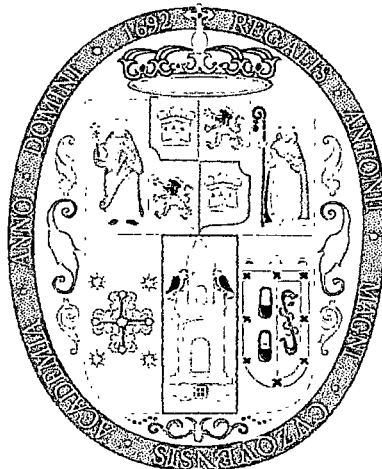


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**CULTIVO DEL HONGO *Pycnoporus sanguineus* (L: Fr) Murr.
PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA EN
PROMASTIGOTES DE LEISHMANIA.**

TESIS PRESENTADA POR LOS BACHILLERES:

Nohely Chany Bautista Valverde

Paul Ricardo Sánchez Huamán

Para optar al título profesional de Biólogo

ASESORA : Blga. María E. Holgado Rojas

CO-ASESORA : Quim. Janet Gonzáles Bellido

CUSCO – PERÚ

2011
“TESIS AUSPICIADA POR EL CONSEJO DE INVESTIGACION UNSAAC”

CONTENIDO

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

INTRODUCCION

JUSTIFICACIÓN

HIPOTESIS

OBJETIVOS

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

	Pág.
1.1 ANTECEDENTES.....	12
1.2 Generalidades del reino Fungí	16
1.3 Posición taxonómica del hongo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	17
1.4 Características generales del Phylum Basidiomycota.....	17
1.5 Características generales de la Clase Hymenomycetes.....	18
1.6 Orden Aphyllophorales.....	18
1.7 Familia Polyporaceae.....	20
1.8 Generalidades de la especie <i>Pycnoporus sanguineus</i>	21
1.8.1 Características Macroscópica.....	21
1.8.2 Características Microscópica.....	22
1.8.3 Sinónimos de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	23
1.8.4 Distribución Geográfica.....	24
1.8.5 Etnomicología de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	24
1.8.6 Actividad leishmanicida del hongo medicinal <i>Pycnoporus sanguineus</i>	25

1.9	CULTIVO DE HONGOS MEDICINALES	26
1.9.1	Historia del cultivo de los hongos medicinales.....	26
1.9.2	Fases del cultivo de hongos medicinales.....	29
1.10	LA LEISHMANIASIS.....	32
1.10.1	La Leishmaniosis en el Perú.....	32
1.10.2	Descripción de la Enfermedad.....	32
1.10.3	Tipos de Leishmaniasis.....	33
1.10.3.1	Leishmaniosis Cutánea.....	33
1.10.3.2	Leishmania Mucosa.....	34
1.10.3.3	Leishmania Visceral.....	34
1.10.4	El parásito: Leishmania.....	35
1.10.4.1	Posición Taxonómica de Leishmania	35
1.10.4.2	Morfología	36
1.10.4.3	Ciclo Biológico.....	37
1.10.5	Tratamiento utilizado para la leishmaniosis.....	38
1.10.5.1	Mecanismos de acción de los antimoniales pentavalentes.....	39

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1	ZONA DE COLECTA DEL HONGO <i>Pycnoporus sanguineus</i>	41
2.2	MATERIALES.....	43
2.2.1	Material Biológico.....	43
2.2.2	Equipos y aparatos.....	43
2.2.3	Reactivos.....	43

2.2.4	Medios de cultivo comerciales.....	44
2.2.5	Medio de cultivo preparado.....	44
2.2.6	Otros materiales.....	44
2.3	MÉTODOS.....	45
2.3.1	COLECTA DE LA MUESTRA DEL HONGO <i>Pycnoporus sanguineus</i>	45
2.3.2	CULTIVO DEL HONGO <i>Pycnoporus sanguineus</i>.....	45
2.3.2.1	Aislamiento a partir de pseudotejido.....	45
2.3.2.2	Selección del medio de cultivo óptimo para la propagación demicelio.....	46
2.3.2.2.1	Tratamiento estadístico.....	46
2.3.2.3	Producción de Spawn "semilla del hongo".....	47
2.3.2.4	Preparación del sustrato final.....	48
2.3.2.5	Inoculación e incubación.....	49
2.3.2.6	Inducción a la fructificación.....	49
2.3.2.7	Cosecha.....	50
2.3.2.8	Evaluación de la producción.....	50
2.3.2.8.1	Tratamiento estadístico.....	51
2.3.3	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DEL HONGO <i>Pycnoporus sanguineus</i>.....	51
2.3.4	BIOTOXICIDAD en <i>Artemia salina</i> Leach.....	53
2.3.4.1	Cultivo de <i>Artemia salina</i>	53
2.3.4.2	Preparación de extractos y adición de nauplios.....	53
2.3.4.3	Determinación de la dosis letal media (DL ₅₀) mediante el medio Probit	54
2.3.5	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA.....	55
2.3.5.1	Cultivo de promastigotes de Leishmania.....	55

2.3.5.2	Comparación de la actividad leishmanicida de los extractos de los carpóforos silvestres y cultivados de hongo <i>Pycnoporus sanguineus</i> ..	56
---------	---	----

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1	COLECTA DEL HONGO <i>Pycnoporus sanguineus</i>	58
3.2	CULTIVO DEL HONGO <i>Pycnoporus sanguineus</i>	59
3.2.1	Aislamiento a partir de pseudotejido.....	59
3.2.2	Selección del medio de cultivo sólido óptimo para la propagación Del micelio vegetativo.....	61
3.2.3	Obtención de cuerpos fructíferos cultivados.....	65
3.2.4	Evaluación de la producción.....	67
3.3	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO HONGO <i>Pycnoporus sanguineus</i>	69
3.4	Biotoxicidad de los extractos crudos de los carpóforos Silvestres y cultivados del hongo <i>Pycnoporus sanguineus</i> en <i>Artemia salina</i> Leach.....	71
3.5	Comparación de la actividad leishmanicida de los extractos De los carpóforos silvestres y cultivados del hongo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	74
	CONCLUSIONES.....	78
	RECOMENDACIONES.....	80
	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	81
	REFERENCIAS EN INTERNET.....	91
	ANEXOS.....	92

RESUMEN

El presente trabajo, tuvo como objetivo el cultivo del hongo *Pycnoporus sanguineus* (L: Fr) Murr para evaluar la actividad leishmanicida de los extractos de los carpóforos silvestres y cultivados. Los cuerpos fructíferos se colectaron en el distrito de Quellouno de la provincia de la Convención, los cuales fueron trasladados al Centro de Investigación y Producción de Hongos Alimenticios y Medicinales (CIPHAM) donde se realizó el proceso del cultivo, determinando como medio sólido óptimo para la propagación del micelio vegetativo el Agar extracto de malta con una velocidad de crecimiento micelial de 11,7 mm/día; siendo el sustrato óptimo para la obtención de cuerpos fructíferos el que contiene 19 % de salvado de arroz + 80 % de aserrín + 1 % de yeso (SAS), el rendimiento obtenido en este sustrato fue de 41,98 %, la eficiencia biológica de 83,97 % con una tasa de producción de 0,23 obtenidos a una temperatura de 16 °C. Los carpóforos silvestres y cultivados fueron llevados al Laboratorio de Química Orgánica, donde se obtuvieron los extractos etanólicos, evaluándose la Biotoxicidad en nauplios de *Artemia salina* Leach, determinando mediante el Método Probit que la dosis letal media (DL₅₀) para el extracto de los carpóforos silvestres es de 415,04 ug/mL y de los cultivados es 441,20 ug/mL, ambos valores se encuentran en la categoría de extractos moderadamente tóxicos.

La actividad leishmanicida de los carpóforos silvestres y cultivados se evaluó en promastigotes de cuatro especies de *Leishmania* determinándose para cada una de ellas la concentración efectiva media (CE₅₀) así en *Leishmania (Viannia) braziliensis* 229,58 y 197,76 ug/mL, en *Leishmania (Viannia) guyanensis* 180,68 y del 172,11ug/mL, en *Leishmania (Viannia) panamensis* 55,72 y 37,71ug/mL y en *Leishmania spp.* 275,78 y 219,86 ug/mL; respectivamente el análisis estadístico demostró que ambos extractos tienen la misma actividad leishmanicida.

DEDICATORIA

Por todo lo que significan en mi vida,

Por sus consejos que con paciencia siempre me brindan;

Por ese apoyo incondicional que solo en ustedes he encontrado;

Por la fortaleza, valor y confianza que me dan,

Por las alegrías y tristezas que nos ayudan a madurar y

Por todo el amor y cariño que siempre me han demostrado y que me ayuda a seguir en este proceso continuo de superación personal.

Por ello y por todo lo que con palabras no se puede expresar,

*Dedico este trabajo a Mis padres **RICARDO** y **SONIA**.*

Paul R.

*- A mis padres **JUAN Y TERESA** por el inmenso amor que me dan*

*A mis hermanos **JOHAN, MERY, ANTHONY** y **GUSTAVO,***

por su amistad y apoyo incondicional, los quiero -

Nohely Ch.

AGRADECIMIENTOS

- ✓ En especial a nuestra asesora Blga. MARÍA E. HOLGADO ROJAS, Directora del Centro de Investigación y Producción de Hongos Comestibles y Medicinales (CIPHAM) por todo el apoyo incondicional y facilidades brindadas durante nuestra vida universitaria y el desarrollo de la Tesis.
- ✓ A la Co asesora Química Janet González Bellido por brindarnos el apoyo y facilidades para realizar el trabajo de tesis en el laboratorio de Química orgánica.
- ✓ A las docentes Blga. Elsa Aguilar y Blga. Maritza Quispe por el apoyo brindado durante la realización de esta tesis.
- ✓ A todos los Docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas que con esmero y dedicación imparten sus conocimientos.
- ✓ A las Sras. Nelly Chávez, Dina Ayerbe y al Sr. Fidel Hincho por su amistad.
- ✓ Al Sr. Josue Concha Lovaton, por las facilidades brindadas para obtener información especializada de la biblioteca de la Facultad de Ciencias Biológicas.
- ✓ A nuestros amigos integrantes del CIPHAM por la amistad brindada, Joel Delgado, Albino Quispe.
- ✓ A Lugó Miranda B. por el apoyo brindado en la realización del presente trabajo.

INTRODUCCIÓN

Pycnoporus sanguineus (L: Fr) Murr., es un hongo de la familia Polyporaceae de color anaranjado y aspecto corchoso. Es considerado con potencial biotecnológico (Acosta, 2010) por los diferentes metabolitos que se encuentran presentes en el cuerpo fructífero entre ellos la cinabarina que presenta actividad antimicrobiana en protozoarios, antibacteriana hacia bacterias Gram positivas, Gram negativas así como actividad antiviral (Smânia, et al., 2003) también se encuentra la fenoxazin-3-ona (Achenbach y Blümm, 1991) el ergosterol-5,8-endoperóxido (Correa, 2005), las dihidroxinaftoquinonas (Chan, et al.; 2001) que son compuestos con actividad leishmanicida.

En el Perú, la leishmaniasis es la segunda enfermedad metaxénica de tipo tropical y la tercera causa de morbilidad por enfermedades transmisibles luego de la malaria y la tuberculosis (MINSA, 2006). El tratamiento consiste en la administración de antimoniales pentavalentes, pero su administración presenta varios inconvenientes como eficacia y toxicidad variable, con esquemas de tratamiento prolongado y resistencia del parásito al medicamento (Croft y Yardley, 2003), razón por la cual se llevó a cabo bioensayos para determinar la actividad leishmanicida del hongo *Pycnoporus sanguineus* en promastigotes de *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *Leishmania* (V.) *guyanensis*, *Leishmania* (V.) *panamensis* y *Leishmania* spp.

En el presente trabajo se evaluó también el crecimiento del hongo *Pycnoporus sanguineus* cultivado sobre sustratos de aserrín y cascarilla de cacao, determinando el rendimiento, la eficiencia biológica y la tasa de producción para una posible proyección comercial, permitiendo el aprovechamiento del hongo desde el aspectomedicinal.

JUSTIFICACIÓN

Se sabe que la leishmaniosis es una enfermedad crónica, de baja patogenicidad, alta morbilidad, metaxénica y zoonótica, producida por protozoarios del Phylum Sarcomastigophora del orden Kinetoplastida, hemoflagelados del género *Leishmania*, según la Organización mundial de Salud (OMS) indico que para el año 2002, esta enfermedad afecto a 12 millones de personas alrededor del mundo, estimándose 2 millones de nuevos casos por año; los casos de leishmaniosis en el Perú, se presenta en dos formas: el 75% de los pacientes reportados corresponden a la forma cutáneo andina o "Uta" (*Leishmania braziliensis peruviana*) y el 25% a la forma cutáneo mucosa " Espundia" (*Leishmania braziliensis braziliensis*).

Por otro lado, el tratamiento de la enfermedad consiste en la administración de antimoniales pentavalentes, su administración causa efectos secundarios como mialgia, pancreatitis, insuficiencia renal, neuropatía periférica, hepatotoxicidad y cardiotoxicidad, en la actualidad se ha reporta la resistencia del parasito a las drogas clásicamente empleadas, lo cual hace necesaria la búsqueda de nuevos medicamentos que reemplacen o complementen el tratamiento actual.

La Región Cusco, cuenta con una amplia diversidad biológica de macromicetos medicinales como *Pycnoporus sanguineus* (L: Fr) Murr en cuya pared celular se encuentran compuestos químicos con propiedades antiparasitarias que pueden actuar como leishmanicida; por lo que el cultivo de los cuerpos fructíferos además de permitir la obtención de los principio activo contra promastigotes de *Leishmania* contribuye a la conservación de los recursos genéticos con los que cuenta nuestra región.

HIPOTESIS

Los extractos crudos de los carpóforos del hongo *Pycnoporus sanguineus* (L: Fr) Murr. silvestres y cultivados tienen actividad leishmanicida *in vitro* en promastigotes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Cultivar el hongo *Pycnopus sanguineus* (L: Fr) Murr y evaluar la actividad leishmanicida de los carpóforos silvestres y cultivados en promastigotes de *Leishmania*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar el micelio y seleccionar el medio de cultivo sólido óptimo para la propagación vegetativa del hongo *Pycnopus sanguineus* (L: Fr) Murr.
2. Determinar el sustrato de cultivo óptimo para la obtención de cuerpos fructíferos del hongo *Pycnopus sanguineus* (L: Fr) Murr.
3. Evaluar la Biotoxicidad de los extractos crudos de los carpóforos silvestres y cultivados del hongo *Pycnopus sanguineus* (L: Fr) Murr en *Artemia salina* Leach.
4. Determinar y comparar la actividad leishmanicida de los extractos crudos de los carpóforos silvestres y cultivados del hongo *Pycnopus sanguineus* (L: Fr) Murr. en promastigotes de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis* y *Leishmania spp.*

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 Antecedentes del Cultivo de Hongos

- ❖ **Acosta, L., y col., 2010 (México) *Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico.** Es el primer reporte del cultivo del hongo *Pycnoporus sanguineus* donde evaluaron el crecimiento de cuatro cepas de *Pycnoporus sanguineus* (HEMIN-51, 52, 53, 54), cultivadas sobre diferentes medios de cultivo y sustratos lignocelulósicos. La cepa HEMIN-52 presentó mayor velocidad de crecimiento de 9mm/día, utilizando agar con harina integral de trigo (HIT). La cepa HEMIN-53 tuvo mejor productividad con una eficiencia biología (EB) de 63.3% y tasa de producción (TP) de 0.20 sobre el sustrato de aserrín de pino, encino y cedro.
- ❖ **Morales, O. y col. 2009 (Guatemala) Caracterización y producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas del hongo “Asan” (*Schizophyllum commune* Fr.)** Determinaron que las cepas *Schizophyllum commune* tuvieron mejor crecimiento micelial en los medios PDA y EMA a 26°C con velocidades de crecimiento de 6 y 4 mm/día respectivamente, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre ambos medios ($p < 0.05$). Los tiempos de colonización del micelio de las cepas hasta la cosecha de los cuerpos fructíferos fue de 48 días en el sustrato de caña de maíz + marlo picado en proporción de 1:1, obtuvieron una eficiencia biología (EB) en el sustrato mencionado de 5.50 %, con una tasa de producción (TP) de 0.19.

- ❖ **Villegas, V, y col., 2007 (Colombia) Evaluación de la producción del hongo *Lentinula edodes* Pegler en bloques sintéticos a base de residuos agroindustriales.** Evaluaron 55 diferentes combinaciones de sustratos determinando que el mejor sustrato que proporcione mejores condiciones para la formación de cuerpos fructíferos contenía 75% de aserrín de roble + 25% de salvado de trigo, obtuvieron un rendimiento (R) de 3.8% una eficiencia biológica (EB) de 21.5 % y una tasa de producción (TP) de 0.29.
- ❖ **González, R. y col. 2007 (Argentina) Cultivo del hongo *Ganoderma lucidum* sobre cáscara de girasol.** *Ganoderma lucidum* es un hongo muy apreciado por sus diversas propiedades medicinales. Evaluaron la cáscara de girasol como sustrato obteniendo mejor eficiencia biológica (EB) de 10.0 % en la mezcla de Cáscara de girasol + 5% salvado arroz y una tasa de producción (TP) de 0.40.
- ❖ **Barreto N., 1997 (Perú) Aislamiento y cultivo del hongo comestible “*Auricularia fuscosuccinea*” (Mont) Farlow, del valle de La Convención.** Indica que la técnica mas eficaz para el aislamiento de la cepa de *A. fuscosuccinea*, es a partir del carpóforo, incorporados en el medio de cultivo. El aislamiento también es factible a partir de las esporas del hongo; pero la probabilidad de obtener la cepa es menor que con la técnica anterior. Con un rendimiento (R) de 2.38 %, eficiencia biológica (EB) de 39.67 % y tasa de producción (TP) de 0.94 sobre el sustrato de aserrín de pino, encino y cedro.

1.1.2 Antecedentes de la actividad leishmanicida

Los siguientes antecedentes se tomaron en cuenta por la falta de trabajos de investigación en el tema, estos permitirán la comparación de los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación

- ❖ **Correa, E. y col., 2005 (Colombia) “Actividad leishmanicida de *Pycnoporus sanguineus*”** Mediante ensayos biodirigidos se aisló de *Pycnoporus sanguineus* (Polyporaceae) un compuesto activo contra amastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis*; su elucidación estructural se realizó mediante técnicas espectroscópicas (RMN ¹H y ¹³C y Espectrometría de Masas); este producto fue identificado como el ergosterol-5,8-endoperóxido, el cual presentó DL₅₀ de 15,4 µg/ml y una CE₅₀ de 4,10 µg/ml, en amastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis*.
- ❖ **Rojas, J.; y col, 2009 (Perú) Actividad leishmanicida de plantas medicinales de la amazonia Peruana:** De las 8 especies vegetales evaluadas (*Ampelozizyphus amazonicus*, *Andira inermes*, *Bellusia pentamera*, *Couma macrocarpa*, *Croton lechleri*, *Unonopsis spectabilis*, *Urena lobat and*, *Xilopia parviflor.*) frente a promastigotes de *Leishmania*, la especie vegetal *Unonopsis spectabilis* es la mas activa con una concentración efectiva media (CE₅₀) de 65.3, 54.2, y 24.5 µg/mL frente a *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. donovani* respectivamente. Las dos fracciones con valores de CE₅₀ µg/mL que van desde 7 a 9 ug/mL respectivamente resultó tener mayor actividad que la droga control (Pentamidina CE₅₀ = 10 ug/mL).

- ❖ **Alzamora, L., y col 2007 (Perú), Actividad leishmanicida de los extractos metanólicos de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum*, Chacón (Brassicaceae).** De los 4 ecotipos de *Lepidium peruvianum* no se evidenció diferencia significativa entre estos. El análisis de los datos de acuerdo a los días de cultivo, permitió determinar que la dosis de 400 µg/ml del extracto metanolico del ecotipo morado de *L. peruvianum* mostró mejor actividad leishmanicida (82,58 %).
- ❖ **Brito, S.; y col., 2006 (Colombia) Eficacia de un ácido kaurénico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asteraceae) contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*.** Este compuesto mostro un potente efecto antiparasitario tanto en amastigotes axénicos como en promastigotes de *Leishmania (Viannia) braziliensis*; obteniendo dosis letales medias (DL₅₀) de 0.25 ug/ml y 0.78 ug/ml respectivamente, en 24 horas de evaluación.
- ❖ **Ruíz, P. G., y col.,2004 (Colombia) “Actividad Leishmanicida y Tripanocida de algunas plantas reportadas como medicinales en Colombia”** Ocho extractos crudos de especies vegetales provenientes de la flora Colombiana, fueron evaluadas in vitro frente a tres especies de *Leishmania* (promastigotes): *L. amazonensis*, *L. donovanni* y *L. braziliensis*; y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*; donde dos de los extractos correspondientes a las especies vegetales *Acnistus arborescens* y *Piper cumanense* mostraron alta actividad leishmanicida en los ensayos realizados con valores de concentración efectiva media (CE₅₀) menores de 12,5 µg/ mL; cercanos a los obtenidos con el fármaco de referencia pentamidina 10 µg/mL.

1.2 Generalidades del Reino Fungi

Este reino tiene aproximadamente 103 órdenes, 484 familias, 1979 géneros y unas 100 000 especies descritas. Se dividen en cuatro grupos o phylum: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota. (Mueller, 2001)

Son organismos heterótrofos, dependen de otros organismos, vivos o muertos para obtener su alimento. Los hongos tienen una forma de nutrición característica y altamente exitosa. Requieren compuestos orgánicos preformados como fuente de energía y de carbono como monosacáridos, aminoácidos y ácidos orgánicos, que absorben a través de la membrana celular. (Deacon, 2006)

El cuerpo vegetativo del hongo puede ser unicelular (como en el caso de las levaduras) o estar compuesto por filamentos llamados hifas. Las hifas (cada una formada por numerosas células) en conjunto se denomina micelio, conforman la fructificación y son de crecimiento apical. Las hifas están rodeadas por una pared que a menudo, aunque no siempre contiene quitina (el mismo elemento con el que está compuesto el exoesqueleto de los insectos) mientras que en las plantas predomina la lignina y la celulosa. Forman esporas que son las células con las que se reproduce y dispersan. Son organismos no vasculares. Esto significa que no tienen tejidos especializados en el transporte. (Sánchez, 2001)

1.2.1 Posición Taxonómica del hongo *Pycnoporus sanguineus*.

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Hymenomycetes

Orden: Aphyllophorales

Familia: Polyporaceae

Género: *Pycnoporus*

Especie: *P. sanguineus* (Mueller, 2001)

NC: Gunsa – Sumpe kallampa (Herrera, 1941)

Figura N° 01: Cuerpos fructíferos silvestres de *Pycnoporus sanguineus*



1.3 Características generales del Phylum Basidiomycota

Incluye hongos con formas de sombrilla, de coral, gelatinosas, globosas, entre otras, también los que tienen aspecto polvoriento o de mancha y crecen sobre diversas estructuras de las plantas (Flores, frutos, hojas, tallo o raíces). Algunos tienen importancia económica como las royas y los carbones. (Wright, 2006)

1.4 Características generales de la Clase Hymenomycetes

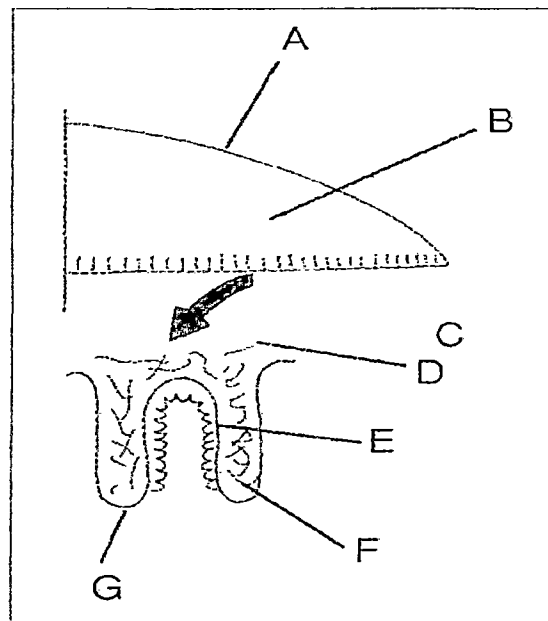
Sus representantes pueden ser *gimnocárpicos* (cuerpo fructífero que se abre desde etapas tempranas de su desarrollo para exponer la capa fértil que produce las esporas) como *hemiangiocárpicos* (comienza con una morfología angiocárpica que después se vuelve gimnocárpico). Poseen un himenio que se puede formar como una capa plana sobre la superficie de una planta hospedera, o dentro de los cuerpos fructíferos o basidiocarpos, caso en el cual se encuentra dispuesto en poros o alveolos, en tubos, sobre dientes o agujones, o sobre láminas; las basidiosporas son disparadas con fuerza. En cuanto a dimensiones y consistencia, los basidiocarpos pueden ser pequeños medianos o grandes desde carnosos y más o menos frágiles y efímeros hasta leñosos y de vida larga o perenne. (Mueller, 2001)

1.5 Orden Aphyllophorales

La mayor parte de estos hongos crecen sobre corteza o madera, de la que extraen sus sustentos. Es un grupo heterogéneo que incluye hongos de tipos muy diversos como son los cantarelos; los hongos en forma de costra y de repisa o ménsula, entre ellos los *Poliporus*: los hongos dentados, y los hongos claviformes, los coraloides y los semejantes a la coliflor. El basidiocarpo, o fructificación, es gimnocárpico; unilateral o anfígeno, según se presente el himenio solo en un lado o en toda la superficie del mismo, respectivamente. Dicho himenio puede estar dispuesto en una superficie lisa o un himenóforo verrugoso o papilado, dentado, plegado en forma de costillas, laminado, tubular o alveolar. El himenóforo está íntimamente ligado al contexto de la fructificación, de manera que no es fácil la separación de los dos sin producir el desgarramiento de los pseudotejidos en tanto que el

himenóforo de muchos agaricales en particular de los *Boletus* que pueden ser confundidos con algunos *Poliporus*, es posible separarlo con facilidad del contexto del píleo. También existen formas de transición entre Agaricales y Aphyllophorales: formas que tiene tubos ensanchados cuyos poros alargados semejan láminas, y formas con láminas anastomosadas que se confunden con las del himenóforo tubular y poroso. (Herrera y Ulloa, 1998)

Figura N° 02: Partes del basidiocarpo en el Orden Aphillophorales



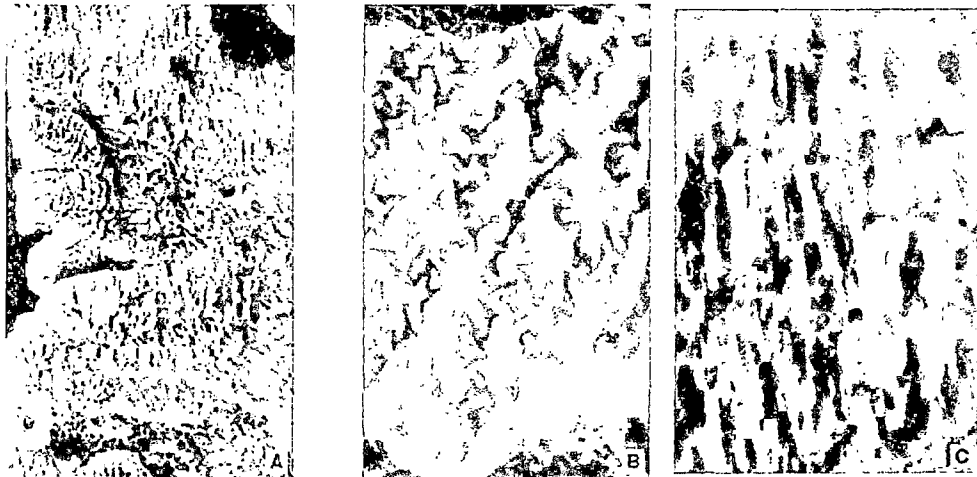
Fuente: Robledo, 2006

- A) Cubierta o corteza superior del píleo. B) Contexto C) Himenóforo D) trama del contexto E) himenio F) trama del disipamento G) borde del tubo (poro)

Las especies que tienen configuración himenial poroide también exhiben un grado de variabilidad notable. Por ejemplo los poros pueden ser isodiamétricos; radialmente elongados, irregulares y parcialmente hendidos; angulosos levemente dentados, de pared delgada; elongados e irregulares, laminares; laminares y parcialmente bifurcados, irregular y parcialmente hidnoides a dentados. Es también importante el color y el tamaño de los mismos. Para muchas especies el número de poros por mm es un carácter

taxonómico relevante aunque es sabido que hay ciertas tendencias a haber poros de mayor tamaño con la edad o especímenes de gran tamaño. Muchas veces los poros son tan diminutos, o el disepimento es tan delgado que solo pueden ser observados con la ayuda de una lupa de mano. (Wright, 2006)

Figura N° 03: Tipos de Himenóforo



Fuente: Wright, 2006

A) poride B) meruloide C) irspicoide

1.6 Familia Polyporaceae

Incluye un gran número de especies generalmente en forma de costra y de repisa, pero también comprende formas de abanico y de seta, estas últimas semejantes a las del género *Boletus*, del orden agaricales. El nombre de la familia alude a la característica del himenóforo casi siempre poroso, es decir esta formado por tubos de extremos libres que constituyen poros a través de los cuales salen las basidiosporas maduras; no obstante, esta familia también incluye formas con el himenóforo laminado o laminado – reticulado, en las que muchas veces resulta difícil precisar si hay láminas o poros. Son hongos anuales o perennes; en particular los leñosos llegan a vivir muchos años, a veces varias décadas. Algunos de estos, como los del género

Fomes, que pueden vivir de 80 a 90 años, forman una nueva capa de tubos cada año, de manera que el himenóforo se vuelve estratificado. Los poros por su forma según los géneros y las especies pueden ser circulares o alargados, cuadrangulares o poligonales; generalmente quedan situados en la parte inferior de la fructificación, por ejemplo en las formas de repisa, o debajo del píleo en las que semejan a las setas; pero a veces están dispuestas hacia arriba, en las formas aplanadas o extendidas sobre el sustrato, a manera de costra, las cuales reciben el nombre de resupinadas. El género *Polyporus*, es el más representativo de la familia, pero como es el más grande y heterogéneo, en la actualidad se tiende a fragmentarlo en varios géneros. (Herrera y Ulloa, 1998)

Una de las funciones más importantes de los hongos de esta familia es degradar o descomponer la materia orgánica (restos de animales muertos, hojarasca, madera, etc.) en compuestos que pueden ser asimilables por otros organismos, principalmente las plantas. En este sentido la madera es uno de los sustratos que presenta mayor dificultad para ser degradados. Existen numerosos grupos de hongos capaces de degradar madera pero los más importantes son los *Polyporus*. (Robledo, 2006)

1.7 Generalidades del hongo *Pycnoporus sanguineus* (L: Fr) Murr.

1.7.1 Características Macroscópicas

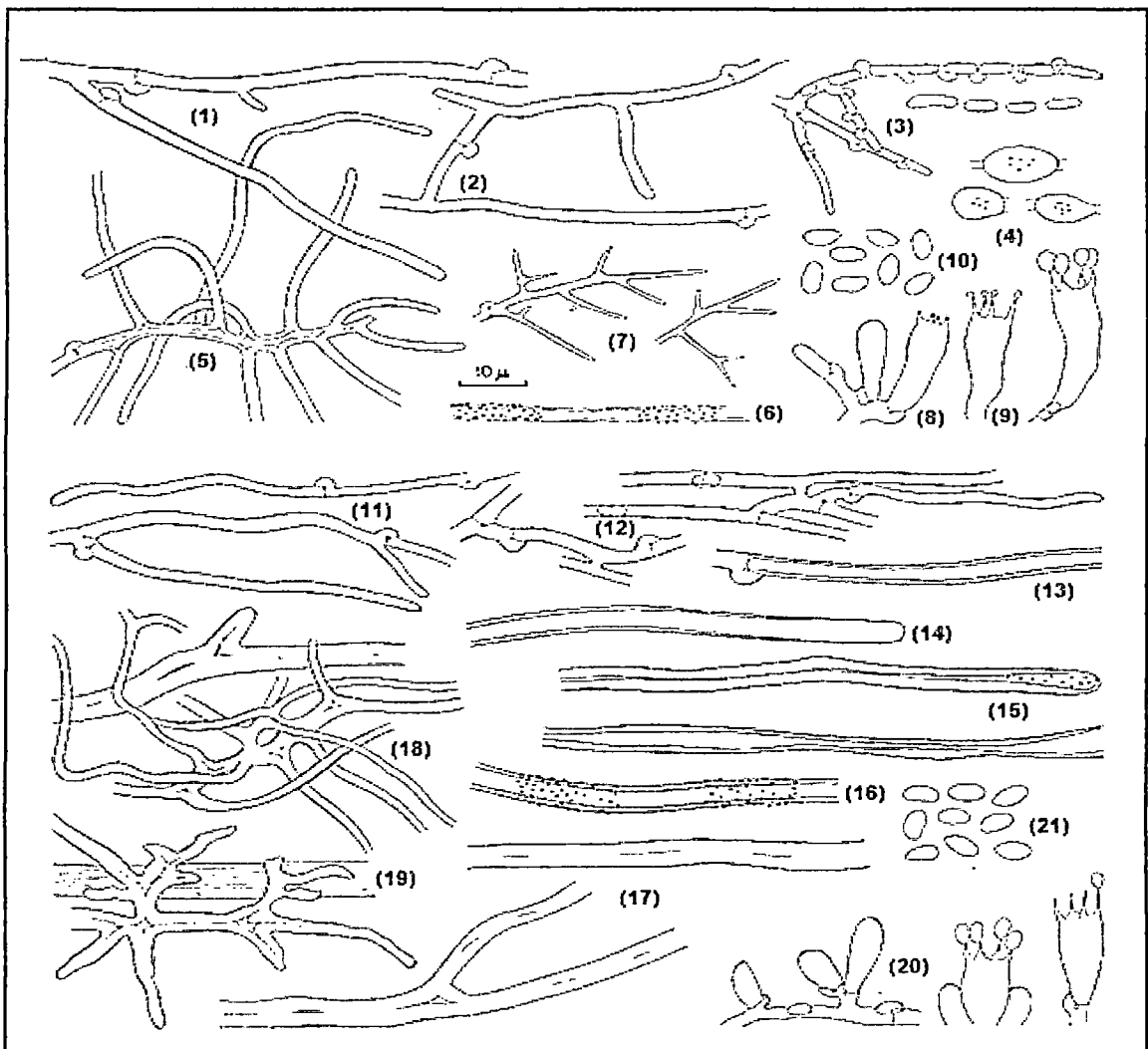
Cuerpos fructíferos con forma de repisa, semicirculares y de consistencia parecida al corcho cuando está fresco. El píleo tiene 1,5- 4,5 cm de ancho y 1 -4 cm de largo. La superficie es aterciopelada cuando muy joven y lisa cuando adulto, algunas veces rugosa, rojo anaranjado brillante cuando está húmedo y anaranjado rojizo a anaranjado amarillento cuando está muy seco.

El contexto tiene 0,2-0,8 cm de ancho y es rojo anaranjado. La superficie inferior o fértil está formada por tubos de 0,1-0,2 cm de longitud, anaranjado rojizo brillante, con 5-6 poros por milímetro, del mismo color que los tubos. No posee pie o estípote, ya que se adhiere lateralmente a la madera. Las esporas son blancas cuando están agrupadas. (Mata, H.; 2003)

1.7.2 Características Microscópicas

La especie se caracteriza por presentar un sistema hifal trimítico: de tres tipos de hifas presentes. La fructificación esta formada por hifas generativas, esqueléticas e hifas ligadoras.

Figura N° 04: Estructuras microscópicas del hongo *Pycnoporus sanguineus*



Fuente: Nobles, 2004

(Del 1 al 10). Estructuras del micelio.(1) Hifas de la zona de crecimiento. (2) Nudos-septos de las hifas del micelio aéreo. (3) Oidióforos y oidios. (4) Clamidosporas. (5), (6) Hifa de fibra bifurcada. (7). Hifas bifurcadas en forma de cuernos de ciervo. (8), (9) Basidios. (10) Basidiosporas. (Del 11 al 21). Estructuras microscópicas de los carpóforos. (11) Nudos-septos de las hifas del margen. (12) Nudos-septos de las hifas saliendo se anastomosan en las capas del margen y de la transición entre el contexto y los tubos. (13) El punto de origen de fibra ancha de la hifa, subtendido por una abrazadera. (14). Punta de la fibra ancha de la hifa, con paredes ligeramente ensanchadas y gruesas. (15) La fibra de la hifa con pared ligeramente irregular se ensancho en la parte superior. (16) La hifa de fibra ancha esta revestida por gránulos anaranjados. (17) Hifa del contexto espesa y amurallada. (18) Hifa estrechamente bifurcada en la zona de transición entre el contexto y trama. (19) Hifa de muros gruesos entrecruzados con las fibras bifurcadas del contexto. (20) Basidio. (21) Basidiosporas. Observaciones a 750X excepto 9, 10, 20, 21 a 900X. (Nobles, 2004)

1.7.3 Sinónimos de *Pycnopus sanguineus*

Debido a la confusión de las especies que engloba el género *Pycnopus*, se han realizados estudios taxonómicos, estableciendo que hay diferencias tanto macroscópicas como microscópicas de los basidiocarpos, como en las características del desarrollo del micelio en medios de cultivo y en áreas de distribución. Se reconocieron como sinónimo de *Pycnopus sanguineus* a *Coriolus sanguineus* (L.) G. Cunn., (1949), *Microporus sanguineus* (L.) Pat., (1900), *Polyporus sanguineus* (L.) Fr., (1821),

Polystictus sanguineus (L.) G. Mey., (1818),

Trametes cinnabarina var. *Sanguínea* (L.) Pilát, (1936),

Trametes sanguinea (L.) Lloyd, (1924). (Pérez, 1988)

1.7.4 Distribución Geográfica de *Pycnoporus sanguineus*

Esta especie se encuentra creciendo sobre diversos tipos de madera (*Quercus spp.*, *Pinus spp.* y otras fanerógamas no identificadas) en zonas perturbadas, tropicales, subtropicales y templados. (Pérez, 1988); se reporta al hongo *Pycnoporus sanguineus* como una especie cosmopolita (Pavlich, 1976)

En Cusco Provincia de la Convención, valle de Santa Ana, hacienda Sahuayaco, 900 a 2900 metros, (Herrera, 1924). En la Reserva del parque nacional del Manu (Trocha Unión – San Pedro) se encuentra distribuida en un rango altitudinal de 3450 a 1500 msnm. (Delgado, 2010)

1.7.5 Etnomicología de *Pycnoporus sanguineus*

Algunas tribus indígenas de América Latina lo pulverizan y aplican sobre las heridas para coagular la sangre (hemostático), previene las infecciones y también para eliminar verrugas en la piel. En África lo usan en infusiones para eliminar parásitos intestinales, problemas de la menopausia y otras enfermedades del vientre. En Asia se usa para bajar la fiebre, contrarresta problemas de reumatismo, artritis, gota, etc. Además activa la circulación sanguínea y se ha demostrado que tiene actividad antitumoral y *leishmanicida*. (Pérez, 1988) La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación realiza una publicación donde analiza algunos usos tradicionales y contemporáneos de los hongos como alimento o medicina, mencionando que al hongo *Pycnoporus sanguineus* se le da un

uso medicinal en: Australia, Gabón, México y La República Democrática del Congo; como alimento en: Brasil, Malawi, Papúa Nueva Guinea; en Hong Kong y en Perú se reporta como medicinal y comestible. (FAO. 2005)

1.7.6 Actividad Leishmanicida del hongo medicinal de *Pycnoporus sanguineus*

De las especies del género *Pycnoporus*, se han aislado varios compuestos intensamente coloreados del tipo fenoxazin-3-ona, que en primera instancia tienen una semejanza electrónica y topológica parcial con el residuo de pterina del ácido fólico, un limitante en el metabolismo de parásitos tales como leishmania, tripanosoma y malaria, como lo reportan. (Cunningham. y col; 2001)

Mediante ensayos biodirigidos se aisló de *Pycnoporus sanguineus* un compuesto activo contra amastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis*, este producto fue identificado como el ergosterol 5,8-endoperóxido. (Correa y col; 2005). Se determinó por espectrofotometría UV que la molécula encargada de dar color al cuerpo fructífero del hongo *Pycnoporus sanguineus* es la 3,5-dihidroxi-naftoquinona (Bautista. y col.; 2009). Las quinonas y bi-naftoquinonason metabolitos que tienen actividad leishmanicida en promastigotes de *Leishmania donovani*, ejerce su acción sobre la Topoisomerasa I del parásito, inhibiendo la acción catalítica de la enzima o estabilizando el complejo binario Topoisomerasa I - ADN. Por otra parte la hidroxinaftoquinona y naftoquinona, basan su acción en la perturbación de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria del parásito o en la generación de radicales libres durante la interacción de los metabolitos y la cadena respiratoria del parásito. (Chan. y col.; 2001)

1.8 CULTIVO DE HONGOS MEDICINALES

1.8.1 Historia del Cultivo de Hongos Medicinales

Los hongos han sido parte de la dieta humana desde tiempos inmemoriales. Se emplearon como alimento y medicina aún antes de que el hombre entendiera el uso de otros organismos. Hace 4.600 años, los egipcios los conocían como “las plantas de la inmortalidad” y creían que eran un alimento sólo para la realeza. En Mesoamérica se encontraron unas 400 figuras de piedra representando hongos. Las civilizaciones Maya y Azteca los usaban en rituales religiosos y como medicina. Muchos pueblos antiguos atribuían a los hongos propiedades mágicas tales como proveer fuerza sobre humana y conducir el alma al plano de los dioses. En la mitología europea antigua, los hongos se asociaban a las estaciones lluviosas y tormentosas y se creía que estaban formados por rayos. En la antigua Grecia, una leyenda cuenta que Perseo, cansado y sediento, al llegar a su nuevo reino pudo recuperarse gracias al agua recogida en el sombrero de un hongo, y fundó en ese lugar la ciudad de Miceba (de mykés, hongo en griego); es así que la gran civilización micénica recibió su nombre por un hongo. Los antiguos romanos, si bien los denominaron “*fungus*”, probablemente derivado de *funus ago* o “portador de la muerte”, adoptaron el consumo de hongos en su dieta. (Curvetto, 2009)

También la micología medicinal encuentra sus raíces en los usos tradicionales de los hongos en la antigua medicina de Oriente. Durante siglos, los cuidadores chinos de la salud emplearon hongos para tratar diferentes enfermedades. Ellos valoraron el poder de algunos hongos como de origen divino (por ejemplo, una diosa estaba asociada con el Reishi,

Ganoderma lucidum, el hongo medicinal por excelencia). (Jong y Birmingham, 1992; Yang et al., 2000).

Hacia finales de los años sesenta tanto los científicos Orientales como los Occidentales comenzaron a investigar los mecanismos por los cuales ciertos hongos tenían efectos positivos sobre la salud, encontrando que los componentes activos principales son polisacáridos, específicamente β -D-glucanos. (Chihara y col., 1969) que fueron aislados de los cuerpos fructíferos de *Lentinula edodes* "shiitake" un polisacárido antitumoral, soluble en agua que se nombró "lentinan". Éste era un descubrimiento mayor dado que el lentinan demostró una fuerte actividad antitumoral, previniendo el desarrollo de tumores provocados por virus y compuestos químicos en ratones y otros modelos experimentales de estudio (Berovic et al., 2003).

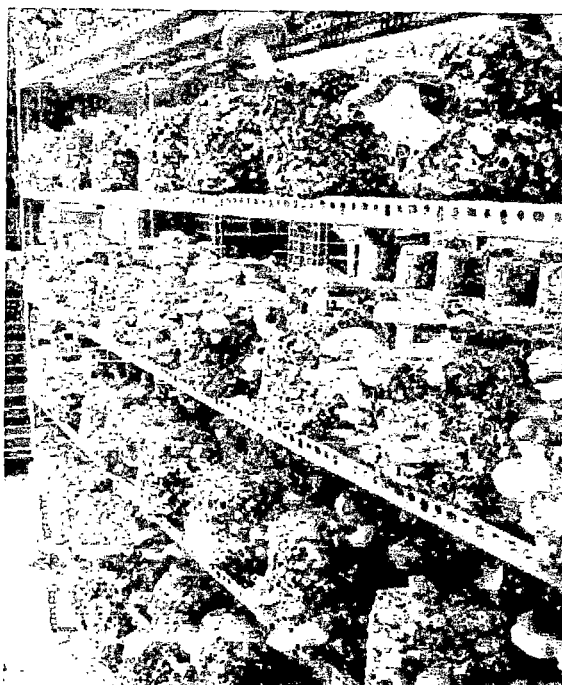
En 1965, en Japón se desarrolló una preparación muy popular y eficaz a partir del hongo *Trametes versicolor* (conocido previamente como *Coriolus versicolor*). Un polisacárido péptido de este hongo con el nombre de "Krestin" fue aceptado para el uso contra varios tipos de cáncer y fue cubierto por el plan oficial de salud japonés. El Krestin contiene 75% de glucanos y 25% de proteína (Hiroshi y Takeda, 1993). En los años 90, este compuesto significó el 25% de las drogas anti cancerígenas en Japón, con ventas por 350 millones de dólares (Sánchez, 2001).

Es así que durante los últimos 20 años, el interés en los aspectos medicinales de los hongos aumentó notablemente como lo demuestra la gran cantidad de estudios científicos realizados por un gran número de grupos de investigación, principalmente de hospitales e instituciones de investigación en Europa, Japón, China y los Estados Unidos, con trabajos en

un amplio espectro de diferentes publicaciones. Pero a partir del 2000 aparece una publicación especialmente dedicada al aspecto medicinal de los hongos para contribuir como fuente de información cubriendo diferentes aspectos de esta especialidad. Todos esos años de uso tradicional ya habían suministrado pistas sobre los hongos como fuentes potenciales de medicinas. En la actualidad, usando modernas herramientas analíticas los científicos han aislado e identificado componentes específicos que pueden ya sea destruir o por lo menos debilitar tres de las enfermedades asesinas de la humanidad: el cáncer, las enfermedades del corazón y el SIDA. (Curvetto, 2009)

En el Perú el cultivo comercial de hongos se inició en la década de los sesenta con la introducción del “champiñón” *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Pilát por la empresa COMPASS, sin embargo, no es sino hasta el ingreso de AGRÍCOLA LA CHACRA (dueña de la marca Don Hongo) y ya en los años ochenta con la entrada de la empresa “Paccu S.A.”, que el cultivo alcanzó niveles industriales. Posteriormente, en los años noventa se completó el panorama con la introducción del cultivo de *Pleurotus ostreatus* “setas”, por parte de las empresas SOLIS y SORI. Cabe destacar que en el 2008, la empresa “Mundo Fungi” logró introducir por primera vez la oferta de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler “shiitake” en estado fresco y cultivado localmente. (Chimey y Holgado; 2010)

Figura N° 05. Cultivo de *shiitake* (*Lentinula edodes*) por la empresa “Mundo Fungi”, en Lima, Perú, Ambiente de cultivo y fructificación del *shiitake*.



Fuente: Chimey y Holgado; 2010

1.8.2 Fases del cultivo de hongos medicinales

Independientemente de la técnica utilizada o de la especie cultivada el proceso se divide en siete fases: (Chimey, 2009)

❖ **Aislamiento, Selección y Conservación de las Cepas**

Es la fase en la cual se obtiene el micelio de un hongo silvestre, se realizan un conjunto de evaluaciones destinadas a verificar su potencial para su posterior uso en un proceso productivo, se incluyen además, el mejoramiento y la conservación de las cepas. (Sánchez, 2001)

❖ **Producción de Spawn o “Semilla”**

Esta fase corresponde a la proliferación de la biomasa micelial, que será utilizada en la etapa de inoculación del sustrato. (López, 2007)

❖ **Preparación del Sustrato**

Corresponde al proceso de elaboración del sustrato, que incluye (dependiendo de la técnica aplicada) la formulación de las mezclas de insumos, preparación y acondicionamiento de estos hasta su conversión en un medio adecuado para el crecimiento y desarrollo del hongo que se pretende cultivar. (MushWorld, 2005)

❖ **Inoculación e incubación.**

La inoculación o siembra consiste en la introducción del hongo en el sustrato; la incubación es el establecimiento de las condiciones ambientales que permitan un crecimiento y desarrollo óptimo del hongo en dicho sustrato. (López, 2007)

❖ **Inducción a la fructificación.**

Consiste en establecer las condiciones ambientales específicas para inducir la formación de los primordios y el posterior desarrollo de los cuerpos fructíferos o carpóforos. (Stamets, 1993)

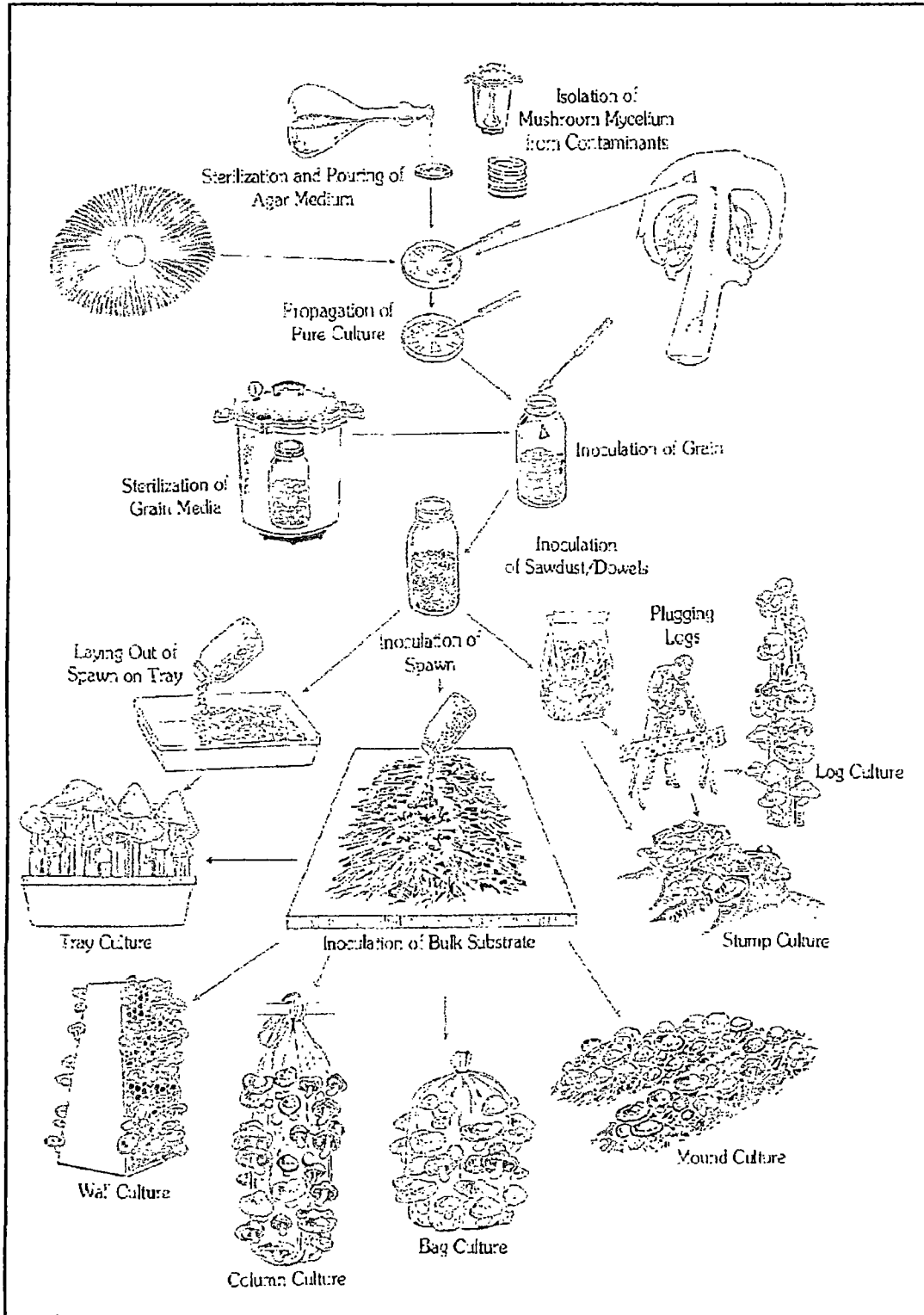
❖ **Cosecha**

La cosecha corresponde al acopio de los cuerpos fructíferos obtenidos, la post-cosecha se refiere a las técnicas usadas para dar al producto su presentación final. (Fernández, 2004)

❖ **Evaluación de la Producción.**

La evaluación es la estimación e interpretación de los parámetros de producción descritos en términos de: Eficiencia biológica (EB), Tasa de productividad (TP) y Rendimiento (R). (Bermúdez, 2007)

Figura N° 06: Técnicas de cultivo de hongos



Fuente: Stament, 1993

1.9 LA LEISHMANIASIS

1.9.1 La Leishmaniasis en el Perú

Según datos estadísticos, se indica los casos de leishmaniasis que se presentaron en el Perú desde el año 1999 hasta el 2006. (INS, 2007)

Tabla N° 01: Número de casos reportados por años

Año	N° de casos
1999	333
2000	488
2001	507
2002	423
2003	348
2004	378
2005	364
2006	350

Fuente: Anuario estadístico, 2007 (INS)

La incidencia de la enfermedad a lo largo de los ocho años se mantuvo casi constante, se observa un incremento considerable de la enfermedad en el año 2001 en más alto número de casos con 507.

1.9.2 Descripción de la Enfermedad

Enfermedad polimórfica de la piel y las mucosas causada por diferentes protozoarios del género *Leishmania*, que son parásitos intracelulares obligados en el hombre y otros mamíferos. (Ampuero, 2000)

La enfermedad se inicia con la aparición de una pápula que se hace más grande y luego se torna en úlcera indolora. En otros casos, diversas especies se multiplican y dan lesiones de mucosas (espundia), aun cuando hayan pasado años de la lesión primaria. Tales secuelas incluyen los tejidos nasofaríngeos, cursan con destrucción tisular progresiva, a menudo con la presencia de pocos parásitos, dejando desfiguraciones en el rostro. (MINSA, 2006)

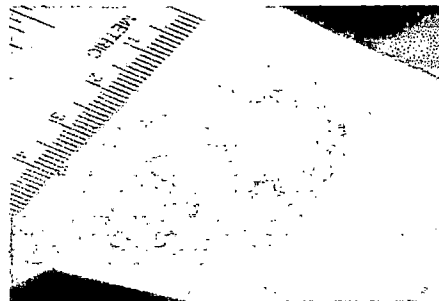
1.9.3 Tipos de Leishmaniasis

Las manifestaciones clínicas de la leishmania, depende de las especies de Leishmania involucradas en la infección y de la respuesta inmune del individuo infectado, generando una gran variedad de manifestaciones clínicas, las cuales se encuentran agrupadas en tres categorías clínicas: Leishmaniasis cutánea, Leishmaniasis mucosa y leishmaniasis visceral. (Cardona, 2006)

1.9.3.1 Leishmaniasis Cutánea

La leishmaniasis cutánea es producida por un amplia variedad de especies de leishmania relacionadas genéticamente, las cuales combinadas con los mecanismo del sistema inmune del hospedero dan como resultados un gran espectro de manifestaciones clínicas, histopatológicas e inmunopatológicas. Las principales manifestaciones clínicas son pápulas eritematosas en áreas expuestas del cuerpo donde vectores infectados se han alimentado. El periodo de incubación puede ser tan corto como 1-2 semanas o tan prolongado como 1-2 meses. La lesión temprana puede presentar prurito pero no dolor, la ulcera puede permanecer relativamente seca con una costra o puede exudar material purulento. Ocasionalmente las úlceras se curan de manera espontanea, pero pueden persistir por un año sin tratamiento. (Chester. y col., 1994)

Figura N° 07: Pacientes con leishmania cutánea

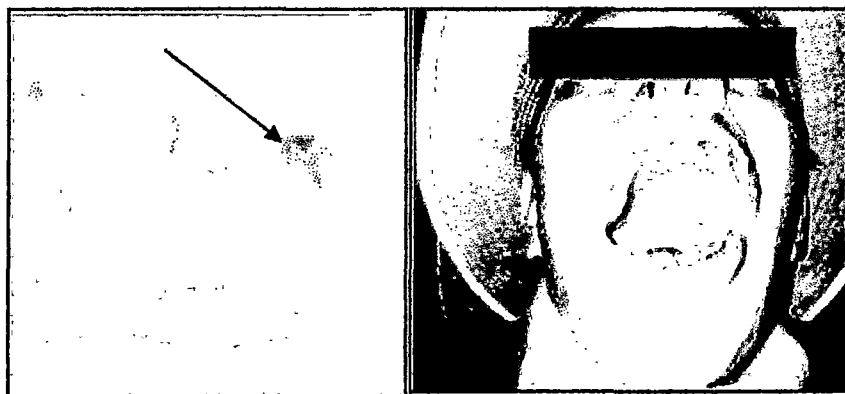


Fuente: Neyra, 1997

1.9.3.2 Leishmania Mucosa

Este tipo de leishmania se caracteriza por formar úlceras y erosión tisular (boca, lengua, encías, labios, nariz, y tabique nasal). Generando obstrucción, hemorragia y goteo nasal, Dificultad para deglutir (disfagia) con compromiso esofágico, dificultad para respirar con compromiso traqueal, pueden formarse lesiones más pequeñas alrededor de la úlcera (lesiones satélites). (Chester. y col., 1994)

Figura N° 08: Lesión de Leishmaniasis mucosa



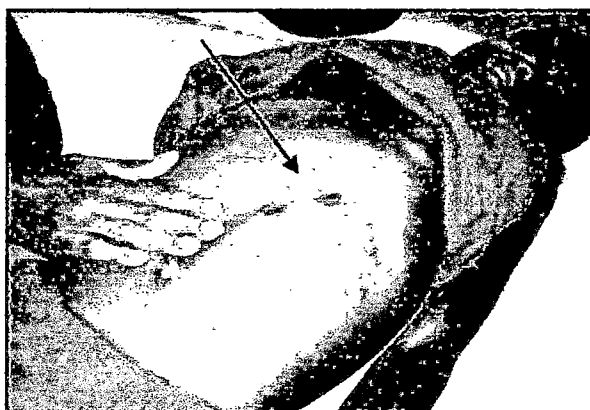
Fuente: OMS, 2002

1.9.3.3 Leishmania Visceral

Es una infección diseminada a otros órganos producida por el subgénero *L.* (Leishmania) e incluye *L. donovani* y *L. infantum* en el Viejo Mundo y *L. chagasi* en el Nuevo Mundo. Afecta a niños y adolescentes, siendo mas frecuente en niños menores de 5 años. Comprende desde una infección asintomática, hasta una infección que se establece en órganos y tejidos que poseen abundantes células del sistema mononuclear fagocítico como son hígado, bazo y médula ósea. Se caracteriza por presencia de fiebre, pérdida de peso hepatomegalia y esplenomegalia e inmunidad comprometida con mayor susceptibilidad a presentar infecciones bacterianas (tuberculosis, Neumonía, entre otros). El período de incubación suele ser varias semanas

o meses y las manifestaciones son fiebre, color gris de la piel (de ahí el término Hindú de kala-azar / fiebre negra), esplenomegalia y hepatomegalias progresivas, también es común una linfadenopatías periférica, incluyen trombocitopenia. (Chester. y col., 1994)

Figura N° 09: Paciente con leishmania visceral



Fuente: Celentano, 2004

1.9.4 El parásito: Leishmania

1.9.4.1 Posición taxonómica de Leishmania

Posición sistemática según Rioux y Lanotte (1993)

Reino: Protista

Sub Reino: Protozoa

Phyllum: Sarcomastigophora

SubPhyllum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophora

Orden: Kinetoplastida

Familia: Trypanosomatidae

Género: *Leishmania*

Sub género: *Viannia*

Especie:

Leishmania (Viannia) braziliensis (Viannia, 1911)

Leishmania (Viannia) guyanensis (Flöch, 1954)

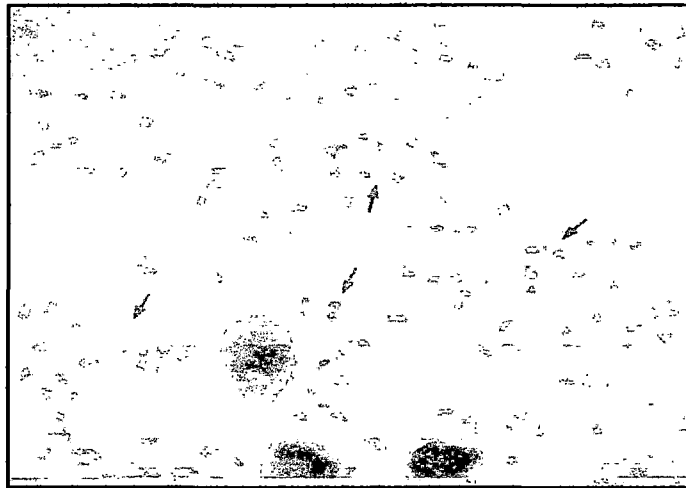
Leishmania (Viannia) panamensis (Lainson y Shaw, 1972)

1.9.4.2 Morfología

Desde el punto de vista morfológico los agentes etiológicos de las Leishmaniasis son indistinguibles entre si, pero producen en el hombre cuadros clínicos mas o menos característicos; las leishmaniasis son parásitos que presentan dos formas evolutivas fundamentales. (Gutiérrez; 2003)

a) Amastigotes: Se caracterizan por ser de forma redondeada u oval, de 2 a 7µm de diámetro, tiene membrana citoplasmática, núcleo esférico y compacto, cromatina granulosa, kinetoplasto de forma bacilar y rizoplasto que dará origen al flagelo en la etapa siguiente, esta forma es intracelular obligada y se encuentra en el hospedador vertebrado. (Gallego, 2000)

Figura N° 10: Amastigotes de Leishmania, de forma ovoide y sin flagelo

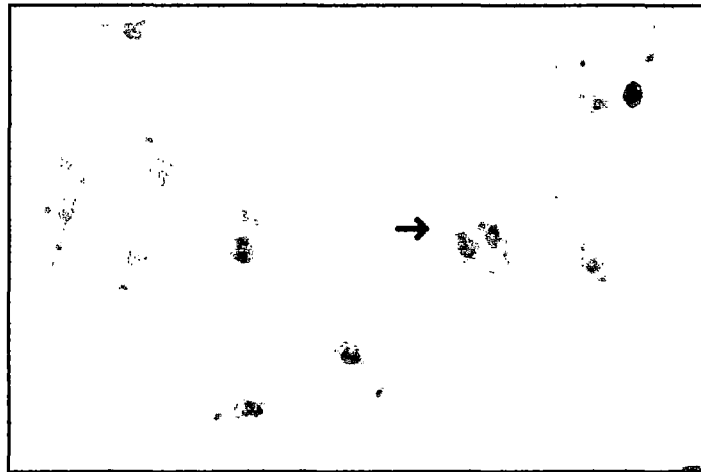


Fuente: Chester, 1994

b) Promastigotes: Fusiforme, extracelular y móvil, presenta un tamaño superior variando entre los 10 – 30 µm de largo y los 1,5 – 3 µm de ancho, posee núcleo central y blefaroblasto situado en posición muy anterior al núcleo, donde se origina el flagelo que, sin formar membrana ondulante, emerge por la porción mas anterior del parásito, ésta forma se encuentra en el mosquito trasmisor y en medios de cultivo. La forma

promastigote presenta un kinetoplasto bastoniforme claramente prenuclear. (Gallego, 2000)

Figura N° 11: Promastigotes de Leishmania



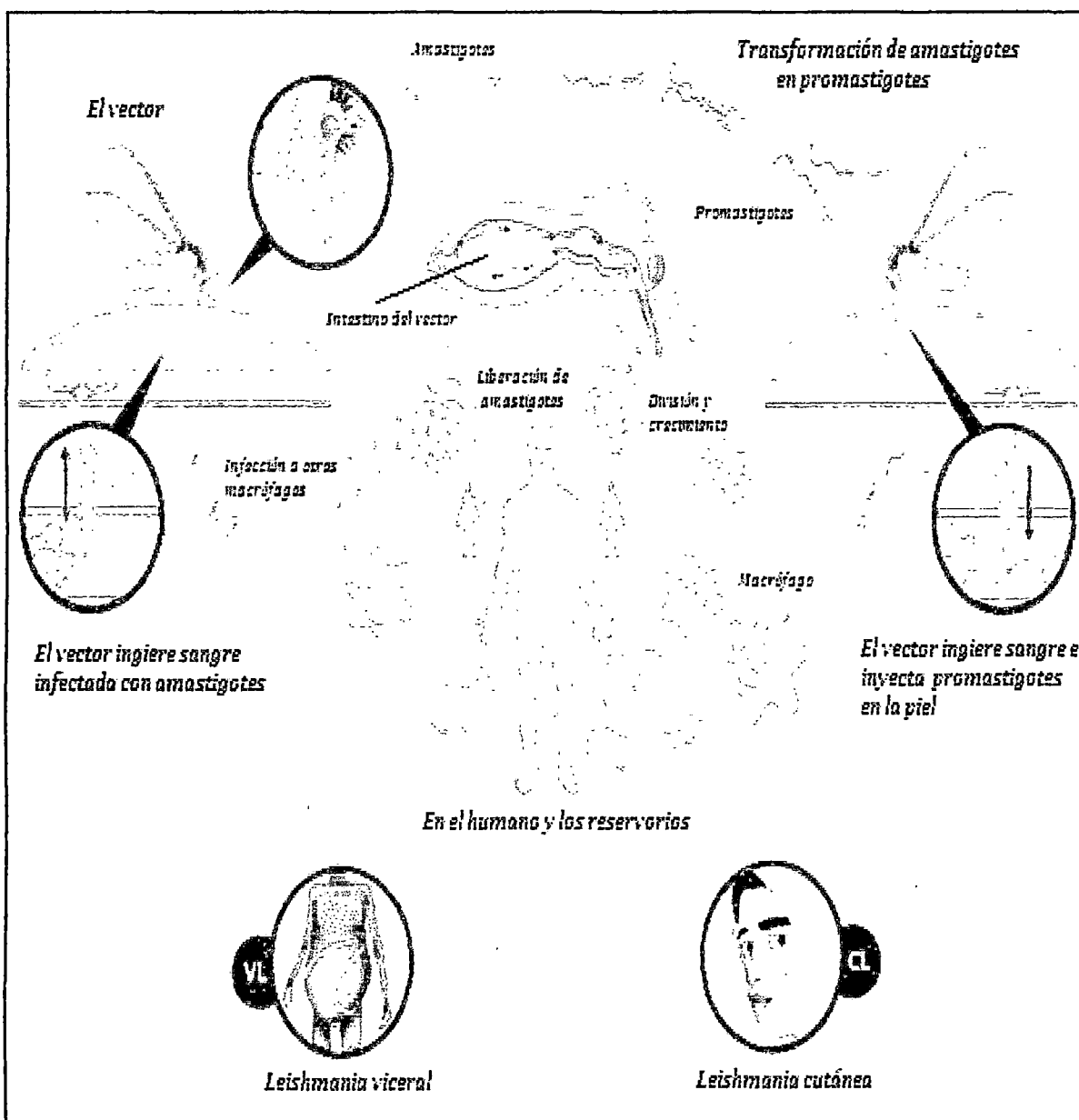
Fuente: Chester, 1994

1.9.4.3 Ciclo Biológico

El ciclo biológico de *Leishmania* transcurre en el intestino de los insectos vectores y en los tejidos de un hospedero vertebrado. Sólo la hembra del insecto vector es capaz de transmitir la infección, adquiriéndola con la ingestión de sangre de animales infectados. Estos mosquitos hematófagos absorben sangre infectada con amastigotes de *Leishmania*, transformándose en promastigotes en el intestino medio del vector, donde después de la ingestión de los parásitos la transformación de estos al estado de promastigote es muy rápida, comenzando ésta en 24 - 36 horas (Killick, 1990).

Al cabo de 8 días los promastigotes migran hacia la faringe del insecto atraídos posiblemente por el azúcar presente. Estas últimas formas son los promastigotes metacíclicos, formas infectivas para el mamífero tras la picadura del mosquito, en el cuerpo humano o en otros animales susceptibles (Ampuero, 2000)

Figura N° 12: Ciclo de vida de *Leishmania sp.*

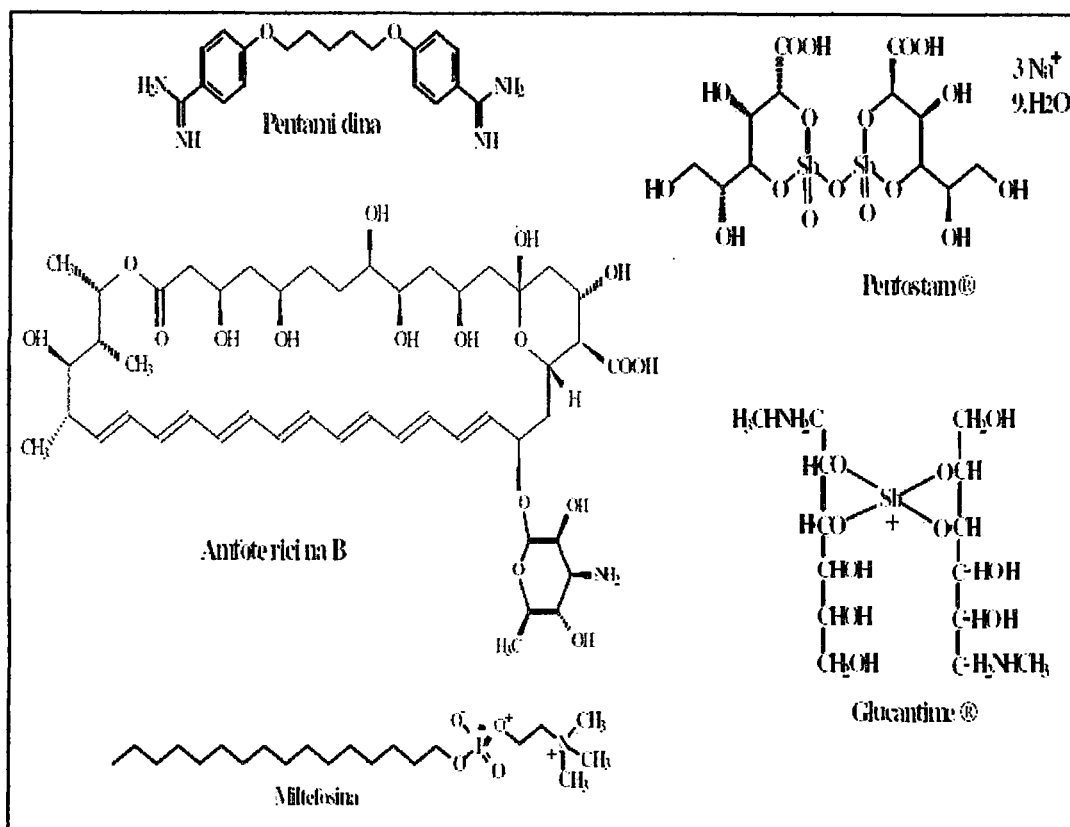


Fuente: www.who.com

1.9.5 Tratamiento utilizado para la leishmaniasis

La infección es tratada comúnmente con antimonio pentavalente en la forma de Estibogluconato de sodio (Pentostam) o Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime) y con Pentamidina o Anfotericina B. Esas drogas son potencialmente tóxicas y generalmente administradas en hospitales. (Mishra, 2007)

Figura N° 13: Medicamentos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis



Fuente: Cardona, 2006

Actualmente se está evaluando el uso de la Miltefosina, un medicamento de administración oral, inicialmente desarrollado como agente antitumoral y que ha demostrado ser muy eficaz para el tratamiento de la leishmaniasis visceral en la India. La principal limitación de la Miltefosina es su teratogenicidad por lo que está contraindicado su uso en mujeres embarazadas. (Croft, 2003) Aunque la situación de la quimioterapia de la leishmaniasis es promisorio, aun no se dispone de un medicamento adecuado. (Robledo, 2008)

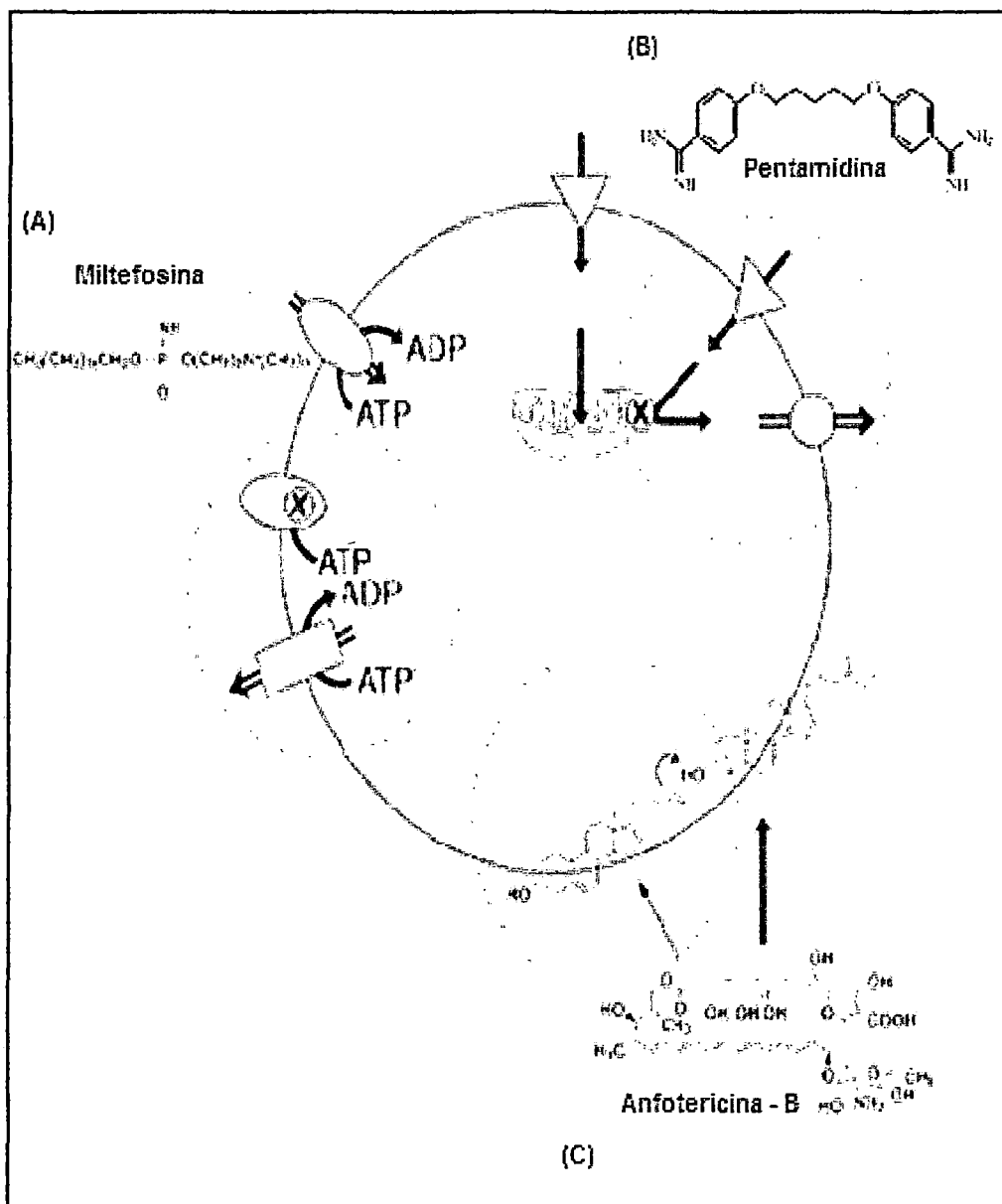
1.9.5.1 Mecanismos de acción de los antimoniales pentavalentes

Los antimoniales pentavalentes inducen a la muerte de los amastigotes al inhibir enzimas glicolíticas (disminuyendo la producción de ATP), la oxidación de ácidos grasos (Mishra, 2007) y la acción de la topoisomerasa I

de Leishmania, afectándose así procesos como el superenrollamiento y desenrollamiento del ADN necesarios en el proceso de duplicación del ADN. (Lucumi, 1998).

En el caso de pentamidina esta se acumula en las mitocondrias, actuando sobre las poliamidas; y la Anfotericina B interactúa con ergosterol presentes en las membranas. (Celentano, 2004)

Figura N° 14: Mecanismos de acción de Anfotericina B, Pentamidina y Miltefosina



Fuente: Celentano, 2004

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ZONA DE COLECTA DEL HONGO *Pycnoporus sanguineus*

Abarca el territorio correspondiente a su distribución natural, por lo que la colecta de los carpóforos se realizó en el distrito de Quellouno, puede ser colectada tanto en época de lluvia como en época de seca debido a que es un género de crecimiento perenne y distribución cosmopolita.

Quellouno se caracteriza por tener precipitaciones anuales de 1142 mm y una temperatura anual de 24.43 °C (SENAMHI, 2007).

El distrito políticamente pertenece a la provincia de la Convención, Departamento del Cusco. Fue creado por ley N° 24553, el primero de octubre de 1986. Localizado al Noreste de la ciudad de Quillabamba, capital de la Convención y geográficamente se encuentra en la cuenca de Yanatile.

Ubicándose en las siguientes coordenadas y latitud:

Latitud sur : 12°38' Sur

Longitud : 72° 31' 13" Oeste.

Altitud : 800 m.s.n.m.

El distrito de Quellouno limita:

Por el Norte : Con el distrito de Echarati y La región de Madre de Dios

Por el Sur : Con el Distrito de Occobamba y las provincias de Calca y
Paucartambo

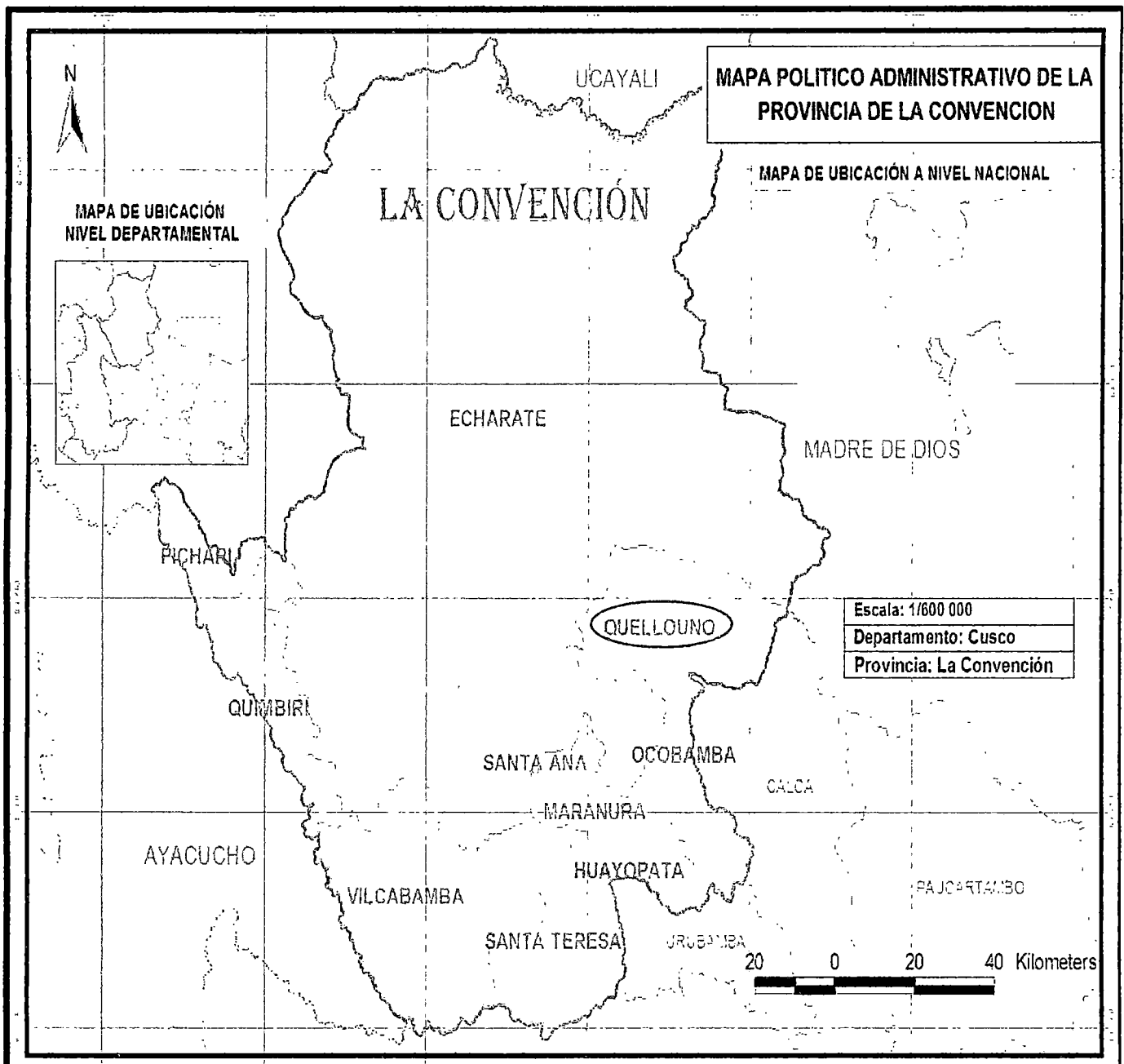
Por el Este : Con la región de Madre de Dios.

Por el Oeste : Con el Distrito de Echarate.

Las muestras colectadas fueron llevadas al laboratorio del Centro de Investigación y Producción de Hongos Alimenticios y Medicinales (CIPHAM)

de la Facultad de Ciencias Biológicas, donde se realizó el aislamiento y el cultivo del hongo, posteriormente se procedió a la obtención del extracto crudo en el Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas, Físicas y Matemáticas. Ambos laboratorios de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

Mapa N° 01: Mapa político administrativo de la provincia de La Convención, departamento de Cusco



Fuente: Gobierno Regional del Cusco, 2009

2.2 MATERIALES

2.2.1 Material Biológico

- ❖ Cuerpos fructíferos de *Pycnopus sanguineus* (L: Fr) Murr.
- ❖ Quistes de *Artemia salina* Leach.
- ❖ Cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*; *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis* y *Leishmania spp.*

2.2.2 Equipos y Aparatos

- ❖ Altímetro (Brunton ADC - SUMMIT).
- ❖ Autoclave. (Wolf KL - 17).
- ❖ Balanza analítica. (Kasell. GR - 200).
- ❖ Baño María. (UNIVEBA L - 110).
- ❖ Cámara fotográfica (Canon PowerShot - SD780 IS).
- ❖ Espectrofotómetro (Thermo - Evolution 300).
- ❖ Estufa eléctrica (Mettler CT - 247).
- ❖ GPS (Garmin - Nuvi 1350T).
- ❖ Incubadora. (Esztergon LP - 114).
- ❖ Microscopio Biológico (Leica - CME).
- ❖ Microscopio Estereoscópico (Leica - 7GA9).
- ❖ Refrigeradora. (Coldex RSE - 14).
- ❖ Rotovapor (B.U.C.H.I -R215 type: U - 850).
- ❖ Termohigrómetro (Radio Shark TK - 76102).

2.2.3 Reactivos

- ❖ Acetato de etilo químicamente puro.
- ❖ Acetona químicamente puro.
- ❖ Cloroformo químicamente puro.

- ❖ Hexano químicamente puro.
- ❖ Metanol químicamente puro.
- ❖ Etanol químicamente puro.
- ❖ Etanol al 70 %.
- ❖ Etanol al 80 %.
- ❖ Aceite de inmersión.
- ❖ Dilución de antibiótico (Cloramfenicol 0,05 %).

2.2.4 Medios de cultivo comerciales

- ❖ Agar extracto de Malta (EMA) Difcotm
- ❖ Agar papa dextrosa (PDA) Difcotm
- ❖ Agar Sabouraud. Difcotm
- ❖ Blood Agar. Difcotm

2.2.5 Medio de cultivo preparado

- ❖ Agar basado en cerveza (MBC)

2.2.6 Otro materiales

- ❖ Cámara de Neubauer (Kittel - GLÄSER)
- ❖ Recipiente con tapa.
- ❖ Bolsas de papel.
- ❖ Bolsas de polipropileno.
- ❖ Ventiladores pequeños.
- ❖ Regla milimétrica.
- ❖ Cintas indicadoras de pH (Merck S.A)

2.3 MÉTODOS

2.3.1 COLECTA DEL HONGO MEDICINAL *Pycnoporus sanguineus*

Los carpóforos del hongo *Pycnoporus sanguineus* se colectaron lo mas sanos posibles del sustrato con la ayuda de una cuchilla, extrayéndolos cuidadosamente, seguidamente se limpiaron y almacenaron en sobres de papel. Se registraron en la ficha de colecta (ver anexos) las características morfológicas de la especie y del sustrato. (Robledo, 2006)

2.3.2 CULTIVO DEL HONGO *Pycnoporus sanguineus*

2.3.2.1 Aislamiento a partir de pseudotejido del hongo *Pycnoporus sanguineus*

En un ambiente estéril, se colocó el hongo el cual debe de estar en buen estado, libre de tierra y o insectos; se partió el hongo de manera longitudinal con la mano y la ayuda de una pinza estéril, fría, se tomó fragmentos del pseudotejido y se colocó en placas de Petri con medio de cultivo PDA a los cuales se les aplicó dilución de cloranfenicol al 0,05% para evitar la contaminación por bacterias. (Modificado de Sánchez, 2001)

Las placas con los fragmentos del pseudotejido del hongo, se incuban en la oscuridad a 25°C (Temperatura promedio anual a la que crece en su hábitat). Las placas fueron monitoreadas cada 48 horas después del aislamiento, seleccionando aquellas que presentaron crecimiento del micelio, estas fueron repicadas obteniendo así placas con micelio del hongo; sin contaminantes. (Modificado de Saldarriaga, 2001)

2.3.2.2 Selección del medio de cultivo óptimo para la propagación de micelio del hongo *Pycnoporus sanguineus*

Los medios sintéticos usados fueron Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Extracto de Malta (EMA), Agar Sabouraud (AS) y el medio de cultivo preparado es el basado en Cerveza (MBC) reportado por Vidovic en 1999 estos fueron esterilizados a 121°C por 15 minutos.

Para las condiciones de estudio del crecimiento micelial se procedió a la adaptación del micelio del hongo en los diferentes medios de cultivo que se evaluaron. Una vez esterilizados los medios, se vierten 20 ml en cada placa de Petri de 9 cm de diámetro. Para la siembra se utilizó un inóculo de 8 mm de diámetro procedente de micelio joven de *P. sanguineus*, colocándolos en el centro de la placa con el mismo medio del cual proviene el inóculo. La incubación se realizó en oscuridad a 25°C; todas las pruebas se ejecutaron por triplicado. Se midió diariamente el diámetro de la colonia a partir del inóculo. Con los datos de crecimiento diario de la colonia se calculó la velocidad de crecimiento micelial, considerando el desarrollo hasta que invada por completo la placa. (Bermúdez, 2007) Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la velocidad de crecimiento. (Martínez, C.; 1993):

$$VC = (D_f - D_i) / T$$

Donde:

VC : Velocidad de crecimiento micelial
D_f : Diámetro final de la colonia
D_i : Diámetro inicial de la colonia
T : Tiempo de crecimiento micelial

2.3.3.2.1 Tratamiento estadístico

Las diferencias entre las velocidades de crecimiento del diámetro de la colonia fueron corroboradas mediante el análisis de varianza (ANOVA). Prueba estadística que permite observar y afirmar la existencia o no de

diferencias significativas entre los promedios de las repeticiones (I, II, III) de los cuatro tratamientos que se trabajaron (PDA, EMA, MBC y AS).

Se plantea la hipótesis nula (H_0) que todos los tratamientos tiene medias iguales y la hipótesis alterna (H_1) que al menos un par de tratamientos no tiene medias iguales. (Wayne, 2002)

$$H_0: \bar{X}_1 = \bar{X}_2 = \bar{X}_3 = \bar{X}_4$$

H_1 : No todas \bar{X}_n son iguales

Se calculó el estadístico de la prueba: donde se rechaza la hipótesis nula (H_0) si el valor F calculado es mayor o igual al valor del F tabular. (Wayne, 2002)

2.3.2.3 Producción de Spawn “semilla de hongo”

Los granos de trigo fueron lavados con abundante agua, las semillas no viables y aquellas que flotan sobre el agua fueron eliminadas cuidadosamente, luego, el trigo se hirvió hasta que el grano obtenga un 50% de humedad (determinado por gravimetría). Cuando los granos de trigo alcanzaron la humedad adecuada son retiraron del calor, se escurrieron y distribuyeron sobre bandejas para eliminar el exceso de humedad (Sánchez, 2001). Por kilo de grano hidratado se agregó 12 gramos de yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y 3 gramos de carbonato de calcio (CaCO_3); el yeso para evitar que la semilla se pegue y el carbonato de calcio para corregir el pH de 5,8 a 6,5 estos valores fueron medidos con cintas indicadoras de pH. (Gaitán, 2006)

El trigo se colocó en las bolsas de polipropileno y fueron llenadas en tres cuartas partes de su volumen. En este punto las bolsas están listas para la esterilización en una autoclave a 121°C por 20 minutos. Las bolsas fueron

enfriadas a temperatura ambiente. La inoculación con cultivo micelial se realizó con la ayuda de un mechero Bunsen que permitió proteger el material cada vez que se abrió la bolsa para introducir el inoculo. El micelio que creció sobre una placa Petri con medio de cultivo fue cortado con un bisturí en pequeños cuadros o trozos y transferidos a los granos estériles. Las bolsas con grano inoculado se incubaron a 25°C, en oscuridad; cuando se observó un crecimiento vigoroso del micelio se procedió a agitar las bolsas cada 4 días para soltar los granos, hasta que el micelio haya cubierto completamente todos los granos. (López, 2007).

2.3.2.4 Preparación de Sustrato

Se utilizaron dos desechos industriales (Cascara de cacao y aserrín) procedentes de la Centro de producción de Chocolates y de la Carpintería, ambos pertenecientes a la Universidad Nacional de San Antonio abad del Cusco, realizando diferentes formulas que se presentan en la tabla 02.

Tabla N° 02: Formulas de sustratos para el cultivo de *Pycnoporus sanguineus*

Formula	Sustrato principal	Fuente de nitrógeno	Suplemento
SAP	99 % de Aserrín	*	1% de yeso.
SAS	80 % de Aserrín	19% de salvado de arroz	1% de yeso.
SCP	99 % de cascara de cacao	*	1% de yeso.
SCS	80 % de cascara de cacao	19% de salvado de arroz	1% de yeso.
SCA	50 % cascara de cacao + 49 % de aserrín	*	1% de yeso

NOTA: * No se utilizó salvado de arroz

Para la preparación de los sustratos se consiguieron los insumos secos y se eliminaron las partículas grandes dejando las partículas de 2 a 5mm de aserrín y de la cascara de cacao luego se mezclaron en las proporciones

correspondientes. Los insumos se humidificaron, remojándolos en agua por dos días, hasta alcanzar la humedad requerida de 65 %, se tomo el peso inicial y al terminar el proceso de hidratación se tomo el peso final para observar si el sustrato incremento un 65 % en proporción al peso inicial, esta humedad no debe ser superficial, sino que el sustrato debe estar hidratado, de tal forma que al tocarlo se sienta húmedo pero no moje las manos, en caso se apriete no debe escurrir agua entre los dedos, luego se agregó el yeso homogenizando la mezcla, con la finalidad de obtener un valor optimo de pH del sustrato para el crecimiento micelial es de 5,0 a 6,5. Se colocaron los sustratos en bolsas de polipropileno de 1Kg y se pasteurizó por 7 horas a 80 °C en un cilindro acondicionado. Cada sustrato fue preparado por triplicado. (Mush World, 2005)

2.3.2.5 Inoculación e Incubación

Despues de la pasteurización, las bolsas se enfriaron a temperatura ambiente, procediendose a la la inoculación con 30gr de spawn “semilla de hongo” por kilogramo de sustrato (Tasa de inoculación de 3 %). (Sanchez, 2001 y Fernández, 2004)

La incubación se realizó en un ambiente cerrado a una temperatura promedio de 16°C sin iluminación ya que la luz inhibe el crecimiento extencivo del micelio vegetativo. (Deacon, 2006); se incubo hasta que las bolsas esten completamente invadidas por el micelio. (García, 2003)

2.3.2.6 Inducción de la fructificación

Las bolsas invadidas completamente por el micelio fueron transportadas a un ambiente acondicionado, recubierto por plástico para evitar la perdida de humedad. Para la inducción a la fructificación se controlaron los parametros:

Temperatura ambiente de 16°C, humedad relativa de 80% conservada mediante el riego realizado dos veces al día; ambos parámetros registrados por un termohigrómetro, la iluminación se logró mediante lámparas fluorescentes encendidas entre 8 y 10 horas por día; la oxigenación se logró recirculando el aire con la ayuda de ventiladores pequeños. (Modificado de García, 2003)

2.3.2.7 Cosecha

La recolección se hizo en forma manual cortando con una cuchilla estéril y el peso de los carpóforos se determinó inmediatamente después de su corte, en una balanza analítica, este procedimiento se realizó durante las tres cosechas recomendadas en la biotecnología del cultivo de hongos. (Staments, 1993 y Fernández, 2004)

2.3.2.8 Evaluación de la Producción.

La productividad se evaluó en función a las tres cosechas obtenidas, tomando en cuenta los siguientes parámetros:

- Ciclo de cultivo (CC): Tiempo transcurrido desde la inoculación del spawn o "semilla del hongo" en el sustrato, hasta el último día de producción. (Acosta, 2010)
- Rendimiento (R): Definido como la relación en porcentaje del peso de hongos frescos y el peso húmedo del sustrato. (Martínez, 1993)

$$R = \frac{\text{Peso de hongos frescos}}{\text{Peso del sustrato húmedo}} \times 100 \%$$

- Eficiencia biológica (EB): Definida como la relación en porcentaje del peso de hongos frescos y el peso seco del sustrato. (Martínez, 1993)

$$EB = \frac{\text{peso de hongos frescos}}{\text{Peso del sustrato seco}} \times 100 \%$$

- Tasa de producción (TP): Definida como la relación en porcentaje de la eficiencia biológica y los días transcurridos desde la siembra hasta el último día de producción. (Sánchez, 2001)

$$TP = \frac{\text{Eficiencia Biológica}}{\text{Ciclo de cultivo}} \%$$

Según establece la tecnología del cultivo de hongos se considera una producción aceptable cuando el rendimiento (R) es superior al 10 %, y la eficiencia biológica (EB) es mayor al 40 %, esto determina que el proceso sea factible económicamente. (Martínez, 1993).

2.3.2.8.1 Tratamiento estadístico

Para comprobar estadísticamente si existe o no variación significativa se realizó la prueba de t-Student, prueba estadístico que permitió establecer la diferencia o igualdad entre los parámetros de Rendimiento (R), eficiencia biológica (EB) y tasa de producción (TP), con las siguientes hipótesis(Wayne, 2002):

$$H_0: \bar{X}_1 = \bar{X}_2$$

$$H_1: \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2$$

Donde se rechaza la hipótesis nula (H_0) si el valor T calculado es mayor o igual al valor del T tabular. (Wayne, 2002)

2.3.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DEL HONGO *Pycnoporus sanguineus*

2.3.3.1 Pruebas de solubilidad

Las pruebas de solubilidad se realizaron con solventes de polaridad creciente (Acetato de etilo, Acetona, Cloroformo, Hexano, Metanol, Etanol puro, Etanol al 80 %, Etanol al 70 % y Agua destilada).

Se picaron los cuerpos fructíferos del hongo *P. sanguineus* hasta obtener partículas de 2 mm aproximadamente, luego se colocaron en tubos de ensayo y se agregó a cada tubo un solvente diferente, observándose la intensidad de color en cada caso, después de 5, 10 y 30 minutos se observó y anotó la coloración, de este modo se determinó la solubilidad cualitativamente. (Lock, 1997)

2.3.3.2 Obtención del extracto crudo

Los cuerpos fructíferos se secaron en una estufa a 45 °C por 48 horas, los cuales se picaron hasta obtener partículas de 5 mm aproximadamente, se pesó 50g del hongo picado. La muestra se colocó en un frasco de vidrio y se agregó 250ml del solvente macerándose por 7 días en oscuridad; transcurrido el tiempo de maceración se procedió a filtrar los extractos utilizando papel filtro con poro de 11 µm de diámetro, el filtrado se almacena en oscuridad, al residuo del hongo que queda se le agrega 250 ml del solvente y se deja macerando en oscuridad nuevamente por 7 días, este proceso se repitió una vez más (extracción por agotamiento). Los tres filtrados obtenidos se mezclan y se llevan al rotavapor para eliminar el solvente por evaporación, a una presión de 80 mbar y 40°C (Temperatura de evaporación para el etanol). El extracto crudo obtenido se mantuvo en una estufa a 45°C por 48 horas para eliminar por completo residuos de solvente y agua. (Lock, 1997) Este proceso se realizó individualmente para los cuerpos fructíferos silvestres y los cultivados.

2.3.4 BIOTOXICIDAD EN *Artemia salina* Leach.

2.3.4.1 Cultivo de *Artemia salina*

Se utilizó el producto Artemia – mix (mezcla de huevos de *Artemia salina* y sal) marca SERA[®], que contiene 18 g de la mezcla. El cultivo de *Artemia salina* se realizó en un recipiente transparente de forma cilíndrica y base cónica, con un volumen de 300 cm³, conectado en la base a un oxigenador de acuario; a este recipiente se le agregó la mezcla de huevos de *Artemia salina* y sal, disuelta en 500ml de agua destilada. Todo esto fue incubado a una temperatura de 27°C con luz continua, durante el tiempo de incubación se mantuvo un flujo constante de aire para garantizar la eclosión. Luego de 48 horas se obtuvieron los nauplios que fueron utilizados en el bioensayo. (Gonzales, 2007).

2.3.4.2 Preparación de extractos y adición de nauplios

A partir de los residuos secos de los extractos etanólicos obtenidos de los carpóforos silvestres y cultivados del hongo *Pycnoporus sanguineus*, se preparó con agua destilada una solución patrón de 1000 mg de extracto por litro de solución, del cual se realizó ocho diluciones de 6, 10, 24, 50, 100, 240, 500 y 1000 ug/mL de concentración, que son un rango preliminar de concentraciones para bioensayos. Todas las diluciones se hicieron con la solución salina en la crecen los nauplios de *Artemia salina*. (Ver anexos)

Se adicionó 5 mililitros de cada dilución del extracto en tubos de ensayo, se transfirieron diez nauplios de *Artemia salina* en cada tubo con una pipeta Pasteur, paralelamente se preparó un blanco por dilución de extracto de la siguiente forma: Se tomaron 10 nauplios en un tubo de ensayo y se completó el volumen de cada uno a 5 mililitros con solución salina en la cual

estaban los nauplios. Las ocho concentraciones y el blanco se trabajaron por triplicado. Se incubaron los tubos a 27°C con iluminación continua durante 48 horas, al cabo de los cuales se contó el número de nauplios muertos en cada tubo. (Flores, 1999)

2.3.4.3 Determinación de la dosis letal media (DL₅₀) mediante el método Probit

El método Probit mide la relación entre la intensidad de un estímulo y la proporción de casos que presentan una cierta respuesta a dicho estímulo. Este procedimiento permite estimar la intensidad necesaria para que un estímulo llegue a inducir una determinada proporción de respuestas, como la dosis letal media. Para la determinación de la DL₅₀ se contaron los nauplios muertos en cada extracto y cada blanco, se corrigen las mortalidades mediante la fórmula de Abbott y paralelamente se utilizó otra corrección que se basa en el porcentaje de supervivencia de los individuos, esta corrección es utilizada en algunos procedimientos encontrados. (Díaz, 2003)

Las fórmulas de estas correcciones son las siguientes:

$$M = \frac{m_e - m_b}{1 - m_b}$$

Donde:

M = Mortalidad.

m_e = mortalidad en el extracto.

m_b = mortalidad en el blanco.

$$m_e = \frac{r}{n} \qquad m_b = \frac{r'}{n}$$

r = Nauplios muertos en el extracto.

r' = Nauplios muertos en el blanco.

n = Número de individuos.

Como el número de individuos es constante (10 en este caso):

$$\%M = \frac{(m_e - m_b)}{(10 - m_b)} \times 100$$

Con los datos obtenidos se determinó la DL₅₀ con el 95% de confianza utilizando el Método Probit, (Díaz, 2003) El grado de toxicidad del extracto se definió en función del rango en que se encontraron los valores de DL₅₀ de acuerdo con la tabla 03 que muestra las categorías:

Tabla N° 03: Categorías de toxicidad.

Categoría	Rango de la concentración
Extremadamente tóxico	DL ₅₀ < 10 µg/mL
Muy tóxico	10 µg/mL < DL ₅₀ < 100 µg/mL
Moderadamente tóxico	100 µg/mL < DL ₅₀ < 1 000 µg/mL
No tóxico	DL ₅₀ > 1 000 µg/mL

Fuente: Bartolomé, 2004

2.3.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA

2.3.5.1 Cultivo de promastigotes de leishmania

Se utilizó el medio bifásico Agar sangre llamado USAMRU rico en nutrientes necesarios para el crecimiento de promastigotes, este medio consta de dos fases, una sólida y otra líquida. La sangre se obtuvo de conejo fue vertida en un frasco estéril con perlas de vidrio, para desfibrinarla se agitó suavemente con movimientos rotatorios durante 10 minutos. Se autoclavó el agar a 121°C por 15 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente; cuando alcanzó los 56°C aproximadamente, se agregó la sangre desfibrinada y la solución stock de antibióticos (ver anexo). Se homogenizó y repartió el medio en tubos de cultivo con tapa rosca. Se colocaron los tubos en plano inclinado y dejaron a medio ambiente hasta que gelifique. Los tubos con medio de cultivo se refrigeraron a 4°C hasta el momento de su uso. (Evans

D.; 1989) Las cepas con las que se trabajaron fueron obtenidas a través del laboratorio Referencial de la Dirección Regional de Salud de Apurímac.

2.3.5.2 Comparación de la actividad leishmanicida de los extractos de los carpóforos silvestres y cultivados del hongo *Pycnoporus sanguineus*.

Para el ensayo *in vitro* se utilizaron cultivos de promastigotes de *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) panamensis*, *L. (Viannia) guyanensis* y *Leishmania spp.* En fase de crecimiento logarítmico. Luego de 3 días de cultivo a la fase líquida de solución fisiológica se le añadió el extracto del hongo *P. sanguineus* obtenidos de los carpóforos silvestres y cultivados. Se emplearon concentraciones de 25, 50, 200 y 400 µg/ml de extracto (Ver anexos); los ensayos se realizaron por triplicado para cada cepa de leishmania, considerando como controles los cultivos sin extracto. (Alzamora, 2007)

El recuento de parásitos se realizó diariamente desde el primer hasta el quinto día de incubación con los extractos. Para el recuento del parásito se empleo la cámara de Neubauer (400x) lo que además permitió evaluar la supervivencia del parásito, esta última, relacionada con su movimiento. La actividad leishmanicida (reducción en la cantidad de promastigotes) se determinó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad Leishmanicida} = \left[100 - \left(\frac{L_2}{L_1} \right) * 100 \right]$$

Donde:

*L*₁: Es el número de células viables en el cultivo control

*L*₂: Es el número de células viables después del tratamiento con los extractos.

El porcentaje de viabilidad se determinó por comparación con el número de promastigotes de los controles. (Alzamora, 2007) Con los datos obtenidos se determinó la concentración efectiva media (CE_{50}) con el 95% de confianza utilizando el Método Probit. (Díaz, 2003) Para comprobar estadísticamente si existe o no variación significativa se realizó la prueba de t-Student, prueba estadístico que permitió establecer la diferencia o igualdad entre los dos promedios de la actividad leishmanicida y la concentración efectiva media (CE_{50}) de los extractos de los carpóforos silvestres y cultivados calculados para los 5 días de evaluación, con las siguientes hipótesis (Wayne, 2002):

$$H_0: \bar{X}_1 = \bar{X}_2$$

$$H_1: \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2$$

Donde se rechaza la hipótesis nula (H_0) si el valor T calculado es mayor o igual al valor del T tabular. (Wayne, 2002)

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 COLECTA DEL HONGO *Pycnoporus sanguineus*.

Los cuerpos fructíferos silvestres del hongo *Pycnoporus sanguineus* fueron colectados de troncos quemados al interior de un cultivo de papayas, que cuenta con riego por aspersión continuo en el distrito de Quellouno, provincia de La Convención, Región del Cusco.

Figura N° 15 y 16. Derecha: Cultivo de papaya. Izquierda: Colecta de los cuerpos fructíferos del hongo *Pycnoporus sanguineus*

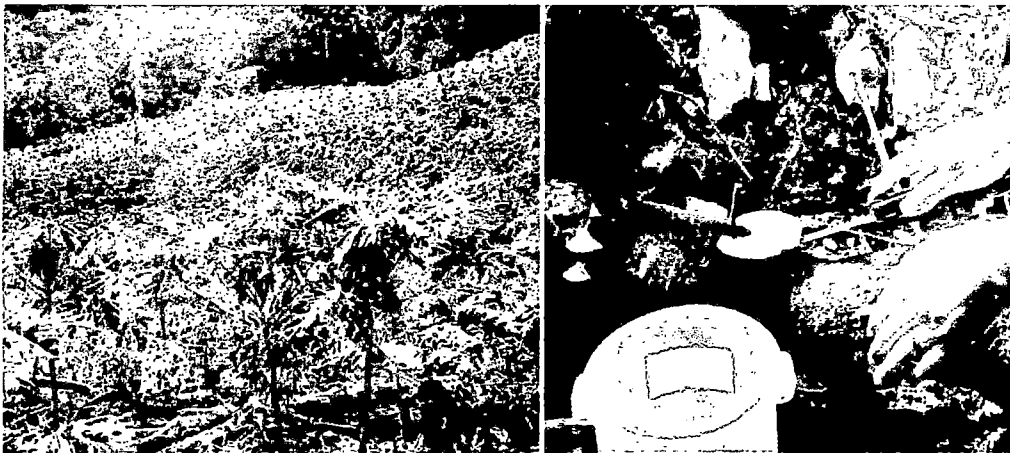


Figura N° 17. Cuerpos fructíferos del hongo *Pycnoporus sanguineus* sobre el sustrato en el que crece naturalmente



3.2 CULTIVO DEL HONGO *Pycnoporus sanguineus*

3.2.1 Aislamiento a partir de pseudotejido

Para el aislamiento por pseudotejido del hongo *Pycnoporus sanguineus* se usó tres placas de Petri con medio de cultivo PDA por cada carpóforo utilizado en el aislamiento.

Tabla N° 04: Grado de desarrollo del micelio del hongo *Pycnoporus sanguineus* durante el aislamiento.

Carpóforo	Placa	Crecimiento Micelial
A	1	++
	2	0
	3	+
B	1	+
	2	+
	3	0

Leyenda:

++ = crecimiento bueno

+ = crecimiento regular

0 = no presente crecimiento

La Tabla 03 muestra el grado de desarrollo del micelio a los 12 días después del aislamiento; observando que la placa A1 presentó crecimiento bueno, las placas A3, B1 y B2 crecimiento regular; A2 y B3 no desarrollaron micelio.

Del proceso de aislamiento se obtuvieron dos cepas las cuales fueron codificadas según el Cepario del Centro de Investigación y Producción de hongos comestibles y medicinales; la cepa obtenida del carpóforo A se codificó como CIPHAM-005 y la cepa obtenida del carpóforo B como CIPHAM-006.

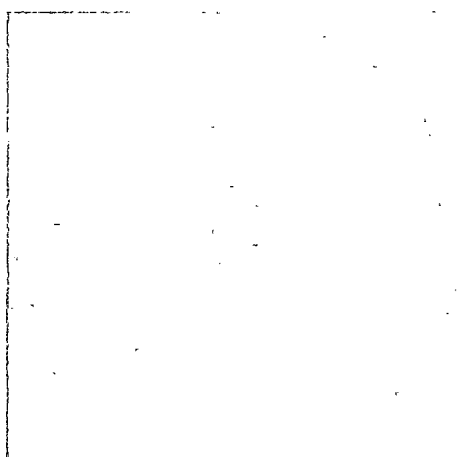
De las dos cepas aisladas (CIPHAM-005 y CIPHAM-006), se utilizó la cepa CIPHAM-005, porque presentó mejor respuesta al proceso de aislamiento, condiciones de laboratorio y un crecimiento más rápido, este fenómeno

biológico ocurre debido a que los individuos de cada especie reaccionan de manera diferente, a los procesos de adaptación.

Barreto en el año 1997 concluye que la técnica más eficaz para el aislamiento del hongo *Auricularia fuscosuccinea*, es a partir de pseudotejido y también es factible a partir de esporas del hongo, aunque la probabilidad de obtener la cepa es menor que con la técnica anterior.

En el caso del hongo *P. sanguineus* es recomendable realizar el aislamiento por medio de pseudotejido debido al himenio poroide que caracteriza a la especie, el cual no permitió obtener esporada con facilidad, haciendo poco probable la realización del aislamiento por esta técnica.

Figura N° 18. Placa con micelio vegetativo característico de *Pycnoporus sanguineus*



El micelio de *P. sanguineus* tiene características especiales que permite diferenciarlos claramente de otro tipo de hongos que comúnmente presentan un micelio blanco, contando con las siguientes características:

Color : Micelio naranja intenso

Aspecto : Algodonoso

Crecimiento : Radial al ras de la placa

La coloración inicial del micelio es blanca, al tercer día se torna naranja y el color va intensificándose con los días y solo se da al entrar en contacto con el oxígeno.

3.2.2 Selección del medio de cultivo sólido óptimo para la propagación del micelio vegetativo del hongo *Pycnoporus sanguineus*.

Al seleccionar el medio de cultivo óptimo para la propagación vegetativo del hongo *Pycnoporus sanguineus* permitirá conocer mejor la preferencia nutricional de la especie, de este modo se disminuye el tiempo de incubación de las placas y los resultados obtenidos sean tomados como antecedentes en el caso que se realice un proceso de producción de mayor escala.

Tabla N° 05: Diámetro de la colonia y velocidad de crecimiento micelial del hongo *Pycnoporus sanguineus* en cuatro medios de cultivo sólidos.

Medios de cultivo	Diámetro de la colonia (mm)							Velocidad de crecimiento (mm/día)
	1° día	2° día	3° día	4° día	5° día	6° día	7° día	
PDA	8,0	14,7	28,0	37,7	53,3	66,0	77,7	10,0
EMA	8,0	16,7	26,0	36,0	50,0	64,0	90,0	11,7
MBC	8,0	14,7	24,7	34,7	48,0	56,3	65,3	8,2
AS	8,0	10,0	25,0	40,0	53,7	67,3	76,7	9,8

* Cada resultado es el promedio de tres repeticiones

Leyenda:

PDA = Papa Dextrosa Agar

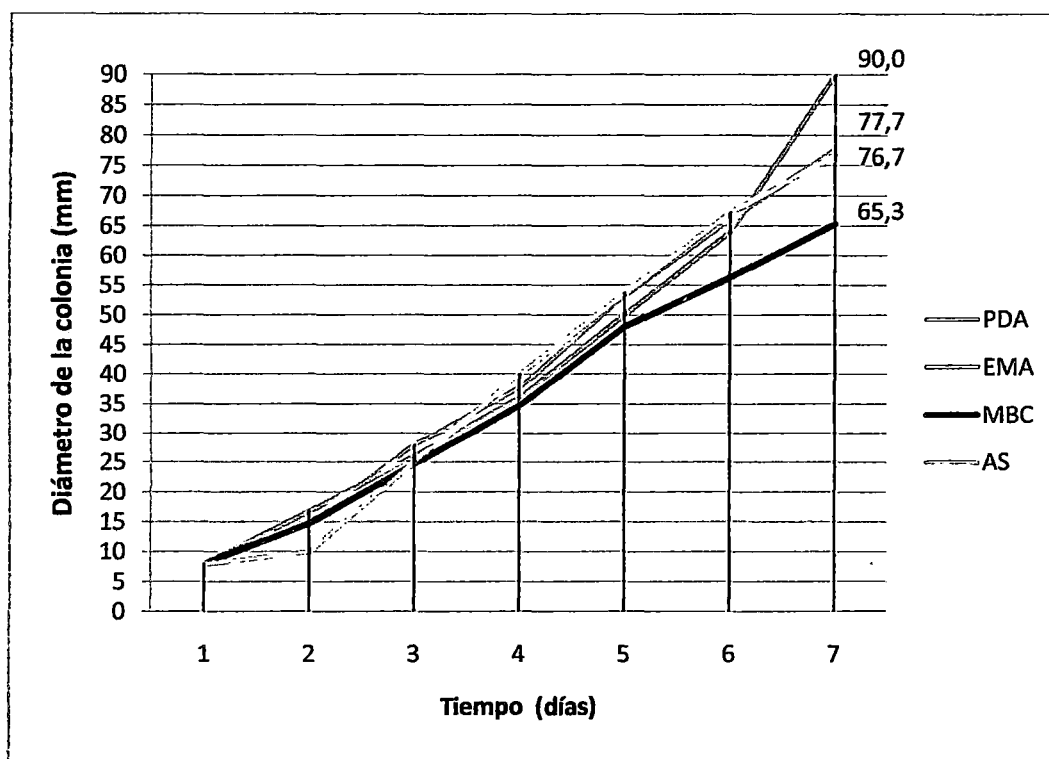
EMA = Agar Extracto de Malta

MBC = Medio Basado en Cerveza

AS = Agar Sabouraud.

La tabla N° 05 muestra el diámetro promedio de las tres repeticiones que presento en micelio del hongo *Pycnoporus sanguineus* durante los 7 días de evaluación y la velocidad de crecimiento micelial en los diferentes medios de cultivo.

Gráfico N° 01: Crecimiento del diámetro de la colonia del hongo *Pycnoporus sanguineus* en cuatro medios de cultivo.

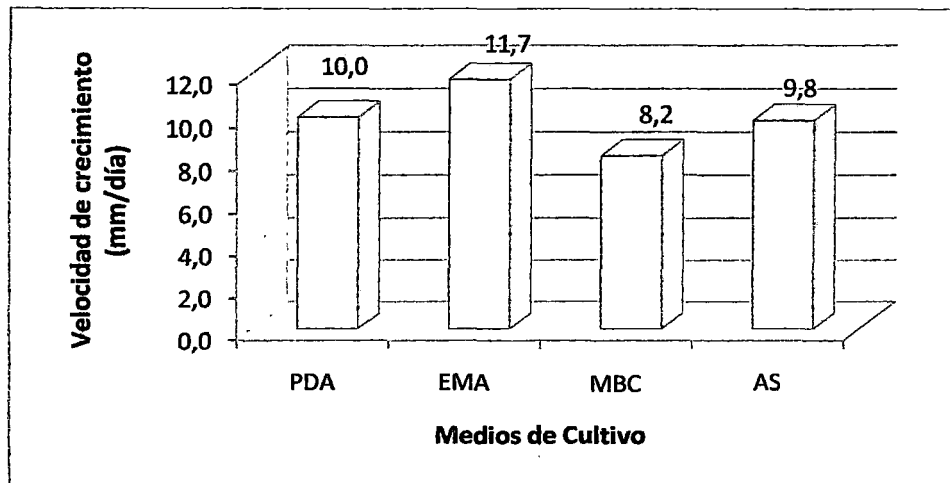


Leyenda:

PDA = Papa Dextrosa Agar
EMA = Agar Extracto de Malta
MBC = Medio Basado en Cerveza
AS = Agar Sabouraud.

El gráfico N° 01, muestra el diámetro promedio de las tres repeticiones que obtuvo el micelio de *P. sanguineus* al cabo de 7 días de evaluación en cada medio de cultivo, el crecimiento del micelio es homogéneo en los cuatro medio de cultivo hasta el 5° día de evaluación; al 6° día se observa diferencias en el crecimiento y al 7° día la diferencia es mayor observado que el micelio tuvo mejor crecimiento en el medio EMA con 90 mm de diámetro llenando la placa Petri por completo, seguido del medio PDA con 77.7 mm, en tercer lugar el medio AS con 76.7 mm y en ultimo lugar el medio basado en cerveza (MBC) con 65.3 mm de diámetro.

Gráfico N° 02: Velocidades de crecimiento del micelio del hongo *P. sanguineus* en cuatro medios de cultivo



Leyenda:

PDA = Papa Dextrosa Agar
EMA = Agar Extracto de Malta
MBC = Medio Basado en Cerveza
AS = Agar Sabouraud.

El gráfico N° 02 muestra las velocidades de crecimiento micelial del hongo *Pycnoporus sanguineus* en los medios de cultivo evaluados, en primer lugar el medio EMA con una velocidad de crecimiento de 11,7 mm/día, probablemente esto fue posible por la composición química (Ver anexos) de este medio que cuenta con extracto de malta y dextrosa, disacáridos de fácil degradación y absorción, siendo la fuente principal de carbono para el micelio del hongo; la peptona suministra el nitrógeno requerido por el hongo. En segundo lugar se encuentra el medio PDA que presentó una velocidad de 10,0 mm/día, este medio tiene un alto contenido de carbohidratos teniendo como componente principal infusión de papa más dextrosa probablemente el contenido de nitrógeno es menor en comparación al medio EMA. En tercer lugar se encuentra el medio Sabouraud con 9,8 mm/día, en este caso este medio presenta mayor contenido de nitrógeno en la caseína y la peptona,

como fuente de carbono un monosacárido (glucosa) que es consumido rápidamente por el hongo. En último lugar se encuentra el medio MBC con una velocidad de 8,2 mm/día probablemente el crecimiento es menor debido a su bajo contenido de carbohidratos.

Tabla N° 06: Análisis de varianza de la velocidad de crecimiento de la colonia de *Pycnoporus sanguineus* en cuatro medios cultivo (mm)

Fuente de variación	SC	GL	CM	Razón de Variación (RV)		Nivel de Significancia
				Fc	Ft (3;24)	
Entre muestras	77.025	3	25.68	Fc = 3.25	0.05	* diferencia significativa
Dentro de las muestras	189.24	24	7.885		0.01	
Total	266.265	27	33.56		3.01	

El análisis estadístico de varianza dio como resultado que el valor del F calculado (Fc) para la razón de varianza, es mayor que F tabular (Ft) al 95% y menor al 99% de confianza; siendo $p > 0.05$ entonces se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis alterna (H_1), es decir que existe una *diferencia significativa* entre los promedios de las velocidades de crecimiento micelial de los cuatro tratamientos evaluados.

Estadísticamente el medio EMA es el más adecuado para la propagación del micelio del hongo *P. sanguineus* con una velocidad de crecimiento micelial de 11.7 mm/día, valor superior al reportado por Acosta en el 2010, que utilizó el medio basado en harina integral de trigo (HIT) con una velocidad de crecimiento micelial de 9mm/día para el hongo *Pycnoporus sanguineus* y a la reportada por Morales en el 2009, indica que para el hongo medicinal *Schizophyllum commune* no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los medios PDA y EMA que presentaron velocidades de crecimiento de 6 y 4 mm/día respectivamente.

3.2.3 Obtención de cuerpos fructíferos cultivados del hongo *Pycnoporus sanguineus*

Respecto a la producción del Spawn "Semilla fúngica", el tiempo de colonización micelial del hongo *Pycnoporus sanguineus* en el trigo fue de 28 días a 25°C.

Figura N° 19: Bolsas con diferentes sustratos inoculadas con spawn "semilla del hongo" del hongo *Pycnoporus sanguineus*



Tabla N° 07: Tiempos del ciclo de cultivo en los diferentes sustratos evaluados

ETAPAS	SUSTRATOS				
	SAP	SAS	SCP	SCS	SCA
Inoculación - Inducción	105 días	97 días	*	*	*
Inducción - 1º cosecha	85 días	84 días	*	*	*
1º cosecha - 2º cosecha	89 días	88 días	*	*	*
2º cosecha - 3º cosecha	97 días	96 días	*	*	*
TOTAL	376 días	365 días	*	*	*

Leyenda:

SAP= 99 % de Aserrín + 1 % de yeso

SAS= 80 % de Aserrín + 19 % de salvado de arroz + 1 % de yeso

SCP= 99 % de cascara de cacao + 1 % de yeso

SCS=80 % de cascara de cacao + 19% de salvado de arroz + 1 % de yeso

SCA=50 % cascara de cacao + 49 % de aserrín 1 % de yeso

*No presento invasión micelial

El micelio del hongo *Pycnoporus sanguineus* colonizó completamente el sustrato SAP (99 % de Aserrín + 1 % de yeso) y SAS (80 % de Aserrín + 19 % de salvado de arroz + 1 % de yeso) mientras que no hubo colonización en los sustratos SCP (99 % de cascara de cacao + 1 % de yeso), SCS (80 % de cascara de cacao + 19% de salvado de arroz + 1 % de yeso) y SCA (50 % cascara de cacao + 49 % de aserrín + 1 % de yeso).

El factor que pudo haber afectado el crecimiento del micelio en los sustratos que presentaron en su composición cascara de cacao fue probablemente el tamaño de partícula entre 2 a 5 mm.

Según Calvo en 1993 indica que el tamaño de las partículas de la cascara de cacao que se encuentran entre 1,25 y 4,00 mm dificulta el crecimiento del hongo sobre el sustrato por la presencia de pectina en la cáscara de cacao y la formación de gel o mucílago, que es mayor en partículas pequeñas.

El proceso de colonización completo se dio a la temperatura ambiente de 16°C en un periodo de 97 días para el sustrato SAS y 105 días para el sustrato SAP; transcurrido este periodo las bolsas se trasladaron al ambiente acondicionado con humedad relativa de 80% y temperatura promedio de 16°C. Las bolsas fueron abiertas por la parte superior, al tercer día de entrar en contacto con el oxígeno los bloques fueron tomando el color anaranjado característico de la especie *Pycnoporus sanguineus*, los primordios iniciales se formaron a los ocho días en promedio; la superficie que seguía cubierta por la bolsa no pigmentó por lo que se decidió retirar las bolsas por completo.

A los 84 y 85 días después de la inducción se obtuvieron cuerpos fructíferos en los sustratos SAS y SAP respectivamente. Después de la realización de

la primera cosecha de los cuerpos fructíferos, los bloques fueron sumergidos en agua por 24 horas, hidratándose al doble del peso que presento el bloque después de la primera cosecha, fue necesario hidratar los bloques debido a la pérdida de humedad de estos y para inducir la segunda oleada; esta técnica es muy utilizada en el cultivo del hongo *Lentinula edodes* "Shitake" para la inducción de la fructificación por lo que fue adaptada a nuestra técnica.

A los 88 y 89 días después se logró la segunda cosecha en los sustratos SAS y SAP respectivamente, para obtener una tercera cosecha se repitió el proceso anterior, 96 y 97 días después se tuvo la tercera cosecha en el sustratos SAS y SAP respectivamente.

3.2.4 Evaluación de la Producción

Tabla N° 08: Ciclo de cultivo, Rendimiento, Eficiencia biológica y tasa de producción de la cepa A del hongo *Pycnoporus sanguineus* en los sustratos SAP y SAS

Cepa	Sustrato	CC (Días)	R (%)	EB (%)	TP
CIPHAM 005	SAP	365	41,98	83,97	0,230
	SAS	376	30,85	61,70	0,164

SAP = 99 % de Aserrín + 1 % de yeso

SAS = 80 % de Aserrín + 19 % de salvado de arroz + 1 % de yeso

CC = Ciclo de Cultivo

R (%) = Rendimiento

EB (%) = Eficiencias Biológica

TP = Tasa de Producción

La tabla N° 08 muestra los resultados del Ciclo de cultivo, Rendimiento, Eficiencia biológica y tasa de producción de la cepa CIPHAM-005 del hongo *Pycnoporus sanguineus* en los sustratos SAP y SAS; esta cepa tuvo mayor rendimiento, eficiencia biológica y tasa de productividad en el sustrato SAS (80 % de Aserrín + 19 % de salvado de arroz + 1 % de yeso), esto se debe probablemente a que el sustrato SAS tiene en su composición una fuente de

nitrógeno que es el salvado de arroz que también es reportado por Sánchez en el 2001, en el caso del sustrato SAP no tuvo suplementos de nitrógeno.

Los valores obtenidos se encuentran dentro de los parámetros recomendados en la tecnología de producción de hongos.

El ciclo de cultivo en el sustrato SAP duró 11 días más que en el sustrato SAS. El rendimiento obtenido en el sustrato SAS fue de 41,98 % y en el SAP 30,85%; La eficiencia biológica del sustrato SAS fue 83,97 % y en el sustrato SAP 61,70%; el sustrato SAS tuvo una mejor tasa de producción debido a que tiene un ciclo de cultivo menor y una eficiencia biológica superior al presentado en el sustrato SAP. Comparando estadísticamente los valores obtenidos en los distintos parámetros evaluados se determinó que existe una diferencia altamente significativa ($p > 0,01$) entre los sustratos SAP y SAS; por lo cual determinamos que el sustrato SAS con 80 % de Aserrín + 19 % de salvado de arroz + 1 % de yeso es el sustrato óptimo para la obtención de cuerpos fructíferos del hongo *Pycnoporus sanguineus*.

La cepa CIPHAM-005 de *Pycnoporus sanguineus* tuvo una eficiencia biológica de 83,97 % y tasa de producción 0,23 obtenidos en el sustrato SAS (80 % de Aserrín + 19 % de salvado de arroz + 1 % de yeso) a una temperatura de 16°C; superiores a los reportados por Acosta (2010) para la cepa HEMIM-53 de *Pycnoporus sanguineus* con una eficiencia biológica de 63,3 % y tasa de producción de 0,20 sobre aserrín de pino, encino y cedro, obtenidos a 24°C.

Figura N° 19 y 20: Derecha primordios a la Izquierda Cuerpos fructíferos del Hongo

Pycnoporus sanguineus en el sustrato (SAS)



3.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DEL HONGO *Pycnoporus sanguineus*

3.3.1 Pruebas de solubilidad

Los resultados de las pruebas de solubilidad se muestran en la siguiente tabla

Tabla N° 09: Resultado de la prueba de solubilidad

Solvente	Muestra	Resultado
Cloroformo	<i>Pycnoporus sanguineus</i> (picado)	I
Acetato de etilo	<i>Pycnoporus sanguineus</i> (picado)	I
Metanol puro	<i>Pycnoporus sanguineus</i> (picado)	PS
Etanol puro	<i>Pycnoporus sanguineus</i> (picado)	PS
Etanol 80%	<i>Pycnoporus sanguineus</i> (picado)	S
Etanol 70%	<i>Pycnoporus sanguineus</i> (picado)	PS
Agua Destilada	<i>Pycnoporus sanguineus</i> (picado)	PS

Leyenda:

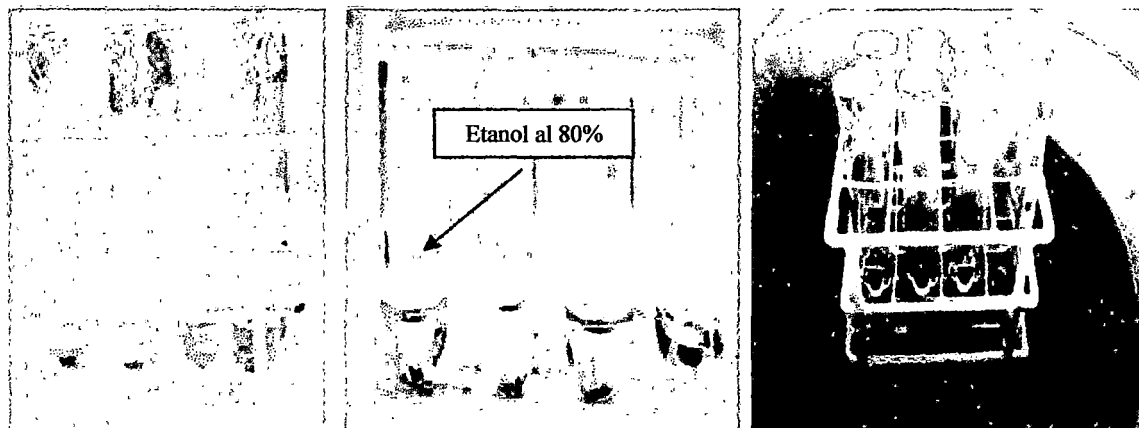
S: soluble

PS: parcialmente soluble

I: insoluble

La tabla N° 09 muestra los resultados obtenidos en la prueba de solubilidad, determinando que el solvente mas adecuado para realizar la extracción del solvente es el Etanol al 80%, fue el que presentó mayor intensidad de color al entrar en contacto con el hongo.

Figura N° 21, 22 y 23: Pruebas de solubilidad



3.3.2 Obtención del extracto crudo

Las cantidades de extracto obtenido a partir de los cuerpos fructíferos secos silvestres y cultivados de la especie en estudio se indican en la siguiente tabla.

Tabla N° 10: Cantidad de extracto crudo obtenido

Muestra	Peso de la muestra(g)	Peso del extracto(g)
Hongo silvestre	50	1,878
Hongo cultivado	50	2,016

En la tabla N° 10 se indica la cantidad de extracto obtenido a partir de 50 gramos de muestra seca del hongo silvestre y cultivado. Ambas muestras proporcionaron una cantidad similar de extracto crudo con una diferencia mínima de 0.138 g, esto puede deberse a las condiciones ambientales en la que los hongos crecieron.

Los hongos silvestres estuvieron expuestos a diferentes factores ambientales; mientras que los hongos cultivados no estuvieron expuestos a

ninguno de estos factores, por lo que no hubo deterioro de los carpóforos; esta podría ser una explicación de porque se obtuvo mayor cantidad de extracto en los carpóforos cultivados.

Figura N° 24 y 25: A la derecha Equipo de Rotavapor donde se realizo el proceso de extracción, a la Izquierda extractos de los carpóforos silvestres y cultivados del hongo *Pycnoporus sanguineus*



3.4 BIOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE LOS CARPÓFOROS SILVESTRES Y CULTIVADOS DEL HONGO *Pycnoporus sanguineus* EN *Artemia salina* Leach.

Artemia salina es un crustáceo sensible a un amplio rango de compuestos con actividad biológica y de muy diversas estructuras químicas planteando su uso en pruebas de toxicidad.

Figura N° 26 y 27: Derecha quistes de *Artemia salina* en cámara de cultivo; a la izquierda vista al microscopio de nauplios de *Artemia salina*.



Figura N° 28: Conteo de nauplios de *Artemia salina* para el bioensayo

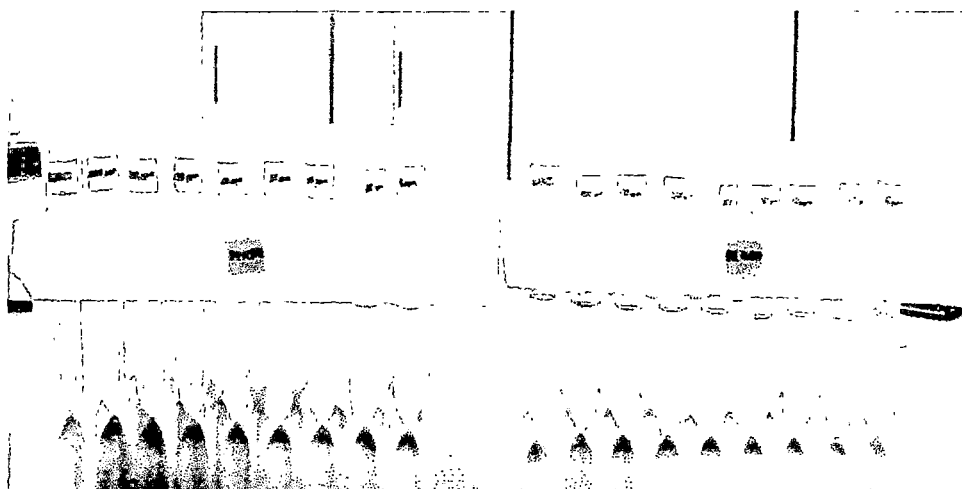


Tabla N° 11: Mortalidad de los nauplios de *A. salina* en los extractos crudos de los carpóforos silvestres y cultivados del hongo *Pycnoporus sanguineus*

Extracto	Porcentaje de Mortalidad (%) por concentración									DL ₅₀ µg/ml	Nivel de Confianza
	Blanco	6 µg/ml	10 µg/ml	24 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	240 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml		
Silvestre	0	10	10	10	10	20	20	50	100	441,2	95%
Cultivado	0	10	10	10	20	20	30	50	100	415,04	95%

La tabla N° 11 muestra el porcentaje de mortalidad en las diferentes concentraciones evaluadas, el porcentaje de mortalidad fue proporcional al incremento de las concentraciones de cada extracto. Estos datos permitieron obtener la DL₅₀ de los extractos de los carpóforos silvestres y cultivados, determinando que la DL₅₀ para el hongo cultivado es 415,04 µg/mL y para el silvestre es 441,20 µg/mL. El grado de toxicidad de los extractos se encuentra dentro de la categoría de moderadamente tóxico. La DL₅₀ permitió establecer la concentración máxima a la que puede exponerse al parásito para que estos mueran por acción del principio activo del extracto de *P. sanguineus* y no por toxicidad excesiva debido a que no son citotóxicos, es decir que la muerte de los nauplios se dio por el principio activo y no porque haya causado daño celular.

Figura N° 29: Diferentes concentraciones de extractos de los carpóforos silvestres y cultivados del hongo *Pycnoporus sanguineus* a los que fueron sometidos los nauplios de *Artemia salina*



Correa (2005) reporta una DL_{50} de 15,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para extractos hexánicos del hongo *Pycnoporus sanguineus* este valor esta en la categoría de muy tóxico, debido al solvente que utilizaron. La DL_{50} del los extractos etanólicos de los carpóforos silvestres y cultivados del hongo *Pycnoporus sanguineus* obtenidos en el presente trabajo de investigación (441,20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 415,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ son menores en toxicidad.

3.5 COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE LOS EXTRACTOS DE LOS CARPÓFOROS SILVESTRES Y CULTIVADOS DEL HONGO *Pycnoporus sanguineus*

Tabla N° 12: Actividad leishmanicida en porcentaje de los extractos silvestres y cultivados del hongo *Pycnoporus sanguineus* en diferentes especies de leishmania.

Especie	Extracto de los carpóforos	Concentraciones			
		25 ug/mL	50 ug/mL	200 ug/mL	400 ug/mL
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	Cultivados	15.86 %	29.33 %	44.34 %	87.71 %
	Silvestres	9.21 %	22.99 %	36.79 %	85.66 %
<i>Leishmania(V.) guyanensis</i>	Cultivados	16.15 %	23.64 %	51.23 %	95.73 %
	Silvestres	14.99 %	22.97 %	49.06 %	94.48 %
<i>Leishmania (V.)panamensis</i>	Cultivados	34.21 %	66.19 %	98.24 %	99.18 %
	Silvestres	25.50 %	58.65 %	95.81 %	98.75 %
<i>Leishmania spp.</i>	Cultivados	9.37 %	18.75 %	42.23 %	78.71 %
	Silvestres	5.39 %	15.57 %	31.58 %	77.78 %

La tabla N° 12 muestra la actividad leishmanicida de las diferentes concentraciones de los extractos de los carpóforos silvestres y cultivados del hongo *Pycnoporus sanguineus*, comprobándose que esta especie si tiene actividad leishmanicida.

Observándose mayor porcentaje de mortalidad a la concentración de 400 ug/mL en ambos extractos, de las cuatro especies de *Leishmania* evaluadas la más susceptible a los extractos fue *Leishmania (V.) panamensis* con un porcentaje de mortalidad de 99,18 % y 98,75%;

Leishmania (V.) guyanensis con 95,73 % y 94,48 %; en tercer lugar *Leishmania (V.) braziliensis* con 87,71 % y 85,66 % en los extractos de los carpóforos cultivados y silvestres respectivamente.

La especie que presento menor susceptibilidad a los extractos del hongo fue la cepa de *Leishmania sp.* con 78,71 % de mortalidad en el extracto de los carpóforos cultivados y 77,74 % en el extracto de los carpóforos silvestres.

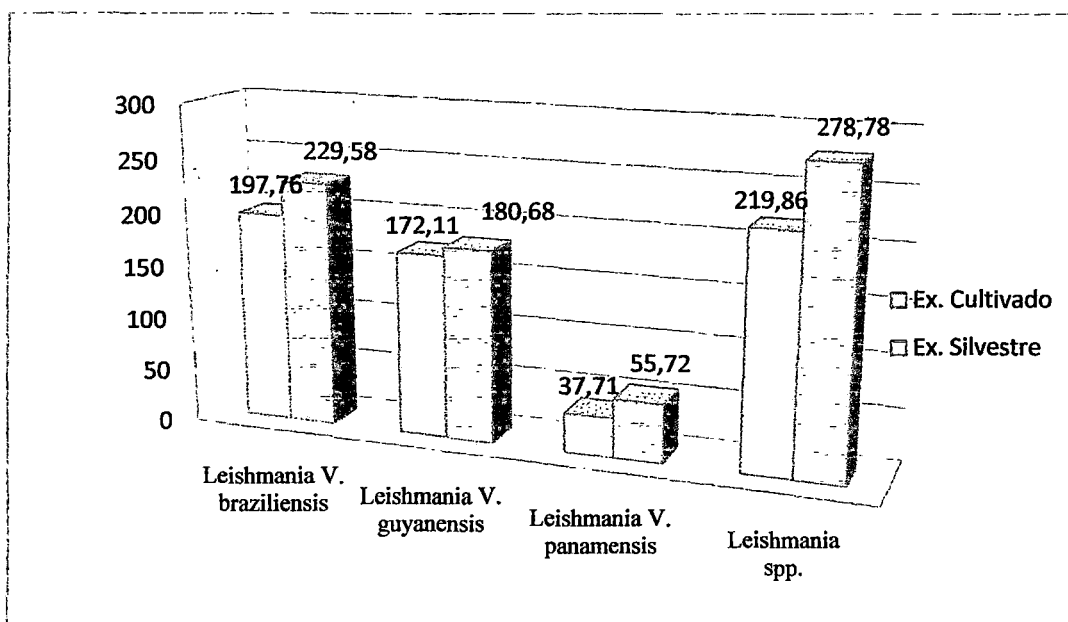
En todos los casos el porcentaje de mortalidad del extracto de los carpóforos cultivados fue mayor, pero estadísticamente con la prueba de T - student se determinó que no existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el porcentaje de actividad leishmanicida de los extractos de los carpóforos silvestres y cultivados del hongo *Pycnoporus sanguineus* concluyendo que ambos extra ambos extractos tienen la misma actividad leishmanicida.

Tabla N° 13: Concentración efectiva media (CE₅₀) de los extractos silvestres y cultivados del hongo *Pycnoporus sanguineus*.

Especie	CE ₅₀ (µg/ml)	
	Extracto Cultivado	Extracto Silvestre
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	197,76	229,58
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	172,11	180,68
<i>Leishmania (V.) panamensis</i>	37,71	55,72
<i>Leishmania spp.</i>	219,86	278,78

La tabla N° 13 muestra las concentraciones efectivas medias CE₅₀ que es la concentración del extracto que provoca una respuesta en un 50 % de la población evaluada; estos valores permiten realizar comparaciones con otros trabajos de investigación.

Gráfico N° 03: Concentración efectiva media (CE₅₀) para los extractos cultivados y silvestres del hongo *Pycnoporus sanguineus*.



Para la especie *Leishmania (Viannia) braziliensis* Rojas, J.; y col, (2009) reportan la actividad leishmanicida de la especie vegetal *Unonopsis spectabilis* con una CE₅₀ = 54,2 ug/mL. Brito, S.; y col. (2006) indica la actividad leishmanicida de la Asteraceae *Wedelia trilobata* contra los amastigotes axénicos y promastigotes de *Leishmania (Viannia) braziliensis* con una CE₅₀ de 0,25 y 0,78 ug/mL respectivamente y Ruíz, G., y col. (2005) reporta la actividad leishmanicida de la planta *Piper cumanense* con una CE₅₀ de 12,5 µg/ mL en *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

En el presente trabajo de investigación se obtuvieron CE₅₀ de 197,76 µg/mL y 229,58 µg/mL de los extractos de los carpóforos cultivados y silvestres respectivamente para *Leishmania (Viannia) braziliensis*; valores superiores encontrados en los reportes anteriores para plantas superiores, se hace esta comparación debido a que no se cuenta con reportes para *Pycnoporus sanguineus*.

Para la especie *Leishmania (Viannia) guyanensis*, no se encontraron antecedentes de actividad leishmanicida de plantas superiores o inferiores, en el estudio realizado se determinó las CE_{50} de los extractos de los carpóforos cultivados y silvestres de 172,11 y 180,68 $\mu\text{g/mL}$ para *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

Correa, E. y col., 2005 reporta la actividad leishmanicida de *Pycnoporus sanguineus* en amastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis* con una CE_{50} de 4,10 $\mu\text{g/mL}$. En nuestro trabajo de investigación se encontró una actividad leishmanicida de los extractos de los carpóforos silvestres y cultivados del hongo *Pycnoporus sanguineus* en promastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis* con una CE_{50} de 55,72 y 37,71 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; siendo estos valores superiores a los reportados por Correa 2005.

Para la cepa de *Leishmania spp.* la CE_{50} del extracto del hongo cultivado fue de 219,86 $\mu\text{g/mL}$ y para el extracto del hongo silvestre fue de 278,78 $\mu\text{g/mL}$.

Rojas, en el 2009 reporta la CE_{50} de 10 $\mu\text{g/mL}$ para la pentamidina como fármaco patrón en contra de leishmania. Todos los valores encontrados en el estudio son mayores a los reportados en los antecedentes.

CONCLUSIONES

1. Se logro el aislamiento del micelio del hongo *Pycnoporus sanguineus* (L: Fr) Murr. por medio de pseudotejido, obteniendo dos cepas; se determino como medio de cultivo sólido óptimo para la propagación del micelio vegetativo de *Pycnoporus sanguineus* (L: Fr) Murr. al Agar Extracto de Malta (EMA) en la cual se logro una velocidad de crecimiento de 11.7 mm/día.
2. El sustrato óptimo para la obtención de cuerpos fructíferos del hongo *Pycnoporus sanguineus* (L: Fr) Murr. es la mezcla de 80 % Aserrín + 19 % Salvado de Arroz + 1 % de yeso con un rendimiento (R) de 41.98 %; eficiencia biológica de 83.97 % y tasa de producción de 0.23 a la temperatura de 16 °C.
3. La DL₅₀ de los extractos crudos de los carpóforos silvestres del hongo *Pycnoporus sanguineus* (L: Fr) Murr. es de 441,20 µg/mL y de los cultivados es 415,04 µg/mL que se encuentran en la categoría de extractos moderadamente tóxicos.
4. Se determinó que los carpóforos del hongo *Pycnoporus sanguineus* (L: Fr) Murr. silvestres y cultivados tienen actividad leishmanicida in vitro sobre promastigotes de leishmania determinado que la concentración efectiva media (CE₅₀) para: *Leishmania (Viannia) braziliensis* de 229,58 y 197,76 µg/mL; *Leishmania (Viannia) guyanensis* de 180,68 y 172,11 µg/mL, *Leishmania (Viannia) panamensis* de 55,72 y 37,71 µg/mL y

Leishmania spp. de 275,78 y 219,86 µg/mL respectivamente; no existe diferencia significativa (al 95 % de significancia) entre la actividad leishmanicida de los extractos de los carpóforos silvestres y cultivados en promastigotes de las cuatro especies de *Leishmania* evaluadas. Siendo *Leishmania (Viannia) panamensis* La especie mas susceptible a los extractos del hongo *Pycnoporus sanguineus* (L: Fr) Murr.

RECOMENDACIONES

1. Aislar nuevas cepas del hongo *Pycnoporus sanguineus* (L: Fr) Murr. y evaluar la actividad leishmanicida de las fracciones de los extractos en diferentes especies de *Leishmania* determinando las moléculas encargadas de la actividad leishmanicida.
2. Continuar con la investigación evaluando la actividad leishmanicida de los extractos en amastigotes de *leishmania* con técnicas como el cultivo celular.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Acosta, L.; et al.; (2010) **“Pycnoporus sanguineus, un hongo con potencial biotecnológico”** libro Hacia en desarrollo sostenible del sistema de producción de hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: avances y perspectivas en el siglo XXI. Capítulo 14, México. Pág. 189 – 220.
2. Alexopoulos, C. J.; Mins, C. W. (1985) **“Introducción a la Micología”**, Editorial Omega S.A, Barcelona. Pág. 389 - 491.
3. Alzamora, L., et al.:(2007)**“Actividad leishmanicida de los extractos metanólicos de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum*, Chacón (Brassicaceae)”**, Rev. Peruana de Biología, Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. número especial 13(3) pág. 211 – 214.
4. Ampuero, Julia.; 2000 **“Leishmaniasis Módulo Técnico”**, Editorial del Ministerio de Salud, Perú. Pág. 9 – 12.
5. Barreto, Noel. (1997) **“Aislamiento y Cultivo del Hongo Comestible *Auricularia Fuscosuccinea* (Mont) Farlow, Del Valle De La Convención”** (Tesis) Facultad De Ciencias Biológicas. UNSAAC, Cusco – Perú. Pág. 95 - 96
6. Bartolomé, M. C. (2004) **“Valoración del Riesgo Toxicológico sobre larvas de *Artemia* de desinfectantes Utilizados en torres de refrigeración”** (tesis doctoral) Universidad Complutense de Madrid. Facultad De Veterinaria, España. Pág. 38 - 57
7. Bautista, N.; et al.; (2009) **“Obtención de Colorante Natural del hongo *Pycnoporus sanguineus* (L: Fr) Murr.”** CIPHAM Cusco–Perú. Pág. 1-7.

8. Bermúdez, R.; García, N.; Mourlot, A.; 2007. **“Tecnología Química” (Fermentación sólida para la producción de *Pleurotus sp.* Sobre mezclas de pulpa de café y viruta de cedro)**, Editorial del centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Vol. XXVII, N°2, Cuba. Pág. 55 al 62.
9. Bermúdez, S. R.; Ramos, S. I.; (2002) **“Fermentación sólida de la cáscara de cacao por *Pleurotus sp.*”**, Revista de Tecnología Química Vol. XXII, N° 3, Ecuador. Pág. 53 – 58
10. Berovic, M., et al.; (2003) **“Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides”** Journal of Biotechnology, 103: Pág. 77-86.
11. Brito, S.; et al.; (2006) **“Eficacia de un ácido kaurénico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asteraceae) contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*”** Revista Biomédica vol. 26, Instituto Nacional de Salud de Bogotá – Colombia. Pág. 180 -187.
12. Calvo, L.; Sánchez; J., (1993) **“Producción de hongos comestibles en condiciones rústicas bajoun cacaotal y utilizando cáscara de coco como sustrato”**, Proceed. 11th Int. Cocoa Res. Cocoa Producers Alliance, Yamoussoukro, Ivory Coast. Pág. 18- 24.
13. Cardona, D., (2006) **“Moléculas Bioactivas contra *Leishmania (viannia) panamensis* Actividad y Optimización Molecular”**, (tesis de doctorado) Universidad De Antioquia, Medellín - Colombia. Pág. 1- 89
14. Celentano, Ana Maria (2004) **“Acción De Las Drogas Antiparasitarias”** Editorial Ouellette, Colombia. Pág. 28 – 30.

15. Chan, M.; Peña, L. (2001) **“Plant natural products with leishmanicidal activity”** Grupo de química orgánica, Unidad de biotecnología, Yucatan – México. Pág. 1 – 16.
16. Chester, P.; Clifton, R.; Wayne, E.; 1994 **“Parasitología Clínica”**, Editorial Metropolitana de ediciones, S.A de C.V, México. Pág. 65 – 88.
17. Chihara G, et al.; (1969) **“Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.)”** Sing. Nature 222: Pág. 687-688.
18. Chimey H. C.; Holgado R. M.; (2010) **“Los hongos comestibles silvestres y cultivados en Perú”**, Libro Hacia en desarrollo sostenible del sistema de producción de hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: avances y perspectivas en el siglo XXI. Capítulo 21, México. Pág. 381-395.
19. Chimey Henna, César A., 2009 **“Manual de Cultivo de Hongos Comestibles y Medicinales”** Centro de Investigación y Producción de Hongos Alimenticios y Medicinales (CIPHAM), UNSAAC. Pág.11-12.
20. Correa, E.; et al.; (2005) **“Actividad leishmanicida de *Pycnoporus sanguineus*”**. Actual Biol 27 (Supl. 1), Colombia- Medellín. Págs. 39-42.
21. Croft S, Coombs G. (2003) **“Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Trends Parasitol”**; 19 (11): Pág. 502-508.
22. Cunningham M, Beverley S. (2001) **“Pteridine salvage throughout the *Leishmania* infectious cycle: implications for antifolate chemotherapy molecular and Biochemical Parasitology”**, Pág. 199 - 213.

23. Curvetto, N. R.; (2009) **“Grifola frondosa(Maitake): Su valor nutracéutico, nutricéutico, farmacéutico y cosmeceúutico. Tecnología de producción”**, Bahía Blanca – Argentina. Pág. 5 -7.
24. Deacon, 1993 **“Introducción a la Micología Moderna”**. Editorial LIMUSA S.A de C.V Segunda edición pág. 115.
25. Deacon, Jim. (2006) **“Fungal Biology”** *Institute of Cell and Molecular Biology, University of Edinburgh, UK*. Editorial Blackwell Publishing, cuarta edición, EE. UU. Pág. 110 – 122.
26. Delgado, Jhoel; 2010 **“Ecología y diversidad de polyporos a través de la gradiente altitudinal en las localidades de Trocha Unión y San Pedro reserva de biosfera del Manu – Cusco”** Tesis, Facultad de Ciencias Biológicas; UNSAAC. Cusco. Pág.60
27. Díaz, B. M.; Bulus, R. G.; (2003) **“Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad”**. Simposio Internacional de estadística, Santa Marta, Colombia. Pág. 67– 94.
28. Escobar, J. (2002) **“Programa Especial de Seguridad Alimentaria en coordinación”** INTECAP – FAO-PESA. Cooperación Española. Pág. 19 – 32.
29. Evans D. (1989). **Handbook on isolation characterization and cryopreservation of *Leishmania***. En: Special programme for research and training in tropical diseases. UNDP/WORLD BANK/WHO. Pág. 1-45
30. FAO (2005) **“Los hongos silvestres comestibles: perspectiva global de su uso e importancia para la población”**, Editorial de la FAO , Pág. 1 - 161

31. Fernández, A.; et al.; (2009) **“Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina*”**. Rev. Cubana medicina Tropical; Cuba. Pág. 254-258
32. Fernández, F., (2004) **“Guía Práctica de Producción de Setas (*Pleurotus Spp.*)”** Fungitec Asesorías, Guadalajara, Jalisco. México. Pág. 14 - 25
33. Flores, E.; et al.; (1999) **“Aceites Esenciales con actividad citotóxica como indicador de propiedades insecticidas”**, Editorial Biofardo, España. Pág. 35 - 38
34. Gaitán, R.; et al.; (2006) **“Manual practico del cultivo de setas”**, Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Veracruz, México, Pág. 16.
35. Gallego, M.; Riera, C. (2000.) **“Leishmaniasis Autóctona por *Leishmania infantum*”**. Unidad de parasitología, departamento de Microbiología y Parasitología sanitaria”, Facultad de Farmacia, universidad de Barcelona, España. Pág. 143 - 158
36. García, M., (2003) **“Cultivo de Setas y Trufas”**, Editorial Mundi-Prensa, España. Pág. 143-236.
37. González. A., Presa. M., (2007) **“Detección de metabólicos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*”**. Revista Iberoamericana de micología, edición 24, Santa Fe – Argentina,: Pág.59-61
38. Gutiérrez, D., Pacheco, C., (2003) **“Estandarización de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) Para el diagnóstico de**

- leishmaniasis**", Facultad De Ciencias Biológicas, UNSAAC, Cusco – Perú. Pág. 33- 37
39. Herrera, F.; (1924) **"Sinopsis de la Flora de Cuzco"**, Editado bajo el supremo auspicio del gobierno, Lima. Pág. 102
 40. Herrera, T.; Ulloa, M. (1998) **"El reino de los hongos micología básica y aplicada"**, Fondo de cultura económica, México D.F, pág. 326 – 370.
 41. Hiroshi S, Takeda M. (1993) **"Diverse biological activity of PSK (Krestin), a protein bound polysaccharide from *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel"** In: Chang ST, Buswell JA, Chiu SW, *et al*, editors. Mushroom Biology and Mushroom Products. Hong Kong: Chinese University Press. Pág. 237-245.
 42. INS, (2006) **"Protocolo De Vigilancia Epidemiológica Parte I"**, segunda edición, editorial del Ministerio de Salud del Perú. Pág. 75 - 86
 43. INS, (2007) **"Anuario Estadístico 2007"**, Editorial del Instituto Nacional de salud. Lima – Perú. Pág. 25
 44. Jong SC, Birmingham JM, Pai SH.; (1991) **Immunomodulatory substances of fungal origin EOS- Journal of Immunology and Immuno Pharmacology**, Pág. 115-122.
 45. Killick, A.; Kendrick, E.; (1990) **"Phlebotominae vectors of the Leishmaniasis"** a review. Medical and Veterinary Entomology (1990) 4; Pág. 1-24
 46. Lock Sing, O., (1997) **"Investigaciones fitoquímicas"**, Editorial De la Pontificia Universidad La Católica del Perú, Pág. 37 – 61.

47. López, A., (2007) **“Manual de producción de micelio de Hongos comestibles”**, Instituto de Genética Forestal – Universidad de Veracruz, México. Pág. 13- 27
48. Lucumi, A.; et al.; (1998) **“Sensitivity of *Leishmania viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes Antimicrob. Agents Chemother”**; 42(8): Pág. 1990-1995.
49. Martínez, C. Larque, (1993). **“Los hongos comestibles en México - Biotecnología de su reproducción”**. Micología Neotropical. Revista vol. V. Escuela de post graduados de Puebla. México.
50. Mata, H.M. (2003). **“Macrohongos de Costa Rica”**. Vol. I. 2 ed. Santo Domingo de Heredia, Instituto Nacional de Biodiversidad, Costa Rica. Pág.208-209
51. MINSA, 2006 **“Protocolos de Vigilancia Epidemiológicas”**, Editorial ministerio de Salud, Parte I, Segunda Edición. Perú. Pág. 80.
52. Mishra J, Saxena A, Singh S. (2007) **“Chemotherapy of Leishmaniasis: Past, Present And Future. Curr. Med. Chem”**.; 14(10): Pág.1153
53. Mojica, J.; Molano, C.; (2006) **“Prueba de determinación de carbono total y nitrógeno total en el capacho de uchuva, la cáscara de arveja y la tusa de mazorca”**. Laboratorio Químico Analítica de Agua. E.U. Marzo. Bogotá, Colombia.
54. Morales, O.;et al.;(2009) **“Caracterización y producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas del hongo comestible “Asan” (*Schizophyllum commune* Fr.)”** Tesis de maestría, Universidad de San

- Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Pág. 01– 59.
55. Mueller, G.; Bills, G.; Foster, M. (2001) **“Biodiversity of fungus inventory and monitoring methods”**, Editorial Materils. USA. Pág. 234
 56. MushWorld, (2005). **“Manual del cultivador de hongos 1”**. Editorial haeng-oon, República de Corea. Pág. 1 - 154
 57. Neyra, D. (1997) **“Las Leishmaniasis en el Perú folia dermatológica peruana”**, Lima – Perú. Pág.51–55.
 58. Nobles, M.K. & Frew, B.P. 2004, **“Fungal Databases”**. Canadá. Jardín Botánicos. 40(7): Pág. 987-1016
 59. OMS. 2002. **“Control of the leishmaniasis”** Geneva, World Health Organization Expert Comite. Technical Report of Series N°793; Pág. 47-51
 60. OPS, 1976 **“Métodos Estadísticos para Ensayos Biológicos”**. Río de Janeiro-Brasil. Pág.10-31.
 61. Pavlich Herrera, M. (1976) **“Ascomycetes y Bacidiomycetes del Perú”**, tomo I, dirección universitaria de bibliotecas y publicaciones, Lima – Perú. Pág. 97.
 62. Pérez Silva, E.; Aguirre, A.; Pérez, A., (1988) **“Aspectos sobre el uso y distribución de *Pycnoporus sanguineus* (Poliporaceae) en México”**, Revista de Micología, pág. 137 – 144.
 63. Rioux, J.; et al.; (1990) **Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification.** Ann Parasitol Hum Comp., 65(3): Pág.111-125.

64. Robledo, G., (2006) **“Taxonomía Ecología y Diversidad de Políporos”**, II Congreso Internacional de Ecología y conservación de Bosques de Polylepis”. Cusco - Perú. Pág. 1- 47
65. Robledo, S. Muñoz, D., Saez, J. (2008) **“Síntesis Y Actividades Leishmanicida Y Citotóxica In Vitro De Análogos 2-Arilquinolinas”**, Colombia. Pág. 27 - 38
66. Rojas, J.; et al.; (2009) **“Actividad leishmanicida de plantas medicinales de la amazonia Peruana”** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, Rev. Bol. de química VOLUMEN 26, Iquitos, Perú. Pág. 43-48
67. Ruiz, G.; et al.; (2005) **“Actividad Leishmanicida y Tripanocida de algunas plantas reportadas como medicinales en Colombia”**, Rev. de med. tropical de Vol: 3, Colombia. Pág. 45 - 56
68. Ryvarden, L. 1991. **“Genere of polypores, Nomenclature and taxonomy. Synopsis Fungorum”**. Oslo, Norway. Pág. 1 – 363.
69. Saldarriaga, Y., Pinedo F., (2001) **“Manual de Micología”**, Editorial Universidad de Antioquia, Medellín. Colombia. Pág. 1- 53
70. Sánchez, J., Royse, D., (2001) **“La Biología y el Cultivo de *Pleurotus spp.*”**, Editorial EcoSur. México. Pág. 1 – 290
71. Siqueira, E. M.; et al (1997), ***Pycnoporus sanguineus*: a novel source of (alpha) – amylase. Mycological Research**, volumen 101, Cambridge – University Press. Pág. 188 – 190.
72. Smânia, A.; et al.; (2003) **“Toxicity and Antiviral Activity of Cinnabarin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr.”** Phytother. Res. 17, 1069–1072.

73. Stamets P, Chilton JS. (1993) Grain culture. En: **“The Mushroom Cultivator”**. Editorial Agarikon. Washington. Pág. 1 – 385.
74. Vidovic, N., (1999) **“Specialty Mushrooms small scale Production, Mycelium”**, 25, Pág. 4 y 8.
75. Villegas, V.; Milena A.; Arredondo, C.; (2007) **“Evaluación de la producción del hongo *Lentinula edodes* Pegler en bloques sintéticos a base de residuos agroindustriales”** Universidad EAFIT, Grupo de investigación en procesos ambientales y biotecnológicos, Revista de Ingeniería y Ciencia, Volumen 3, número 6, Medellín - Colombia. Pág. 23 – 39.
76. Wayne, D. (2002). **“Bioestadística, Base para el análisis de las ciencias de la salud”**, Editorial Limusa Wiley, México. Pág. 65 - 107
77. Wrigtht, J., (2006) **“Hongos Guía de la Región Pampeana “Hongos sin Laminillas”**, Editorial L.O.L.A. Argentina. Pág. 49 – 61
78. Yang JH, Lin HC, Mau JL.; (2002) **“Antioxidant properties of several commercial mushrooms”**. Food Chemistry 77: Pág. 229-235.

REFERENCIAS EN INTERNET

- ✓ <http://www.hongoscomestibles-latinoamerica.com/>
- ✓ <http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/>
- ✓ http://wwwbiohidrica.cl/biohidrica_servicios.
- ✓ <http://www.revistademicologiamexica.mex/>
- ✓ <http://www.oecd.org/document/22/>
- ✓ <http://www.hongosenlaalimentacion.enfasis.com/usos-y-perspectivas>.
- ✓ <http://www.geocities.com/cucba/revistadeciencias.html>
- ✓ <http://openpdf.com/ebook/leishmanicidal-activity-of-pycnoporus-sanguineus-pdf>.
- ✓ <http://es.Los Hongos: Su Morf Reproduccion Fisiologia pdf>.
- ✓ <http://www.ib.unsam.edu.ar>
- ✓ <http://www.mycelia.be>
- ✓ <http://www.demycel.com>
- ✓ <http://www.sh-mushroom.com>
- ✓ <http://www.fifungi.com>
- ✓ <http://www.italspawn.com>

ANEXOS

Anexo N° 01: Ficha de colecta

Fecha.....Número.....

Localidad exacta.....Distrito.....Prov.:.....Dpto.:.....

Hábitat.....Hábito.....

Basidiocarpo

Tiempo..... Forma.....

Medidas.....x.....x.....cm Consistencia.....

Superficie del Píleo:..... Margen:.....

Textura:

Zonación:

Contexto

Superficie de los poros:..... Color:.....

Zonación:

Poros...../mm Capas de los

poros:.....

Sistema Hifal

Septos:..... Color:..... Medidas:..... Otros.....

Hifas generativas.....

Hifas esqueléticas.....

Hifas ligadoras.....

Esporas, Basidios y Cistidios

Forma:Tamaño:.....x.....x.....um Color:.....

Observaciones:

.....
.....
.....

Anexo N° 02: Clave Taxonómica para identificar la especie *Pycnopus sanguineus*

1'	Basidiocarpo resupinado	2
2'	Himenoforo con poros redondeados.....	3
3'	Esporas lisas	5
5'	Hifas generativas con fíbulas.....	6
6	Tubos y contexto, anaranjados o rojo cinabarrínico.....	104
104	Tubos y contexto naranjas, rojo latérico o rojo cinabarrínico.....	105
105'	Basidiocarpo anual resupinado, tubos y contexto naranja a rojo cinabarrínico creciendo sobre angiospermas.....	107
107'	Basidiocarpo rojo cinabarrínico, sistema hifal trimítico..... <i>Pycnopus sanguineus</i> (Ryvarden, L. 1991)	

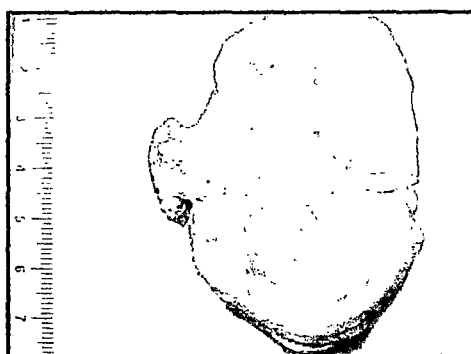
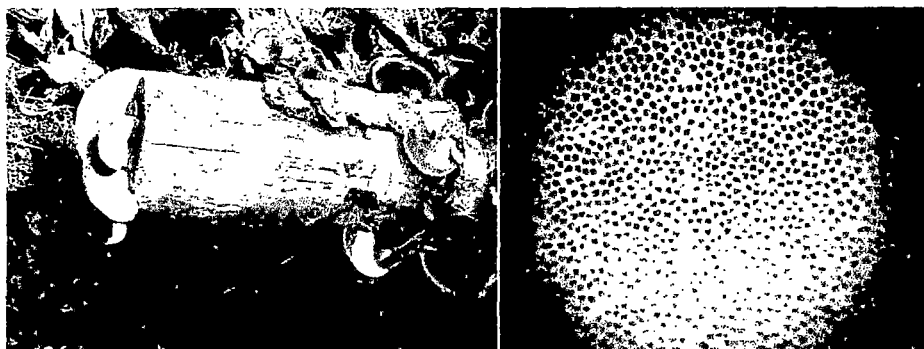
Anexo N° 03: Determinación taxonómica del hongo *Pycnoporus*

sanguineus

Características Macroscópicas

Basidiocarpo anual 8 x 4 x 1,5 cm, adherido por una base lateral o un pequeño estípote, delgado coriáceo cuando fresco, duro al secarse. Superficie del píleo glabro lustroso con zonación con ligeras bandas algo más claras u oscuras anaranjadas, contextocorchoso fibroso, margen agudo, himeniotubular con poros circulares, de 5 a 6 por mm. Se encontró sobre un sustrato lignícola.

Figura N° 01, 02 Y 03: Características morfológicas del cuerpo fructífero y el sustrato donde fue encontrado.



3.5.1 Características Microscópicas

Esporas cilíndricas lisas de pared delgada 5,8 μm ; basidios claviformes, sistema hifal trimítico con hifas generativas de septos fibulados; hifas esqueléticas y ligadoras de hasta 10 μm de ancho.

Observación: Se realizó observaciones del pseudotejido sin coloración, viendo las hifas esqueléticas de pared engrosada, cubierta de gránulos de pigmentos solubles el alcohol.

Figura N° 04: Hifas generativas e hifas esqueléticas himeniales

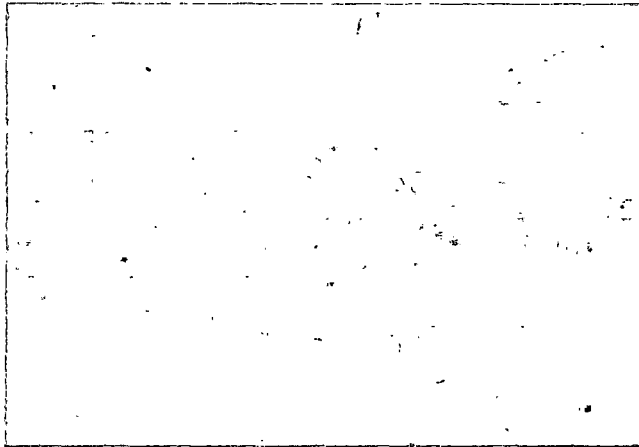


Figura N° 05: Hifas esqueléticas y ligadoras, (del trama)

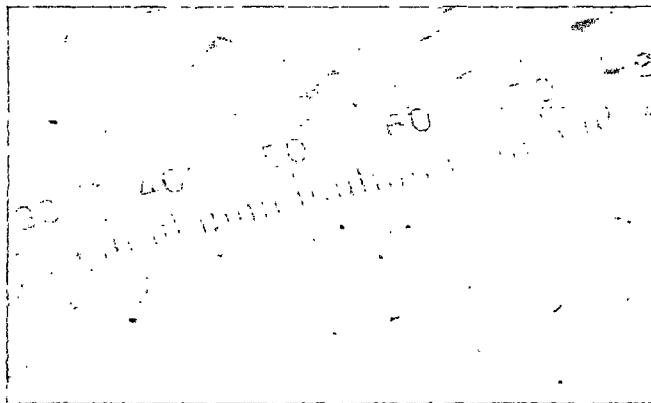
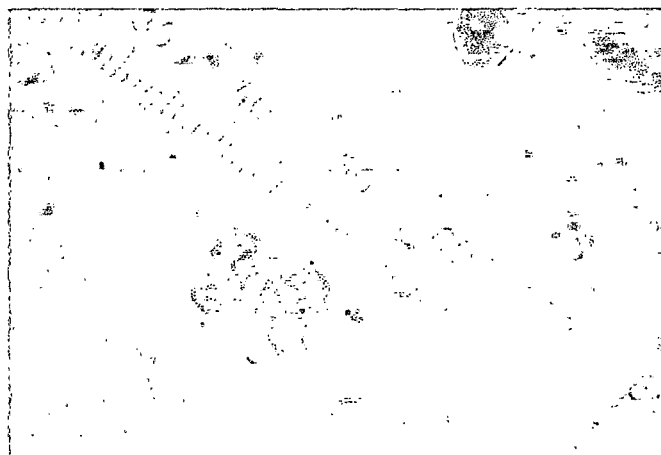


Figura N° 06: Basidios claviformes



Anexo N° 04: Composición química y preparación de los medios de cultivo sintéticos

1) Agar Extracto De Malta (Difcotm EMA)

Formula aproximada para 1 L (pH 4.7 +/- 0.2)

Maltosa	12.75g
Dextrosa.....	2.75g
Glicerol.....	2.35g
Peptona.....	0.78g
Agar.....	15g

Preparación: Suspensa 33.6 g del polvo en 1 L de agua destilada. Caliéntese con agitación frecuente y hierva por 1 minuto hasta que disuelva completamente. Autoclavar a 121 ° C por 15 minutos. Evitar el exceso de sobrecalentado para tener culturas optimas.

2) Oxoid Sabouraud

Formula aproximada para 1 L (pH 5.7 +/- 0.2)

Digerido pancreático de caseína.....	5.0 g
Digerido peptídico de carne fresca.....	5.0 g
Glucosa.....	20.0 g

Preparación: Preparar 30g del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y distribuir en recipientes definitivos. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 minutos.

3) Papa Dextrosa Agar (Difcotm PDA)

Formula aproximada para 1 L

Infusión de papa.....	200g
Bacto dextrosa.....	20g
Bacto Agar.....	15g

Preparación: Disolver 39 g de PDA en un litro de agua destilada, homogenizar y autoclavar y 121 – 124 ° C por 15 minutos.

4) Medio Basado en Cerveza (MBC)

Formula aproximada para 1 L

Cerveza.....250 mL

Agua destilada.....750 mL

Bacto Agar.....15 g

La cerveza contiene:

- Anhidrido carbónico
- Etanol
- Azucares
- Dextrinas
- Glicerina
- Ácidos orgánicos
- Proteínas
- Sales minerales

Preparación: Para preparar el medio se debe mezclar: 15 g de agar- agar, 250 ml de cerveza, 750 ml de agua destilada. Agitar hasta obtener una mezcla homogénea Autoclavar a 121° C por 15 minutos.

5) Medio USMARU

Solución fisiológica

- ClNa (0.85 g)
- Agua destilada (100 mL); diluir y autoclavar.

Solución stock de antibióticos

- Sulfato de estreptomina (0.5 g)
- Penicilina sódica (0.5 g)
- Agua destilada (10 mL)

Anexo N° 05: Crecimiento radial de la colonia de *Pycnoporus sanguineus*

en cuatro medios cultivo (mm)

Medio	Rep.	1° d	2° d	3° d	4° d	5°d	6° d	7° d
PDA	I	8.0	18.0	30.0	35.0	48.0	62.0	79.0
	II	8.0	12.0	26.0	40.0	62.0	72.0	76.0
	III	8.0	14.0	28.0	38.0	50.0	64.0	78.0
	Promedio	8.0	14.7	28.0	37.7	53.3	66.0	77.7
EMA	I	8.0	16.0	24.0	32.0	48.0	62.0	90.0
	II	8.0	16.0	26.0	40.0	54.0	60.0	90.0
	III	8.0	18.0	28.0	36.0	48.0	70.0	90.0
	Promedio	8.0	16.7	26.0	36.0	50.0	64.0	90.0
MBC	I	8.0	14.0	28.0	38.0	52.0	61.0	70.0
	II	8.0	16.0	22.0	34.0	46.0	54.0	62.0
	III	8.0	14.0	24.0	32.0	46.0	54.0	64.0
	Promedio	8.0	14.7	24.7	34.7	48.0	56.3	65.3
AS	I	8.0	10.0	25.0	40.0	53.0	66.0	74.0
	II	8.0	10.0	24.0	38.0	53.0	68.0	78.0
	III	8.0	10.0	26.0	42.0	55.0	68.0	78.0
	Promedio	8.0	10.0	25.0	40.0	53.7	67.3	76.7

Leyenda:

PDA: Papa dextrosa Agar

EMA: Agar extracto de Malta

MBC: Medio basado en cerveza

AS: Agar Sabouraud

d: día

Anexo N° 06: Tablas de composición química de diferentes sustratos en porcentajes

Residuo agroindustrial	Carbono total (%p/p)	Nitrógeno total (%p/p)
Aserrín *	51	9.11
Capacho de uchuva **	28.31	1.10
Cáscara de arveja **	25.51	9.18
Tuza de maíz **	18.66	10.85

Fuente : *Escobar, 2002, y **Mojica y Molano, 2006

MATERIAL	MATERIA SECA	GRASA	FIBRA	N-LIBRE	MINERALES TOTALES	CALCIO	NITROGENO
Roble (Hojas, en vivo o seco)	93.8	9.3	2.7	29.9	45.3	6.6	1.49

Fuente: Staments, 1993.

Material	Materia orgánica	N total	Grasa bruta	Fibra bruta	Extracto libre de N	Cenizas	C/N
Salvado de trigo	92.9	2.57	4.9	14.1	57.9	7.1	21.0
Salvado de centeno	94.6	2.69	4.3	7.4	66.1	5.4	20.4
Salvado de cebada	94.1	2.17	3.6	15.4	61.6	5.9	25.2
Salvado de avena	93.5	1.33	3.6	22.4	59.2	6.5	40.8
Salvado de arroz (entero)	88.5	2.32	18.3	11.8	43.9	11.5	22.1
Salvado de arroz (desgrasado)	87.8	3.17	3.0	13.1	51.9	12.2	16.1
Salvado de maíz	97.3	1.74	8.2	9.8	68.5	2.7	32.4
Bagazo de caña de azúcar (1)	97.5	0.18	0.4	51.9	44.0	2.5	314.2
Pulpa de café	—	0.59	—	—	—	—	—
Maguey (2)	91.1	0.36	2.8	32.4	53.6	8.9	146.8
Residuo de algodón	86.9	1.29	1.5	52.8	24.5	13.1	39.1
Cáscara de semilla de algodón	97.0	1.00	3.1	47.0	40.6	3.0	55.7
Cáscara de cacao (3)	92.2	2.79	5.3	16.1	53.3	7.8	19.2
Cáscara de girasol	96.1	0.96	3.4	53.4	33.3	3.9	58.0
Cáscara de cacahuete (3)	92.4	2.44	9.7	26.3	41.2	7.6	22.0
Cascarilla de arroz (4)	82.5	0.63	1.3	48.1	29.2	17.5	75.9
Semilla de uva (harina íntegra)	96.9	1.92	13.2	58.9	12.8	3.1	29.3
Semilla de uva (harina desgrasada)	96.3	1.87	1.3	49.6	33.7	3.7	29.9
Orujo de uva (alcoholería) (hollejo + raspón)	93.2	1.93	4.9	26.7	49.5	6.8	28.0
Orujo de uva (alcoholería) (hollejo + raspón + semillas)	95.1	1.87	8.6	28.6	46.2	4.9	29.5
Orujillo de aceituna (agotado)	97.7	0.85	1.0	56.5	34.9	2.3	66.7
Orujillo de aceituna (no agotado)	93.2	1.06	6.9	47.6	32.1	6.8	51.0

Fuente: Sanchez, 2001.

Anexo N° 07: Preparación de las diferentes concentraciones a partir de la solución stock para el bioensayo con *Artemia salina*

CONCENTRACIÓN	VOLUMEN DE SOLUCIÓN STOCK AGREGADA	VOLUMEN DE AFORO
6 µg/mL	0,06 mL	10 mL
10 µg/mL	0,1 mL	10 mL
24 µg/mL	0,24 mL	10 mL
50 µg/mL	0,5 mL	10 mL
100 µg/mL	1,0 mL	10 mL
240 µg/mL	2.4 mL	10 mL
500 µg/mL	5,0 mL	10 mL
1000 µg/mL	10 mL	10 mL

Anexo N° 08: Preparación de las diferentes concentraciones a partir de la solución stock para el evaluar la actividad leishmanicida

CONCENTRACIÓN	VOLUMEN DE SOLUCIÓN STOCK AGREGADA	VOLUMEN DE AFORO
25 µg/mL	0,5 mL	20 mL
50 µg/mL	1,0 mL	20 mL
200 µg/mL	4.0 mL	20 mL
400 µg/mL	8,0 mL	20 mL

Anexo N° 09: Curvas de crecimiento de promastigotes

Al representar el número de promastigotes obtenido en los recuentos diarios de los cultivos se distinguen dos fases de crecimiento de la población de leishmanias: logarítmica (\square) y estacionaria (\circ).

Figura N° 07: Curva de crecimiento de promastigotes de *Leishmania (V.) guyanensis*

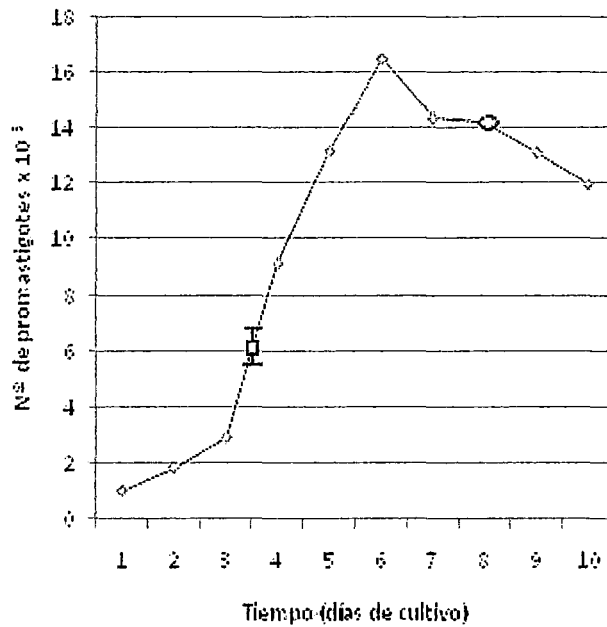


Figura N° 08: Curva de crecimiento de promastigotes de *Leishmania (V.) braziliensis*

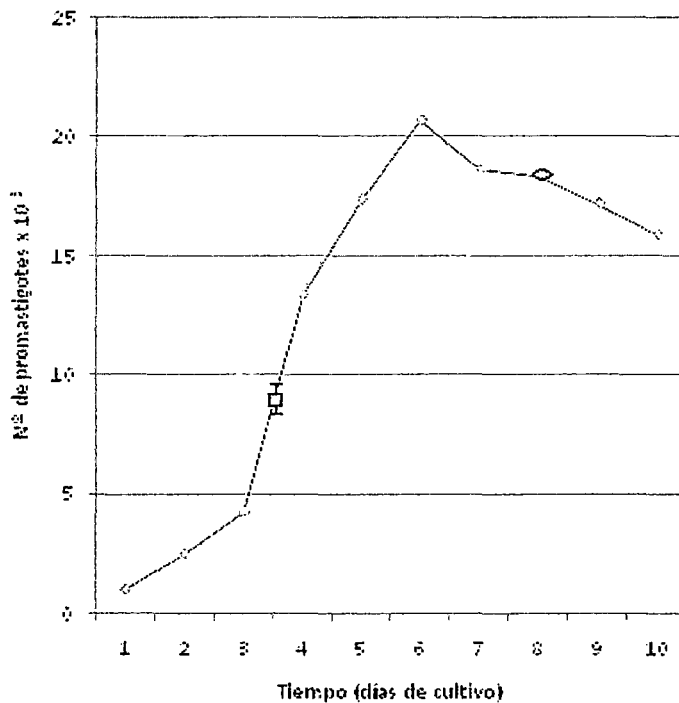


Figura N° 09: Curva de crecimiento de promastigotes de *Leishmania (V.) panamensis*

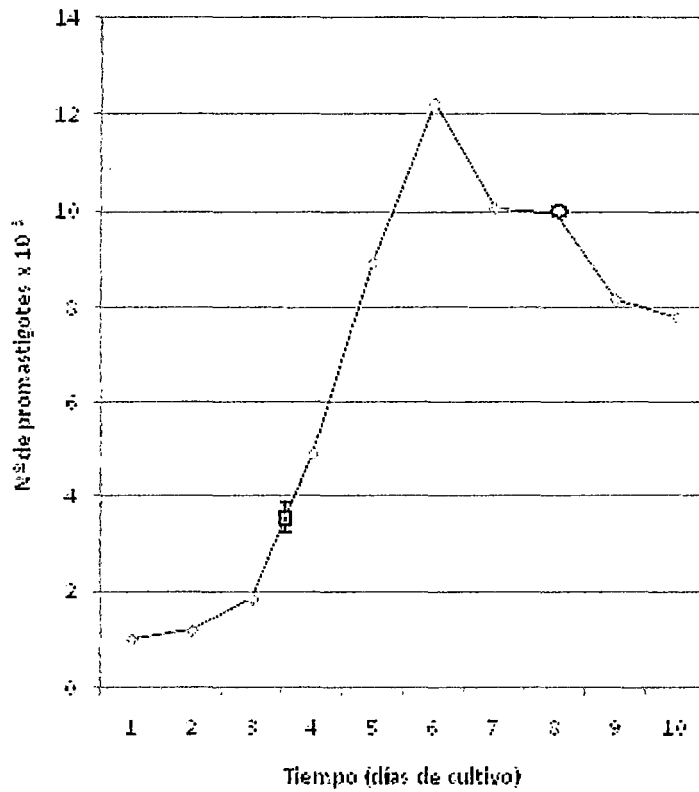
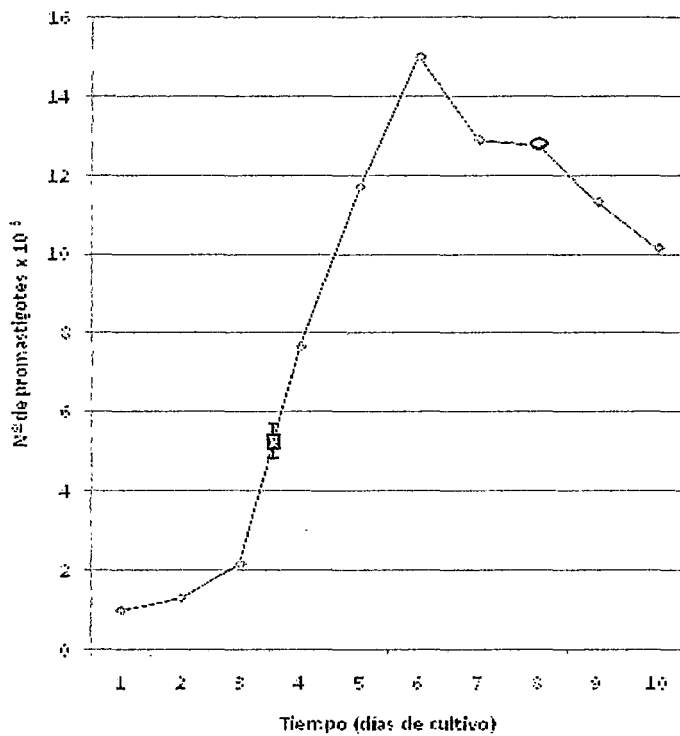


Figura N° 11: Curva de crecimiento de promastigotes de *Leishmania spp.*



Anexo N° 10: Número de promastigotes X 10⁶ / mL

<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> (Extracto Cultivado)					
µg/mL/Día	1	2	3	4	5
25	12,09	15,14	18,14	14,69	14,12
50	10,98	12,43	16,5	11,65	10,94
200	8,17	11,5	12,36	9,3	7,63
400	2,94	4,21	2,59	0,32	0,18

<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> (Extracto Silvestre)					
µg/mL/Día	1	2	3	4	5
25	12,83	15,44	19,86	17,01	15,08
50	11,37	13,31	18,31	13,83	11,17
200	9,03	12,23	13,74	11,45	9,26
400	3,47	4,5	3,05	0,66	0,28

<i>Leishmania (V.) guyanensis</i> (Extracto Cultivado)					
µg/mL/Día	1	2	3	4	5
25	7,53	10,23	13,45	12,05	13,39
50	7,31	10,07	13,96	9,97	10,2
200	4,63	6,35	8,41	7,23	6,24
400	0,51	0,62	0,96	0,61	0,14

<i>Leishmania (V.) guyanensis</i> (Extracto Silvestre)					
µg/mL/Día	1	2	3	4	5
25	7,93	11,31	14,06	13,56	10,4
50	7,59	10,78	12,04	10,49	10,61
200	4,7	6,86	8,78	7,51	6,52
400	0,68	0,73	1,06	0,9	0,28

<i>Leishmania (V.) panamensis</i> (Extracto Cultivado)					
µg/mL/Día	1	2	3	4	5
25	3,4	6,25	7,95	6,61	5,95
50	1,82	3,29	4	3,27	3,03
200	0,2	0,33	0,13	0	0
400	0,15	0,1	0	0	0

<i>Leishmania (V.) panamensis</i> (Extracto Silvestre)					
µg/mL/Día	1	2	3	4	5
25	3,52	7,25	8,75	7,77	7,15
50	2,13	3,95	5,64	3,61	3,75
200	0,58	0,44	0,27	0,21	0
400	0,17	0,18	0,09	0	0

<i>Leishmania spp.</i> (Extracto Cultivado)					
µg/mL/Día	1	2	3	4	5
25	6,9	10,86	13,51	11,73	11,4
50	6,2	9,7	12,42	10,48	10,02
200	5,18	6,76	9,63	8	4,77
400	1,23	2,07	2,79	0,69	0,48

<i>Leishmania spp.</i> (Extracto Silvestre)					
µg/mL/Día	1	2	3	4	5
25	7,46	11,35	13,78	11,97	12,01
50	6,37	9,98	12,99	11,08	10,38
200	6,19	9,6	10,03	9,1	5,37
400	3,39	2,69	3,22	2,19	0,86

CONTROL					
Cepa/Día	1	2	3	4	5
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	13,35	17,39	20,69	18,65	18,41
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	9,16	13,2	16,5	14,36	14,22
<i>Leishmania (V.) panamensis</i>	4,92	8,96	12,26	10,09	9,98
<i>Leishmania spp.</i>	7,67	11,71	15,01	12,91	12,73

Anexo N° 11: Porcentaje de actividad leishmanicida por día

<i>Leishmania V. braziliensis</i> (Extracto Cultivado) %					
µg/mL/Día	1	2	3	4	5
25	9.44	12.99	12.31	21.23	23.31
50	17.75	28.53	20.25	37.54	42.58
200	38.80	33.89	40.28	50.15	58.57
400	77.98	75.77	87.46	98.31	99.04

<i>Leishmania V. braziliensis</i> (Extracto Silvestre) %					
µg/mL/Día	1	2	3	4	5
25	3.90	11.24	4.03	8.77	18.11
50	14.83	23.44	11.51	25.85	39.31
200	32.36	29.68	33.60	38.62	49.71
400	74.01	74.10	85.27	96.46	98.46

<i>Leishmania V. guyanensis</i> (Extracto Cultivado) %					
µg/mL/Día	1	2	3	4	5
25	17.79	22.48	18.50	16.12	5.85
50	20.20	23.72	15.38	30.59	28.29
200	49.45	51.86	49.06	49.67	56.10
400	94.43	95.31	94.18	95.72	99.02

<i>Leishmania V. guyanensis</i> (Extracto Silvestre) %					
µg/mL/Día	1	2	3	4	5
25	13.43	14.34	14.76	5.59	26.83
50	17.14	18.34	27.03	26.97	25.37
200	48.69	48.00	46.78	47.70	54.15
400	92.58	94.48	93.56	93.75	98.05

<i>Leishmania V. panamensis</i> (Extracto Cultivado) %					
µg/mL/Día	1	2	3	4	5
25	30.89	30.21	35.14	34.46	40.37
50	63.01	63.28	67.39	67.57	69.72
200	95.93	96.35	98.91	100.00	100.00
400	96.95	98.96	100.00	100.00	100.00

<i>Leishmania V. panamensis</i> (Extracto Silvestre) %					
µg/mL/Día	1	2	3	4	5
25	28.46	19.01	28.62	22.97	28.44
50	56.71	55.99	53.99	64.19	62.39
200	88.21	95.05	97.83	97.97	100.00
400	96.54	97.92	99.28	100.00	100.00

<i>Leishmania spp.</i> (Extracto Cultivado) %					
µg/mL/Día	1	2	3	4	5
25	10.04	7.29	9.96	9.12	10.43
50	19.17	17.12	17.26	18.87	21.33
200	32.46	42.26	35.84	38.05	62.56
400	83.96	82.33	81.42	94.65	96.21

<i>Leishmania spp.</i> (Extracto Silvestre) %					
µg/mL/Día	1	2	3	4	5
25	2.74	3.10	8.19	7.23	5.69
50	16.95	14.75	13.50	14.15	18.48
200	19.30	18.03	33.19	29.56	57.82
400	55.80	77.05	78.54	83.02	94.31