± 9.7	103 ± 11.3	98.25 ± 1.7	86.5 ± 8.4
AM 100	97 ± 8.8	117 ± 19	99.75 ± 3.1	104.75 ± 10	92 ± 7

Tabla 2.- Efecto de los extractos de *L. edodes* en las curvas de tolerancia a la glucosa. Se presenta la media y desviación estándar ($X \pm DE$) de 4 experimentos.

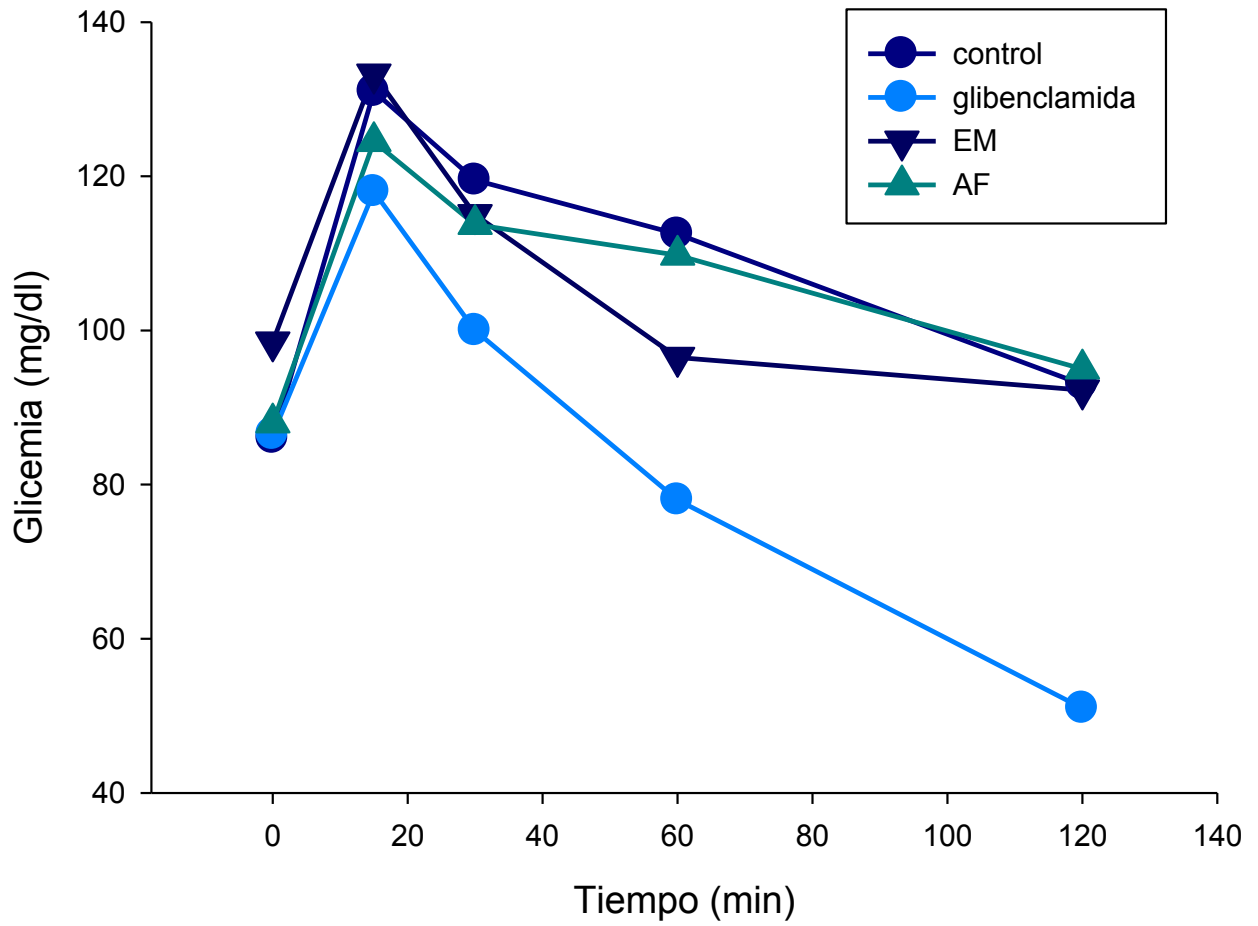


Figura 7.- Efecto de los extractos EM y AF sobre las curvas de tolerancia a la glucosa. Se presenta la $X \pm DE$ de 4 experimentos.

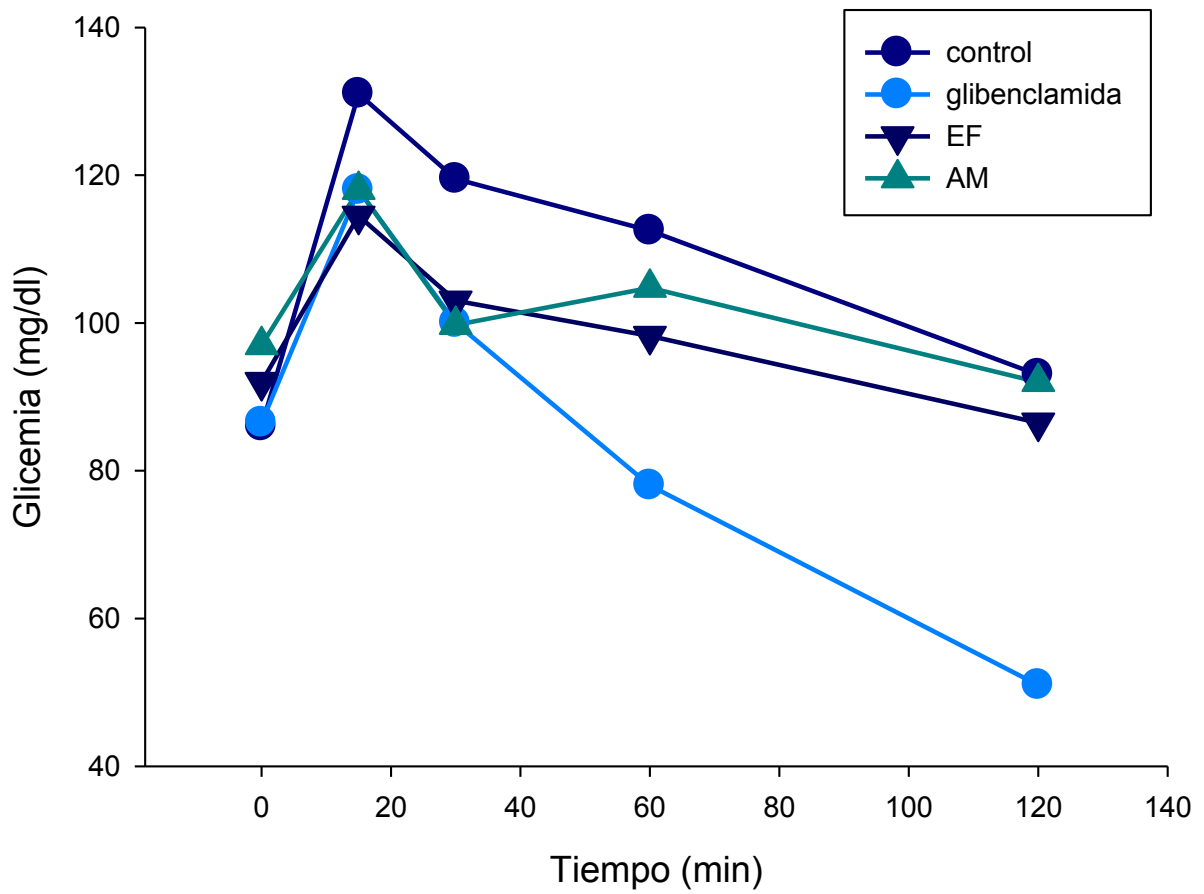


Figura 8.- Efecto de los extractos EF y AM sobre las curvas de tolerancia a la glucosa. Se presenta la $X \pm DE$ de 4 experimentos.

La curva de tolerancia a la glucosa es una prueba que mide la capacidad que tiene el organismo para metabolizar glucosa, cuando existe alguna alteración en el metabolismo de los carbohidratos se puede mostrar alteraciones en la curva (Trujillo, 2007). Para determinar qué efecto tuvieron los extractos en la curva se compararon con los niveles de glucosa que una rata sana debería de tener. De acuerdo con Urzúa, 2011, no existen cifras de corte que determinen la presencia de niveles altos de glucosa en ratas, proponiendo los siguientes parámetros, a partir de mediciones a 22 ratas Wistar en ayuno nocturno de 12 hr:

- Niveles de glucosa en ratas sanas: 80-115 mg/dL
- Glicemia basal alterada: ≥ 126 pero < 140 mg/dL
- Intolerancia a la glucosa: ≥ 140 pero < 200 mg/dL
- Diagnóstico Diabetes Mellitus: ≥ 200 mg/dL

Al grupo que se le administró el extracto EM (figura 7) tuvo una tendencia análoga al grupo con glibenclamida, llegando a un pico máximo de glucosa similar en tiempo 1 (15 minutos) con 118 mg/dl y 133 mg/dl de glucosa, respectivamente; los datos de glucosa postprandial que se observan en la figura muestran una disminución mayor en comparación con el grupo control de solución salina, de manera en que la regulación a tiempo 4 fue de 51 mg/dl para glibenclamida y 92.25 mg/dl de EM, lo cual demuestra que dentro de los niveles de glucosa en ratas sanas fue mejor regulado a los niveles basales por el extracto EM. La actividad de la glibenclamida, que es un medicamento de mecanismo de acción pancreático, incrementa la secreción de insulina al unirse a receptores específicos de la célula β se inhiben canales de K^+ , provocando la apertura de canales de Ca^{++} , desencadenando la exocitosis en la membrana celular translocándose los gránulos secretores que dan lugar a la liberación de la insulina (Lisson, 1999).

En el caso del extracto AF el comportamiento fue análogo al grupo control de 0.9% sol. salina, los niveles de glucosa se mantuvieron como una curva de tolerancia normal en ratas sanas que después de la carga de glucosa suministrada se reguló de 124.5 mg/dl a los 120 min con 95 mg/dl.

Los extractos EF y AM tuvieron un efecto similar al no alterar la glucosa basal después de una carga de glucosa, en los resultados obtenidos la glicemia fue menor en comparación a la tendencia de una curva de tolerancia normal, ya que los datos que arrojan en tiempo 1 después de una carga de glucosa, entran dentro de los niveles de glucosa basal no alterada (80-115 mg/dl), siendo que los demás grupos se altera esta glucosa basal mayor a 126 mg/dl.

La baja concentración registrada de glucosa en los dos grupos de ratas para EF y AM infiere un patrón antihiperглиcémico por parte de los extractos; es decir tiene un impacto en la disminución de la glicemia postprandial, que puede ser dada por acción de inhibidores de α -glucosidasas, que inhiben la hidrólisis de los hidratos de carbono en el tubo digestivo y retrasan su absorción (Rodríguez, 2012). Estas enzimas están localizadas fundamentalmente en el borde de las vellosidades del intestino delgado, y su inhibición produce un retraso en la digestión de los carbohidratos (Calle, 2001). Es por eso que con base a estos resultados se realizaron ensayos para determinar la acción inhibitoria sobre α -glucosidasas presente en ambos extractos.

Actividad Inhibitoria sobre α -glucosidasa

Las glucosidasas localizadas en las vellosidades de la superficie de la membrana intestinal, son enzimas clave en la digestión de carbohidratos. La administración oral de inhibidores de glucosidasas retarda la digestión y absorción de carbohidratos y modulan así, la elevación de la glucosa postprandial en sangre. Los resultados demuestran que hay

actividad inhibitoria prometedora frente a α -glucosidasa por parte del extracto EF como se puede observar en las figuras 9 y 10; ya que muestran un IC_{50} de 1.4 mg/mL con respecto al IC_{50} de la acarbosa 0.31 mg/mL. Estos resultados se asemejan con los reportados por Brindis *et al.*, en 2013, donde el extracto acuoso de *Annona macrophyllata* inhibe la actividad de la α -glucosidasa con un bajo IC_{50} de 1.18 mg/mL y su control con acarbosa es de 0.27 mg/mL. Al igual Escandón *et al.*, en reporta un IC_{50} 0.169 mg/mL de extracto acuoso de *Brickellia cavanillesi* vs 1.12 mg/mL para acarbosa. Los resultados comparados no difieren mucho de los obtenidos por el extracto EF, por lo tanto se puede inferir que el extracto acuoso de cuerpo fructífero de *L. edodes* tiene un efecto antihiper glucémico. En el caso del extracto AM (figura 11) se obtuvo una respuesta diferente, con variaciones de los % de inhibición con la concentración de sustrato, que no muestran una tendencia de inhibición para α -glucosidasas, estas variaciones pueden ser debidas a la mezcla de compuestos que pueden estar presentes en el extracto, que al contrario de acarbosa, siendo una sustancia pura se puede observar una curva típica de inhibición.

El hongo *L. edodes* ha sido investigado por sus propiedades medicinales, como en este trabajo, los resultados obtenidos apoyan la idea de que el hongo puede actuar de diferentes formas ante la regulación de la glicemia. Una como estimulador a nivel pancreático para incrementar la secreción de insulina, por parte del extracto etanólico de micelio, y otra como controlador de la glicemia postprandial, mediada por la regulación en la absorción de la glucosa a nivel intestinal, inhibiendo la acción de α -glucosidasas que el extracto etanólico de cuerpo fructífero mostró en su acción.

Este efecto de los extractos en la regulación de la glicemia puede deberse a la presencia de compuestos medicinales. Nutricionalmente, el hongo tiene gran valor debido a que es un buen recurso de vitaminas, aminoácidos, fibra dietaria, proteínas y alto contenido de

minerales como Fe, K y P (Staments, 2000), que ayudan a la salud humana, además de contar con metabolitos secundarios que han resaltado en su investigación con propiedades medicinales, ya que pueden constituirse en una valiosa fuente de nuevos compuestos con potencial aplicación terapéutica (Ávila, 2009).

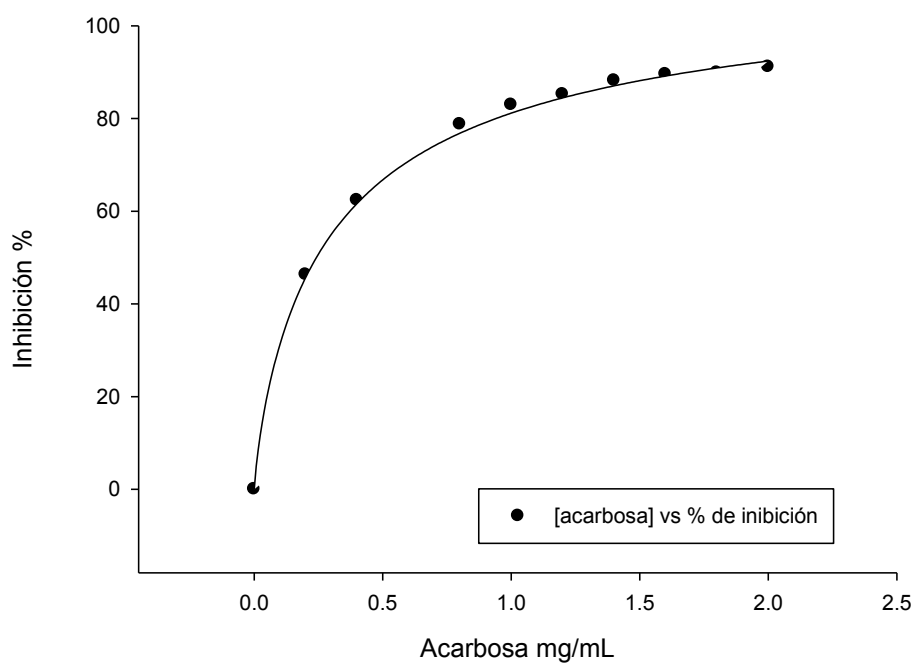


Figura 9.- Inhibición de α -glucosidasa por acarbosa, se calculó una IC_{50} de 0.31mg/mL. Se presenta una curva representativa de 3 repeticiones.

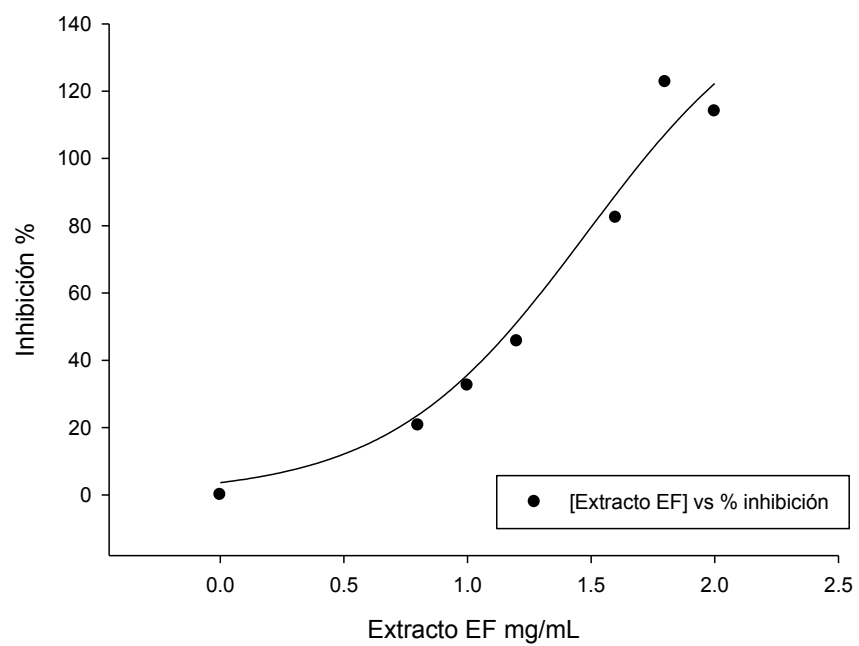


Figura 10.- Inhibición de α -glucosidasa por el extracto etanólico de cuerpo fructífero con un IC_{50} de 1.4 mg/mL.

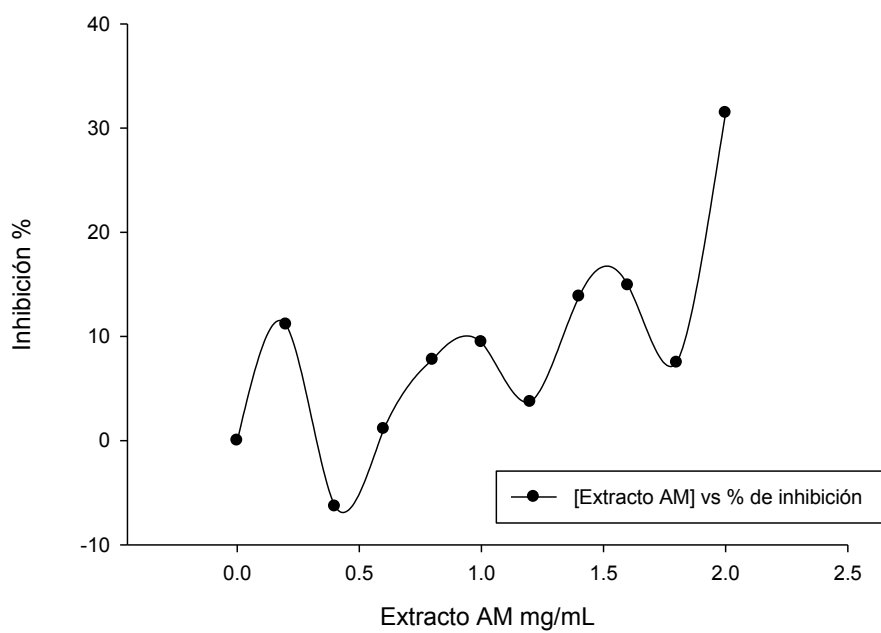


Figura 11.- Inhibición de α -glucosidasa por el extracto acuoso de micelio.

El uso de la extracción es un método que hace posible encontrar la presencia de compuestos como triterpenos, flavonoides, fenoles, esteroides, polisacáridos, entre otros. Formando parte de la gran variedad de compuestos aislados de este hongo y que exhiben marcada actividad biológica y farmacológica, se encuentran polisacáridos como β - glucano, el cual es el principal componente de *L. edodes* y que presenta un marcado efecto anticancerígeno e inmunomodulador (Ávila, 2009). En estudios anteriores se han reportado que los hongos de la Clase *Agaricomycetes* como *Coprinus comatus* y *Griofola frondosa* tienen potencial para el tratamiento de regulación de glucosa alta en sangre, coincidiendo con Manohar en 2002, que designa el principal mecanismo de acción de los β -*glucanos* del hongo Maitake, al disminuir la absorción de glucosa, reduciendo el índice glicémico, mitigando un efecto de bolo de rápida absorción de glucosa. De esta forma los resultados de la aplicación de los extractos en este trabajo de *L. edodes* podrían mostrar estas propiedades terapéuticas familiarizadas con el contenido de posibles polisacáridos que ayuden a la regulación de la glicemia.

Aunado a lo anterior, el reporte de la presencia de polifenoles en algunos macromicetos y la actividad antioxidante atribuida al Shitake, permiten presumir que debe contener polifenoles y flavonoides (Choi *et al.* 2005). Estos compuestos son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua o solución alcohólica. Entre los compuestos polifenólicos se encuentran los flavonoides, ampliamente distribuidos en plantas, tienen una importante actividad antioxidante, la cual es debida a varios mecanismos como son atrapamiento de las especies reactivas de oxígeno, enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos. Asimismo pueden atrapar radicales libres, son estos los que se consideran que afectan en mayor medida el deterioro de las células. Shiitake se reporta que un extracto polar del cuerpo fructífero muestra una moderada actividad antioxidante (Ávila, 2009).

Zamora en 2013 realizó una cuantificación de fenoles, encontrando una alta cantidad de estos compuestos en el micelio de *L. edodes* cultivado en medio líquido. Los fenoles, aparte de tener actividad antioxidante, funcionan también como activador directo para la translocación de los transportadores GLUT4, permitiendo la entrada de glucosa en la célula, reduciendo de esta manera los niveles de glucosa libre en sangre (Rodríguez, 2012). Aspectos directos e indirectos demuestran que el hongo tiene una relevancia importante para el futuro, con la búsqueda del principio activo del extracto y el estudio más refinado por el beneficio terapéutico en regulación de la glicemia, se podría desarrollar un tratamiento que vaya más allá de la medicina tradicional o natural alternativa.

Conclusiones

- Los resultados obtenidos apoyan la idea de que los extractos de *L. edodes* actúan como reguladores de la glicemia en dos formas: Como estimulador pancreático y como inhibidor de la actividad de α glucosidasa.
- La propagación de la cepa de *L. edodes* es eficaz en medio sólido de Agar dextrosa papa
- La producción de micelio en medio líquido de maltosa + glucosa favorece su crecimiento

Referencias Bibliográficas

- ❖ Aguilar Doroteo, L. (2007). Producción de inóculo líquido para el cultivo de *Pleurotus spp.* (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional. México.
- ❖ Ávila Castañeda, I. M. (2009). “Estudio de los compuestos polifenólicos con énfasis en flavonoides del hongo *Lentinula edodes* y determinación de la actividad antioxidante”. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Química. Bogotá.
- ❖ Brindis, H. F., Gonzáles, T. E., González, A. M., Aguirre, H. E., y Villalobos, M. R. (2013). Aqueous Extract of *Annona macrophyllata*: A Potential α -glucosidase Inhibitor. BioMed Research International. ID 591313.
- ❖ Calle Pascual, A. L., Charro Salgado, A. L. (2001). Acarbosa y diabetes mellitus: Implicaciones prácticas. Ann. Med. Interna (Madrid). vol.18, n.5, pp. 5-9.
- ❖ Carrillo, L. (2003). Microbiología Agrícola. Universidad Nacional de Salta. (pp. 105-107). Argentina.
- ❖ Choi, Y., Lee, S., Chun, J., Lee H y Lee J. (2005). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. Food Chemistry. 99:381-387.
- ❖ Escandón R. S y Mata E. R. (s/a). Compuestos inhibidores de alfa glucosidasas de *Brickellia cavanillesii*. Tesis maestría. Facultad de Química. UNAM.
- ❖ García Cruz, I. (2003). Experimentación de diferentes tipos de sustratos para el cultivo de *Lentinus edodes* (shiitake) y su desarrollo químico-biológico. (Tesis). Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México.
- ❖ Garza, O.L., Ramírez, G. X., Garza, O. F., Salinas, M. C., Waksman, T. N., Alcaraz, C. Y., y Torres, A. O. (2006). Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos de macromicetos del noreste de México. Ciencia UANL, Vol. 9 (2).

- ❖ González Villa, A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. (Tesis). Universidad Nacional de Colombia- Sede Manizales.

- ❖ Han C., Yuan J., Wang Y y Li L. (2006). Hypoglycemic activity of fermented mushroom of *Coprinus comatus* rich in vanadium. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 20. Beijing China.

- ❖ Lisson Abanto, R. (1999). Glibenclamida en diabetes mellitus. Hospital Nacional E. Rebagliati Martins. Instituto Peruano de Seguridad Social. Revista Farmacológica Terap (Lima) Vol. 6 (1-2).

- ❖ Lo, Hui. C. y Wasser, S. P. (2011). Medical mushrooms for glycemic control in diabetes mellitus, history, current status, future perspectives and unsolved problems. International Journal of Medicinal Mushrooms, 13(5): 401–426.

- ❖ Manohar, V., Talpur, N.A., Echard, B.W., Lieberman S., y Preuss, H.G. (2002). Effects of a water-solution extract of maitake mushroom on circulating glucose/insulin concentrations in KK mice. Diabetes Obes Metab ;4(1):43-8

- ❖ Martínez, C. D., Sobal M., Morales P., Martínez W., Martínez M., y Mayett Y. (2004). Los hongos comestibles: Propiedades nutricionales, medicinales y su contribución a la alimentación mexicana el Shiitake. Instituto de Ciencias, UPAEP, IMINAP A.C. México. 48 pp.

- ❖ Martínez, C. D., Morales P., Sobal M., Bonilla M., y Martínez W. (2007). México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. ECOSUR-CONACYT, México.

- ❖ Murillo E., Tique M., Ospina L. y Lombo O. (2006). Evaluación preliminar de la actividad hipoglicemiante en ratones diabéticos por aloxano y capacidad antioxidante in vitro de extractos de *Bauhinia kalbreyeri harms*. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas; núm. 1. 0034-7418.

- ❖ Nieto, R.I., Rojas, L. R., y Suarez, A. C. (2012). Evaluación del estípite de Shiitake como aportante de fibra y bioactivos con miras a su empleo en alimentos funcionales. Universidad de Antioquia, Medellín. Colombia. Vol. 19 (1) pp. S331-S333.
- ❖ Piqueras J. (2004). Los hongos como alimentos funcionales. A.M. Fontiquer 2:46-49.
- ❖ Rivera Morales, O. A. (2010). Estudio del efecto de la adición del estípite de Shiitake (*Lentinula edodes* Berk. Pegler) y de un extracto rico en sus polisacáridos sobre las cualidades nutricionales del antiparásito. (Tesis). Programa de Interfacultades Especialización y Tecnología de Alimentos. Bogotá DC.
- ❖ Rodríguez García, V. (2012). Extracción y purificación del inhibidor de α -amilasa de diferentes variedades mejoradas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y su efecto *in vivo*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- ❖ Rojas Luna, J. R. (2012). Estudio químico y de potencial antimicrobiano del estípite de shiitake (*Lentinula edodes*) y su factibilidad de empleo como ingrediente nutracéutico en la preparación de alimento aviar. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencia. Bogotá Colombia.
- ❖ Salvo Miranda. P. (2008). Evaluación *in vitro* del efecto Antiproliferativo de Polisacáridos obtenidos desde el micelio de *Agrocybe aegerita* y *Hericium erinaceum*, sobre células tumorales N2A y JURKAT T. (Tesis). Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Valdivia.
- ❖ Saritha, L. K., Usha, P.T.A y Chandrasekhara, A. M. (2009). Hypoglycaemic effect of *Pleurotus ostreatus* in rats. Indian J. Anim. Res., 43 (2): 139-141.
- ❖ Suárez Arango, C. (2010). Obtención in vitro de micelio de hongos comestibles, shiitake (*Lentinula edodes*) y orellanas (*pleurotus ostreatus* y *pleurotus pulmonarius*) a partir de aislamientos de cuerpos fructíferos, para la producción de semilla. (Tesis). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.

- ❖ Staments, P. (2000). Growing gourmet and medicinal mushrooms. McGraw-Hill. Canadá.
- ❖ Trujillo Arriaga. H. M. (2007). La curva de Tolerancia a la glucosa oral. Un enfoque alternativo. UAM-I. Ingeniería Biomédica.
- ❖ Urzúa García, Z. (2011). Efectos crónicos de la cafeína sobre el nivel y Tolerancia a la glucosa en ratas sanas y con Diabetes *mellitus* experimental. (Tesis de maestría). Universidad de Colima Facultad de Medicina. México.
- ❖ Zamora M. E. (2013). Caracterización química parcial de los extractos de *Lentinula edodes* (Berk) Pegler. (Shiitake), empleando disolventes de diferentes polaridades. (Tesis). Universidad Nacional Autónoma de México. México.