



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL



Tesis Presentada en Opción al Título Académico de Master en Biotecnología  
Mención Industrial

TÍTULO

**Aspectos regulatorios, del Control y Aseguramiento de la calidad  
de *Pleurotus* spp. como fuente de suplementos dietéticos.**

AUTORA

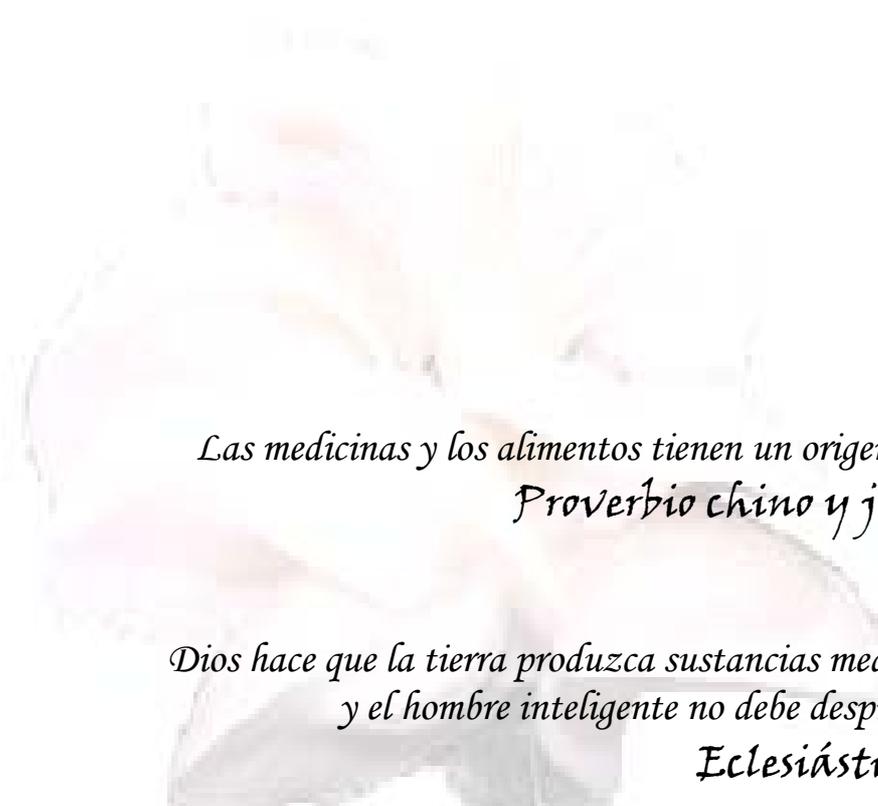
**Lic. Jane Marcos Albear**

TUTORES

DraC. Rosa Catalina Bermúdez Savón  
DrC. Humberto Joaquín Morris Quevedo

Santiago de Cuba, 2009  
“Año del 50 Aniversario del Triunfo de la Revolución”

*A mis padres y hermano  
A la memoria de mi papá Gustavo y del P. Héctor (sdb)*



*Las medicinas y los alimentos tienen un origen común.  
Proverbio chino y japonés*

*Dios hace que la tierra produzca sustancias medicinales,  
y el hombre inteligente no debe despreciarlas.*

*Eclesiástico 38, 4*

*No andamos solos por la vida. Asimismo, tampoco el logro de los sueños y de las metas propuestas es fruto únicamente del esfuerzo propio. Como Padre amoroso, Dios se vale constantemente de muchas personas para ayudarnos en el camino del crecimiento y la realización personal y profesional.*

*A mi familia, mi motor, mi soporte; por hacer suyos mis anhelos y caminar conmigo.*

*A mis amigos, que me animan y acompañan comprensiva y cariñosamente.*

*A mis tutores, por ser los catalizadores de este logro y aportar “la ciencia necesaria”.*

*A quienes, cercanos geográficamente o no, mostraron su apoyo y su presencia.*

*A conocidos y hasta no conocidos que cooperaron aun con el más mínimo detalle.*

*A los profesores de toda mi vida, porque a todos debo mi formación.*

*A mis compañero de trabajo y de curso.*

*A quien, aún sin saberlo, aportó una idea valiosa, un material oportuno...*

*A ellos, Innombrables con Nombre, que han contribuido en alguna medida a que este resultado sea expresado hoy, doy mis más sinceras ¡GRACIAS!*

A handwritten signature in cursive script that reads "Jane". The signature is written in black ink and is positioned in the lower right quadrant of the page.

## ABREVIATURAS EMPLEADAS

- BPA = Buenas Prácticas de Agricultura  
BPL = Buenas Prácticas de Laboratorio  
BPP = Buenas Prácticas de Producción  
CEBI = Centro de Estudios de Biotecnología Industrial  
CECMED = Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos  
DSHEA = Dietary Supplement Health and Education Act (Norma para la Educación y la Salud relacionada con los Suplementos Dietéticos)  
FAO = Food and Agriculture Organization (Organización para los Alimentos y la Agricultura)  
FES = Fermentación en estado sólido  
FDA = Food and Drugs Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos), EE.UU.  
FOSHU = Foods for Specified Health Use (Alimentos para Uso Específico en la Salud)  
GRAS = Generally Recognised As Safe (categoría de la FDA para alimentos “generalmente aceptados como seguros”)  
HACCP = Hazard Analysis Critical Control Point System (Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control)  
IADSA = International Alliance of Dietary/Food Supplements Associations (Alianza Internacional de Asociaciones de Suplementos Dietéticos y Alimenticios), Bélgica  
ICIDCA = Instituto Cubano de Investigación de los Derivados de la Caña de Azúcar  
ICP-AES = Inductively Coupled Plasma of Atomic Emission Spectroscopy (Equipo de Espectroscopía de Emisión Atómica)  
IDR = Ingesta Diaria Recomendada  
INHA = Instituto Nacional de Higiene de los Alimentos  
LBO = Laboratorio Farmacéutico Oriente  
MINSAP = Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba  
NLEA = The Nutrition Labeling and Education Act (Norma para el Etiquetado y Educación Nutricional)  
NPA = Natural Products Association (Asociación de Productos Naturales), EE.UU.  
OMS = Organización Mundial de la Salud  
QUIMEFA = Industria Química Farmacéutica de Cuba  
SDCA = Syndicat de la Diététique et des Compléments Alimentaires (Sindicato de la Dietética y de los Suplementos Alimenticios)  
SYNADIET = Syndicat National des Fabricants en Produits Diététiques, Naturels et Compléments Alimentaires (Sindicato Nacional de Fabricantes de Productos Dietéticos, Naturales y Suplementos Alimenticios), Francia.  
TOXIMED = Centro de Toxicología y Biomedicina, Santiago de Cuba, Cuba.  
USD = United States Dollars (Unidad monetaria estadounidense)

## RESUMEN

El aseguramiento de la calidad representa un aspecto esencial para el desarrollo de suplementos dietéticos a partir de hongos comestibles-medicinales. En este trabajo, se realiza un análisis de las potencialidades existentes en el país para la obtención de un inmunocéutico derivado de *Pleurotus* spp., teniendo en cuenta las actuales tendencias regulatorias relacionadas con esta clase de productos. Se evalúa, además, la seguridad de *Pleurotus* spp. como fuente de suplementos dietéticos, a través de la realización de un estudio de su perfil fármaco-toxicológico. Se analizan, por otra parte, los aspectos relativos al aseguramiento y control de la calidad de *Pleurotus* spp. como materia prima de un inmunocéutico. Se evidenció en el perfil, que *Pleurotus* spp. posee un amplio espectro de acciones farmacológicas, entre las que se destaca la capacidad de estimular el sistema inmune, así como la seguridad de su utilización. El análisis de los factores relativos a la producción de la materia prima principal y los relacionados con la producción del inmunocéutico, tomando en cuenta los aspectos tecnológicos, económicos, de aseguramiento de la calidad, y los referidos a la aplicación del producto, demostró la posibilidad de desarrollar en nuestro país un suplemento dietético a partir de *Pleurotus* spp. Se consideraron los elementos que integran el diseño de un Sistema de Gestión de Calidad para la producción de las setas *Pleurotus* spp. como materia prima, el cual una vez implementado y perfeccionado podría cumplir con los aspectos regulatorios vigentes en el ámbito nacional e internacional.

**ABSTRACT**

The quality assurance represents an essential aspect in the development of dietary supplements derived from edible and medicinal mushrooms. In this work, an analysis of the potentialities existing in our country for developing an immunoceutical from *Pleurotus* spp. is made, taking into account the standing tendencies concerning the regulatory issues for this class of products. Moreover, the safety of *Pleurotus* spp. as a source of dietary supplements is evaluated, through the performance of a pharmacological and toxicological profile. On the other hand, the aspects referred to the quality assurance and control of *Pleurotus* spp. as immunoceutical's raw material are analyzed. The profile showed the safety of *Pleurotus* utilization and the wide spectrum of pharmacological actions, such as the ability to stimulate the immune system. The analysis of factors regarding the production of the main raw material and those concerning the immunoceutic production and application, considering technical, economical and quality assurance issues demonstrated the potential to develop a dietary supplement from *Pleurotus* in Cuba. The elements consisting of the design of a Quality Management System for *Pleurotus* production as raw material were identified, once established and improved it could satisfy the regulatory concerns standing at the national and international level.

## INDICE

<u>Epígrafe</u>	<u>Subtítulo</u>	<u>página</u>
<b>INTRODUCCIÓN</b>		1
<b>CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>		3-22
1.1 - La ciencia de los alimentos saludables. Factores que favorecen su desarrollo y otros aspectos relacionados.		3
1.1.1 - Alimentos funcionales y productos nutracéuticos.		4
1.2 - Un acercamiento al mundo de los suplementos dietéticos.		6
1.2.1 - Definición de suplementos dietéticos, características e interrelación con otros términos.		6
1.2.2 - Desarrollo de los productos naturales en Cuba.		7
1.2.3 - La visión del consumidor.		7
1.2.4 - Los suplementos dietéticos desde una mirada industrial.		8
1.2.5 - La mirada regulatoria: ¿necesaria?		8
1.3 - Regulaciones relacionadas con los suplementos dietéticos.		9
1.3.1 - Otras regulaciones internacionales.		10
1.3.2 - Ambiente regulatorio nacional en torno a los suplementos dietéticos.		10
1.4 - Aspectos generales del Control de Calidad de suplementos dietéticos nutracéuticos.		12
1.5 - Uso nutracéutico de los hongos comestibles.		13
1.5.1 - Suplementos dietéticos nutracéuticos derivados de hongos comestibles en el mercado internacional.		15
1.5.2 - Aspectos generales de <i>Pleurotus</i> spp.		16
1.6 - Desarrollo de suplementos dietéticos con actividad inmunocéutica.		18
1.6.1 - Polisacáridos $\beta$ -D-glucanos como principales responsables de la actividad inmunomoduladora de las setas comestibles medicinales.		18
1.6.2 - Mecanismo de acción de los inmunocéuticos del tipo $\beta$ -D-glucano.		19
1.6.3 - Aplicación terapéutica de los compuestos inmunocéuticos.		20
1.6.4 - Toxicología asociada a $\beta$ -D-glucanos.		21
<b>CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>		23-26
2.1 - Estudio del ambiente regulatorio relacionado con los suplementos dietéticos.		23
2.2 - Análisis de las propiedades fármaco-toxicológicas de los hongos comestibles.		23
2.3 - Preparación de los extractos hidrosolubles crudos de micelio de <i>Pleurotus</i> spp. como suplemento dietético potencial.		24
2.3.1 - Materiales y reactivos utilizados		24
2.3.2 - Cepa utilizada y preparación de los inóculos.		24
2.3.3 - Cultivo sumergido de <i>Pleurotus</i> spp.		24

<u>Epígrafe</u>	<u>Subtítulo</u>	<u>página</u>
2.3.4 - Método de obtención de los extractos hidrosolubles crudos de micelio de <i>Pleurotus</i> spp.		24
2.4 - Aspectos relativos al Control de Calidad del extracto hidrosoluble de <i>Pleurotus</i> spp.		25
2.4.1 - Análisis microbiológico.		25
2.4.2 - Análisis químico.		25
2.4.2.1 - Determinación del contenido de carbohidratos totales.		25
2.4.2.2 - Determinación de metales.		26
2.5 - Evaluación del cumplimiento de los Requisitos de Aseguramiento de la Calidad.		26
<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>		27-51
3.1 - Aspectos regulatorios en torno al desarrollo de un suplemento dietético.		27
3.2 - Ventajas del uso de setas comestibles como fuente de suplementos dietéticos.		28
3.2.1 - Perfil fármaco-toxicológico.		29
3.3 - Factores que propician el desarrollo de suplementos dietéticos inmunocéuticos derivados de <i>Pleurotus</i> spp.		29
3.3.1 - Factores relativos a la producción de la materia prima principal.		30
3.3.2 - Factores relativos a la producción del inmunocéutico.		34
3.3.3 - Factores relativos al control de calidad de la materia prima principal y a la producción del suplemento dietético.		35
3.3.3.1 - Elementos del sistema HACCP aplicados a la producción de los cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus</i> spp.		36
3.3.3.2 - Control microbiológico de la materia prima.		39
3.3.3.3 - Control químico analítico.		39
3.3.4 - Factores relativos a su aplicación.		42
3.3.5 - Factores relativos a aspectos económicos		44
3.4 - Aspectos relativos al aseguramiento de la calidad.		45
3.4.1 - Requisitos necesarios para asegurar la calidad de las setas comestibles de <i>Pleurotus</i> spp. como materia prima de suplementos dietéticos.		46
3.5 - Trinomio Ciencia-Salud-Economía.		50
3.6 - La Biotecnología "blanca" al servicio de la salud y otros sectores.		50
3.7 - La producción de suplementos dietéticos desde una panorámica nacional.		51
<b>CONCLUSIONES</b>		52
<b>RECOMENDACIONES</b>		53
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>		54-66

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, tanto nacional como internacionalmente, una gran cantidad de productos naturales con diferentes efectos biológicos son comercializados como suplementos dietéticos. Bajo ciertos requisitos y regulaciones, menos exigentes que los necesarios para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos, éstos se producen y distribuyen, constituyendo en muchos casos, una contribución significativa la terapéutica. En este grupo encontramos a los productos nutraceuticos, los cuales aún en la interfase entre alimento y medicamento, cada año incrementan considerablemente su número, sobre todo en países desarrollados con tradición en la Medicina Natural.

Aunque en el listado de suplementos dietéticos producidos en el mundo entero imperan las plantas medicinales, cabe destacar que no son pocos los obtenidos a partir de hongos comestibles, cuyas propiedades farmacológicas han sido valoradas desde antaño por muchas culturas. Estos efectos se han demostrado hoy día científicamente, gracias al desarrollo de la ciencia y la técnica, por disímiles investigadores representativos de diversas ramas de las ciencias naturales.

En Cuba, hasta la fecha, no se conoce ningún producto natural elaborado a partir de hongos comestibles. Sin embargo, en varios países, sobre todo orientales como China y Japón, europeos como Francia y España; y americanos como Canadá, México, EE.UU. y Brasil, se formulan suplementos dietéticos de setas. Estos productos son investigados de manera creciente y recomendados por profesionales de la salud para la prevención de distintas enfermedades crónicas, así como coadyuvantes en la terapia anticancerígena con el propósito de contrarrestar los efectos inmunodepresores adversos provocados por ésta.

Desarrollar este tipo de producto en nuestra isla no resulta utópico, sino por el contrario, posible. En la misma ciudad de Santiago de Cuba, se dispone de la infraestructura y la experiencia requerida para tales fines. Se suma también la existencia de varios programas nacionales, vigentes en la actualidad, que promueven este tipo de investigaciones. Además resulta imprescindible tomar en cuenta la prevalencia de cáncer en el país, una de las primeras causas de mortalidad, según las cifras publicadas por el Sistema de Información Estadístico Nacional, así como otras enfermedades que también están asociadas a un deterioro del sistema inmune.

En nuestro país, el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), adscrito a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente posee una amplia experiencia en el cultivo y utilización del hongo basidiomiceto *Pleurotus* spp. como alimento (Bermúdez, 2001). En adición a esto, un equipo de investigadores de esta misma institución ha realizado varios estudios preclínicos demostrando sus propiedades inmunoestimulantes (Morris *et al.*, 2007). Su condición de inocuo ha sido corroborada por varios estudios anatomopatológicos desarrollados en el Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED) de Santiago de Cuba.

Los elementos anteriormente considerados nos permiten suponer que el desarrollo de un suplemento dietético a partir de un hongo comestible, cuyas propiedades inmunonutricionales puedan ser demostradas y su calidad asegurada, constituye un proyecto de interés cuya realización contribuiría al mejoramiento de la salud y al aumento de la calidad de vida, dos de los principios más sublimes de nuestra sociedad.

Las evidencias que existen en cuanto al cultivo de *Pleurotus* spp., su inocuidad y las propiedades inmunoestimulantes nos permitieron formular la siguiente Hipótesis de trabajo:

“Es posible diseñar una estrategia viable para el control y aseguramiento de la calidad de un suplemento dietético potencial de *Pleurotus* spp., en correspondencia con los requisitos y las regulaciones vigentes en el país.”

A partir de esta hipótesis el trabajo tuvo como **Objetivo General:**

 Diseñar una estrategia para el aseguramiento y control de la calidad de la materia prima principal de un suplemento dietético de *Pleurotus* spp. acorde con las regulaciones vigentes en el país.

Para su cumplimiento se trazaron los siguientes **Objetivos Específicos:**

- Caracterizar las tendencias actuales en el ambiente regulatorio relacionado con el desarrollo de suplementos dietéticos.
- Evaluar las potencialidades de desarrollo de un suplemento dietético inmunocéutico derivado de *Pleurotus* spp.
- Evaluar la seguridad de *Pleurotus* spp. como fuente de suplementos dietéticos a través de la realización de un estudio de su Perfil Fármaco-toxicológico
- Analizar los aspectos relativos al aseguramiento y control de la calidad de la materia prima principal y del suplemento dietético inmunocéutico.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1- La ciencia de los alimentos saludables. Factores que favorecen su desarrollo y otros aspectos relacionados.

El griego Hipócrates de Cos (460 - 377 A.C.), devenido “Padre de la Medicina”, inició lo que se conoce actualmente como “Medicina Preventiva”. En varias de sus obras otorgó gran importancia a la influencia de la *dieta* y el *estilo de vida* en el estado de salud y convalecencia de un paciente, tesis que resumió en su célebre frase: “*Que los alimentos sean tu medicina*” (una de las más preclaras y famosas en lo que se refiere a la relación entre *Nutrición y Salud*) (<http://bvs.sld.cu/revista/mgi>). Igualmente, numerosos expertos han observado la existencia de una estrecha relación, poco comprendida aún, entre los factores mencionados anteriormente con ciertas enfermedades crónicas como el cáncer, la obesidad, la hipertensión y los trastornos cardiovasculares, entre otros (Jones, 2002).

Asimismo, varias investigaciones epidemiológicas, bioquímicas y moleculares han demostrado la presencia en los alimentos de ciertos componentes capaces de modular distintas funciones en el organismo, favoreciendo con ello en el mantenimiento del estado de salud y reduciendo el riesgo de padecer enfermedades relacionadas estrechamente con el estilo de vida (Kuriyama *et al.*, 2006; Nöthlings *et al.*, 2007). Esta es la plataforma del concepto “alimento funcional” (traducido del inglés “*functional food*”) aparecido en la revista *Nature* por vez primera en 1993, refiriéndose a un término similar japonés (Swinbanks y O’Brien, 1993). Dicho término, a partir de entonces, se ha convertido en uno de los más importantes en la industria alimenticia en el mundo. Aún así, es difícil estimar su alcance y la variabilidad en su comprensión entre las diferentes regiones (Arai, 2002).

Aunque tales planteamientos científicos no se formularon sino a finales del siglo XX, varios de los componentes alimenticios con efectos saludables ya eran conocidos acertadamente en la medicina oriental, que siempre ha sabido aprovecharlos y aplicarlos con eficacia (Bello, 2006). En los países occidentales, sin embargo, la historia comienza con las primeras prácticas de fortificación con vitaminas y minerales y la inclusión de ciertos componentes en los alimentos procesados.

Según Cortés (2007), la población hoy se interesa más por los efectos saludables de los alimentos, manifestando claras preferencias, por los productos naturales, fenómeno que es atribuido a diferentes causas (Agriculture and Agri-Food Canada, 2002):

- el envejecimiento de la población mundial y su creciente interés por una vida saludable y con calidad.
- la aceptación creciente de tratamientos alternativos, favorecido además por la general insatisfacción del consumidor con las terapias y fármacos convencionales.
- el incremento en la educación nutricional y su relación con la salud.
- la mayor integración de médicos, farmacéuticos, profesionales de la salud en general y otras ramas de la ciencia.
- la gran cantidad de evidencias científicas e investigaciones clínicas sobre la seguridad y efectividad de estos productos.
- una mayor actividad y suministro de los proveedores.
- el énfasis de las instituciones y gobiernos en el desarrollo de medidas preventivas para disminuir los costos de salud.
- la existencia de una mayor cobertura de prensa para tales investigaciones y la promoción de dichos productos.
- la evolución del ambiente regulatorio y la opinión pública.

Tales causas han incidido en la producción de alimentos del siglo XXI. De modo, que los antiguos conceptos a favor de ofrecer una alimentación ajustada a los niveles dietéticos recomendados para evitar enfermedades carenciales han sido desplazados por otros nuevos. En los conceptos actuales se sugiere una oferta alimenticia con niveles óptimos de macro y micronutrientes para impedir el desarrollo de enfermedades crónicas. Ello está respaldado por el descubrimiento, en determinados alimentos, de sustancias específicas capaces de beneficiar la salud (Takachi *et al.*, 2007).

En correspondencia, Bello (2006) describe el surgimiento de una nueva rama de la Bromatología: la Ciencia de los Alimentos Saludables, encargada de “investigar e identificar los compuestos alimenticios capaces de aportar beneficios saludables al organismo que los consume; aclarar cuáles son los mecanismos implicados en dichos efectos; cómo diseñar nuevos productos cuyo consumo proteja o promueva el bienestar y la salud de la población y poner a punto tecnologías que permitan dar una forma comercial a las nuevas formulaciones establecidas”. Resume de esa forma todo un extenso campo cuyo fin es aprovechar los beneficios saludables que aportan los alimentos. Obsérvese en la Tabla 1, los distintos grupos que integran esta categoría, así como sus características generales y algunos ejemplos de ellos en la Tabla 2.

En respuesta a la gran expansión que experimentan esta clase de productos se creó en 1995 la Comisión Europea de Acción Concertada para la Ciencia de Alimentos Funcionales (FUFOSE) coordinado por ILSI Europe (International Life Science Institute, Europe Branch) como la red europea multidisciplinaria encargada del aporte de la evidencia científica necesaria y desarrollo de tales productos (Arai, 2002).

#### **1.1.1- Alimentos funcionales y productos nutracéuticos.**

A los alimentos que contienen sustancias capaces de modular varias funciones en el organismo y que permiten mantener el estado de salud y bienestar se les llama “alimentos funcionales”, y también, en ciertos casos, “nutracéuticos”. Estos términos despiertan hoy el interés de muchas compañías y que forman parte de áreas específicas de la industria biotecnológica actual. Tan sólo en Canadá existe alrededor de 300 compañías comprometidas con el desarrollo de estos productos (<http://www.caf.com>).

El origen de la definición “alimentos funcionales” se encuentra en la publicación, en los años '80 del pasado siglo, en Japón, de la *Reglamentación de los Alimentos para Uso Específico en la Salud* (Foods for Specified Health Use, FOSHU). El sistema de regulación japonés para los FOSHU es el más avanzado del mundo. Para que un alimento o ingrediente obtenga la licencia FOSHU debe cumplir con las características expuestas de los alimentos saludables y además, según Ehrnreich (2000) debe ser consumido no ocasional sino regularmente, en forma de alimento y no como tabletas o cápsulas.

En la Tabla 3 se muestran algunas definiciones diversas relacionadas con estos compuestos. Puede observarse que entre la concepción europea y la japonesa existe una evidente diferencia. En la segunda, el requisito inicial es que el alimento debe ser procesado. Al omitirse esta característica en la primera se abre la posibilidad de que mayor cantidad de alimentos sean clasificados como tal. Ésta es probablemente una de las causas fundamentales por la que aún existe cierta divergencia en cuanto a la temática y se encuentran en el mercado internacional gran cantidad de productos etiquetados bajo el sello de *Alimento Funcional*, cuando en realidad no se corresponden con la clasificación publicada por Bello (2006). Además, analizando la etimología de las palabras *farmaalimento* y *alimento de diseño*, utilizadas indistintamente como sinónimos

de alimento funcional (<http://www.pharmsci.org>), se puede observar la mayor armonía de éstos con el concepto japonés, lo cual soporta la tesis de que éste es el más adecuado para definir tales productos.

Por otra parte, según Brower (1998), cuando la forma comercial del alimento funcional o de alguno de sus componentes es semejante a la de un medicamento, entonces se convierte en un producto *nutracéutico*. Pero según Kalra (2003) dicho término es resultante de la traducción literal del inglés *nutraceutical*, que deriva de la contracción entre las palabras “nutrición” y “farmacéutico” (Nutrition y pharmaceutical, respectivamente) y fue acuñado por Stephen DeFelice, fundador y presidente de la Fundación para la Innovación en Medicina (Tabla 3). Tal punto de vista es casi sinónimo de alimento funcional, lo que podría ser otra de las posibles causas por la que ambos términos son considerados equivalentes. Sin embargo, Zeisel (1999) define *nutracéutico* sin ambigüedad, así como también el Gran Diccionario Terminológico de la Lengua Francesa (2002). Como puede observarse en la tabla, esta última definición incluye un nuevo elemento: el tratamiento y la prevención de enfermedades crónicas, dos problemáticas de salud que atraen sobre sí la atención de instituciones y gobiernos (Cynober, 1998).

Para ilustrar mejor la diferencia entre alimento funcional y nutracéutico se expone el ejemplo del ajo. Éste alimento, consumido con frecuencia como condimento, contiene una sustancia antioxidante, la alicina, capaz de proteger contra una gran variedad de enfermedades. Debido a la presencia de este compuesto y de otros que ejercen una actividad beneficiosa para la salud, cuando es ingerido en su forma natural se usa como alimento funcional. En cambio, si dicha sustancia se comercializa en forma de polvo o comprimido se considera un nutracéutico (Ashwell, 2002).

De todas formas, aún continúan las confusiones. Ni en Europa ni en EUA, por ejemplo, la diferencia entre estos términos está bien establecida (Arai, 2002). Existe además otra cuestión que precisa de un acuerdo general: ¿acaso *nutracéutico* y *nutricéutico* son sinónimos o tienen significados diferentes? Según Chang y Buswell (1996), refiriéndose a productos derivados de hongos comestibles, estos términos son diferentes (Tabla 3). En cambio, el diccionario antes mencionado, elaborado en fecha más actual, afirma que la gran confusión tanto nocional como terminológica alrededor de los alimentos, productos o sustancias con probado efecto preventivo o beneficioso para la salud se atribuye en gran parte a la ausencia de un consenso internacional sobre el sentido de diferentes términos surgidos al respecto, y a la inexistencia de una reglamentación en esta materia. Además, especifica que el término “nutracéutico” (“nutraceutical”, en inglés y “nutraceutique”, en francés) es más aceptado mundialmente que “nutricéutico” y se encuentra ampliamente difundido tanto en el medio industrial como en la población. Por tales motivos, en este trabajo se utiliza el término nutracéutico según la definición propuesta por Zeisel (1999), en lugar del término nutricéutico propuesto por Chang y Buswell (1996) con el mismo sentido.

El país líder en esta temática es Japón, donde están bien definidas y desarrolladas las categorías de nutracéuticos según los problemas de salud presentados por su población (Tabla 4). Aún así, obsérvese en la tabla la baja proporción existente de productos destinados al fortalecimiento del sistema inmune.

Los productos naturales con las características anteriormente mencionadas se comercializan bajo el nombre de *suplementos dietéticos*, según podemos observar también en la Farmacopea de los Estados Unidos de América del 2007. Este documento de referencia internacional, establece un apartado para esta clase de productos, siendo éste un indicio del nivel de reconocimiento alcanzado por los mismos.

No sucede así con su equivalente británico, la British Pharmacopoeia, igualmente del 2007, donde las monografías de suplementos dietéticos no se encuentran independientes de las monografías de productos farmacéuticos.

### 1.2- Un acercamiento al mundo de los suplementos dietéticos.

La medicina natural ha sido utilizada para el tratamiento de numerosas enfermedades en el transcurso de toda la historia de la humanidad (Pezzuto, 1997). Según estimados de la OMS, un 80% de la población mundial depende de este tipo de medicina, la cual está representada en su mayoría por productos herbarios (Cragg y Newman, 2001).

Las plantas medicinales, ya sea como materia prima para la producción de extractos o como fuente de aislamiento de sustancias naturales puras, ocupan un área en franca expansión. En los países industrializados dichos productos representan cerca del 25% del total de las prescripciones médicas. En los que se encuentran en vía de desarrollo abarcan prácticamente el 80% de la terapéutica (Sharapin, 2000). Igualmente, en la USP 30 (2007), donde son registrados alrededor de 220 suplementos dietéticos, un porcentaje elevado está constituido por derivados de plantas (36%). También se encuentran, entre otros de naturaleza diversa (10%), las vitaminas, minerales y sus mezclas (43%) y en menor cantidad, los suplementos dietéticos compuestos por aminoácidos y otros por ácidos grasos, siendo estos dos últimos casos los de menor proporción (9% y 2 %, respectivamente).

Según el SYNADIET y el SDCA, entre marzo y agosto del 2006, la cifra de suplementos dietéticos con sustancias botánicas u otros nutrientes incluidos, notificados y comercializados en Francia eran unos 3000 (<http://www.hsias.org/updates>). Igualmente, según Gibson y Taylor, en el 2005 más de 29 000 suplementos dietéticos diferentes estaban disponibles en el mercado estadounidense, aunque oficialmente sólo aparecen aprobados una minoría.

#### 1.2.1- Definición de suplementos dietéticos, características e interrelación con otros términos.

Inicialmente, la FDA\* consideraba que un suplemento dietético estaba compuesto solamente por nutrientes esenciales tales como: vitaminas, minerales y proteínas. Sin embargo, en 1990, la NLEA incluyó a las sustancias nutricionales derivadas de plantas u otras similares, por ejemplo, los productos derivados de ginseng, ajo, psyllium, así como aceites de pescado, enzimas, hormonas, y sus mezclas. Posteriormente, en 1994, la DSHEA estableció la definición oficial según la cual, un *suplemento dietético* es: un producto *distinto al tabaco* cuyo propósito es complementar la dieta incrementando la ingesta diaria total y que contiene uno o más de los siguientes ingredientes dietéticos: vitamina, mineral, aminoácido, hierba u otro botánico, o un concentrado, metabolito, constituyente, extracto o combinaciones de estos ingredientes. Presenta además las siguientes características:

- ✓ es presentado en forma líquida, de píldora, cápsula, o tableta
- ✓ no es usado como alimento convencional o como único componente de una dieta o comida
- ✓ está etiquetado como *suplemento dietético*

---

\* FDA: entidad del Departamento de Salud y Servicios Humanos (EE.UU.) que vela por la seguridad e integridad de los medicamentos y alimentos en el país (excepto cárnicos y derivados de pollos y huevos). Inspecciona sorpresivamente, toma muestras de productos procesados, monitorea los niveles de pesticidas en los mismos. Además, desarrolla normas de composición, calidad, nutrición y seguridad de alimentos y aditivos alimentarios y orienta a los fabricantes sobre el tipo y diseño de pruebas a realizar a sus productos (<http://www.fda.gov>).

Comparando con las definiciones anteriores se observan semejanzas. Si se relee la definición de Zeisel (1999) puede comprenderse por qué este autor considera como suplementos dietéticos a los productos nutraceuticos. Para Kalra (2003) el alcance de un nutraceutico es mayor, puesto que no sólo complementa la dieta, sino que también ayuda en la prevención y tratamiento de una enfermedad o desorden fisiológico.

### **1.2.2- Desarrollo de los productos naturales en Cuba.**

El hecho de que Cuba desarrolle hoy esta clase de productos tiene sus antecedentes en el naturalista y botánico cubano Dr. Juan Tomás Roig, quien investigó la flora cubana identificando unas 595 especies utilizadas empíricamente por la población para el tratamiento de disímiles afecciones. Sus experiencias fueron recogidas en su libro *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba* (1988), en cuyo prólogo invita a la comunidad científica nacional a verificar las propiedades farmacológicas atribuidas a las mismas, señalando además la notable posibilidad de desarrollar a partir de ellas una industria farmacéutica cubana.

Actualmente, la investigación científica en el área de las plantas medicinales ha tenido un avance significativo. Esto lo ha propiciado la existencia de Programas como el *Programa Nacional de Desarrollo y Generalización de la Medicina Tradicional y Natural* (MINSAP, 1999) y el *Programa Nacional de Ciencia e Innovación Tecnológica (PNCT) para el Desarrollo de Productos Biotecnológicos, Farmacéuticos y de Medicina Verde*, liderado por el CITMA, los cuales tienen el objetivo general de elevar la calidad de la Atención Médica y la satisfacción de la población con los servicios de salud. Sumado a ello, se cuenta con el trabajo integrado de varios centros de investigación y la Industria Farmacéutica Cubana (Carvalho, 2007 comunicación personal).

Los suplementos dietéticos cubanos, como en otros países, integran el grupo de los *Productos Naturales*, cuyas características se presentan en la Tabla 5. Según Peláez (2006), en el país se han desarrollado, al menos, 298 productos naturales destinados a la salud, registrados ya sea como medicamentos o como suplementos dietéticos. Las mayores fuentes de materia prima las constituyen la caña de azúcar y otras plantas, de las cuales se han obtenido productos como el PPG, Vimang, aceites esenciales y otros. Se encuentran también productos del tabaco como alcaloides y anticuerpos monoclonales, productos apícolas elaborados con miel, cera y propóleos, así como también algunos productos marinos (quitina, prostaglandinas, cartílago de tiburón) y derivados de algas (espirulina). Pero se considera que la cifra puede aumentar, dado que el país, solamente considerando la flora etnomédica, cuenta con al menos 314 plantas endémicas medicinales, agrupadas en 188 géneros de 35 familias, constituyendo un potencial vasto y rico para el desarrollo de tales productos.

### **1.2.3- La visión del consumidor.**

La mayoría de los consumidores ignoran las múltiples evidencias que demuestran que estos productos no son básicamente un grupo de sustancias inocuas complementarias a la dieta, que además, pueden convertirse en tóxicos (Zeisel, 1999). También asumen que éstos son inherentemente seguros o más seguros que los medicamentos sintéticos sólo por el hecho de ser naturales (Gibson y Taylor, 2005). Inclusive varios datos de encuestas confirman que las personas los consumen con propósitos médicos aún conociendo que no han sido sometidos a ensayos rigurosos de seguridad y eficacia ([http://www.supplementinfo.org/latest\\_news/survey\\_results.htm](http://www.supplementinfo.org/latest_news/survey_results.htm)).

Adicionalmente, muchos son de la opinión que no deben ser regulados, temiendo que eso pudiera limitar el acceso a tales beneficiosos productos. Piensan y así lo expresan, que todo control ejercido sobre ellos es una forma del gobierno y las instituciones médicas de monopolizar también las formas alternativas de tratamiento, irrespetando así el derecho individual de cuidar su propia salud (Blendon *et al.*, 2001).

#### **1.2.4- Los suplementos dietéticos desde una mirada industrial.**

El uso de suplementos dietéticos del tipo nutracéuticos para lograr efectos terapéuticos deseables con mínimas reacciones adversas comparados con otros agentes terapéuticos ha tenido gran éxito también en la arista económica. Por sus relativas facilidades de producción varias compañías farmacéuticas y biotecnológicas actualmente prefieren invertir en el descubrimiento y producción de nutracéuticos con respecto a los productos farmacéuticos. En la Tabla 6 se muestran algunas de las compañías más famosas que desarrollan esta clase de productos.

En contraste, hay otra gran cantidad de empresas que se incorporan o abandonan la industria sin restricciones, vendiendo productos no sujetos a patentes ni a regulación gubernamental alguna. Siendo así, como es lógico, muchas compañías comercializadoras de suplementos dietéticos, se aprovechan de tales brechas, en busca de grandes beneficios económicos y colocan en el mercado productos cuya eficacia y seguridad no han sido probadas satisfactoriamente (Gibson y Taylor, 2005). Por ejemplo, sólo en el año 2006, la compañía nutracéutica *Mannatech Inc.*, de Texas (EUA), ingresó más de 400 millones de USD por concepto de ventas. En ese mismo año estaba en discusión la eficacia de uno de sus productos líderes (Kaiser, 2007). Ni la FDA ni ninguna otra entidad federal o estatal de los EUA prueban la calidad del suplemento dietético antes de salir al mercado. No obstante, varios productores se esfuerzan por cumplir con las BPP y lograr productos con calidad, lo cual, en mayor o menor medida, también sucede en otros países (Blendon *et al.*, 2001).

#### **1.2.5- La mirada regulatoria: ¿necesaria?**

Se ha observado que algunos suplementos dietéticos tienen potentes efectos farmacológicos, pero a la vez, considerables efectos adversos. Es lógico, puesto que ellos contienen ingredientes biológicamente activos, igual que los medicamentos convencionales. No obstante, numerosas agencias regulatorias consideran a los suplementos dietéticos como si fuesen alimentos (Gibson y Taylor, 2005).

Al tratarlos como tales, parecieran inocuos, pero Zeisel (1999) advierte que inclusive un consumo exagerado de alimentos podría dañar la salud. En su artículo, expone que el metabolismo normal de los nutrientes incluye la activación de enzimas hepáticas para metabolizar o almacenar el exceso de éstos, de acuerdo a una ingesta moderada, como mecanismo fisiológico protector y regulatorio. Cuando el nutriente o la sustancia química se administra en exceso, dichos mecanismos pueden agotarse y conducir a un deterioro de la salud. Por ende, podría generarse un problema quizás más grave que el que pudo dar origen al consumo del suplemento dietético. También puede darse el caso de algunas interacciones negativas; por ejemplo, se ha observado que existe un incremento del riesgo de padecer cáncer de próstata cuando se consumen suplementos dietéticos que contienen beta carotenos y alcohol. También cuando son consumidos por fumadores habituales podrían incrementar el riesgo de padecer cáncer de pulmón (Blendon *et al.*, 2001).

En la Tabla 6 también se han presentado algunos problemas presentados con varios productos de diferentes compañías (Tabla 6), los cuales han conllevado a la toma de acciones legales contra ellas. Sin embargo, estas acciones sólo son llevadas a cabo

una vez que la FDA ha demostrado los daños reales o potenciales del consumo de estos productos por la población y (<http://www.hsias.org>).

Según Zeisel (1999) los nutraceuticos deben considerarse como una categoría de aquellos suplementos dietéticos administrados en dosis prolongadas con el propósito de obtener un efecto farmacológico. De igual manera, hace hincapié en la valoración del riesgo-beneficio y en que esta evaluación debe hacerse antes de su administración y no después de la exposición al riesgo potencial. Invita además a la FDA, a establecer un tratamiento más riguroso, comparándolos con los alimentos. También es importante conocer si estos productos son seguros y eficaces y cómo interaccionan con otros suplementos, medicamentos u otra sustancia administrada al organismo (Hardy, 2001; Jang *et al.*, 2004). Todo ello implica que la comunidad científica internacional, a la vez que procure la evidencia científica necesaria para que tales productos cumplan con el objetivo de elevar la calidad de vida de los individuos, debe trabajar por multiplicar la vigilancia y la regulación al respecto, tal como se hace con los medicamentos (Gibson y Taylor, 2005).

### **1.3- Regulaciones relacionadas con los suplementos dietéticos.**

En numerosos países existen agencias que constituyen esencialmente el cuerpo regulatorio protector del consumidor, avalando cuándo un producto cumple con los requisitos necesarios para ser aprobado y comercializado. Los mismos alimentos funcionales, a pesar de ser Japón uno de los principales líderes en esta materia y de contar con una vasta experiencia en su desarrollo, no son comercializados si no llevan el sello de aprobación del Ministerio de Salud y Bienestar del gobierno (Arai, 1996). En Gran Bretaña, se encuentra la Agencia para el Control de Medicamentos ("MCA" de *Medicines Control Agency*), en la Unión Europea la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos ("EMA", de *European Medicines Evaluation Agency*) y en los Estados Unidos de América, la Administración de Alimentos y Medicamentos ("FDA", *Food and Drugs Administration*) sólo por citar algunos ejemplos (<http://www.hsias.org>).

En la Tabla 7 se presentan algunos eventos de mayor importancia en el ámbito regulatorio de los suplementos dietéticos en los EE.UU., los cuales han tenido trascendencia a nivel internacional, sobre todo en países de América.

La recién publicada Guía de *Buenas Prácticas de Producción para Suplementos Dietéticos* reitera el papel decisivo de los fabricantes en la calidad del producto final. Además, confiere especial importancia a la verificación del cumplimiento de los requisitos de calidad establecidos para la materia prima, ya sea material crudo o principio activo purificado. La evaluación de los proveedores se convierte así en un elemento clave en el logro de la calidad del suplemento dietético. Adicionalmente, esta guía es flexible en cuanto al uso de los métodos científicos para verificar la identidad, la pureza y la composición de los suplementos dietéticos, por lo que brinda libertad para desarrollar los estándares de calidad y la documentación correspondiente. Sin embargo, tiene como deficiencia el no establecer ningún requisito relacionado con la fecha de vencimiento del producto, aunque la mayoría de las compañías lo incluyan en sus etiquetas como práctica habitual (Zboraj, 2007). A este paso, muy pronto la visión, que ha imperado durante años, de una industria pobremente regulada será historia pasada ([www.nutraceuticalsworld.com/articles](http://www.nutraceuticalsworld.com/articles)).

Aún así las condiciones de reglamentación para estos productos difieren ampliamente entre los EE.UU., la Unión Europea (UE) y Japón. En la UE, por ejemplo, éstas son determinadas por Estados Miembros individuales y como consecuencia, resulta muy incierta la aprobación de las mismas. Además, contienen pocas estipulaciones relacionadas con los nutraceuticos, enfocándose principalmente en la protección de los consumidores contra productos inseguros en general (<http://www.caf.com>).

Por otro lado, es válido destacar la existencia de centros como el *Instituto de Nutraceuticos* (Camden, New Jersey, EE.UU.), el cual está auspiciado por dos universidades estadounidenses (la Universidad Estatal Rutgers, de New Jersey y la Universidad Jesuita "San José", de Filadelfia). El principal objetivo de este centro es promover la comercialización de productos saludables que sean seguros, eficaces y cumplan con los requisitos de calidad, proporcionando el conocimiento científico necesario para que esta creciente industria gane credibilidad. Para ello, realiza investigaciones científicas, pruebas químico-analíticas, bioensayos de seguridad y eficacia, estudios clínicos, toxicológicos, ensayos de optimización, trabajos de normalización, aseguramiento y control de la calidad, definición de requisitos de la materia prima y de parámetros de control del proceso, así como estudios de mercado y de transferencia de tecnologías (<http://www.rutgers.edu>).

### **1.3.1- Otras regulaciones internacionales.**

Existen otras regulaciones internacionales elaboradas por diferentes órganos reguladores. Entre ellos, con mayor alcance que la FDA, se encuentra la Comisión para el Código Alimentario (Codex Alimentarius Commission). Creada en 1963 bajo el Programa Conjunto FAO/OMS de Normas Alimentarias para el desarrollo de normas alimentarias, guías, directrices, códigos de práctica y otros documentos relacionados, está integrada por más de 160 países, cubriendo alrededor del 98% de la población mundial. Se reúne cada dos años con el objetivo de proteger la salud del consumidor, asegurar unas prácticas de comercio justas y promover la armonización de todas las normas alimentarias emprendidas por organizaciones internacionales gubernamentales y no gubernamentales ([www.codexalimentarius.net](http://www.codexalimentarius.net)).

El seguimiento y adopción de estas normas es muy importante, pues se han convertido en la referencia global para los consumidores, productores, agencias nacionales de control e internacionales del comercio de alimentos. Inclusive la Organización Mundial del Comercio exige a los países que establezcan sus medidas de sanidad alimentaria sobre la base de las evaluaciones de riesgos, como los define el Codex Alimentarius. Dichas evaluaciones suponen previamente que los riesgos del consumo de alimentos donde se han empleado plaguicidas químicos, hormonas y antibióticos pueden ser evaluados y manejados para fijar *Límites Máximos Permisibles* que garanticen su seguridad o inocuidad al ser consumidos por el ser humano. La influencia del Codex Alimentarius es tal que se ha extendido a todos los continentes y su contribución a la salud pública ha sido inmensurable (Omaye, 2004).

### **1.3.2- Ambiente regulatorio nacional en torno a los suplementos dietéticos.**

Antes de que las entidades regulatorias cubanas acepten la comercialización de un producto natural, el solicitante debe presentar un expediente a la institución correspondiente, el CECMED o el INHA, en dependencia de las características y fines del producto. A pesar de que aún falta desarrollar el marco regulatorio, existe un Comité de Expertos multidisciplinario que evalúa los documentos presentados atendiendo a criterios científicos, y otros relativos a la calidad, eficacia e inocuidad del producto (Luna, 2007).

En Cuba no existe una sólida cultura al respecto, por ello, a menudo, los fabricantes o solicitantes de tales registros no distinguen fácilmente si sus productos son considerados como medicamentos o como suplementos dietéticos. En el caso de medicamentos, la solicitud se presentará al CECMED, donde los estudios de seguridad y eficacia son usualmente más complejos. Tal rigurosidad es atribuida al hecho de que los medicamentos son agentes extraños al organismo utilizados en condiciones más comprometidas, en ocasiones con un alto riesgo para la vida. Por eso también los requerimientos son mayores, según queda establecido en los "*Requisitos para la Inscripción, Renovación y Modificación en el Registro de Medicamentos de la República de Cuba*", los cuales han sido elaborados teniendo en cuenta los lineamientos de la FDA. Si adicionalmente, éstos son de origen natural, también deben cumplir la Regulación 28-02 del CECMED "*Requisitos necesarios para solicitar la inscripción de un producto de uso humano en el Registro de Medicamentos de Origen Natural*", documento conforme con las normas y regulaciones de la FDA. En cambio, si el producto es propuesto como suplemento dietético, la solicitud debe presentarse al INHA donde las exigencias son menores que las establecidas para medicamentos y por ende, menores también la duración de los trámites y el tiempo de desarrollo del producto.

Pero ¿cómo discriminar un medicamento de origen natural de un suplemento dietético? Según la Regulación 28-02 del CECMED, no se consideran medicamento natural *las plantas medicinales crudas o sus partes, procesadas y envasadas a granel como materia prima farmacéutica* (Anexo 1). Estos casos, en cambio, sí pueden registrarse como suplemento dietético ante el INHA (Anexo 2). Otro criterio de clasificación, si está compuesto por vitaminas, minerales o sus mezclas, es la concentración de éstos y la relación con los valores de su IDR. Si la posología para su administración sobrepasa el 100% de la IDR para los individuos de mayor nivel de exigencia, el producto se debe presentar al registro como medicamento. Si el producto aporta con su administración entre el 25% y el 100% de la cantidad correspondiente a la IDR recomendada se presentará como suplemento dietético.

Adicionalmente, el desarrollo de los productos herbarios exige el cumplimiento de los aspectos recogidos en las *Guía Metodológica para la Investigación en Plantas Medicinales del MINSAP* elaboradas en el año 1997 (Anexo 3). Asimismo en la Tabla 8 se muestran algunos aspectos y requisitos que se valoran al desarrollar los productos naturales en el país.

En Cuba, la producción de suplementos dietéticos utiliza la misma tecnología de producción y equipamiento que la producción de medicamentos. Ambos son liderados por la Industria Químico-Farmacéutica. En consecuencia, la producción de los suplementos dietéticos se ha apropiado también de algunos requisitos y estándares de calidad de aquella. No obstante, aún el país debe avanzar en cuanto a las regulaciones y el nivel de exigencia para esta clase de productos, puesto que es un área en franca expansión. Además debería contarse con un organismo encargado específicamente de esta actividad, como sucede en otros países, ya que la tendencia es desarrollar una rama independiente en la industria dedicada especialmente a los productos naturales (Carvallo, Director de la Industria Química Farmacéutica Cuba. Comunicación personal. 2007).

El principio a seguir en el tema de las regulaciones para suplementos dietéticos es el de la armonización. Por eso son muy frecuentes las reuniones de especialistas en la temática, donde se abordan y llegan a acuerdos sobre asuntos relacionados con estos productos (O'Hara, 2002). Otro ejemplo de integración lo constituye, la *Alianza Internacional de Asociaciones de Suplementos Dietéticos* (Anexo 4).

#### 1.4- Aspectos generales del Control de Calidad de suplementos dietéticos nutraceuticos.

La obtención de cualquier producto farmacéutico, exige el control constante de los parámetros de calidad, antes, durante y después de su fabricación. Como ya se ha mencionado, estos productos tienen altos niveles de exigencia pero algunos criterios son aplicables, sin diferencia, a cualquier preparación terapéutica. Por ejemplo, deben satisfacer la exigencia de estabilidad, pureza, esterilidad y límite de solventes residuales y pesticidas, conforme a lo que establecen las normas oficiales vigentes (Sharapin, 2000). Así, los mismos estándares aplicados al desarrollo de medicamentos son adoptados por varias compañías dedicadas a la producción de suplementos dietéticos, también por la existencia de un punto de convergencia entre ambos procesos de producción. En ambos casos se siguen los principios de BPL y BPP y se cuenta con métodos analíticos específicos, actualizados regularmente. La mayoría de ellos aparecen desarrollados en las *Farmacopeas Nacionales* y otros documentos relacionados, donde se describe la extensión y la naturaleza de los diferentes ensayos a realizar para verificar la presencia del principio activo de interés. Se aplican además semejantes requisitos para garantizar un adecuado envasado y almacenamiento, así como un uso eficaz y seguro del producto, que genere beneficios para la salud minimizando los daños asociados con su administración (Gareth, 2003).

Sin embargo, a menudo tal suplemento nutraceutico no contiene un principio activo purificado sino una compleja matriz, debido a la heterogénea naturaleza de la fuente. Por ende, no se trata de un análisis cuantitativo del principio activo, sino de un marcador de contenido y de **estandarización**, como método de verificación, empleando análisis cromatográficos u otros métodos ensayos (<http://www.meridianmedical.org>).

La naturaleza de la fuente de la materia prima es entonces un factor determinante pues debido a ella generalmente hay que aplicar otros principios de Buenas Prácticas también relacionados, como es el caso de las BPA. Estos principios son esenciales en el desarrollo de esta clase de productos, especialmente en el caso de los derivados de especies botánicas, como sucede generalmente con muchos nutraceuticos. A través de ellos se incrementará su seguridad al reducir la contaminación con microbios, metales pesados, pesticidas herbicidas y materias extrañas (O'Hara, 2002). Lo anterior puede resumirse en la existencia de tres niveles de control de calidad, según como se muestra en la Tabla 9.

Debido a que los nutraceuticos parten de una matriz alimenticia resulta indispensable lograr una correcta seguridad alimentaria como requisito fundamental para garantizar la calidad del producto final. En la actualidad se utiliza el sistema HACCP, cuya correcta aplicación será la producción de alimentos inocuos. Ello se logra a través del cumplimiento de los 7 principios fundamentales que se exponen en la Tabla 10.

El sistema HACCP atribuye al cumplimiento de las BPA y BPP una vital importancia para la garantía de la calidad de los suplementos dietéticos derivados de matrices alimentarias, así como a la elaboración e implantación de los Procedimientos Normalizados de Trabajo y registros relacionados con las actividades fundamentales (<http://groups.ucanr.org>). En este caso, las BPP se refieren a los requerimientos sanitarios y de proceso mínimos, a ser aplicados por quienes procesen alimentos. El objetivo es impedir adulteraciones, o que el alimento esté descompuesto, contaminado, preparado, empacado o mantenido bajo condiciones no sanitarias o no apropiadas pudiendo su consumo constituir un peligro para la salud (Castillo y Martínez, 2002).

### 1.5- Uso nutracéutico de los hongos comestibles.

Además de los productos herbarios se pueden encontrar otros, derivados de distintos organismos capaces de sintetizar compuestos beneficiosos para la salud, que también son formulados como suplementos dietéticos. Es el caso de los hongos comestibles, cuyo consumo se remonta a varios siglos antes de Cristo, sobre todo en los países asiáticos donde están estrechamente ligados a una cultura ancestral (Wasser y Weis, 1999). Se utilizan lo mismo como alimentos, por su buen sabor, que como medicamentos, ya que son una típica fuente reconocida de compuestos fisiológicamente activos (Zhuang y Mizuno, 1999). Su alto valor nutritivo se debe también a la presencia de ácidos grasos polinsaturados (ácido linoleico, ácido araquidónico) y reducidas cantidades de ácidos grasos saturados. Son particularmente ricas en carbohidratos, fibras,  $\beta$ -glucanos,  $\beta$ -proteoglucanos, heteroglucanos, quitina, peptidoglucanos, así como minerales (potasio, calcio, fósforo, magnesio, hierro, zinc, sodio), vitaminas (niacina, tiamina, riboflavina, biotina, ácido ascórbico), ergosterol, tripsina, maltasa y enzimas hidrolíticas que ayudan a la digestión (Costa et al., 2006).

Los hongos comestibles, de los que se presentan algunos ejemplares en el Anexo 5, pueden crecer naturalmente o producirse por vía biotecnológica. Según Camelini *et al.* (2005) los productos derivados de hongos comestibles, incluyendo extractos parcialmente refinados o biomasa desecada procesados en forma de cápsulas o tabletas, se clasifican como productos nutracéuticos y constituyen una nueva clase de suplemento dietético. También Costa *et al.* (2006) usa esta denominación en casos semejantes.

Según la definición de suplemento dietético publicada por la DSHEA, los productos derivados de hongos podrán considerarse como "otro botánico", lo cual puede generar el siguiente conflicto: si "*la botánica es la ciencia que estudia todo lo referente a las plantas*" (del Piñal, 1987) y los pertenecen a otro reino, ¿estarán entonces los productos derivados de hongos comestibles excluidos del concepto de suplementos dietéticos? En ese caso estaría errada su clasificación como tales, pues actualmente un elevado número de productos naturales derivados de hongos comestibles son comercializados bajo esa categoría (véase el Anexo 6).

Aunque no sea del todo acertado, los hongos comestibles son considerados como especies botánicas. La causa podría estar relacionada con el sistema de división de los reinos. En los orígenes, el naturalista sueco Carl von Linneo (1707-1778), dividió en dos grupos los organismos vivos: Plantae (plantas) y Animalia (animales). Sólo al establecer cinco reinos, adicionando Procariotas o Móneras (Monera), (Fungi) y Protistas (Protista) se erigieron los hongos como reino independiente. Aun así, el naturalista australiano Pengelly (2002) en su libro sobre plantas medicinales, en el epígrafe Polisacáridos inmunoestimulantes, menciona mayoritariamente varios  $\beta$ -glucanos derivados de estos organismos.

Los hongos comestibles desempeñan un importante papel en la ecología del ciclo del carbono. Por su carácter saprofítico pueden reducir la acumulación de residuos orgánicos en la naturaleza convirtiéndolos en alimentos humanos de buen sabor (Rodríguez, 2005). Se reproducen en ausencia de la luz solar, no realizan fotosíntesis y su eficiencia en la conversión de proteína por unidad de área y unidad de tiempo es muy superior, comparada con las fuentes de proteína animal (Rajaratnam y Bano, 1991). En el Reino Unido son subvalorados pues los consideran bajos en nutrientes, con poco o ningún valor para la salud. Sin embargo, muchas especies, por ejemplo *Agaricus bisporus* y *Lentinus edodes* son muy ricos en minerales (K, Ca, Mg), vitaminas (D2, B2, C, niacina), fibra dietética, proteínas, contienen todos los aminoácidos

esenciales, y poseen además niveles extremadamente bajos de energía, ácidos grasos saturados y colesterol. También se ha determinado la presencia de adenosina, un agente inmunomodulador, en varios hongos comestibles medicinales (Wang *et al.*, 2008).

Según Breene (1990), los hongos comestibles están compuestos por agua (90%) y la materia seca por proteínas (10-40 %), grasas (2-8 %), carbohidratos (3-28 %), fibra (3-32 %) y cenizas (8-10%), donde se incluyen sales, metales y otros compuestos que no son incinerados.

Las primeras especies de hongos comestibles cultivados fueron *Auricularia*, *Flammulina velutipes* y *Lentinus edodes* en los siglos VII, X y XI en China y Japón. *Agaricus bisporus* (el verdadero champiñón), fue cultivado en Francia a partir del siglo XVIII. Estas y otras especies fueron objeto de atención también durante siglos en Corea y el este de Rusia (Wasser, 2002). Luego, la tecnología fue asimilada discretamente en América entre finales del siglo XIX y la primera mitad del XX; aunque, fue en la segunda mitad del siglo XX cuando su presencia se hizo significativa en el continente, por ejemplo, en México, Brasil, EUA, Canadá y Colombia. El cultivo de hongos comestibles medicinales ha dejado atrás las improvisaciones y técnicas artesanales para convertirse en la base de una industria altamente tecnificada y fructífera (Lull *et al.*, 2005). Tanto es así que su producción mundial se ha incrementado más de 18 veces en las últimas décadas, pasando de 350 000 toneladas en 1965 hasta cerca de las 6 160 800 toneladas producidas en 1997 (Royse, 2003). Cifras con mayor detalle se ilustran en la Tabla 11 como un ejemplo de la gran expansión que ha experimentado esta tecnología.

En el mundo, las diferentes especialidades de hongos comestibles son muy cotizadas, muchas de ellas por sus propiedades culinarias, según se puede observar en la Tabla 12.

En el 2006, existían alrededor de 2000 variedades de hongos comestibles disponibles en el mercado mundial. Aún así, en Europa del Este, a pesar de los altos precios de estos productos, la oferta no llegó a cubrir la demanda, cada vez más creciente (Chavarrías, 2005; Roach, 2008).

Actualmente el número estimado de hongos superiores a nivel mundial, oscila alrededor de unos catorce mil. De ellos, conocidos un diez por ciento, cuya mitad se considera comestible. Se piensa además, que unas dos mil especies son seguras, y que alrededor de setecientos poseen propiedades farmacológicas significativas (Chang, 1996; Wasser y Weis, 1999; Reshetnikov *et al.*, 2001 y Wasser, 2002). Estas especies también han sido aprovechadas, sobre todo en las terapias tradicionales orientales, donde por siglos se han utilizado generalmente como extractos hidrosolubles (Hobbs, 1995, 2000; Wasser, 2002) en forma de tónicos, tinturas, infusiones, sopas y esencias. Han sido aplicados como lubricantes para los pulmones (*Tremella fuciformis*), tonificadores de los riñones (*Cordyceps sinensis*), reductores de la humedad excesiva (*Grifola umbellata*), vigorizadores del bazo (*Poria cocos*) e inmunoestimulantes (Lakhanpal y Rana, 2005). En el Anexo 5 pueden observarse algunos hongos empleados tradicionalmente por sus propiedades medicinales, muchos de los cuales, en Japón, son incluidos en varios programas de nutrición saludable y recomendados por médicos y nutricionistas para promover la salud (Ikekawa, 2001).

El conocimiento empírico acerca de las propiedades medicinales de los hongos comestibles ha conllevado al desarrollo de un número elevado de investigaciones científicas, descubriendo así una variedad extraordinaria de compuestos, tanto componentes celulares como metabolitos secundarios con propiedades farmacológicas

y efectos fisiológicos significativos. Se ha observado que estas sustancias son útiles para el tratamiento complementario de diversas enfermedades como: asma alérgica, alergia a ciertos alimentos, dermatitis atópica, inflamación, artritis reumatoidea, aterosclerosis, hiperglicemia, trombosis síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), listeriosis tuberculosis, shock séptico y cáncer (Lull *et al.*, 2005). Son reconocidos como “modificadores de la respuesta biológica”, ya que presentan sustancias, que actuando inespecíficamente son capaces de modificar la respuesta biológica en el hospedero estimulando su sistema inmunológico y posibilitando al organismo a adaptarse al estrés biológico y ambiental (Costa *et al.*, 2006). Entre las especies mayormente estudiadas por sus propiedades medicinales están: *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa*, *Agaricus blazei*, *Hericium erinaceous*, *Cordyceps militaris* y *Pleurotus ostreatus* (Lakhanpal y Rana, 2005).

Estas investigaciones, de las que algunos resultados son presentados en la Tabla 13, han propiciado el desarrollo de diversos productos naturales a partir de las propiedades farmacológicas demostradas (Mizuno, 2002). Esto ha provocado, aparejado al consumo creciente de hongos frescos o en conserva, un incremento de su comercialización en forma de suplementos dietéticos. De tal manera, que según Wasser *et al.* (2004) el valor alcanzado por las ventas de estos últimos en el mercado mundial, en los albores del siglo XXI, oscilaba entre 5 y 6 billones de USD anuales.

#### **1.5.1- Suplementos dietéticos nutraceuticos derivados de hongos comestibles en el mercado internacional.**

Según Lull *et al.* (2005) los productos nutraceuticos derivados de hongos comestibles, administrados al organismo por vía oral, han resultado una herramienta muy útil como complementos de la dieta. Los mismos se han obtenido por distintas vías biotecnológicas de fermentación y se consumen en variadas formas farmacéuticas tales como (Wasser *et al.*, 2004):

- tabletas y cápsulas de cuerpos fructíferos silvestres secados y pulverizados.
- polvos de cuerpos fructíferos cultivados artificialmente y sus extractos (por decocción o alcohólicos), solos o mezclados.
- granos del sustrato, micelio y primordios combinados, luego de inoculados en medio semisólido.
- preparaciones farmacéuticas derivadas de la biomasa, extractos de micelio, o medio de cultivo obtenidos por cultivo sumergido en biorreactores.

La *Industria Nutraceutica* representa una intersección única entre las industrias alimentaria y farmacéutica integrando ventajosamente aspectos de una y otra en función de lograr un producto de alta calidad. Este movimiento tuvo sus orígenes en Japón, por lo que no sorprende que el mercado japonés para nutraceuticos lleve la vanguardia. Este desarrollo también está respaldado por el gobierno, el que solamente en el año 1998, destinó un presupuesto equivalente a 13 billones de USD por ese concepto (Agricultura and Agri-Food Canada, 2002). Los suplementos de *Agaricus blazei* son los más prescritos en este país para el tratamiento complementario del cáncer (Hirofumi *et al.* 2006).

El mercado nutraceutico europeo, como entidad unificada, es menos desarrollado que el asiático pero más que el norteamericano. Sin embargo, en este último, los hongos medicinales se están convirtiendo en uno de los principales productos consumidos por sus efectos saludables, brindando más importancia a los nutraceuticos con efectos en el sistema cardiovascular y el sistema inmune y dando preferencia a los regímenes curativos sobre los preventivos. El mercado europeo y estadounidense para

productos nutracéuticos oscila alrededor de los €819.9 millones y crece anualmente un 4.5 %. Se estima que en el 2009 alcance la cifra de €1.07 billones (Partos, 2005).

También en Taiwán, los suplementos dietéticos derivados del cuerpo fructífero de *Grifola frondosa* tienen una gran demanda por sus propiedades antitumorales e inmunomoduladoras (Wang *et al.*, 2008). Se ha observado también la tendencia a la fortificación con componentes fisiológicamente activos, como antioxidantes (vitaminas C, E, provitamina A, etc.) y minerales (Se, Ca, Mg o Zn, etc.). Una de las experiencias de este tipo fue realizada en la Universidad de Medellín, Colombia, donde se produjo *P. ostreatus* fortificado con Ca, Se y Vit. C (Cortés, 2007).

La Tabla 14 también es una muestra de diferentes suplementos dietéticos elaborados a partir de hongos comestibles medicinales. Obsérvese en dicha tabla los requisitos y estándares de calidad establecidos para los mismos, los cuales son semejantes a los que existen para productos farmacéuticos. Algunos de esos componentes han sido purificados y formulados, alcanzando la categoría de medicamentos. De esa forma constituyen formulaciones únicas y potentes, sobre todo como antitumorales. Además de los presentados en el Anexo 7, tenemos entre ellos al sizofirano o esquizofilano, de *Schizophyllum commune* (Wasser *et al.*, 2004). La primera fracción polisacáridica aprobada para el tratamiento del cáncer en Japón (1977) fue el PSK o Krestin. Luego se aisló el PSP un polisacaropéptido, purificados ambos de la decocción de *Coriolus versicolor* (no comestible). Varios de estos productos han experimentado más de 400 estudios preclínicos y más de una docena de estudios clínicos a doble ciego controlados con placebo para comprobar sus efectos inmunopotenciadores. De esta manera, PSK y PSP figuran entre los extractos de glucanos más extensamente estudiados y mejores validados como antitumorales hasta la fecha (<http://www.mushroomscience.com>). Algunos ensayos clínicos utilizando diferentes especies de hongos comestibles son presentados en la Tabla 15.

Muchas son las compañías dedicadas a la producción de nutracéuticos derivados de hongos comestibles medicinales (ver tabla 6). Éstas elaboran los suplementos dietéticos bajo estándares de calidad similares a los que utilizan compañías farmacéuticas. Inclusive, muchos de ellos son comercializados con prospectos donde publican las características del producto y otras informaciones usualmente asociadas a medicamentos (Anexo 8).

### **1.5.2- Aspectos generales de *Pleurotus* spp.**

#### Clasificación taxonómica:

Reino: *Fungi* (Hongo)

Clase: *Basidiomycetes*

Orden: *Agaricales*

Familia: *Pleurotaceae*

Género: *Pleurotus*

Los hongos del género *Pleurotus*, crecen como saprófitos en trozos de plantas vivas o muertas, pobres generalmente en nutrientes y vitaminas. Se consideran de “pudrición blanca” por degradar materiales ricos en lignina, celulosa y hemicelulosa (Sánchez y Royse, 2002). Se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo (Vilgalys y Sun, 1994). Los caracteriza un rápido crecimiento, una gran habilidad del micelio para colonizar el sustrato, así como una alta adaptabilidad y productividad. Son muy fáciles y poco costosos de producir (Curvetto, 1999). La mayoría de las especies son comestibles, con alto valor comercial por lo que también son extensamente cultivadas (Cohen *et al.*, 2002).

*Pleurotus ostreatus* es una especie compleja que incluye diferentes variedades, subespecies y cepas cultivadas, las cuales han sido muy estudiadas en varios aspectos como: taxonomía, nutrición, compuestos beneficiosos para la salud y biodegradación de residuales (Park *et al.*, 2006; Saavedra *et al.*, 2006). Inclusive ya ha sido secuenciado el genoma mitocondrial de diferentes subespecies con el propósito de clasificarlas filogenéticamente (Wang *et al.*, 2008).

A pesar de que el cultivo de *Pleurotus ostreatus* se inició apenas en el siglo XX, sus características le han permitido experimentar un desarrollo acelerado, siendo México el principal productor de hongos comestibles en toda América. Hace sólo tres años cosechaba unas cinco toneladas diarias de esta especie. En Argentina, en el año 2003, *Pleurotus ostreatus* ya se producía a escala comercial utilizando varios desechos lignocelulósicos disponibles (Albertó *et al.*, 2003), ocupando allí el segundo lugar, después del champiñón (Lechner *et al.*, 2003). Colombia también ha experimentado un crecimiento acelerado en su cultivo (Rodríguez y Jaramillo, 2005). Sin embargo, de todos los países hispanoamericanos, España es el mayor productor de *Pleurotus* spp. Este país produjo en 1998 un aproximado de 1 640 toneladas (alrededor del 1,5% de la producción mundial). En el 2001, ya ocupaba en el mundo, el tercer lugar luego de *A. bisporus* y *L. edodes* (Sánchez y Royse, 2002), cultivándose en la actualidad en casi todas las latitudes (Velasco, 2004).

Entre las ventajas del cultivo de *Pleurotus*, Bermúdez *et al.* (2002) citan: la posibilidad de crecer en climas tropicales y de utilizar una amplia gama de sustratos orgánicos, así como la simplicidad en su tecnología de producción. Entre esos sustratos se encuentra una gran variedad de subproductos agrícolas e industriales como la paja de arroz, el bagazo de caña, la pulpa de café, los residuales del cacao y el pasto seco.

En Cuba, entre los años 1989 y 1994 con el asesoramiento del ICIDCA se comenzó la construcción de 15 plantas en diferentes provincias para la producción de *Pleurotus* spp. empleando la paja de caña, el bagazo, la paja de arroz y hojas de plátano (ICIDCA, 1998). Su cultivo había sido introducido al país, por ese instituto en el año 1988. En la región oriental, ha sido el CEBI, centro adscrito a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente (Santiago de Cuba), el que una vez asimilada dicha tecnología, se ha dedicado a la investigación y producción de *Pleurotus* spp. de forma continuada, sobre subproductos agrícolas, fundamentalmente de la industria cafetalera (Bermúdez *et al.*, 2001).

Las especies de *Pleurotus* son consideradas como alimento de gran valor nutritivo debido a su alto contenido de proteínas, fibra y minerales. En el caso de *Pleurotus ostreatus* su composición química es muy variable, en dependencia del tiempo de cultivo, la especie, el contenido de humedad, la temperatura y los nutrientes del sustrato (Steineck, 1987; Zervakis y Balis, 1992; Zhao, 1998). El contenido proteico, por ejemplo, tiene una estrecha relación con el contenido de nitrógeno del sustrato (Kawai *et al.*, 1994). Esta especie contiene todos los aminoácidos esenciales, los cuales constituyen entre el 25 y 40% del contenido aminoácido total como se puede apreciar en la Tabla 16 (Miles y Chang, 1999) lo cual contribuye directamente a la alta calidad proteica de la biomasa (Bermúdez *et al.*, 2002). En esta tabla se pueden apreciar igualmente otras propiedades nutraceuticas generales de este género así como de algunos de los representantes más estudiados.

Adicionalmente se conoce que la administración de *Pleurotus ostreatus* (var. *florida*) en conejos provocó una disminución de los lípidos totales, colesterol total, y niveles de glicéridos del plasma sanguíneo y del hígado, incrementando a su vez el balance

colesterol de lipoproteína de alta densidad/colesterol de lipoproteína de baja densidad (HDLc/LDLc), lo cual es benéfico para la salud (Bajaj *et al.*, 1997). A esta misma especie se refieren Bermúdez *et al.* (2002) destacando su gran potencial como materia prima para la obtención de ergosterol (provitamina D<sub>2</sub>), necesaria para la formación de la hormona calcitriol, clave en el metabolismo del calcio y el fósforo. Por otra parte, Okuda *et al.*, (1972) aislaron de *Pleurotus ostreatus* varios polisacáridos hidrosolubles, del tipo  $\beta$ -glucano ramificados, con propiedades antitumorales. Esta propiedad farmacológica es probablemente la más estudiada de *Pleurotus* spp. y la de mayor potencial para el desarrollo de productos que puedan usarse en la terapia anticancerígena (Zhang, 1994). También se ha descubierto en *P. ostreatus* la presencia de una sustancia antioxidante termoestable (ergotionina) de concentración superior a la encontrada en *Agaricus blazei*, la mayor fuente conocida hasta el momento (Partos, 2005).

Sheu *et al.*, (2007) extrajeron de *Pleurotus citrinopileatus* una nueva proteína de 15.0 kDa aproximadamente, no asociada a carbohidratos, con características inmunomoduladoras. Esta proteína es capaz de activar esplenocitos murinos, propiciar su proliferación, la secreción de IFN- $\gamma$  y de activar directamente los macrófagos, así como incrementar la producción de NO y de TNF- $\alpha$ , sugiriendo la activación en el hospedero de las respuestas innata y adaptativa.

#### **1.6- Desarrollo de suplementos dietéticos con actividad inmunocéutica.**

Según Kidd (1999), el término “inmunocéutico” fue introducido para caracterizar mejor a aquellos nutraceuticos capaces de potenciar el sistema inmune y entre ellos pueden encontrarse:

- Fitosteroles derivados de plantas, en combinación con sus derivados glicosídicos denominados esterolinas.
- El *Eleutherococcus senticosus* (nombrado erróneamente como ginseng siberiano).
- La raíz de *Astragalus membranaceus*, usada en China tradicionalmente como inmunopotenciador, donde forma parte de casi todas las fórmulas herbarias.
- Extractos de timo de mamíferos jóvenes.
- Extractos de cartílago de tiburón (aunque aún hay controversias sobre ello)
- El factor de transferencia obtenido de las vacas, preparado a partir del calostro, rico en sustancias inmunopotenciadoras.
- Los glucanos derivados de superiores, la mayoría de hongos comestibles.

Algunos hongos superiores medicinales que constituyen la materia prima principal de varios suplementos dietéticos se presentan en la Tabla 17. Se relacionan conjuntamente sus productos comercializados, disponibles muchos de ellos en la red electrónica internacional. Las evidencias científicas demuestran que los  $\beta$ -D-glucanos son los responsables de los efectos inmunomoduladores de los hongos comestibles medicinales (Costa *et al.*, 2006), los que pueden modular positiva o negativamente la respuesta biológica (son modificadores de la respuesta biológica) de las células inmunes (inmunomoduladores). Varios de ellos han resultado exitosos al ser probados clínicamente (Reshetnikov *et al.*, 2001), siendo hasta la fecha más de 50, las especies de hongos superiores que han mostrado su potencial como inmunocéuticos (Bush y Watkin, 2007).

##### **1.6.1- Polisacáridos $\beta$ -D-glucanos como principales responsables de la actividad inmunomoduladora de hongos comestibles medicinales.**

Los glucanos son polisacáridos (carbohidratos) de alto peso molecular compuestos solamente por unidades monosacarídicas de glucosa que difieren unos de otros en la longitud de sus cadenas y el grado de ramificación de las mismas. Están ampliamente

distribuidos en plantas, algas, participando en el almacenamiento de nutrientes y la protección de las membranas (Bruneton, 1995).

Se ha observado que las levaduras sintetizan al menos tres tipos diferentes de polisacáridos  $\beta$ -glucanos (Czop y Kay, 1991):

- a) uno de cadena lineal del tipo  $\beta$ -1,3-D-glucano
- b) otro también de cadena lineal pero del tipo  $\beta$ -1,6-D-glucano
- c) un tercero, cuya cadena principal es del tipo 1,3- $\beta$ -D-glucano con cadenas ramificadas del tipo  $\beta$ -1,6-D-glucano ( $\beta$ -1,3/1,6-D-glucanos).

Estos y otros se encuentran en los hongos comestibles medicinales. Sin embargo, no todos los  $\beta$ -D-glucanos presentes en los hongos exhiben propiedades antitumorales. Se plantea que las estructuras lineales no activan o lo hacen muy pobremente a los macrófagos, células NK o neutrófilos; en cambio los  $\beta$ -(1-3) glucanos con cadena laterales ramificadas del tipo  $\beta$ -(1-6) (Figura 1) presentan la mayor actividad, tanto en organismos vertebrados, como invertebrados. Se ha observado además en algunos 1,3/1,6-  $\beta$ -D-glucanos, específicamente el lentinano, la presencia de una estructura conformacional de triple hélice (Miles y Chang, 1999). Otros factores como la solubilidad en agua y el tamaño de las moléculas parecen también influir también en su actividad (Czop y Kay, 1991; Gotoh, 1991). De igual forma, se ha observado que la actividad de los extractos obtenidos por decocción difiere ampliamente de la de los extractos procesados con agua fría (Furukawa, 2006).

Según Yan *et al.* en 1999 ya existían más de 500 publicaciones demostrando los efectos antitumorales y antimicrobianos de  $\beta$ -D-glucanos provenientes de los hongos medicinales, en estado soluble o particulado, sobre diferentes biomodelos experimentales. Los diversos resultados presentados en la Tabla 18, muestran que la actividad biológica de  $\beta$ -D-glucanos está relacionada con su capacidad de activar macrófagos, neutrófilos, linfocitos T, así como de estimular la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF), especies reactivas del nitrógeno, intermediarios del oxígeno, interleucinas (ILs) y otros elementos de la inmunidad. Se ha observado que también están involucrados en la activación de la vía alternativa del sistema de complemento (Sutherland, 1998), potenciando así tanto la inmunidad innata como la humoral (Cruse, 2004; Vetvicka *et al.*, 2007).

#### **1.6.2- Mecanismo de acción de los inmunocéuticos del tipo $\beta$ -D-glucano.**

Tanto las poblaciones celulares como las moléculas involucradas en mecanismos del sistema inmunológico representan blancos atractivos para la acción de los inmunocéuticos del tipo  $\beta$ -D-glucanos derivados de hongos comestibles medicinales. De esa manera, es en la Inmunoterapia donde estos compuestos encuentran actualmente su mayor aplicación (Ikekawa, 2001, Costa *et al.*, 2006).

Se conoce que los glucanos desencadenan los efectos antes mencionados, uniéndose a receptores en las membranas de macrófagos, neutrófilos, células NK, células T, células dendríticas, fibroblastos, y células vasculo-endoteliales (Seo *et al.*, 2003). Aunque, algunos estudios *in vivo* realizados por Trnovec y Hrmová (1993), usando materiales marcados, mostraron que las partículas de glucanos son captados predominantemente por los macrófagos del sistema reticuloendotelial y que su degradación es muy lenta. La afinidad con el receptor y la consecuente actividad inmunomoduladora parece estar relacionada con la estructura molecular, referida al grado de ramificación, a la longitud del polímero y a la estructura terciaria que presente el  $\beta$ -D-glucano (Costa *et al.*, 2006).

En el organismo existen Receptores de Reconocimiento de Patrones capaces de reconocer carbohidratos, lípidos, proteínas y otras biomoléculas que forman parte únicamente de elementos celulares (usualmente la pared celular) de algunos microorganismos. Las señales mediadas por éstos, a las que se llama “señales de peligro”, están involucradas en una fase temprana de la respuesta inmune, teniendo una crucial importancia en la inmunidad innata (Wales *et al.*, 2007). Estas estructuras macromoleculares son conocidas como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) y los glucanos pueden ser considerados como tales por el sistema inmune innato del hospedero (Akramiené *et al.*, 2007). Por la importancia de estos receptores en la actividad de los compuestos inmunocéuticos, en la Tabla 19 se presentan algunos de ellos y los ligandos que normalmente reconocen. De algunos de ellos se muestra su estructura conformacional en las Figuras 2 y 3.

A pesar de no estar del todo dilucidados los detalles de los mecanismos de acción, se conoce que el efecto inmunoestimulante y antitumoral de los  $\beta$ -D-glucanos se logra a través de la activación de ambos tipos de inmunidad. Kikkert *et al.* (2007), además, plantean que la coestimulación de TLRs específicos y del receptor dectin-1 (en este último caso, para  $\beta$ -glucanos de alto peso molecular) ocasiona un poderoso efecto inmunoestimulante. En consecuencia, también se liberan mediadores proteicos denominados citoquinas tales como: interleucinas (IL), interferones (IFN), factores estimuladores de colonias (CSF) y quimioquinas, las cuales, de forma individual, pueden actuar sobre varios tipos celulares, proporcionando además un nexo entre la inmunidad innata y la específica (Abbas, 2000; Kaiko *et al.*, 2008; Bettelli *et al.*, 2007).

### **1.6.3- Aplicación terapéutica de los compuestos inmunocéuticos.**

Las numerosas evidencias acumuladas a partir de estudios epidemiológicos y en animales de experimentación han demostrado que componentes de la dieta pueden disminuir la incidencia de algunos tipos de tumores, a través de mecanismos quimiopreventivos (Havas *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994). Se considera que existe una quimiopreención del cáncer cuando se inhibe o revierte el proceso de carcinogénesis a través de la ingestión de agentes químicos, naturales o sintéticos (Pezzuto, 1997).

Según Costa *et al.* (1990) existen más de 600 agentes quimiopreventivos de más de 25 clases químicas diferentes: retinoides, sales de selenio, indoles, fenoles, tocoferoles, entre otros, agrupados bajo las siguientes categorías:

- aditivos alimentarios
- moléculas (no nutrientes) presentes en los alimentos
- micronutrientes
- reactivos industriales
- hormonas y antihormonas
- agentes farmacológicos

Los compuestos anticancerígenos presentes en los alimentos se dividen en preventivos o terapéuticos. En ambos, el sistema inmune juega un papel fundamental y la ingesta de alimentos es un factor determinante (Arai, 2002). Algunos son quimiopreventivos directos pues interfieren la activación metabólica de la carcinogénesis actuando sobre tejidos dianas o inhibiéndola luego de una exposición carcinogénica. Otros actúan indirectamente estimulando el sistema inmune del hospedero (<http://www.meridianmedical.org>).

Por otra parte, uno de los efectos adversos más comunes de la quimioterapia es la neutropenia, provocada por el deterioro de la médula ósea. Como resultado, este tipo de terapia contra el cáncer puede acelerar el riesgo a las infecciones, y un detrimento

de la calidad de vida de los pacientes. De igual manera, la radioterapia frecuentemente provoca depleción hematopoyética e inmunológica, ocasionando anemia, linfocitopenia, trombocitopenia y granulocitopenia. Ello también incrementa el riesgo de desarrollar infecciones letales, y por tanto, la morbilidad y mortalidad por esta causa (Akramienè *et al.*, 2007). Los mejores inmunocéuticos contribuyen a que el sistema inmune ataque a las células cancerígenas. De la misma forma, favorecen la recuperación y movilización de los componentes inmunológicos, una vez que éstos han sido dañados por la aplicación de las terapias antes mencionadas (Kidd, 1999).

La Inmunoterapia también es efectiva en el caso de otros eventos igualmente nocivos, generalmente asociados a otras inmunodeficiencias secundarias. Las cuales pueden ser también desarrolladas como consecuencia de la malnutrición, el tratamiento con fármacos inmunosupresores, o las infecciones de las células del sistema inmunitario, especialmente por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Abbas, 2000).

En todos estos casos, el uso de los  $\beta$ -D-glucanos ha mostrado resultados positivos. De tal manera, que su inserción en la cultura occidental, ya sea constituyendo medicamentos o formando parte de otro tipo de formulaciones, se está convirtiendo en práctica habitual (Sullivan *et al.*, 2006).

#### 1.6.4- Toxicología asociada a $\beta$ -D-glucanos.

Las muertes por intoxicación accidental con venenosos se producen con frecuencia. En China, país consumidor habitual de hongos comestibles, se estima que entre 1996 y 2002 murieron aproximadamente 195 personas por envenenamiento involuntario (Chen, 2003). Pero, ¿basta con no confundirse para evitar efectos indeseables al consumir esta clase de productos? ¿Son realmente inocuos?

Los hongos comestibles medicinales, como ya se ha comentado, se han usado milenariamente para el alivio de diferentes afecciones y se han considerado como seguras. Sin embargo, ¿su consumo tradicional y la muy poca o nula evidencia de efectos adversos son suficientes para considerarlas un producto seguro? Esta idea generalizada sobre la inocuidad de los comestibles ha sido rechazada por Zeisel (1999).

También Wasser *et al.*, (2004) concuerdan en que no debe ser ésta una garantía de su seguridad, sobre todo si se valoran algunos aspectos sobre los cuales llaman la atención ([http://www.icnet.uk/labs/med\\_mush/final\\_pdfs/chapt9.pdf](http://www.icnet.uk/labs/med_mush/final_pdfs/chapt9.pdf)):

- En primer lugar, se ha producido un cambio en la perspectiva de “seguridad” actual debido a que los patrones de mortalidad de las sociedades desarrolladas son muy diferentes a los tradicionales. Además, los consumidores de siglos atrás raramente poseían los medios para evaluar la toxicidad crónica de un agente. Un ejemplo de ello es la seta comestible medicinal *Paxillus involutus*, de la cual hoy se conocen efectos tóxicos considerables.
- Muchos productos derivados de hongos comestibles se comercializan actualmente de forma diferente, generalmente más concentrada. Por ejemplo, 31 g de lentinano equivalen a 200 kg de la seta fresca, por lo que, junto a un mayor efecto farmacológico también se incrementan los efectos adversos.
- Por otra parte, algunos hongos comestibles o sus productos antes usados con fines terapéuticos específicos hoy se utilizan como profilácticos y también de manera concomitante con medicamentos y otras sustancias.

- Finalmente, confiar en las evidencias tradicionales para declarar la seguridad de un producto es bastante arriesgado ya que es muy escasa o vaga la información que ha llegado hasta nuestros días.

❖ Manifestaciones clínicas observadas:

En Finlandia se observó una relación entre el consumo de *Lentinus edodes* crudo y la aparición de dermatitis por contacto, así como reacciones alérgicas manifestadas en las vías respiratorias por trabajadores dedicados a su cultivo. Estas reacciones están potencialmente asociada a la presencia de una proteína, además ha sido aislada una IgE específica contra componentes de este hongo (Aalto-Korte *et al.*, 2005).

Se ha descrito igualmente que el lentinano ha producido ocasionalmente alergias, y rara vez: sarpullido, sensación de presión en el pecho, náuseas, vómito, dolor de cabeza, sensación de ardor y sudoración. Y otras reacciones adversas de menor incidencia como: fiebre, oleadas de calor transitorio en la cara, anorexia, leucopenia, vértigo, disminución de la hemoglobina y sensación de faringitis (<http://www.cdeea.com/shiitake.htm>).

Se observó además que la fracción D de *Grifola frondosa* indujo artritis en ratones a los que fue administrada (Shigesu *et al.*, 2000).

Sin embargo, los efectos más graves fueron publicados por Hirofumi *et al.* (2006). Es el caso de tres pacientes con cáncer avanzado, quienes desarrollaron un severo daño hepático, directamente relacionado con el consumo prolongado de *Agaricus blazei*. Dos de ellos murieron de hepatitis fulminante y el tercero mejoró gradualmente cuando hubo suspendido su consumo para empeorar nuevamente una vez que lo reinició. Lo cual conllevó al establecimiento de una causalidad estrechamente ligada al consumo prolongado de  $\beta$ -glucanos.

Estos hechos demuestran que tales compuestos no deben ser considerados como panaceas. Inclusive en los casos en que se consumen como paliativos de los tratamientos quimio y radioterapéuticos también es aconsejable el consumo de sustancias antioxidantes que contribuyan a la neutralización de la gran cantidad de radicales libres generados, así como otros nutracéuticos que ayuden al buen funcionamiento de los diferentes sistemas de órganos. No obstante, es indiscutible que la calidad de vida de las personas que consumen los glucanos derivados de hongos comestibles puede ser mejorada considerablemente, también el tiempo de supervivencia de pacientes con cáncer. Y de la misma forma, constituyen una esperanza para quienes padecen de inmunodeficiencias secundarias. A pesar de las reacciones adversas presentadas, como suplementos dietéticos son bastante seguros y exhiben perfiles casi perfectos de riesgo-beneficio (Kidd, 1999; 2000).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1- Estudio del ambiente regulatorio relacionado con los suplementos dietéticos.

Para estudiar el ambiente regulatorio internacional en torno a los suplementos dietéticos se consultaron varios sitios de agencias regulatorias de prestigio como:

- La FDA (<http://www.fda.gov>)
- El Codex Alimentarius (<http://www.codexalimentarius.net>)
- La Organización Mundial de la Salud (<http://www.who.int>)

En estos sitios se tuvo acceso a enlaces relacionados con los documentos oficiales relativos a los productos naturales de naturaleza variada, algunos generales, y otros específicos para los productos derivados de hongos comestibles.

Para completar los elementos necesarios para la investigación respecto a esta temática, en el caso de las regulaciones nacionales, fue necesario la consulta de las páginas principales de las entidades regulatorias cubanas como:

- El INHA (<http://www.INHA>)
- El CECMED (<http://www.cecmed.sld>)

A través de estas páginas principales, se pudo acceder a documentos de naturaleza regulatoria en el ámbito nacional, publicados por el INHA y el CECMED, relacionados con productos naturales y suplementos dietéticos. Las valoraciones al respecto son presentadas en el capítulo 3.

### 2.2- Análisis de las propiedades fármaco-toxicológicas de los hongos comestibles.

Los datos científicos relativos a las propiedades fármaco-toxicológicas de hongos comestibles, incluidas las del género *Pleurotus*, fueron obtenidos a través de la consulta de Internet, en particular del portal **espacenet** (<http://www.espacenet.com>). Este sitio contiene la base de datos Latipat, con acceso gratuito a la información bibliográfica e imágenes de documentos de patente de 20 países de distintos continentes, con derecho de propiedad intelectual sobre los mismos.

De igual manera, vía intranet, se accedió por medio del portal de Infomed (<http://www.infomed.sld.cu>) a la Base de Datos **Hinari**. Ésta es financiada por el país y permite disponer de numerosos artículos científicos con buen nivel de actualización. A través del mismo portal se pudieron revisar diversas publicaciones editadas en Revistas Cubanas especializadas en diferentes temáticas relacionadas con la salud, las Ciencias Farmacéuticas y ciencias afines, con el fin de encontrar información relacionada con el uso de suplementos dietéticos, en general, y a los elaborados a partir de hongos comestibles, en particular, dentro del territorio nacional.

Otros enlaces a sitios de interés se establecieron a partir de los buscadores generales de Google y Yahoo, lo que permitió conocer el universo más común de la temática a nivel internacional.

El perfil fármaco-toxicológico de *Pleurotus* fue elaborado por especialistas de la Consultoría Fármaco-toxicológica del Centro de Toxicología y Biomedicina de Santiago de Cuba. Estos profesionales se encargan de la búsqueda de información científica especializada y actualizada, relativa a las propiedades farmacológicas y toxicológicas asociadas a la exposición a un producto determinado, en este caso una especie botánica.

## **2.3- Preparación de los extractos hidrosolubles crudos de micelio de *Pleurotus* spp. como suplemento dietético potencial.**

### **2.3.1- Materiales y reactivos utilizados**

Los compuestos empleados en la preparación de los medios poseían la calidad microbiológica necesaria. Estos fueron los siguientes:

- agar extracto malta (BIOCEN, Cuba)
- glucosa (Merck, Alemania)
- peptona (OXOID, Alemania)
- extracto de levadura (Biolife, Italia)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Alemania)
- $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Alemania)

De forma semejante, los siguientes reactivos empleados poseían calidad analítica y estaban aptos para su uso en el laboratorio:

- Ácido sulfúrico 95-97%, reactivo para análisis (Merck, Alemania, reenvasado por QUINSA, Quimefa, Cuba).
- Antrona, reactivo para análisis (Merck, Alemania)

### **2.3.2- Cepa utilizada y preparación de los inóculos.**

Se utilizó la cepa de *Pleurotus* spp. CCEBI 3024 depositada en la colección de cultivos del CEBI. Para la preparación de los inóculos se propagó la cepa en medio sólido compuesto por agar-extracto-malta. La siembra se realizó en tres placas Petri, las cuales fueron incubadas a 37 °C hasta observar un crecimiento micelial total.

### **2.3.3- Cultivo sumergido de *Pleurotus* spp.**

Se utilizó el medio YPG líquido de composición: glucosa (2%), peptona (0,5%), extracto de levadura (0,5%),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1%),  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  (0,1%). El pH final del medio fue ajustado a 5.0 en un pHmetro (CRISON Instruments, S.A, Spain) y a continuación esterilizado en autoclave (SAKURA, Tokio, Japan).

Cuando el micelio cubrió la superficie de las placas, bajo cabina de flujo laminar (Telstar Bio-II-A, Spain), se procedió a su raspado con una espátula estéril y a la fragmentación en piezas de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>. Posteriormente, se inocularon tres erlenmeyers de 1L de capacidad conteniendo 500 mL de medio de cultivo. Éstos fueron incubados a 37 °C con agitación en mini-zaranda (MIZARD.2001, Retomed, Cuba) a 120 rpm aproximadamente, durante 15-20 días.

### **2.3.4- Método de obtención de los extractos hidrosolubles crudos de micelio de *Pleurotus* spp.**

Al término del cultivo sumergido, la biomasa micelial fue colectada por filtración exhaustivamente con agua bidestilada procedente del Laboratorio Farmacéutico Oriente, con el objetivo de remover los restos de medio de cultivo presente. La biomasa fue pesada en balanza digital (Sartorius) y depositada en frascos Pirex, a los que se adicionó 5 ml de agua bidestilada por cada gramo de micelio pesado. Posteriormente se procedió al tratamiento térmico, a 95 °C durante 10 horas aproximadamente.

Transcurridas las 10 h, el contenido se filtró a través de una gasa estéril y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min (mLw T 54). Luego se concentró a un tercio del volumen original, obteniendo así los extractos hidrosolubles correspondientes. Los mismos fueron identificados como Extracto I, II y III según el orden que fueron procesados. Las soluciones se conservaron en refrigeración a 4 °C para la posterior realización de los análisis microbiológicos y químicos.

## **2.4- Aspectos relativos al Control de Calidad del extracto hidrosoluble de *Pleurotus* spp.**

### **2.4.1- Análisis microbiológico.**

El análisis microbiológico fue realizado en el Laboratorio de Microbiología del Laboratorio Farmacéutico Oriente. El medio utilizado para analizar el crecimiento de bacterias contenidas en cada extracto estuvo compuesto por triptona-soya-agar, el cual fue incubado (Incubadora SAKURA, Tokio, Japan) durante 48 h a 30-35 °C. Para el análisis de hongos en los extractos se empleó Saboraud-dextrosa-agar, incubándose éste por 7 días a 20-25 °C, siguiendo en ambos casos el método descrito en el Procedimiento *INSOI.148T Análisis microbiológico de materia prima y producto terminado no estéril por el método de las placas vertidas*, conforme a los establecido en la USP 30 (2007).

### **2.4.2- Análisis químico.**

#### **2.4.2.1- Determinación del contenido de carbohidratos totales.**

Para la determinación del contenido de carbohidratos totales se utilizó el método colorimétrico, basado en la reacción con la antrona y ácido sulfúrico (Koehler, 1952). Se utilizó una solución patrón preparada con dextrano, homopolisacárido constituido por unidades de glucosa.

##### Preparación de la solución patrón:

Para la construcción de la curva de calibración se preparó una solución de dextrano de concentración 100 µg/mL. Se tomaron volúmenes diferentes de la misma para la preparación de soluciones de concentración igual a 10, 30, 50, 70 y 90 µg/mL. La reacción colorimétrica se desarrolló según Koheler (1952) y se midió la absorbancia a 625 nm. La recta de calibrado fue obtenida con ayuda del programa Excel del paquete de Microsoft Office, Windows 2000.

Se realizó análisis de regresión lineal para la estimación de la ecuación de regresión. Se comprobó la significación estadística del coeficiente de regresión "b" ( $p < 0,05$ ) y se estimaron sus límites de confianza ( $b \pm t_{0,05} S_b$ ), donde  $S_b$  es el error estándar asociado al coeficiente de regresión y  $t$  es el valor del estadístico para  $n-2$  grados de libertad (Sigarroa, 1985).

##### Preparación de las disoluciones de extractos

Se realizaron dos diluciones a partir de cada uno de los extractos hidrosolubles de micelio:  $1/100$  y  $1/50$ , tomando 1 mL de ellas para la reacción y haciendo tres réplicas en cada caso.

#### **2.4.2.2- Determinación de metales.**

La determinación de los elementos metálicos Fe, Ca, Mg, Cu, Cd, Zn y Pb fue realizada en los Laboratorios de Geominera Oriente a través de un Análisis "quick quant", utilizando un equipo ICP-AES (SPECTROFLAME, Spectro Analytical Instruments).

#### **2.5- Evaluación del cumplimiento de los Requisitos de Aseguramiento de la Calidad.**

Se realizó una valoración de los factores que propician el desarrollo de suplementos dietéticos derivados de *Pleurotus* spp. no exclusivo para los derivados de extractos hidrosolubles crudos. En este sentido, fueron considerados los requisitos necesarios para asegurar la calidad de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. como materia prima de suplementos dietéticos inmunocéuticos. En este análisis se contemplaron los elementos del Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) dada la naturaleza alimentaria de la fuente del producto de interés.

Los Requisitos Generales para el Aseguramiento de la Calidad se establecieron de acuerdo a la Norma Internacional ISO 9001: 2000 y los requerimientos específicos para suplementos dietéticos se obtuvieron de la USP 30 (2007), documento de referencia internacional.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1- Aspectos regulatorios en torno al desarrollo de un suplemento dietético.

La propuesta de un nuevo suplemento dietético es presentada ante el INHA por la entidad encargada de producirlo, a través de un expediente donde deben constar los datos que se presentan a continuación. Dicho expediente es evaluado por un equipo de expertos, quienes aprueban o no el registro del producto, y en el caso de ser éste aprobado, la relación fabricante/proveedor cobra entonces un papel fundamental en el proceso de producción.

A continuación se muestran los Datos que conforman el Expediente de un Producto Natural propuesto en Cuba como suplemento dietético (Instituto de la Nutrición e Higiene de los Alimentos):

- 1- Nombre del Producto
- 2- Marca comercial
- 3- Fábrica productora
- 4- Empresa productora
- 5- Composición de un comprimido
- 6- Aditivos alimentarios
- 7- \* Especificaciones de calidad físico-químicas (incluye ensayos realizados)
- 8- \* Límite de contaminantes metálicos en el producto
- 9- \* Límite para contaminantes microbiológicos
- 10- \* Límite máximo de residuos para otros contaminantes
- 11- Resultados de los análisis realizados
- 12- Breve descripción del proceso tecnológico
- 13- Tipo de envase que se propone, descripción
- 14- Etiqueta
- 15- Fecha de producción
- 16- Interpretación de la clave del lote
- 17- Vencimiento
- 18- Contenido neto
- 19- Tipo de embalaje
- 20- Identificación del embalaje
- 21- Número de embalaje de altura por estiba
- 22- \* Condiciones de almacenamiento y/o conservación
- 23- \* Formas de consumo
- 24- \* Grupo poblacional al que va dirigido

La mayoría de los datos que forman parte del expediente, dada su naturaleza, son conformados por el laboratorio productor. Sin embargo, entre ellos existen otros (a los que se ha identificado con el símbolo “\*”), en los que incide, ya sea directa o indirectamente el proveedor de la materia prima principal, cuando éste es un participante activo en la investigación y en el esclarecimiento de las evidencias científicas necesarias. A lo largo del capítulo estos aspectos se abordarán paulatinamente.

### 3.2- Ventajas del uso de los hongos comestibles como fuente de suplementos dietéticos.

La mayoría de los suplementos dietéticos son derivados de plantas medicinales, pero el uso de éstas como materia prima tiene asociado diversos problemas. Uno de ellos es la gran variabilidad en la composición química, ocasionando de este modo grandes diferencias entre los lotes de producción.

Esas diferencias pueden ser atribuidas a varias causas (Sharapin, 2000):

- los factores intrínsecos, que determinan la presencia o ausencia de sustancias farmacológicamente activas según las especies.
- el lugar de recolección, las condiciones climáticas y del suelo, la época del año, así como las diferentes técnicas de cultivo.
- el factor ambiental (clima, nutrición, ataque de plagas, etc.) puede modificar la producción de los metabolitos secundarios influyendo directamente en la expresión de los genes responsables de la producción de los principios activos.

Otro problema que se presenta es en relación al tipo de población vegetal a utilizar (nativa o cultivada). La nativa se utiliza en ocasiones, generalmente cuando son especies de domesticación difícil, crecimiento lento o demanda reducida en los mercados. Éstas presentan mayor variabilidad en el contenido de principios activos. Por eso, para mantener constante la composición se necesita mezclar grandes cantidades de plantas, recolectadas en áreas diferentes. Ello puede dar lugar a falsificaciones, mezclas y destrucción innecesaria de especies. También, a la disminución considerable de la especie de interés, como ocurrió en Brasil con la ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*), fuente de la emetina. Esto incide negativamente en el proceso industrial, pues afecta la posibilidad real de obtener la cantidad de materia prima necesaria.

Como solución, para lograr un suministro con calidad y en cantidad suficiente para la actividad industrial, se utilizan plantas medicinales cultivadas, las que presentan una mayor homogeneidad en el contenido de los principios activos y asegura un mejor procesamiento de la planta recolectada. Esta variante permite el mejoramiento de las condiciones del suelo y la observación de las BPA. Sin embargo, es necesario establecer los parámetros y técnicas del cultivo para obtener genotipos homogéneos. A este proceso se le llama “domesticación de la especie” y puede durar muchos años, constituyendo éste el mayor inconveniente.

En cambio, los hongos comestibles, a pesar de poseer estructuras morfo-fisiológicas complejas y que la composición del cuerpo fructífero varíe en dependencia del sustrato utilizado y su grado de madurez (Gunde-Cimerman, 1999), en la actualidad, constituyen una fuente considerable de productos naturales, tanto farmacéuticos como suplementos dietéticos (la mayoría). Los hongos comestibles, en relación con otras fuentes de materia prima presentan, entre otras, las siguientes ventajas (Wasser *et al.*, 2004):

- La mayoría de los hongos comestibles utilizadas en la producción de suplementos dietéticos son cultivadas, lo que garantiza la adecuada identificación y pureza, y en algunos casos, también uniformidad genética.
- La velocidad de propagación de algunos hongos en forma vegetativa es muy alta, lo que asegura una gran producción a partir de un solo clon.
- El micelio, utilizado en el crecimiento de los inóculos, etapa anterior a la formación del cuerpo fructífero, puede ser almacenado por largo tiempo sin alteración. Su consistencia genética y bioquímica puede ser verificada regularmente con facilidad.

- Muchas tienen la capacidad de crecer también por fermentación en estado sumergido. Así la biomasa es obtenida en forma de micelio, en menor tiempo, en comparación con el cultivo en estado sólido.

En Cuba, hoy día, el CEBI es uno de los centros con mayor incursión y resultados en relación al cultivo y aplicación de los hongos comestibles. Por esta razón, en este capítulo se abordan varios de los factores que respaldan el uso de *Pleurotus* spp. en la producción de suplementos dietéticos con propiedades inmunocéuticas. Para ello es necesario tener en cuenta algunas de las características descritas por Bello (2006) para los alimentos saludables, así como las experiencias presentadas por varios institutos nutracéuticos. El análisis estará permeado además de elementos regulatorios específicos, basados tanto en las normativas actuales internacionales, como en las que están vigentes en el país.

### 3.2.1- Perfil fármaco-toxicológico.

Un elemento de importancia crucial dentro de las ventajas del uso de los hongos comestibles como fuente de suplementos dietéticos lo constituye el amplio espectro de acciones farmacológicas y la inocuidad de su administración.

En el perfil fármaco-toxicológico de *Pleurotus* spp., elaborado por especialistas de TOXIMED (Anexo 9) se aborda la información relativa a los efectos tóxicos publicados sobre *Pleurotus* spp. Puede observarse en el mismo que no aparecen evidencias significativas, exceptuando los efectos de la proteína ostreolisina, que es además termolábil. Debido a que las preparaciones hidrosolubles utilizadas en la mayoría de los estudios preclínicos se han obtenido tras extracciones sucesivas en agua caliente durante varias horas, es muy probable que de estar presente esta proteína se hubiera inactivado. Sin embargo, tampoco se observaron signos de toxicidad cuando Llauradó et al. (2008) administraron los extractos hidrosolubles preparados a bajas temperaturas. No obstante, éste es un aspecto que debe ser estudiado más exhaustivamente.

### 3.3- Factores que propician el desarrollo de suplementos dietéticos inmunocéuticos derivados de *Pleurotus* spp.

Son muchos y variados los factores que pueden incidir en el desarrollo de un producto aplicado a la salud humana. Los mismos deben ser tomados en cuenta para hacer una correcta selección del proceso de producción de la materia prima principal, así como la forma de presentación del producto final y otros aspectos relacionados, de manera tal que puedan ser optimizados los recursos disponibles. Todo ello, en aras de lograr un producto de alta calidad, eficaz y seguro.

Con el objetivo de agrupar estos factores ordenadamente se ha decidido, para el caso de inmunocéuticos derivados de hongos comestibles medicinales, que es el producto en cuestión, resumirlos en relación con:

-  La producción de la materia prima principal
-  La producción del suplemento dietético
-  El control de calidad de la materia prima principal y del suplemento dietético
-  Su aplicación y efectos asociados
-  Aspectos económicos

De cada factor se brinda más información en lo adelante y a medida en que es analizado, se presentan algunas evidencias que avalan la producción de un suplemento dietético a partir de *Pleurotus* spp. De igual manera, en el caso de existir alternativas se valora cuál de ellas sería más viable, lo cual permitirá ir definiendo las características de la elaboración del suplemento dietético.

### 3.3.1- Factores relativos a la producción de la materia prima principal.

Al elaborar una forma farmacéutica cualquiera, se utilizan diferentes tipos de materia prima, algunas de las cuales son sustituidas en busca de una mejora en la formulación. Sin embargo, la materia prima que porta o que constituye esencialmente el (los) principio(s) activo(s) es considerada como la principal, puesto que es la responsable del efecto saludable que se quiere alcanzar con la administración del producto.

#### Facilidad de cultivo de *Pleurotus* spp.

Las especies del género *Pleurotus* pueden ser cultivadas satisfactoriamente en climas tropicales (Sánchez y Royse, 2001), como el de Cuba. En el capítulo anterior se han mencionado otras características de este género, donde se incluyen una alta adaptabilidad al medio y una gran productividad. Estas propiedades hacen que su cultivo sea relativamente fácil y poco costoso.

#### Es posible obtener la materia prima principal en cantidades industriales.

En Cuba, al igual que en la mayoría de los países, una de las principales desventajas que afecta la comercialización de productos naturales, es la inestabilidad en el suministro de materias primas, causada generalmente por la limitada disponibilidad de sus fuentes (Pérez Cristiá, 2007). En comparación con las materias primas vegetales convencionales, utilizando la vía biotecnológica es posible disponer de mayores cantidades del hongo comestible. Esto es debido a que, en dependencia de la naturaleza del sustrato empleado, entre otros factores, la biomasa de *Pleurotus* spp., es producida más fácilmente, con mayores rendimientos y en un menor tiempo que aquéllas.

Para producir la materia prima de *Pleurotus* spp. necesaria, por vía biotecnológica, se pueden utilizar dos tipos de tecnologías fermentativas:

- 1- fermentación en estado sólido (FES).
- 2- fermentación sumergida.

Tradicionalmente, el CEBI, ha utilizado la fermentación en estado sólido para producir hongos comestibles del género *Pleurotus* spp. (Bermúdez *et al.*, 2001). Sin embargo, Morris *et al.* (2007) y Rodríguez (2006), aunque con fines distintos, han desarrollado también la fermentación sumergida. Según Wasser (2004) y Lull (2005) existen varios autores que prefieren utilizar el cultivo sumergido para la producción de la biomasa, lo cual garantiza un proceso más limpio y un producto mejor caracterizado, al emplear medios de cultivo convencionales, bien definidos.

Al existir relativamente poca experiencia en el CEBI, respecto a la utilización de las tecnologías de cultivo sumergido para la producción de biomasa y metabolitos derivados, resultó de interés producir el micelio de *Pleurotus* spp. mediante este procedimiento, para luego evaluar las ventajas y desventajas de su utilización.

### PRODUCCIÓN DEL MICELIO POR CULTIVO SUMERGIDO.

El cultivo sumergido se realizó observando los requisitos de Buenas Prácticas de Laboratorio con la metodología presentada en el capítulo 2. En la Figura 4 y 5 se muestran las etapas principales del proceso; así como la decocción del micelio para la elaboración de los extractos.

#### Preparación de los inóculos.

Los inóculos demoraron alrededor de 10 días para cubrir toda la superficie de las placas Petri (paso común para ambas vías de producción biotecnológica de la

biomasa). No se observó ningún signo de contaminación con microorganismos o alteración en el crecimiento micelial. Al comparar cualitativamente los micelios que se utilizarían para la siembra, se observó que el micelio I tenía la mayor biomasa inicial y el mayor grosor de todos, además de una consistencia más compacta, lo que hizo más fácil su separación del medio sólido, reduciendo considerablemente el tiempo de manipulación. En los otros casos, al ser más difícil separarlos, en ocasiones se arrastró parte del medio sólido, por lo que hubo que dedicar mayor tiempo a esta etapa. El micelio III fue el de menor biomasa, la cual estuvo caracterizada por una capa muy delgada, de difícil separación.

#### Proceso fermentativo:

El cultivo sumergido se desarrolló durante aproximadamente 20 días, observándose un adecuado crecimiento de los pellets.

#### Cosecha de los Micelios:

Se realiza cuando la biomasa celular, en forma de pellets, cubre prácticamente todo el volumen del medio de cultivo. La biomasa fresca obtenida resultó como promedio de 69,2 g/L, valor similar al de 67,5 g/L informado por Beltrán (2008).

Resulta necesario caracterizar mejor las condiciones de este tipo de fermentación para *Pleurotus* spp., específicamente para la cepa escogida. Ello permitiría optimizar el proceso y alcanzar los mejores resultados posibles.

### PRODUCCIÓN DE LOS CUERPOS FRUCTÍFEROS POR FERMENTACIÓN SÓLIDA.

En contraposición con la experiencia limitada del CEBI en el cultivo sumergido de *Pleurotus*, se encuentra la vasta experiencia acumulada en la producción de los hongos comestibles, de la cual se muestran algunas etapas en la Figura 6. Esta experiencia es fruto de un trabajo ininterrumpido, ejemplificado indudablemente por las evidencias que se presentan a continuación.

En 1996, fue otorgado al CEBI el Registro de Marca "NORA'S" (Anexo 10) y en 1997, la licencia sanitaria (Anexo 11) para la producción y comercialización de hongos del género *Pleurotus*, documentos que posteriormente fueron renovados pertinentemente (Anexos 12 y 13, respectivamente). En el transcurso de una década este producto ha sido obtenido usando la cepa productora de la planta (CCEBI 3024), con la cual se ha observado una buena eficiencia biológica a los 45 días de producción, utilizando la pulpa de café como sustrato (García *et al.*, 2006). Los hongos han sido empleados en la alimentación, llegando a recibir avales relativos a sus bondades, emitidos por organismos de las instancias superiores del territorio, como el CITMA, institución que además ha apreciado y recomendado la implantación de esta tecnología, debido a su alto valor agregado (Anexo 14).

#### ➔ Comparación entre las dos tecnologías de fermentación.

En la Tabla 20 se establece una comparación entre los dos procesos biotecnológicos fermentativos, empleados en la producción de la biomasa necesaria de *Pleurotus* spp. para la elaboración de suplementos dietéticos. Dicha comparación está basada en los datos obtenidos con la cepa CCEBI 3024.

El cultivo de hongos comestibles para la producción de cuerpos fructíferos se considera un proceso largo, que requiere de uno o varios meses hasta que aparezcan los primeros cuerpos fructíferos en dependencia de la especie y el sustrato (Wasser, 2002). No obstante, el análisis de la tabla 16 pone de manifiesto que resulta más fácil obtener cantidades industriales de biomasa por FES, empleando mayor cantidad de

desechos agrícolas lignocelulósicos. De igual manera, el rendimiento, según los resultados actuales, es mayor en el caso de la fermentación sólida, la cual según lo descrito por García (2008) presenta ventajas netas sobre el método de cultivo sumergido.

➔ Selección bidireccional de la vía fermentativa y del tipo de materia prima a utilizar.

Según Moore (1982), los cuerpos fructíferos tienen un mayor contenido de polisacáridos que el micelio. Esto ocurre porque a medida que transcurren las diferentes fases o estadios de su desarrollo (latencia, germinación de las esporas, desarrollo del micelio y formación del cuerpo fructífero) el hongo superior asimila mayor cantidad de carbono, la mayoría destinada a la biosíntesis de la pared celular. Primeramente, esta pared está compuesta por sustancias insolubles en agua como la quitina o la celulosa, pero luego son sintetizados otros polisacáridos generalmente hidrosolubles, los que contribuyen a conformar la matriz amorfa donde quedan embebidos aquellos polisacáridos insolubles. Al respecto, Wang *et al.* (2008) observaron que la concentración de carbohidratos de la mezcla micelio-medio de cultivo obtenidos del cultivo sumergido de *Grifola frondosa* era inferior a la mitad de la concentración de los carbohidratos presentes en el cuerpo fructífero obtenido por fermentación sólida.

Mizuno *et al.* en 1990 informaron la presencia de un polisacárido de naturaleza  $\alpha$ -(1,4)-glucano con actividad antitumoral, pero sólo en estado maduro de la seta. Por otra parte, Camellini *et al.* (2005) hicieron una caracterización estructural de los  $\beta$ -glucanos presentes en el cuerpo fructífero de *Agaricus brasiliensis*, en tres estadios distintos de maduración (inmaduro, maduro con esporas aún inmaduras y maduro con esporas ya maduras). Los resultados afirman que existen diferencias entre ellos, en cuanto a la diversidad y a la cantidad de estos metabolitos. Se observó que a mayor grado de madurez del cuerpo fructífero, el rendimiento y la diversidad de  $\beta$ -glucanos se incrementa, siendo en el cuerpo fructífero ya maduro donde son más elevados los niveles de (1,3)- $\beta$ -D-glucanos y sus derivados con ramificaciones del tipo  $\beta$ -(1,6). Estos deben ser los motivos por los que tanto Dong *et al.* (2002) como Camellini *et al.* (2005) recomiendan el uso de los cuerpos fructíferos maduros de *Agaricus brasiliensis* como productos nutracéuticos. Una situación similar podría presentarse con otros hongos comestibles, siendo necesario un número mayor de evidencias experimentales.

 Existe una gran disponibilidad de sustratos

La gran habilidad de las especies de *Pleurotus* para colonizar sustratos lignocelulósicos varía en dependencia de la naturaleza de los mismos, su nivel de degradabilidad, la tasa de crecimiento del hongo y su capacidad para fructificar, transformando los residuos en biomasa comestible. Aún así, *Pleurotus* es una de las especies más adecuadas para ser cultivado en estado sólido, utilizando una extensa variedad de desechos agrícolas (Rajaratnam y Bano, 1991).

Según Muez y Pardo (2001) antes de elegir el sustrato más adecuado para su cultivo deben considerarse los siguientes aspectos:

- disponibilidad suficiente y continua
- regularidad en su composición físico-química
- precio de adquisición ventajoso
- localización fácil y cercana
- facilidad para su transporte y manejo

El cultivo del café en la zona cafetalera oriental representa el 80% del total cultivado en Cuba. Igualmente, en la zona de Baracoa se concentra una proporción semejante de la producción de cacao, aunque una parte también es reservada para la provincia Santiago de Cuba (García, 1999).

La pulpa de café ha sido uno de los sustratos más utilizados por el CEBI para la producción biotecnológica de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. aplicando la tecnología de FES. De igual manera, se han utilizado comúnmente las cáscaras de cacao y de coco, también de segura adquisición. Con relación a ello se ha observado que, después de la inoculación, los primordios tardan en aparecer 11, 16 y 25 días cuando se utiliza cáscara de coco, cáscara de cacao, y pulpa de café respectivamente como sustrato. Asimismo, el crecimiento del micelio es más rápido, vigoroso y con menor tendencia a la contaminación en el cacao y el coco. No obstante, el mayor rendimiento es alcanzado empleando la pulpa de café, posteriormente con la cáscara de coco y por último con la cáscara de cacao (Bermúdez *et al.*, 2001).

 Existe suficiente material bibliográfico de soporte para un cultivo eficiente de *Pleurotus* spp.

El CEBI cuenta con una extensa literatura, tanto publicada internacional como nacionalmente, incluyendo la elaborada por los investigadores del proyecto, donde se detallan las etapas y características principales de la producción de los hongos comestibles del género *Pleurotus*. Tales referencias constituyen obras de gran valor, en especial se destacan las Tesis de Maestrías y de Doctorado defendidas en el tema.

 Grado de refinamiento de la materia prima.

La industria químico farmacéutica de países desarrollados, prefiere obtener productos naturales a partir de sustancias puras o sus derivados semisintéticos; garantizando así un producto de estructura conocida, con composición química definida. Un principio activo purificado generalmente genera una respuesta más intensa aunque también está acompañada de efectos adversos indeseables. Sin embargo, el número de países en vías de desarrollo es mayor. Para ellos, los procesos de extracción y purificación de sustancias elevaría el costo de la inversión, por lo que es muy común encontrar productos naturales elaborados con las partes crudas (Sharapin, 2000).

Por otro lado, existen consideraciones a las que se debe prestar atención, por ejemplo, la categoría del producto. Como ya se ha expresado, de *Lentinus edodes*, se extrae y concentra el lentinano, que tiene categoría de medicamento y es usado en la terapia anticancerígena. Es sabido que los medicamentos deben tener principios activos bien definidos, en cambio, este no es un requisito para los suplementos dietéticos.

En contraste con la tendencia de purificar, caracterizar y administrar estos metabolitos con actividad inmunomoduladora y anticancerígena se plantea que en los hongos hay varios componentes que tienen actividad sinérgica. Se conoce también que existe más de un tipo de polisacárido con estas propiedades y se piensa que pueden unirse a diferentes receptores de la superficie de células específicas y desencadenar distintas cascadas de respuestas. En consecuencia, una combinación de ellos involucraría a diferentes tipos celulares y por tanto, podría lograrse una mayor inmunomodulación e inhibición del crecimiento tumoral que en el caso de un metabolito purificado (Lull, 2005).

Cabe señalar también que muchas veces cuando se prefieren los extractos no se aprovechan otros compuestos con propiedades bioactivas. En el mismo caso de purificación del lentinano, durante el proceso se pierde un metabolito de importancia biológica, la eritadenina, útil en el tratamiento de la hipercolesterolemia. Utilizando la seta en su forma cruda para la producción del suplemento dietético se pueden obtener los beneficios de cada fase del ciclo de crecimiento y una mayor concentración y variedad de  $\beta$ -D-glucanos inmunoestimulantes. La principal desventaja es que al emplearse el material crudo, en el caso de los hongos comestibles, así como sucede con otras fuentes, la calidad y el efecto beneficioso son variables (Sharapin, 2000).

Es conveniente destacar que Morris *et al.* (2007) observaron mayores propiedades inmunoestimulantes al evaluar *in vitro* el extracto hidrosoluble crudo de *Pleurotus* al compararlo con cuatro fracciones semipurificadas. Este resultado experimental según Camelini (2005) se corresponde con lo publicado por otros autores, quienes refieren una mayor inmunoestimulación cuando se emplean extractos crudos de productos naturales en comparación con los mismos extractos cuando sufren algún proceso de purificación.

Teniendo en cuenta este hecho y las ventajas económicas que proporciona, la alternativa más acertada sería utilizar el material crudo de *Pleurotus* como materia prima principal para la elaboración de productos inmunocéuticos.

### 3.3.2- Factores relativos a la producción del inmunocéutico.

#### ➤ Definiendo el tratamiento post-cosecha y la forma de presentación del producto final.

Antes de proceder a la elaboración del producto terminado se deben especificar las características de la materia prima principal. Por ejemplo, si ésta será utilizada fresca o tras experimentar algún tratamiento previo. Lo más común, según Sharapin (2000), es que la industria utilice preferentemente el material seco, porque de esa manera se interrumpen los procesos enzimáticos celulares que pueden conllevar a la degradación del material, se impide el crecimiento de microorganismos y se facilita el almacenamiento y transporte del material sin riesgos de deterioro. Pero entre proveedor y fabricante deben decidir, según las facilidades que presente cada uno, cómo será entregada la materia prima.

De igual manera debe definirse la forma de presentación del suplemento dietético ya que existe una amplia gama de formas farmacéuticas de administración por vía oral que pueden ser utilizadas:

- ❖ formulaciones líquidas: gotas, jarabes, soluciones o suspensiones para cápsulas blandas de gelatina
- ❖ formulaciones sólidas: comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas de gelatina, entre otras.

Para seleccionar la más adecuada, dicho autor recomienda tener en cuenta, además, que la forma farmacéutica escogida debe:

- ser aceptable para el individuo
- ser química y físicamente estable
- estar exenta de contaminación microbiana
- ser capaz de proporcionar una dosis correcta
- ser económico su proceso de producción a gran escala

Actualmente, se calcula que la mitad de los medicamentos son administrados bajo la

forma de comprimidos, convirtiéndose en una de las formas farmacéuticas más comúnmente utilizadas. Éstos, además de permitir precisión en la dosificación, son de fácil empleo y pueden ser formulados en gran escala con la consecuente reducción de costos, entre otras ventajas. Por otra parte, presentan un menor riesgo de descomposición del principio activo y de contaminación del producto, en relación con las formas líquidas.

 Existe la infraestructura industrial necesaria para desarrollar el producto.

Además de la cercanía de las fuentes de sustrato para la producción de los hongos comestibles como materia prima, también es válido destacar la presencia en el territorio del Laboratorio Farmacéutico Oriente (LFO) como fabricante candidato. Éste, en la región oriental, es la institución de más vasta experiencia en el diseño, la elaboración, y la comercialización de productos naturales, en formas farmacéuticas sólidas de dosificación, sobre todo a partir de plantas medicinales. Como puede apreciarse en la Tabla 21, donde se ofrece un listado de esta clase de productos que han sido desarrollados por dicho laboratorio, ya se han diseñado algunos con propiedades inmunoestimulantes. Varios de estos productos han sido registrados ante el INHA como suplementos dietéticos; otros, transitan diferentes fases para su registro como medicamentos de origen natural, ante el CECMED. Un ejemplo de este último caso lo constituye el INMUNOSAN.

En dicho laboratorio, específicamente en la Unidad Básica de Tabletas, investigadores del Departamento de Investigación y Desarrollo se encargan de la confección de los *Expedientes de los Productos Naturales* a presentar ante el INHA. Es un paso de avance contar con esta experiencia para el registro del producto, ya que poseen pleno conocimiento de los requisitos y de los aspectos regulatorios a tener en cuenta. También la provincia Granma cuenta con otra institución de la Industria Farmacéutica, la Fábrica de Líquidos Orales. Ésta podría ser útil en el caso del diseño de una formulación líquida. No obstante, es indiscutible que la cercanía del LFO constituye una ventaja exclusiva. En resumen, si además se consideran las mencionadas anteriormente, puede afirmarse que la mejor opción es formular el suplemento dietético como comprimido, no en forma líquida.

 No se requiere invertir en sustancias auxiliares especiales para la producción.

Las sustancias auxiliares que se emplearían en la producción del suplemento dietético no difieren de las utilizadas normalmente por el LFO para la producción común de las tabletas. Las mismas no representan un costo elevado y algunas de ellas son producidas nacionalmente. El costo se ve afectado por el precio del envase, factor que también afecta a otros tipos de producciones que utilizan recipientes plásticos para envasar el producto final.

### **3.3.3- Factores relativos al control de calidad de la materia prima principal y a la producción del suplemento dietético.**

#### **❖ FACTORES RELATIVOS A LA MATERIA PRIMA PRINCIPAL**

La calidad de la materia prima es un elemento clave, el cual debe ser asegurado y controlado cuidadosamente, pues determina la calidad final del suplemento dietético. Ésta debe cumplir con diferentes requisitos de calidad antes de formar parte del producto terminado. En este caso, el producto es destinado a la salud humana, por lo que los requisitos específicos deben observarse con mayor rigurosidad. Igualmente, el empleo de cantidades adecuadas de inóculo y sustrato, el conocimiento y el control de cada uno de los parámetros que pueden afectar la producción de los hongos comestibles del género *Pleurotus* son imprescindibles para garantizar su producción industrial. A continuación se exponen algunas características que la favorecen.

 Es posible aplicar el sistema HACCP.

Para garantizar una óptima producción de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp., dada su naturaleza alimentaria, se aplica el sistema HACCP.

### **3.3.3.1- Elementos del sistema HACCP aplicados a la producción de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp.**

La identificación de los puntos críticos de control, basados primeramente en un análisis de peligro, según los pasos del proceso de cultivo utilizando la tecnología de fermentación en estado sólido, se muestran en la Tabla 22. Aunque aquí se abordan algunas características, otras más generales son tratadas en el epígrafe correspondiente a “Aseguramiento de la Calidad”.

Una vez identificados los PCC se deben establecer los límites críticos de aquellos parámetros que influyen directa o indirectamente en la calidad de los cuerpos fructíferos, tomando en consideración la experiencia acumulada al respecto. Estos parámetros deben ser medidos en los diferentes momentos del cultivo. Se conoce, por ejemplo, que no debe desestimarse el control de la temperatura y humedad, el tiempo de cultivo para la cosecha, los índices de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, los ciclos de luz, entre otros. Estos factores están reconocidos como los principales factores abióticos que pueden ocasionar daños en el cultivo.

➤ La selección y tratamiento del sustrato

Aunque para la producción de una cantidad adecuada de cuerpos fructíferos deben tenerse en cuenta otros factores como los mencionados en el epígrafe 3.3.1, uno de los mayores peligros lo constituye en esta etapa la calidad del sustrato que se va a emplear. El mismo no debe estar contaminado con metales pesados o con sustancias químicas como plaguicidas que comprometan posteriormente la seguridad del producto. Para ello, debe existir una estrecha relación entre los proveedores de sustratos, así como un mecanismo de control que permita conocer en qué medida se aplican las Buenas Prácticas de Agricultura y las sustancias empleadas antes y durante la generación del desecho agrícola. En los casos en que fuera dudoso el procedimiento se deberían hacer determinaciones químico analíticas.

Antes de inocular el micelio de *Pleurotus* spp. el sustrato es sometido a esterilización. La realización correcta de este procedimiento disminuirá considerablemente la probabilidad de una posterior contaminación. Este paso es de vital importancia en la calidad de los cuerpos fructíferos.

➤ Higienización de áreas y personal

Así como es necesaria la existencia de áreas protegidas contra insectos y otras plagas, una adecuada higienización de las mismas es imprescindible para evitar contaminaciones. La organización debe contar con procedimientos implementados que garanticen la higiene de las mismas. De igual manera, el personal debe practicar las normas de higiene y bioseguridad: lavarse las manos, usar delantal, gorro, guantes limpios y tomar otras precauciones específicas para esta clase de cultivo.

➤ Inoculación

El mayor peligro en esta etapa es la contaminación del inóculo. El seguimiento de las normas de higiene abordadas anteriormente y de una adecuada Práctica deberá garantizar el éxito de la inoculación.

➤ Colonización

Esta demostrado que durante la colonización, *Pleurotus* spp. necesita temperaturas entre los 20 y 28 °C, pues de registrarse temperaturas más bajas el riesgo de contaminación es mayor (Mendoza, 2004; Velasco, 2004). Adicionalmente, las especies de *Pleurotus*, presentan fototropismo positivo, por tanto, la luz es necesaria para el desarrollo de los primordios. Si ésta es pobre o nula puede provocar disminución o fracaso en la producción, afectando sus características organolépticas. Un exceso podría retardar la formación de los primordios. Asimismo, el aumento de CO<sub>2</sub> por falta de ventilación puede demorar la aparición de los cuerpos fructíferos o provocar que éstos se marchiten una vez desarrollados. Por otro lado, el uso de productos químicos durante el ciclo de cultivo de *Pleurotus* está limitado debido a la alta susceptibilidad de los hongos a los plaguicidas y por el riesgo de acumulación de éstos en los cuerpos fructíferos (Gea, 2001). Por esta razón, se debe evitar al máximo la exposición del sustrato empleado a plaguicidas y metales pesados. En este paso, también es importante observar el estado de las bolsas plásticas a utilizar en el cultivo de *Pleurotus* spp.

En algunas instituciones de experiencia en la cosecha de hongos comestibles y sólidos recursos financieros, como es el caso de la compañía Forest Mushrooms Inc. (Minnesota, EUA), una vez que se detecta la presencia de los primordios, las bolsas plásticas son trasladadas a áreas de fructificación controladas. En dichas áreas se cuenta con un sistema computarizado para el control de la humedad ambiental, niveles de CO<sub>2</sub> y temperatura, por medio de sensores distribuidos a lo largo de la nave de cultivo y los parámetros son medidos y controlados a través de un ordenador en el laboratorio central (Vogel y Salmones, 2000). En nuestro caso, se ha establecido un sistema de control del proceso. De hecho, las condiciones de cultivo son rigurosamente monitoreadas y los parámetros controlados con frecuencia una vez comenzado el proceso.

➤ Fructificación

Debe existir una adecuada documentación de las condiciones del ambiente que propicien la formación de los cuerpos fructíferos (fructificación): la temperatura, humedad, cambios de aire, volumen del cuarto de fructificación, entre otros. Su control además debe garantizar que se obtengan cuerpos fructíferos según las especificaciones requeridas para el producto. La protección de las áreas contra la entrada de insectos evitará el ataque de plagas.

Tanto los parámetros que deben supervisarse durante la colonización como durante la fructificación, han sido bien definidos, descritos e implementados por el CEBI durante el cultivo de *Pleurotus* spp. Esto se ha evidenciado, entre otros aspectos, en los valores obtenidos en el rendimiento del proceso experimentado por lotes diferentes (Bermúdez *et al.*, 2001; 2002; 2003; García *et al.*, 2006; Murlot, 2006).

➤ Cosecha

Cuando el píleo está casi plano, es cuando *Pleurotus* spp. ha alcanzado su máximo crecimiento. Esta característica indica que ha llegado el momento de la cosecha. La cosecha puede realizarse con la mano o con instrumentos como tijeras o cuchillo y no es recomendable lavar los cuerpos fructíferos una vez recogidos. Asimismo, se debe tener cuidado de no tomarlos por el pie, donde pueden haber crecido otros hongos contaminantes (Rodríguez y Jaramillo, 2005). De lo contrario, se corre el riesgo de provocar un rápido deterioro o de propiciar la contaminación de los cuerpos fructíferos

luego de la cosecha. Como es lógico, mantener la higiene durante la manipulación es de suma importancia para evitar el crecimiento de microorganismos durante el almacenamiento.

➤ Secado

Se debe garantizar que exista un flujo de aire adecuado para que el secado elimine la mayor humedad posible, lo cual disminuirá significativamente la probabilidad de contaminación. Se recomienda ubicar las bases de los carpóforos hacia abajo. Se plantea además que los cuerpos fructíferos pueden secarse al sol. No obstante, lo más recomendable sería disponer de estufas con adecuados requisitos de higiene que permitan un secado rápido y seguro.

El principio activo  $\beta$ -D-glucano es termoestable por lo que soporta altas temperaturas de secado. Sin embargo, debe preverse que se puede propiciar la pérdida de otros metabolitos de diferente naturaleza, presentes en los cuerpos fructíferos. Éstos poseen también beneficios para la salud, por lo que es preciso que se estudien las condiciones óptimas de secado que permitan obtener un producto con calidad.

El proceso de secado de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. aún no ha sido optimizado, ya que hasta ahora la mayoría de los producidos por el CEBI sólo se han utilizado como alimento humano, para lo cual el tratamiento mayormente utilizado es la conservación en salmuera.

➤ Empaque

Los materiales empleados como envase primario (bolsas de polietileno u otros) deben estar limpios. También deberían usarse envases secundarios que permitan un mayor aislamiento del ambiente y una mejor conservación de las propiedades organolépticas de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* desecados.

➤ Almacenamiento

Puede suceder que sea necesario almacenar por un período determinado de tiempo los cuerpos fructíferos una vez cosechados y posteriormente realizar el proceso de secado. Sin embargo, la forma más segura para evitar contaminaciones, u otro problema relacionado con un inadecuado almacenamiento, es que éstos sean secados inmediatamente después de la cosecha, almacenados y transportados a la industria, donde será elaborado el suplemento dietético, con brevedad. Aún así, en ambos casos, se debe evitar almacenar el producto en un ambiente caluroso y de higiene cuestionable.

➤ Traslado

Durante el traslado de los cuerpos fructíferos desecados (materia prima principal) hacia la industria debe tenerse sumo cuidado de mantener la integridad de los envases, para evitar con ello la pérdida de producto, así como la contaminación del mismo.

En cada una de las etapas, debe registrarse la evidencia de cada control realizado. En caso de que se presente alguna No conformidad, esto permitirá ejecutar las acciones correctivas necesarias. Así pueden detectarse las incidencias que afectan la producción de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. y de tal manera garantizar la calidad requerida de la materia prima, lo cual es el principal propósito del proveedor.

### 3.3.3.2- Control microbiológico de la materia prima.

Como se ha observado en el epígrafe anterior, los mayores peligros que pueden afectar la calidad de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. están relacionados con la contaminación. Según Rajarathnam y Bano (1991), Rodríguez (1993), Gaitán *et al.* (2002) y Gea (2001), el cultivo de *Pleurotus* spp., es generalmente afectado por:

- hongos parásitos y hongos competidores (*Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp, *Neurospora* spp., *Coprinus* spp.), levaduras, entre otros.
- bacterias (*Pseudomonas tolaasi*)
- virus
- plagas de insectos (dípteros de las familias *Phoridae* del género *Megaselia* y *Sciaridae* del género *Lycoriella*), colémbolos
- ácaros

La USP 30 (2007) plantea que estos productos pueden ser contaminados microbiológicamente en cualquier momento durante su cultivo, cosecha, procesamiento, empaqueo o distribución. Ello puede tener su origen, entre otras causas, en la irrigación con agua contaminada o la poca higiene del personal que los manipula. Para el caso de la contaminación microbiana, las Buenas Prácticas de Producción establecen las especificaciones microbiológicas adecuadas para la producción de suplementos dietéticos no estériles. De la misma manera, tanto la USP 30 así como la BP del 2007 describen cómo realizar el control del proceso microbiológico y de la carga microbiana de los materiales crudos destinados a la producción del suplemento dietético.

Según Beltrán (2008), varios investigadores concuerdan en que una de las ventajas de la fermentación sumergida radica precisamente en que es más difícil la contaminación al usar este método. Los resultados que se exponen en la Tabla 23 sobre el análisis microbiológico realizado a los medios de cultivo y a los extractos hidrosolubles corroboran este criterio. En los extractos estudiados el conteo de colonias bacterianas resultó de aproximadamente  $2,5 \times 10^3$  UFC/g muy inferior al de  $5,5 \times 10^3$  UFC/g, establecido como valor límite por la BP (2007).

Como refleja la tabla, en los cultivos de los extractos I y II no se produjo contaminación por hongos. En cambio, se observó crecimiento bacteriano, no muy diferentes entre ambos extractos en cuanto al conteo global, pero sí en relación a los tipos de microorganismos contaminantes aunque no fueron caracterizados. En el cultivo del Extracto II se observaron cinco tipos de colonias diferentes mientras que en el Extracto I, sólo dos, las cuales también estaban incluidas en el primero.

 Se pueden implementar métodos químico-analíticos para la estandarización de la materia prima como método de control de calidad.

En este caso, no se trata de un producto de origen natural purificado, de estructura química definida, sino de uno cuya composición química es compleja, variable y no completamente conocida. Por tales motivos, el producto debe ser estandarizado, a través del uso de marcadores. Estos se encuentran en correspondencia con los compuestos responsables de la actividad farmacológica más significativa.

### 3.3.3.3- Control químico analítico.

Como se ha explicado anteriormente, la actividad inmunoestimulante de *Pleurotus* spp. se atribuye esencialmente a la presencia de carbohidratos del tipo  $\beta$ -D-glucanos. La evidencia de la presencia de esta clase de compuestos en *Pleurotus* CCEBI 3024 fue analizada a través de la transición conformacional por el complejo rojo congo-extracto crudo, a diferentes concentraciones de NaOH, obteniéndose una curva con un comportamiento similar al de  $\beta$ -glucanos de conformación ordenada (Marcos, 2003).

Sin embargo, para establecer un control de calidad se debe utilizar un método cuantitativo reproducible, sensible y eficaz que permita la determinación del contenido total de polisacáridos en extractos de hongos comestibles. Estos métodos incluyen (He y Seleen, 2004; Camellini *et al.*, 2005):

- Ensayos colorimétricos utilizando diferentes agentes químicos como el ácido sulfúrico con distintos compuestos fenólicos (fenol, resorcinol, antrona, timol, etc).
- Métodos enzimáticos para determinar  $\beta$ -glucanos totales.
- Cromatografía gaseosa o Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los componentes de extractos crudos pueden ser analizados por HPLC. El resultado sería un cromatograma único al cual se le conoce como “huella digital” (en inglés, *fingerprint*). En él se pueden identificar los diferentes picos correspondientes a los distintos compuestos. De tal manera, que si en el cromatograma aparece un cambio puede conocerse a cuál componente se refiere. La HPLC, acoplada a espectroscopía de masas, es aún más útil en el desarrollo de esta técnica.
- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear Protónica ( $^3\text{H-NMR}$ ), que también proporciona una “huella digital” de los extractos crudos.

La principal desventaja de estos dos últimos métodos es que requieren equipos especializados de alto costo. Por eso para ciertos laboratorios resulta más factible desarrollar los dos primeros.

Para la estandarización de la muestra compleja de carbohidratos presentes en la decocción de *Pleurotus* cepa CCEBI 3024 se propone la utilización del método colorimétrico basado en la reacción del ácido sulfúrico y la antrona. Este método, además del dato cuantitativo, ofrece una información cualitativa de la naturaleza de los polisacáridos presentes mayoritariamente en una mezcla heterogénea.

A continuación se presentan los resultados cualitativos y cuantitativos de la determinación de carbohidratos (Figuras 7 y 8 y Tabla 24).

Según los resultados mostrados, la mayoría de los polisacáridos presentes en los extractos son del tipo aldohexosas, ya que el tiempo de desarrollo del color verde característico de la reacción, una vez calentada la mezcla, estuvo comprendido entre los 5 y 10 min. Éste es el tiempo de calentamiento necesario para que aparezca la coloración correspondiente a este tipo de compuestos, al cual pertenecen los  $\beta$ -glucanos. Adicionalmente, según Koheler (1952), cuando en la mezcla la mayoría de los polisacáridos son del tipo aldohexosas, el color desarrollado en la reacción es estable durante 12 min. En este caso puede apreciarse también en la Tabla 20 que no hubo una decoloración significativa aún pasados 30 min. de haberse producido la reacción, lo cual es otro elemento que confirma la presencia de esta clase de carbohidratos en cada uno de los extractos analizados.

Como se observa en la Figura 8, a excepción del Extracto I, el contenido de carbohidratos totales solubles estuvo comprendido entre el 30 y el 35 %, similares a los referidos por Marcos (2002) y Beltrán (2008).

Es válido señalar que en el caso de utilizar como proceso biotecnológico la tecnología de fermentación sumergida para la producción del micelio con interés farmacéutico, además de los aspectos que ya han sido discutidos, debe tenerse en cuenta como una cuestión importante el tiempo óptimo de recolección del micelio, con el fin de garantizar una mayor concentración del metabolito de interés: los  $\beta$ -glucanos.

El método colorimétrico tradicionalmente empleado en los laboratorios del CEBI, para la determinación de carbohidratos totales es el de la reacción con fenol-sulfúrico (Dubois, 1956). Sin embargo, la reacción con sulfúrico-antrona, es más específica y sensible, y aporta además un análisis cualitativo adicional acerca de la naturaleza del tipo de polisacárido mayoritario en la muestra (Koehler, 1952).

La reacción con antrona es la que se utiliza actualmente en el Laboratorio donde se realizan las determinaciones químico analíticas del ICIDCA para el procesamiento de muestras varias (Bello, Jefe de Laboratorio de Análisis Químico, ICIDCA. Comunicación personal, 2007). No obstante, a pesar de la mayor especificidad declarada para este método, es recomendable evaluarlos y establecer una comparación entre ambos, en cuanto a la precisión y exactitud de las valoraciones. Sería útil, además, determinar si pueden usarse indistintamente ya que el método de Dubois, aunque emplea más tiempo en el análisis, es de más fácil ejecución y los reactivos pueden ser conservados por un espacio mayor de tiempo sin que se vea afectada la calidad de la determinación.

En futuros trabajos sería interesante valorar la utilización en el análisis químico del suplemento, dada la complejidad de la matriz, de un marcador de contenido y verificación, empleando métodos cromatográficos u otros ensayos.

Por otro lado, también se determinó el contenido de metales en los Extractos I y II (Tabla 25). Se aprecia la presencia de minerales importantes en la nutrición humana, comúnmente encontrados en la formulación de suplementos dietéticos como el Fe, Ca, Mg y Zn, lo cual es un elemento favorable. Adicionalmente, puede observarse que la concentración de Zn, se encuentra dentro de los niveles máximos permisibles para contaminantes metálicos con relación a las conservas de champiñón según lo regulado por la Norma Cubana NC 38-02-06, 1987. En los análisis efectuados la presencia de los metales Cu, Cd y Pb no fueron detectados por el equipo, cuestión que resulta positiva si se utilizara esta materia prima para la elaboración del suplemento dietético. De forma comparativa se presentan, además, los niveles máximos permisibles en alimentos secos (vegetales y levaduras) en correspondencia con la norma referida anteriormente.

En el caso del empleo del proceso biotecnológico mediante FES para la producción de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. como materia prima debe también analizarse previamente el sustrato que será utilizado en el proceso. De esa manera será posible evitar la presencia posterior de metales pesados en el producto, uno de los aspectos más controlados en este campo.

 Existe una norma específica para evaluar la calidad de la materia prima.

El Codex Alimentarius en el *Codex Stan 39-1981* establece la *Norma del Codex para los hongos comestibles desecados* (Anexo 15). La misma, aún vigente, es aplicada a todos los hongos comestibles cualesquiera sea su especie y describe todos los requisitos generales que deben cumplir éstos para ser consideradas como un producto con calidad.

Conjuntamente con esta norma, es posible aplicar una evaluación de calidad específica para *Pleurotus* spp., ya que se conocen sus características organolépticas y bromatológicas fundamentales (Anexo 16).

#### ❖ FACTORES RELATIVOS A LA PRODUCCIÓN DEL SUPLEMENTO DIETÉTICO

En cuanto a la calidad en el proceso de producción del suplemento dietético es la protagonista. El centro productor, en este caso el Laboratorio Farmacéutico Oriente, específicamente la Unidad Básica de Tabletas, está encargado de lograr un suplemento dietético, conforme a los estándares de calidad correspondientes a esta clase de productos. Para ello utiliza la misma tecnología que la empleada para la producción de medicamentos. Por ende, se aplican las Normas de Buenas Prácticas de Producción y Buenas Prácticas de Laboratorio, según lo acostumbrado.

De la misma forma, se aplican los controles químicos, microbiológicos y tecnológicos conforme a lo establecido en los documentos normativos de referencia y a los procedimientos normalizados de trabajo involucrados en el proceso. Se incluyen también entre ellos los manuales de tecnología, la USP 30 (2007) y la BP del 2007.

#### 3.3.4- Factores relativos a su aplicación.

A través de algunos años, bajo la dirección o solicitud de los investigadores del CEBI, se han realizado algunos ensayos preclínicos y toxicológicos a extractos hidrosolubles de *Pleurotus* spp. Estos estudios han contribuido a consolidar la evidencia científica necesaria para su aplicación práctica en la salud humana como agente inmunoterapéutico (Morris *et al.*, 2003, Llauradó, 2008; Beltrán 2008).

 Se han estudiado las propiedades inmunocéuticas de *Pleurotus* spp. cepa CCEBI 3024.

Las propiedades inmunocéuticas de un extracto hidrosoluble de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. (cepa CCEBI 3024) obtenido a bajas temperaturas, fueron evaluadas en un biomodelo experimental de malnutrición proteico-energética (MPE) inducida por restricción dietética. En el grupo de animales que recibieron el extracto como suplemento de la dieta, se observó una estimulación del metabolismo proteico hepático y una recuperación de la integridad y procesos de recambio celular en la mucosa intestinal. Asimismo, se produjo una estimulación del sistema inmunológico, tanto de la respuesta inmune inespecífica, como de la específica. Esto se evidenció en un incremento en el conteo de leucocitos totales en sangre periférica y del número de células de la cavidad peritoneal, en la estimulación del sistema monocito-macrófago y una adecuada respuesta de hipersensibilidad retardada y de anticuerpos frente a antígenos timo-dependientes y timo-independientes (Llauradó, 2008).

El efecto del extracto hidrosoluble de micelio cultivado por fermentación en estado sólido y obtenido a altas temperaturas, fue evaluado en ratones Balb/c con inmunodeficiencia secundaria causada por el antineoplásico ciclofosfamida. Se observó que aquellos biomodelos que recibieron previamente el extracto crudo mostraron una inmunosupresión menos pronunciada y una recuperación más rápida de varios parámetros hematológicos e inmunológicos, los cuales diferían significativamente de los del grupo que no recibió el extracto. Se evidenció un incrementado en la celularidad de la médula ósea, los conteos leucocitarios, el número de colonias macroscópicas endógenas de tejido hematopoyético en la superficie parietal del bazo, el número de células presentes en el exudado peritoneal, el porcentaje de macrófagos fagocitantes y el índice fagocítico. Por otra parte, no se encontraron signos de toxicidad en los ratones tratados con el extracto, sugiriendo que el mismo es capaz de potenciar los mecanismos de defensa del huésped *in vivo*, sin manifestar reacciones tóxicas.

Del extracto hidrosoluble de micelio se derivaron, por precipitación etanólica, 4 fracciones adicionales y se evaluó *in vitro* su influencia en la actividad de macrófagos peritoneales murinos. Se observó un incremento del consumo de glucosa en los macrófagos y de la actividad de la enzima fosfatasa ácida lisosomal, en comparación con el control sin polisacárido. También se estableció una relación dosis-dependiente para el extracto crudo, el cual mostró un mayor efecto en este último parámetro, dato que puede ser la evidencia de que se encuentre involucrado uno o varios de los receptores para  $\beta$ -glucanos (Morris *et al.*, 2007).

Adicionalmente, los mismos autores probaron el efecto inmunoestimulante de un extracto crudo semejante, pero obtenido por cultivo sumergido, en ratones Balb/c con inmunodeficiencia secundaria provocada por exposición a radiaciones ionizantes. Se observó que el extracto proporcionó una mejor base para la regeneración de la hemopoyesis, la cual fue afectada severamente en los ratones irradiados a los que no se administró el extracto hidrosoluble crudo de *Pleurotus*.

Una dosis única de este extracto (100 mg/kg), administrado por vía endovenosa a ratones Balb/c, fue capaz de estimular la hemopoyesis medular y la actividad del sistema fagocítico mononuclear, además de provocar como evidencia de una actividad inmunoestimulante, un aumento en los pesos relativos de los órganos relacionados con el sistema fagocítico mononuclear (hígado, bazo y pulmones) y el timo (Alcántara, 2004). También se observó que este extracto, además de estimular la función de macrófagos peritoneales murinos, es capaz de activar la vía alternativa del sistema de complemento (Ferrera, 2005).

### Se han desarrollado ensayos preclínicos que avalan la seguridad del producto.

En los ensayos preclínicos realizados, no se han detectado signos de hepatoesplenomegalia, ni otros signos de toxicidad que puedan asociarse con la administración de los extractos acuosos de *Pleurotus*.

Los resultados de Alcántara (2004), de igual forma, no mostraron signos de toxicidad al estudiar los efectos de la administración a dosis única (100 mg/kg), por vía endovenosa, en ratones Balb/c, de un extracto acuoso del micelio de *Pleurotus* spp. obtenido por cultivo sumergido. Según las observaciones clínicas realizadas, no se observaron evidencias de procesos patológicos, o cambios en la conducta, ni se produjo muerte, así como tampoco diferencias significativas entre los pesos corporales de los grupos tratados y los del grupo control.

Gran importancia es conferida a la investigación de la Toxicología de tales productos. En Canadá por ejemplo, el gobierno asignó en el 2008, 33 millones de dólares del Presupuesto Federal al Consejo de Administración de Productos Naturales para la Salud (NHPD) con el propósito de obtener la evidencia científica necesaria para asegurar la eficacia y la seguridad de los mismos y el cumplimiento con las regulaciones (<http://www.hsias.org/updates/IADSA/March2008update>). En contraste, en América Latina a pesar de los numerosos grupos prestigiosos de investigación en química y farmacología de productos naturales, muchos de los fitoterapéuticos comercializados son de baja calidad y adolecen de información toxicológica una vez que ha sido probada su efectividad terapéutica (Sharapin, 2000).

Por tanto, el hecho de que *Pleurotus* cuente con estos estudios es un gran avance en el campo de los suplementos dietéticos.

 Existe un mercado terapéutico para los suplementos dietéticos inmunocéuticos.

Según lo publicado anualmente por la Oficina Nacional de Estadísticas entre el 2001 y el 2007, los tumores malignos constituyeron en Cuba la segunda causa de muerte en individuos de todas las edades (Figura 10). Como puede observarse, al transcurrir los años, el número de fallecimientos por cáncer se ha incrementado, tendiendo a igualarse en el 2007 al porcentaje de enfermedades del corazón (Figura 11). La tendencia es tal que según algunas estadísticas extraoficiales, en el 2008 las muertes por cáncer llegaron a alcanzar el primer lugar, constituyendo hoy día el principal problema de salud en Cuba (Struch, 2008). Sin embargo, aunque en las últimas décadas, la Oncología ha adquirido una visión sistémica de la enfermedad, convirtiéndose en ejemplo de manejo multidisciplinario para el abordaje terapéutico del cáncer, aún en Cuba el uso de inmunoterapéuticos que ayuden a contrarrestar los efectos sobre el sistema inmune provocado por el tratamiento antineoplásico no está bien establecido. Esto puede observarse en el último Formulario Nacional de Medicamentos (2006), donde los productos utilizados como paliativos de esta enfermedad, además de pocos, son dirigidos fundamentalmente al alivio de otros síntomas como náuseas y mareos.

Algunos productos naturales como el INMUNOSAN, con propiedades inmunopotenciadoras, han sido desarrollados, y comercializados en el país. Existen instituciones como la *Empresa de Producción y Comercialización de Microalgas y sus Derivados* (GENIX) que comercializan productos elaborados con *Spirulina*. Mas la cantidad de éstos en el país no es capaz de cubrir la demanda, la cual es mucho mayor de lo que se conoce. Ello es agravado por la existencia junto al registro oficial, de un sub-registro, quizás mayor, correspondiente a los individuos con inmunodeficiencias secundarias declaradas o no, que pueden o no ser tratados por esa causa, ya que muchas veces éstas se encuentran enmascaradas por otro tipo de enfermedad.

La Inmunoterapia, además, se perfila en el país como el cuarto pilar en el tratamiento de las neoplasias malignas, luego de las formas ya establecidas: cirugía, radioterapia y quimioterapia (Batista, 2003). Por tal motivo, el descubrimiento y desarrollo de productos que ayuden a la cura, tratamiento, prevención o alivio de este tipo de enfermedades se erige hoy como uno de los principales retos para los centros científicos del país. Dentro de este contexto, es válido destacar que más de 50 especies diferentes de hongos superiores han mostrado su potencial como inmunocéuticos y que las especies de *Pleurotus* poseen numerosas propiedades medicinales demostradas (Gregory, 2007). Por tanto, los resultados de las investigaciones realizadas con *Pleurotus* cepa CCEBI 3024 aportan datos prometedores en esta temática.

### 3.3.5- Factores relativos a aspectos económicos.

 La producción de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. es económicamente viable.

Las grandes compañías biofarmacéuticas se enfrascan en la búsqueda a gran escala de compuestos naturales (generalmente para nuevos candidatos a fármacos) y en la investigación de remedios tradicionales encontrados en otras culturas para combatir las deficiencias del tratamiento moderno del cáncer. El desarrollo de inmunocéuticos es una de las vías, donde entre varios candidatos se destacan según (Bush y Watkin, 2007), dos clases de polisacáridos:

- 1- oligosacáridos relacionados con la oligosacarina, utilizados en la prevención del cáncer de piel inducido por exposición al sol.
- 2-  $\beta$ -glucanos como modificadores de la respuesta biológica usados en el tratamiento adyuvante del cáncer.

Según este mismo autor, son los  $\beta$ -glucanos los que despiertan un mayor interés. Nuestro país, a través de procesos biotecnológicos, cuenta con la posibilidad de producir una materia prima que contenga este tipo de productos, consistente en biomasa de *Pleurotus* spp. La producción de suplementos dietéticos a partir de la misma, hecho sin precedentes en el ámbito nacional, por lo demás, no es costosa; por tanto, es una oportunidad que debe ser aprovechada.

Para obtener los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. por vía biotecnológica, no se requiere una gran inversión económica. Como ya se ha presentado, los mayores rendimientos se obtienen empleando la pulpa de café, que por otra parte es un sustrato de gran disponibilidad en el territorio. Datos con mayor detalle económico han sido expuestos por García (2008), quien al respecto, describe todos los aspectos que evidencian que la actividad es un proceso rentable.

El hecho de que exista un mercado no cubierto de esta clase de productos en el país también es un factor que favorece la comercialización de *Pleurotus* spp. como suplemento dietético.

 El interés gubernamental por el desarrollo de los productos naturales se ha incrementado en el país.

Otro factor de gran importancia es la existencia en el país de varios programas como el *Programa Nacional para el Desarrollo y Generalización de la Medicina Tradicional y Natural*, y el *Programa Nacional de Ciencia e Innovación Tecnológica para el Desarrollo de Productos Biotecnológicos, Farmacéuticos y de Medicina Verde*, de plena vigencia en la actualidad. El desarrollo del suplemento dietético elaborado a partir de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. puede también estar amparado en ambos proyectos dada su variada naturaleza de producto natural, biotecnológico, aplicado a la salud, perteneciente a la medicina natural y tradicional.

A la par, existe la intención de la industria farmacéutica cubana (QUIMEFA), de impulsar el desarrollo de esta clase de productos, entre otras acciones, con la construcción de una Planta de Productos Naturales, la cual estará ubicada en el territorio perteneciente al LFO en Santiago de Cuba. Este propósito es parte del proyecto de inversiones de dicha institución y su objetivo principal es elevar la calidad de vida de la población cubana (Carvallo, Director de Quimefa, comunicación personal, 2007).

### **3.4- Aspectos relativos al aseguramiento de la calidad.**

La Norma Internacional ISO 9001: 2000 promueve la adopción de un enfoque basado en procesos para desarrollar, implementar y mejorar la eficacia de un sistema de gestión de la calidad, en aras de aumentar la satisfacción del cliente mediante el cumplimiento de sus exigencias. Según esta norma, la adopción de un sistema de gestión de calidad por la organización debe ser la primera decisión estratégica a tomar. Para ello se aplica la metodología conocida como "Planificar-Hacer-Verificar-Actuar": planificar las actividades necesarias para alcanzar la calidad del producto, hacerlas según lo planificado, controlar si se hacen del modo en que se debe y tomar acciones correctivas si se presenta algún problema que pueda afectar la calidad de ese producto. Todos los requisitos de esta Norma Internacional son genéricos y se pretende que sean aplicables a todas las organizaciones sin importar su tipo, tamaño y producto suministrado. Los mismos además, son complementarios a los requisitos específicos para los productos.

En la Industria Farmacéutica cubana todo el proceso de producción de medicamentos está bien definido y regulado. Por ello, la producción del suplemento dietético a este nivel, tiene también la garantía de la aplicación de las mismas Normas de Buenas Prácticas de Producción y de Control de Calidad que se aplican para la producción de formulaciones farmacéuticas. Por esa razón, este epígrafe está centrado básicamente en un objetivo de trascendental importancia, asegurar la calidad de la materia prima, puesto que es en esta etapa donde incide significativamente el proveedor en la calidad del suplemento dietético como producto final.

Adaptando entonces la terminología de la familia ISO 9000, se puede decir que en el caso abordado en este trabajo, el término “organización” se refiere al CEBI, principal encargado de la calidad del “producto”, el cual está representado por los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. (materia prima). Es necesario luego que el “proceso”, referido al mismo como el conjunto de actividades relacionadas entre sí que propician la obtención del producto con la calidad requerida, cumpla con todas las condiciones que plantea esta norma para el aseguramiento de la calidad. En este caso, al utilizar la palabra “proceso”, es necesario esclarecer que el término va más allá del método fermentativo empleado.

Para cumplir con los *Requisitos Generales* de la ISO 9001, el CEBI necesita establecer, documentar, implementar y mantener un sistema de gestión de la calidad y mejorar continuamente su eficacia. Para ello primeramente debe:

- a) identificar los procesos necesarios para el sistema de gestión de la calidad y su aplicación
- b) determinar la secuencia e interacción de estos procesos
- c) determinar los criterios y métodos necesarios para asegurarse de que tanto la operación como el control de estos procesos sean eficaces
- d) asegurarse de la disponibilidad de recursos e información necesarios para apoyar la operación y el seguimiento de estos procesos
- e) realizar el seguimiento, la medición y el análisis de estos procesos
- f) implementar las acciones necesarias para alcanzar los resultados planificados y la mejora continua de estos procesos.

#### **3.4.1- Requisitos necesarios para asegurar la calidad de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. como materia prima principal de suplementos dietéticos.**

Para asegurar que los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. sean producidos con calidad deben cumplirse ciertos requisitos en relación a:

- o *El personal*  
Los técnicos y operadores involucrados en el proceso deben estar debidamente capacitados y debe existir constancia de su idoneidad para ejecutar las actividades. De la misma forma debe asegurarse que éste esté consciente de la pertinencia e importancia de sus actividades y de cómo contribuyen al logro de los objetivos de la calidad.
- o *La instalación*  
Deben existir las áreas necesarias para la producción de los cuerpos fructíferos, ya sea dentro de la instalación o fuera de ella, pero siempre supervisadas por el CEBI, como proveedor y principal responsable de la calidad del producto.

- *Los equipos*  
El equipamiento involucrado en el proceso debe ser calibrado y verificado de manera que se asegure un adecuado funcionamiento. En este caso, se trata de los equipos necesarios para controlar que los parámetros declarados se mantengan en el rango descrito, el equipo de esterilización (donde son esterilizados los sustratos empleados) y el equipo de secado, involucrado en la última etapa, en el tratamiento de la materia prima principal.
- *Los recursos*  
El CEBI debe garantizar que los recursos humanos y materiales estén disponibles antes de comenzar cada etapa del proceso donde son requeridos: el sustrato para los inóculos, el sustrato para la fructificación, las bolsas de nylon PVC, como mínimo, entre otros, así como el personal técnico que intervendrá en cada etapa del proceso.
- *La documentación*  
Entre los documentos básicos para el aseguramiento de la calidad se incluyen: Procedimientos Normalizados de Trabajo, Instrucciones y Registros que permitan proporcionar la evidencia de que el proceso completo hasta la obtención del producto cumplen los requisitos de calidad.

Por otra parte, la existencia de las Normas de BPA, las normas de BPP aceptadas e implementadas en el país, así como la Norma específica para los hongos comestibles desecados, publicada por el Codex Alimentarius, son aspectos que contribuyen a elevar la calidad en la producción de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp.

Al respecto, el CEBI cuenta con un personal especializado y entrenado en el proceso biotecnológico de producción de hongos comestibles por FES y tiene establecidas las especificaciones de calidad del producto. Otro elemento de importancia es la existencia en el CEBI de suficiente material bibliográfico relacionado con el cultivo de los hongos comestibles del género *Pleurotus*, incluyendo el *Manual de Instrucción de la Tecnología de Producción de hongos comestibles sobre pulpa de café*, documento enriquecido además con los resultados experimentados en el CEBI. Estos documentos han favorecido la elaboración de algunos Procedimientos Normalizados de Trabajo básicos para la producción de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. (Tabla 26), los cuales fueron elaborados recientemente (Julio del 2007).

No obstante, aún no están establecidas las interacciones entre los procesos ni elaborada toda la documentación necesaria para la implantación de un Sistema de Aseguramiento de la Calidad del proceso de producción de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp., materia prima. Esta actividad requiere de dedicación pero es imprescindible para lograr la calidad que se exige para tales productos, ya que su destino final es ser consumidos para mejorar la salud humana y con ello, la calidad de vida de los individuos.

Sin embargo, se pueden utilizar los resultados del análisis basado en el sistema HACCP, los cuales arrojaron algunos aspectos en los que se deben enfocar las actividades de Aseguramiento de la Calidad, como elemento prioritario. Estos están relacionados con la contaminación del cultivo y el mantenimiento de las características organolépticas. De manera que a continuación se exponen algunas de las acciones que deben tomarse en cuenta y formar parte indisoluble de cualquier sistema de aseguramiento de la calidad para esta clase de producto.

❖ Para evitar la contaminación con agentes patógenos.

Resulta imprescindible evitar en toda medida la contaminación del cultivo, puesto que su persistencia puede afectar considerablemente el rendimiento. En ello, la higiene, es un requisito que cobra extrema importancia, el cual es reconocido como el método más eficaz de control de las enfermedades y plagas dentro del cultivo de los hongos comestibles. Las medidas que mejor pueden ayudar a reducir la contaminación según Gea (2001) son:

- ✓ La limpieza y la desinfección de las áreas vacías.
- ✓ Uso de agua limpia para la adecuación anaerobia del sustrato y para los riegos, ya que cuando se usa agua contaminada con productos químicos se inhibe el crecimiento micelial y cuando está contaminada con materia orgánica se fomenta la proliferación de microorganismos contaminantes.
- ✓ Una apropiada disposición de los sustratos residuales y de todas las posibles fuentes de contaminación.
- ✓ Uso de materias primas frescas o, en su defecto, materiales secos almacenados apropiadamente. Con subproductos envejecidos y una humedad alrededor del 12%, es mayor el riesgo de asentamiento de microorganismos competidores que interfieren durante la etapa de incubación.
- ✓ Uso de un inóculo fresco, con un máximo de 15 días de generado y proveniente de un cultivo puro o aislado de un cuerpo reproductor sano y de excelente calidad.
- ✓ El buen manejo del cultivo por parte del personal encargado, el cual debe practicar las normas de higiene recomendadas.
- ✓ Los utensilios utilizados durante la recolección de los cuerpos fructíferos deben ser desinfectados previamente.

Cuando la higiene no es mantenida, los patógenos pueden colonizar todo el sustrato, volviéndolo inutilizable para el crecimiento de los cuerpos fructíferos. En estos casos conviene desechar y destruir inmediatamente todo el sustrato, ya que las esporas de los hongos patógenos pueden dispersarse y permanecer en el ambiente, presentándose más probabilidades de futuras contaminaciones (Mendoza, 2004; Velasco, 2004).

❖ Para mantener las características organolépticas luego de la cosecha.

Se debe tener en cuenta que *Pleurotus* spp. durante el almacenamiento puede presentar oscurecimiento. Esto puede estar ocasionado principalmente por varios factores: el pardeamiento no enzimático, asociada a la reacción entre azúcares reductores, como la glucosa, y aminoácidos, como la lisina; la degradación oxidativa del ácido ascórbico; así como la conversión de polifenoles en policarbonilos (Cortés, 2007).

Una vez cosechados los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. y antes de ser empacadas, no deben ser lavadas, pues el agua residual puede provocar un rápido deterioro de las mismas. Inmediatamente después de cortadas pueden empacarse y refrigerarse entre 1 y 4 °C para su conservación. No obstante, como serán utilizadas luego por el fabricante para la producción del suplemento dietético, según lo recomendado por Sánchez y Royse (2001) es preferible proceder al secado.

Estas actividades en su conjunto son concebidas por la recién publicada *Norma para la Producción de Suplementos Dietéticos*, como parte de la actividad que debe realizar todo proveedor de la materia prima. Se debe cumplir con ellas y asegurar su calidad como aspecto relevante para la obtención de un producto seguro, eficaz y que satisfaga las expectativas del cliente.

Tomando todos estos elementos en consideración, podría resumirse que existe un saldo positivo con relación a los factores existentes a favor del desarrollo de suplementos dietéticos inmunocéuticos derivados de *Pleurotus* spp., específicamente de los cuerpos fructíferos obtenidos por vía biotecnológica mediante FES.

Teniendo como base la idea planteada por Bello (2006):

- se han investigado e identificado en *Pleurotus* spp. los compuestos alimenticios capaces de aportar los beneficios saludables al individuo que los consuma.
- Aunque no bien dilucidados, se relacionan los posibles mecanismos implicados en los efectos farmacológicos demostrados.
- Se puede diseñar uno o varios productos a través de tecnologías que permitan dar una forma comercial a la formulación escogida.

Como se planteó, aunque la industria farmacéutica tiene bien formulados los estándares de calidad y las estrategias a implementar según los documentos normativos de referencia, el proveedor de la materia prima necesita un diseño que permita asegurar la calidad de su producto. Ante esta situación, al CEBI pertenece la responsabilidad de garantizar una materia prima que cumpla con los requisitos de calidad establecidos para los hongos comestibles desecados, en general y para los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp., en particular.

Entonces, tomando en consideración lo expuesto durante este capítulo, resulta válido resumir que el Sistema de Aseguramiento de la Calidad para la producción de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp., como materia prima principal escogida para la producción de los suplementos dietéticos, debe estar conformado por tres etapas esenciales:

1. Las acciones previas al proceso biotecnológico.
2. Las acciones a ejecutar durante el proceso biotecnológico.
3. Las acciones a ejecutar una vez cosechados los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp.

En cada una de las etapas, según un análisis particularizado de los subprocesos que tienen lugar se han identificado las actividades relativas que influyen en la calidad de los cuerpos fructíferos, materia prima del suplemento dietético inmunocéutico.

Así se tienen:

1. Las acciones previas al proceso biotecnológico.

El productor debe garantizar que todas las condiciones previas al proceso biotecnológico por FES estén disponibles:

- los materiales, reactivos, medios y otros insumos
- el personal técnico debe estar capacitado
- garantizar una adecuada higiene
- los equipos para la medición de los parámetros que determinan la calidad del producto deben estar verificados y calibrados
- velar por el cumplimiento de las BPL, las BPP y las BPA.

2. Las acciones a ejecutar durante el proceso biotecnológico.

Además de mantener las anteriores:

- Seguimiento de los Procedimientos Normalizados de Trabajo.
- Control estricto de los parámetros que influyen en las características finales del producto y en el cumplimiento o no de las especificaciones de la calidad.
- Registro de las actividades.
- Detección y solución de las No conformidades.

3. Las acciones a ejecutar una vez cosechados los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp.

- Control del manejo poscosecha.
- Cuidado en el almacenamiento y transportación hacia las instalaciones del fabricante.

Cumpliendo con estos principios generales y con los requisitos específicos para cada actividad según lo declarado en los Procedimientos Normalizados de Trabajo y en los manuales del proceso, es posible asegurar que la materia prima sea producida en óptimas condiciones y con la mayor calidad que requiere un producto semejante.

### 3.5- Trinomio Ciencia-Salud-Economía

El Dr. Agustín Lage, Director del Centro de Inmunología Molecular, en varias de las conferencias impartidas y en entrevistas concedidas a los medios nacionales de comunicación masiva, ha hecho hincapié en la importancia que tiene en nuestros días la relación establecida entre la generación y desarrollo de productos a través de tecnologías optimizadas, que sean viables económicamente y su aplicación concreta en el tratamiento de los problemas de salud de la población. En su concepción se va más allá, puesto que se habla también en términos de exportación, con la intención de que los mismos sean una fuente de ingreso considerable para el país. Si bien es cierto que el centro de atención lo constituyen los productos biotecnológicos obtenidos por ingeniería genética, esto no quiere decir que queden excluidos otros productos, como por ejemplo, los obtenidos por las tecnologías de primera generación.

El hecho de obtener productos que puedan ser aplicados para el alivio o prevención de determinados problemas de salud, con una base científica sólida, que éstos sean producidos con altos estándares de calidad, y que además no se necesite la implementación de una tecnología que requiera gran inversión de recursos materiales y humanos, es ya de hecho una opción económicamente viable. El consumo de tales productos es gestionado por muchos países desarrollados como un método para disminuir significativamente los gastos de salud. Las instituciones en Cuba, donde existe un Sistema Nacional de Salud en el que la Prevención ocupa un lugar privilegiado, deben promover el desarrollo de los mismos, y atraer sobre sí la mirada atenta de cuantos se encuentren involucrados en el proceso, sobre todo cuando existen las condiciones necesarias para su implementación.

### 3.6- La Biotecnología “blanca” al servicio de la salud y otros sectores.

Según García (1999) el empleo de la vía biotecnológica para obtener productos y subproductos de alto valor agregado a partir de desechos agrícolas e industriales es una rama muy explotada, aunque no tanto en Cuba como en otros países de todo el orbe. La producción de hongos tropicales además de permitir obtener un producto nutracéutico, también es una alternativa económica social y ambiental para el manejo y aprovechamiento de los residuos industriales (Puerta y Rodríguez, 2001) y la

generación de empleo. El proceso de la fermentación en estado sólido permite transformar compuestos que constituyen la mayor fuente de contaminación ambiental de la zona cafetalera (polifenoles, taninos, cafeína y ácido clorogénico). Generalmente, los cuerpos fructíferos son cosechados en condiciones rurales donde los subproductos agrícolas, por su cantidad y difícil manejo, se convierten en un peligro de contaminación. Su cultivo no sólo esté ligado al impulso de programas de seguridad alimentaria o a la diversificación del ingreso al productor, sino también a la protección de los recursos naturales (Rodríguez y Jaramillo, 2005).

En Cuba, la producción de hongos comestibles constituye una alternativa viable para la adquisición de productos saludables, a la vez que se puede generar como subproducto un forraje beneficiado (pleurotina), útil para la alimentación ganadera y para el empleo como biofertilizante, según lo planteado por García (1999).

Los recortes del pie de los hongos generados en la postcosecha representan un 12% del peso de los hongos. Estos presentan un contenido de proteínas del 20.6% y son un alimento de calidad para suministrarlo a pollos de engorde o a estanques piscícolas en forma de polvo seco.

Descontaminando del ambiente una tonelada de sustrato fresco que involucre pulpa de café en un 50% o más, se pueden obtener como promedio 100 kg de hongos frescos por ciclo de cultivo cuya duración es de 3 meses (Rodríguez y Jaramillo, 2005).

Todo lo anterior sólo muestra una parte de cuánto es posible y sobre cuántas áreas se puede accionar al producir los hongos comestibles *Pleurotus* spp. por FES utilizando desechos agrícolas lignocelulósicos.

### **3.7- La producción de suplementos dietéticos desde una panorámica nacional.**

Como se mostró en el capítulo 1, en el campo de los suplementos dietéticos a nivel internacional se presentan diferentes problemas, entre los que se encuentran: la adulteración del producto terminado, la falsa declaración de sus propiedades medicinales, así como la no observancia de las normas y requisitos de calidad necesarios para la elaboración de los mismos. Adicionalmente, es significativo el hecho de que, en general, el desarrollo de éstos no está movido solamente por una situación de salud determinada sino que depende directamente del interés y la decisión de las numerosas compañías farmacéuticas y alimentarias, que invierten sumas cuantiosas en campañas publicitarias para introducirlos en el mercado y compiten por obtener incrementos mayores en sus ganancias.

En Cuba, no hay espacio para esta lucha encarnizada por un lugar en el mercado a costa de la seguridad del cliente. Tampoco se producen intencionalmente la mayoría de los otros problemas mencionados. En primer lugar, esta situación está favorecida por la no existencia de compañías farmacéuticas y alimentarias privadas sino de un Ministerio de Salud Pública, una Industria Químico Farmacéutica, un Ministerio de Agricultura, entre otros, cuyo principal interés es resolver un problema social y velar por el bienestar de la población; en segundo lugar, por la presencia de entidades regulatorias que velan porque el cliente consuma un producto seguro y eficaz.

Con los resultados mostrados hasta ahora y en sintonía con lo expresado por Kidd (2008), es tiempo de que la comunidad científica se integre y desarrolle en el país los productos derivados de hongos superiores. Debido a que los mismos son altamente estimados internacionalmente y que en el país existen las evidencias y los medios necesarios para su utilización como productos saludables, resulta inminente su aplicación para elevar la calidad de vida de la población.

## CONCLUSIONES

-  Las tendencias actuales en el ámbito regulatorio relacionado con el desarrollo de suplementos dietéticos evidencia una franca evolución. En Cuba, la propuesta de un nuevo suplemento dietético es presentada ante el Instituto Nacional de Higiene de los Alimentos por el Laboratorio productor, siendo el proveedor de la materia prima principal un participante activo en el proceso de registro.
-  El análisis de los factores relativos a la obtención de la materia prima principal y los relacionados con la producción del inmunocéutico, tomando en cuenta los aspectos tecnológicos, económicos, de aseguramiento de la calidad, y los referidos a la aplicación del producto, demostró la potencialidad de desarrollar un suplemento dietético a partir de *Pleurotus* spp. en nuestro país.
-  El Perfil Fármaco-toxicológico de *Pleurotus* spp. evidenció su amplio espectro de acciones farmacológicas, entre las que se destaca la capacidad de estimular el sistema inmune, y la seguridad de su utilización, formulado como suplemento dietético.
-  Las especificaciones y los métodos de estandarización relativos a la producción de setas *Pleurotus* spp. se encuentran bien definidos, por lo que es posible establecer un control de calidad en la obtención de la materia prima principal del suplemento dietético inmunocéutico.
-  Se definieron los elementos que integran el Diseño de un Sistema de Gestión de Calidad para la producción de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. materia prima, el cual una vez implementado y perfeccionado podrá cumplir con los aspectos regulatorios vigentes en el ámbito nacional e internacional.

## RECOMENDACIONES

- ✓ Ampliar los estudios toxicológicos preclínicos realizados, incluyendo estudios de toxicidad subcrónicos y crónicos con el propósito de conocer los efectos que produciría la ingestión prolongada de las setas *Pleurotus* spp. o los suplementos dietéticos derivados.
- ✓ Valorar la posible utilización en el análisis químico del suplemento, dada la complejidad de la matriz, de un marcador de contenido para la estandarización del producto final empleando procedimientos cromatográficos u otros ensayos como método de control de calidad.
- ✓ Continuar implementando el Sistema de Gestión de la Calidad para el Aseguramiento de la Calidad en la producción de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp., materia prima, como paso fundamental en el logro de la calidad del suplemento dietético.
- ✓ Realizar el registro del suplemento dietético ante el INHA, a partir de la relación fabricante/proveedor.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichman AH, Pober JS. Inmunidad frente a los microorganismos. En: Inmunología celular y molecular. 4ta ed. España: McGrawHill. 2000. 355-75.
- Aalto-Korte K, Susitaival P, Kaminska R, Makinen-Kiljunen S. Occupational protein contact dermatitis from shiitake mushroom and demonstration of shiitake-specific immunoglobulin E. Contact Dermatitis. 2005. 53(4): 211-213.
- Adachi Y, Ishii T, Ikeda Y, Hoshino A, Tamura H, Aketagawa J, *et al.* Characterization of  $\beta$ -glucan recognition site on C-type lectin, Dectin-1. Infection and Immunity. 2004. july: 4159-4171.
- Adachi Y y Ohno N. Contribution of Dectin-1 to the Recognition of fungal cell wall products and the activation of Innate Immune Response. Jpn. J. Med. Mycol. 2006. 47(3): 185-194.
- Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC). Potential Benefits of Funtional Foods and Nutraceuticals to the Agri-Food Industry in Canada. Final Report on Behalf of Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC). Scott Wolfe Management. March, 2002.
- Akira S y Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nature Rev. Immunol. 2004. 4: 499-511.
- Akramienė D, Kondrotas A, Didžiapetrienė J, Kėvelaitis E. Effects of b-glucans on the immune system. Medicina (Kaunas) 2007.43(8):597-606.
- Albertó E, Pire D, Lechner B y Álvarez C. Producción de *Pleurotus ostreatus* empleando 13 desechos lignocelulósicos disponibles en la Argentina. XXIX Jornadas Argentinas de Botánica y XV Reunión Anual de la Sociedad Botánica de Chile. Bol. Soc. Argent. Bot. 38 (Supl). 2003: 256.
- Alcántara M. Efectos de la administración endovenosa a dosis única de un extracto de *Pleurotus spp.* sobre la hemopoyesis y el sistema fagocítico mononuclear de ratones balb/c. Forum Nacional de Ciencias Naturales. 2004.
- Andreotti R, Tomasicchio M. Il *Pleurotus ostreatus*, nuovo fungo di coltivazione: caratteristiche e idoneità alla preparazione di conserve. Industria Conserve. 1975. 1: 29-32.
- Arai S. Studies on functional foods in Japan. State of the art. Biosci. Biotech. Biochem. 1996. 60: 9-15.
- Arai S, Morinaga Y, Yoshikawa T, Ichiishi E, Kiso Y, Yamazaki M, *et al.* Recent Trends in Functional Food Science and the Industry in Japan. Review. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2002. 66(10), 2017-2029.
- Arnoldi A. Functional Foods, Cardiovascular Disease and Diabetes, Ed. Arnoldi, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK. 2004: 488p.

- Ashwell M. Conceptos sobre los alimentos funcionales. ILSI Europe Concise Monograph Series. 2002.
- Batista A. Función del sistema inmune en la defensa contra tumores malignos MEDISAN 2003. 7(2). En: [http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol7\\_2\\_03/san11203.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol7_2_03/san11203.htm) [consulta: 7 febrero 2007].
- Bello J. Los alimentos funcionales o nutraceuticos. Nueva gama de productos en la industria alimentaria. Alimentaria. 1995. 265: 25-29.
- Bello J. La ciencia de los alimentos saludables: una panorámica actual. Ars Pharm. 2006. 47(2): 137-171.
- Beltrán Y. Algunos efectos inmunomoduladores de un extracto micelial de *Pleurotus* spp. En biomodelos *in vivo* e *in vitro*. Tesis Presentada en Opción al Título Académico de Master en Biotecnología Mención Industrial. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba. 2008.
- Bermúdez RC, García N, Groos P y Serrano M. Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba. Micología Aplicada International. 2001. 13 (1): 25-29.
- Bermúdez RC, Donoso C, Martínez CE, Ramos EI, Morris HJ. Efecto de la luz en la concentración de micosteroides de *Pleurotus ostreatus* var. Florida. Rev Cub de Aliment y Nutr. 2002. 16(1):13-18.
- Bermúdez RC, Morris HJ, Donoso C, Martínez CE, Ramos EI. Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus*, var. florida. Rev Cub Invest Biomed. 2003. 22(4): 226-231.
- Bettelli E, Korn T y Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. Current Opinion in Immunology. 2007. 19:652–657.
- Blendon RJ, DesRoches CM, Benson JM, Brodie M y Altman DE. American's Views on the Use and Regulation of Dietary Supplements. *Archives of Internal Medicine*. 2001. 161(6): 805–810.
- Bobek, P., Ozdin, L. and Cerbven, J. Efectos hipocolesterolémicos de la seta ostra (*Pleurotus ostreatus*) con sensibilidad hereditaria aumentada al colesterol de dieta. Biología (Bratislava). 1990. 54: 961-966.
- Bobek P, Galbavy S. Hypocholesterolemic and antiatherogenic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rabbits. Nahrung. 1999. 43(5): 339–342.
- Brower, V. Nutraceuticals: poised for a healthy slice of the healthcare market? Nat Biotechnol. 1998.16: 728-731.
- Bruneton, J. 1995. Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants. Lavnisier Pubs, Paris.
- Bush JA y Watkin JE. The beneficial effects of mushrooms. A preventative and adjuvant therapeutic strategy against cancer. 2007. En: <http://www.biomedicallabs.com> [consulta: 21 de agosto 2007].

- Camelini CM, Maraschin M, Matos de Mendonça M, Zucco C, Ferreira AG y Tavares LA. Structural characterization of  $\beta$ -glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products. *Biotechnology Letters*. 2005. 27: 1295–1299.
- Cardona LF. Hongos: alimento y medicina. Conferencia. Escuela de Biociencias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. 2003.
- Castillo A y Martínez MA. HACCP. Conferencia. Programa FAO-ONU. Agosto de 2002.
- CECMED. Requerimientos para el registro como medicamentos de Productos farmacéuticos con vitaminas y minerales. 2002.
- Chang S, Miles P. *Edible mushrooms and their cultivation*. Boca Ratón, CRC Press, 1989. 345 p
- Chang R. Functional properties of edible mushrooms. *Nutr Rev*. 1996. 54(2):91–93.
- Chang S y Buswell J. Mushroom Nutraceuticals. *World J. Microb Biotech*. 1996.12: 473-476.
- Chavarrías M. La recolección segura de setas. *Sociedad y Consumo. Consuma seguridad*. 2005. En [www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad\\_y\\_consumo/2005/09/29/20286.php](http://www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad_y_consumo/2005/09/29/20286.php). (Consulta: 15 de julio de 2006).
- Cohen R, Persky L y Hadar Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002. 58: 582–594.
- Comité Estatal de Normalización, Cuba. NC 38-02-06. Contaminantes metálicos en alimentos.
- Regulaciones sanitarias. 1987. Unidad impresora CEN. La Habana.
- Cortés M, García A, Suárez H. Fortificación de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) con calcio, selenio y vitamina C. *VITAE. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia*. 2007. 14(1): 16-24.
- Costa A, Santoro G y Assimakopoulos G. Cancer chemoprevention: a review of ongoing clinical studies. *Acta Oncology*. 1990. 29, 657-663.
- Cragg G y Newman D. Nature's bounty. *Chemistry in Britain*. 2001. January: 22-26.
- Costa R, Cunha V, Carvalho R. The immunomodulator role of  $\beta$ -D-glucans as co-adjuvant for cancer therapy. *Rev Bras Nutr Clin*. 2006. 21(2):163-66.
- Cruse JM, Lewis RE. *Atlas of immunology*. 2ed. 2004. CRC Press LLC

- Curvetto N. Biotecnología de hongos comestibles y medicinales. Bahía Blanca, 2ed. 1999. 74p.
- Cynober L. Le pharmacien nutritionniste : mythe ou nécessité ? Annales pharmaceutiques françaises. 1998. 56(3): 139-140.
- Czop y Kay. Isolation and characterization of P-glucan receptors on human mononuclear phagocytes. J. Exp. Med. 1991. 173: 1511-1520.
- DSHEA (Dietary Supplements Health and Education Act). 1994. Public Law 103-417. 25 October 1994. Codified at 42USC 287C-11.
- Dong Q, Yao J, Yang X, Fang J. Structural characterization of water-soluble  $\beta$ -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. Carbohydr. Res. 2002. 337: 1417-1421.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 1956. 28: 350-356.
- Ehrnreich H. Foods as medicine. *The World of Food Ingredients*. 2000. June/July: 18-28.
- El-Kattan MT, Helmy Z, El-Leithy M y Abdelkawi K. Studies on cultivation techniques and chemical composition of oyster mushroom. Mushroom journal for the Tropics 1991. 11(3): 59-66.
- Ferrera L. Evaluación preliminar del efecto *in vitro* del extracto F-I de *Pleurotus spp.* sobre el sistema complemento. Trabajo de Diploma en Opción al Título de Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de Oriente. 2005
- Formulario Nacional de Medicamentos. 2006. Ministerio de Salud Pública y el Centro para el Desarrollo de la Farmacoepidemiología. Editorial Ciencias Médicas. Cuba. p181-236.
- Furukawa M, Miura N, Adachi Y, Motoi M, Ohno N. Effect of *Agaricus brasiliensis* S. Wasser *et al.* (agaricomycetideae) on murine diabetic model C57BL/Ksj-db/db. International Journal of Medicinal Mushrooms. 2006. 8(2): 115-128.
- Gaitán HR, Almones D, Pérez MR y Mata G. Manual práctico del cultivo de setas: asilamiento, siembra y producción. Xalapa, Instituto de Ecología. 2002: 56p.
- García N. Producción de setas comestibles *Pleurotus ostreatus* sobre subproductos del café y del cacao. Tesis Presentada en Opción al Título Académico de Master en Biotecnología Mención Industrial. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba. 1999.
- García N, Bermúdez RC, Gross P, Hernández M. Cultivo de cepas de *Pleurotus spp.* sobre pulpa de café. Revista Mexicana de Micología. 2006. 23: 99-101.

- Gareth Thomas. 2003. *Fundamentals of Medicinal Chemistry*. University of Portsmouth, UK. John Wiley and Sons, Ltd. 235p.
- Gea FJ. Plagas y enfermedades del género *Pleurotus* spp. En: Sánchez JE, Royce DJ. *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* México, Editorial Limusa, 2001. p 205-224.
- Gibson JE y Taylor DA. Can claims, misleading information, and manufacturing issues regarding Dietary Supplements be improved in the United States? *Perspectives in Pharmacology in The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005. 314(3): 939-944.
- Gregori A, Vagel M y Pohleven J. Cultivation of *Pleurotus* spp, *Food Technol. Biotechnol.* 2007. 45 (3): 238–249.
- González P y Labarere J. Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit rRNAV4, V6 and V9 domains. *Microbiology*. 2000. 146: 209–221.
- Gotoh K, Gouchi A, Akura Y, Tanaka N y Orita K. Augmentation of Cytotoxicity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes by Biological Response Modifiers. *Int. J. Immunopharmac.* 1991. 5: 485-492.
- Guías Metodológicas para la investigación en Plantas Medicinales. Dirección de Ciencia y Técnica. Área Docencia e Investigaciones. Ministerio de Salud Pública. 1997.
- Gunde-Cimerman N. Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst (Agaricales, Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1999. 1: 69-80.
- Gutiérrez I, González AL. Caracterización de residuos del cultivo de hongos comestibles para alimento animal. *Revista ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*. 1998. XXXII (1): 84-90.
- Hardy M. Herb-drug interactions; an evidence-based table. *Intern Med Alert Suppl.* 2001. Jan 29.
- Havas S, Heinendinger J, Reynolds K, Baranowski T, Nicklas TA, Bishop D *et al.* Food-medication interactions en: Ernst E y Young VSL. *Herb-Drug Interaction Handbook*. 2ed. Church Street Books, Nassau, NY. 2005: 1–418.
- He y Seleen. Chemical Análisis as a quality control method for medicinal mushroom and fungi extracts. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2004. 6: 253-261.
- Hirofumi M, Toru W, Masashi A y Noriyuki K. An alternative medicine, *Agaricus blazei*, may have induced severe hepatic dysfunction in cancer patients. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2006. 36(12): 808-10.
- Hobbs C. *Medicinal Mushrooms: An Exploration of Tradition, Healing and Culture*. Santa Cruz, Calif: Botanica Press. 1995.

- Hobbs C. Medicinal value of *Lentinus edodes* (Berk) Sing (*Agaricomycetidae*). A literature review. *Int JMed Mushr.* 2000. 2(4): 287–302.
- Hong F, Yan J, Baran JT, Allendorf DJ, Hansen RD, Ostroff GR *et al.*. Mechanism by which orally administered  $\beta$ -1-3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *The Journal of Immunology.* 2004. 173: 797-806.
- Huang N, Brazilian Mushroom (Gee Song Rong) En: Huang. *Cultivation of Eighteen rare and precious gourmet mushrooms.* Beijing, China. Chinese Agricultural Press. 1997: 95-101.
- Ikekawa T. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms on health care. *International Journal of Medicinal Mushrooms.* 2001. 3: 291-298.
- Jones, PJ. Clinical nutrition: 7 Functional foods – more than just nutrition. *Can. Med. Assoc. J.* 2002. 166(12): 1555.
- Kaiko GE, Horvat JC, Beagley y Hansbro PM. Immunological decisión-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Review. Immunology* 2007. 123: 326-338.
- Kaiser J. Who Owns Glycobiology? *Science.* 2007. 318: 734-737.
- Kalra EK. 2003. Nutraceutical - Definition and Introduction. *AAPS PharmSci.* 2003. 5(3) Article 25.
- Kawagishi H, Inagaki R, Kanao T y Mizuno T. Fraction and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr. Res.* 1989. 186: 267–273.
- Kidd P. Immunoceuticals: Potentiating the Body's Immune Offenses Against Cancer. *Total Health Magazine.* Sep/Oct 1999. En: <http://totalhealthmagazine.com>. (Consulta: 21 de marzo de 2008).
- Kidd PM. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Altern Med Rev.* 2000. 5(1): 4–27.
- Kidd P. MUSHROOM Superfoods and Immunoceuticals Combat Cancer. 2008. En: [www.americanwellnessnetwork.com](http://www.americanwellnessnetwork.com). (Consulta: 30 de noviembre de 2008)
- Kikkert R, Bulder I, de Groot ER, Aarden LA y Finkelman MA. Potentiation of Toll-like receptor-induced cytokine production by (1,3)- $\beta$  -D-glucans: implications for the monocyte activation test. *Journal of Endotoxin Research.* 2007. 13(3): 140-149.
- Koehler L.H. Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction rate and color intensity. *Analytical Chemistry.* 1952. 24(10): 1576-1579.
- Kuriyama S, Hozawa A, Ohmori K, Shimazu T, Matsui T, Ebihara S, *et al.* Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2006. 83: 355-361.

- Lakhanpal TN y Rana M. Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. *Plant Genetic Resources: characterization and utilization*, 2005. 3(2): 288-303.
- Le grand dictionnaire terminologique. Office de la langue française, 2002. En: [http://www.olf.gouv.qc.ca/ressources/bibliotheque/GDT\\_fiches/nutraceutique.html](http://www.olf.gouv.qc.ca/ressources/bibliotheque/GDT_fiches/nutraceutique.html). (Consulta: 8 de noviembre de 2007).
- Lechner B, Wright JE y Albertó E. Cultivo de especies silvestres de *Pleurotus* en desechos lignocelulósicos. XXIX Jornadas Argentinas de Botánica y XV Reunión Anual de la Sociedad Botánica de Chile. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 38 (Supl.) 2003: 268.
- Lozano Teruel, J. A. 2005. La alimentación. Nutrientes y complementos. Periódico digital La verdad. Disponible en [www.canales.laverdad.es/cienciaysalud/5\\_3\\_88.html](http://www.canales.laverdad.es/cienciaysalud/5_3_88.html) - 25k. (Consulta: 31 de julio de 2007).
- Lull C, Wichers H y Savelkoul H. Antiinflammatory and Immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation*. 2005. 2: 63-80.
- Luna MV. Regulaciones para el Registro Sanitario de Productos Naturales, suplementos y nutracéuticos. Conferencia. VI Congreso Continental y III Congreso Iberoamericano y del Caribe de Productos y Medicina Natural. Noviembre 2007. La Habana. Cuba.
- Llauradó G. Propiedades inmunocéuticas del extracto hidrosoluble crudo (F-I) de setas comestibles *Pleurotus spp.* en un biomodelo experimental de malnutrición proteico-energética. Tesis Presentada en Opción al Título Académico de Master en Biotecnología Mención Industrial. Universidad de Oriente. 2008.
- Marcos J. Efectos inmunomoduladores de extractos acuosos de *Pleurotus spp.* en biomodelos de inmunodeficiencias secundarias. Tesis en Opción al Título de Licenciatura en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de Oriente. 2003.
- Mendoza V. F. Experiencia profesional generada en Módulos de Producción de hongos comestibles en el Edo. De Chiapas, México. 2004.
- Miles, PG y Chang ST. *Biología de las setas. Fundamentos básicos y acontecimientos actuales*. Santafé de Bogotá, World Scientific, 1999: 206 p.
- Ministerio de Salud Pública. Programa Nacional para el Desarrollo y Generalización de la Medicina Tradicional y Natural. 1999.
- Ministerio de Salud Pública. Guías metodológicas para la investigación en plantas medicinales. Área Docencia e Investigaciones. Dirección de Ciencia y Técnica. 1997.
- Mizuno T, Hagiwara T, Nakamura T, Ito H, Shimura K, Sumiya T y Asakura A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric.Biol. Chem.* 1990. 54: 2889–2896.

- Mizuno, T. Medicinal properties and clinical effects of *Agaricus blazei* Murr.(Review). Int J Med Mush. 2002. 4: 299-312.
- Moore LE. Fundamentals of the fungi. Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ. 1982.
- Morris HJ, Marcos J, Llauradó G, Fontaine R, Tamayo V, García N, y Bermúdez RC. Immunomodulating effects of hot-water extract from *Pleurotus ostreatus* mycelium on cyclophosphamide treated mice. Micología Aplicada Internacional. 2003. 15(1): 7-13
- Morris HJ, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, Llauradó G, Marcos J. A note on the in vitro macrophage-stimulating activity of water-soluble extracts from mycelium of *Pleurotus spp.* Food and Agricultural Immunology. 2007. 18(1): 31-37.
- Murlot A. Producción de *Pleurotus spp.* sobre mezclas de pulpa de café y viruta de madera. Tesis Presentada en Opción al Título Académico de Master en Biotecnología Mención Industrial. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba. 2006.
- Muez MA y Pardo J. La preparación del sustrato. En: Sánchez JE y Royse DJ. Eds. La biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* México. Editorial Limusa. 2001. 157-186.
- Nöthlings U, Wilkens LR, Murphy SP, Hankin JH, Henderson BE, Kolonel LN. Vegetable Intake and Pancreatic Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study. American Journal of Epidemiology. 2007. 165(2):138-147.
- Nosálová V, Bobek P, Cerná S. et al. Effects of pleuran (beta-glucan isolated from *Pleurotus ostreatus*) on experimental colitis in rats. Physiol Res. 2001. 50: 575-581.
- O'Hara DP. Quality controls and product standards: A research priority-setting. Conference. March 8-9, 2002. Vancouver, British Columbia. Canada.
- Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Yadomae T. Antitumor  $\beta$ -glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. Biol Pharm Bull. 2001. 24(7): 820-828.
- Okuda T, Yoshioka Y, Ikekawa Y et al. Anticomplementary activity of antitumor polysaccharides. Nature. 1972. 238(80): 59-60.
- Omaye S. Food and Nutritional Toxicology. CRC Press LLC. Boca Raton, London New York, Washington D.C. 2004.
- Opletal L, Jahordar L, Chobot R. Evidence for the hyperlipidemic activity of the edible fungus *Pleurotus ostreatus*. British Journal of Biomedical Science. 1997. 54(4): 240-243.
- Palou A y Serra F. 2000. Perspectivas europeas sobre alimentos funcionales. Alimentación, Nutrición y Salud. 7(3): 76-90.
- Pardo V. 1995. Hongos fitopatógenos de Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Centro de Publicaciones de la Universidad Nacional de Colombia. 166p.

- Park S, Penas M, Ramírez L y Pisabarro A. Genetic linkage map and expression analysis of genes expressed in the lamellae of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Genet Biol.* 2006. 43: 376–387.
- Parris MK. The use of mushroom glucans and proteoglycans in Cancer Treatment. *Alternative Medicine Review.* 2000. 5(1): 4-27.
- Partos L. Mushrooms beat wheatgerm to top antioxidant slot. Publicado el 5 de sep de 2005. <http://www.decisionnewsmedia.com>. (Consulta: 7 de agosto de 2008).
- Peláez O. El dilema de los productos naturales. La Habana, 26 de octubre de 2006. [www.granma.cubaweb.cu/secciones/ciencia/ciencia353.htm](http://www.granma.cubaweb.cu/secciones/ciencia/ciencia353.htm) - 9k (Consulta: 17 de octubre de 2008).
- Pérez Cristiá (Director del CECMED y Presidente del Buró Regulatorio para la Protección de la Salud Pública). Inauguración del VI Congreso Continental. III Congreso Iberoamericano y del Caribe de Productos y Medicinas Naturales. *ProMedNatur 2007*. Palacio de Convenciones de La Habana, Cuba. 26-30 de noviembre de 2007.
- Pezzuto JH. Plant-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology.* 1997. 53: 121-133.
- Puerta Q y Rodríguez V. Buenas Prácticas de Manufactura. Programa de Saneamiento y Plan HACCP para el proceso del café en la finca. Manizales. Universidad de Caldas. Facultad de Ingeniería. Programa de Ingeniería de Alimentos. 2001. 360p.
- Rajarathnam S y Bano Z. Biological utilization of edible fruiting fungi. En: Arora D, Mukerji K y Math E. Eds. *Handbooks of Applied Mycology. Foods and feeds.* 1991. 3: 241-292.
- Regulación No. 28-02. Requisitos para las solicitudes de inscripción, renovación y modificación en el registro de medicamentos de origen natural de uso humano. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Ministerio de Salud Pública. República de Cuba. 2002.
- Regulaciones para el Registro Sanitario de Productos Naturales, suplementos y nutracéuticos. VI Congreso Continental y III Congreso Iberoamericano y del Caribe de Productos y Medicina Natural. La Habana, 29 de noviembre 2007. Presentación. Ing. María Victoria Luna Martínez, Jefa Dpto. Registro, Control y Calidad Sanitaria. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos.
- Reshetnikov S, Wasser S, Nevo E, Duckman I y Tsukor K. Medicinal value of the genus *Tremella* Pers.(Heterobasidiomycetes) (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms.* 2001. 2: 169-193.
- Remacle C y Reusens B. In *Functional Foods, Aging, and Degenerative Disease*, CRC Publisher. 2004. 771p.

- Requerimientos para el registro como medicamentos de Productos farmacéuticos con vitaminas y minerales. CECMED. MINSAP. 2002.
- Roach S. A mushrooming industry. Publicado el 17 de agosto de 2006 en News on Supplements & Nutrition – Europe. <http://www.decisionnewsmedia.com>. (Consulta:7 de agosto de 2008).
- Robertfroid MB. 2000. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. Am. J. Clin. Nutr. 71(6): 1669S-1664S.
- Rodríguez N. Informe anual de actividades 1992-1993. Chinchiná. CENICAFÉ. Disciplina de Química Industrial, 1993: 91.
- Rodríguez N y Jaramillo C. Cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus* sobre residuos agrícolas de la zona cafetera. Boletín Técnico No. 27. Gerencia Técnica Programa de Investigación Científica. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé). Chinchiná. Caldas. Colombia. 2005.
- Rodríguez S. Decoloración de los residuales de la pasteurización de la pulpa de café y la vinaza por *Pleurotus* spp. Tesis Presentada en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba. 2006.
- Roig, J. T. 1988. Plantas Medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Editorial Científico-técnica, La Habana, Cuba.
- Royse DJ. Cultivation of oyster mushrooms. Pennsylvania, College of Agricultural Sciences. 2003. The Pennsylvania State University. University Park.
- Sánchez JE y Royse DJ. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp.. México. Editorial Limusa. 2001. 157-186.
- Saavedra M, Benitez E, Cifuentes C y Nogales R. Enzyme Activities and Chemical Changes in Wet Olive Cake after Treatment with *Pleurotus ostreatus* or *Eisenia fetida*. Biodegradation. 2006.17: 93–102.
- Schiff I, Abou-Mansour E, Job D, Gillet F. Physiological and Chemical Variations in the cultivated culinary-medicinal maitake mushroom *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr) S.F. Gray (Aphyllophoromycetidae) in conjunction with strain, substrate, and technical treatments. International Journal of Medicinal Mushrooms. 2004. 6: 263-274.
- Schijns V y O'Hagan D. Immunopotentiators in Modern Vaccines. 2006. Elsevier Academia Press.
- Seo S-Y, Sharma VK, Sharma N. Mushroom tyrosinase: recent prospects. J.Agric. Food Chem. 2003. 51: 2837-53.

- Sharapin N, Pinzón RS, *et al.* Fundamentos de Tecnología de productos fitoterapéuticos. Santa Fé de Bogotá. Convenio Andrés Bello. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología. 2000. 257 p.
- Sheu F, Chien P, Wang H, Chang H y Shyu Y. New protein PCiP from edible golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus*) activating murine macrophages and splenocytes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007. 87(8): 1550-1558.
- Shigesu K, Kodama N, y Nanba H. Effects of maitake (*Grifola frondosa*) polysaccharide on collagen-induced arthritis in mice. *Jpn J Pharmacol*. 2000. 84, 293-300.
- Sigarroa A. *Biometría y Diseño Experimental*. La Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1985.
- Sullivan R. Extraction, development and chemistry of anti-cancer compounds from medicinal mushrooms. 2006. 5: 80-105.
- Swinbanks D y O'Brien J. Japan explores the boundary between food and medicine. *Nature*. 1993. 364: 180.
- Takachi R, Manami I, Junko I, Norie K, Motoki I, Shizuka S, *et al.* Fruit and Vegetable Intake and Risk of Total Cancer and Cardiovascular Disease- Japan Public Health Center-based Prospective Study. *American Journal of Epidemiology*. October 2007.
- Trnovec T y Hrmová M. Immunomodulator polysaccharide: chemistry, disposition and metabolism. *Biopharmaceutics and drug disposition*. 1993. 14, 187-198.
- USP 30-NF 25. U.S. Pharmacopeia 30-National Formulary 25.2007. The Official Compendia Standards (Formato digital).
- Velasco V. Experiencia profesional generada en el Sistema de Producción Integral de Traspacio del Colegio de Postgraduados. Montecillo. Texcoco, Edo. de México. México. 2004.
- Vetvicka V, Dvorak B, Vetvickova J, Richter J, Krizan J, Sima P, Yvin JC. Orally administered marine (1→ 3)-β -D-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2007. 40(4): 291-298.
- Vilgalys R y Sun BL. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994. 491: 4599–4603.
- Vogel F y Salmones D. Análisis comparativo de la productividad de cepas de *Pleurotus spp.* cultivadas en una planta comercial. *Rev Iberoam Micol*. 2000. 17: 138-141.

- Wales J, Andreakos E, Feldmann M y Foxwell B. Targeting intracellular mediators of pattern-recognition receptor signalling to adjuvant vaccination. *Biochemical Society Transactions*. 2007. 35(6)
- Wang L, Ha Ch, Cheng T, Cheng S, Lian T y Wu M. Oral administration of submerged cultivated *Grifola frondosa* enhances phagocytic activity in normal mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2008. 60(2): 237-243.
- Wang Y, Zeng F, Hon Ch, Zhang Y y Leung FCC. The mitochondrial genome of the Basidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). *FEMS Microbiol Lett*. 2008 280: 34–41.
- Wasser Sp y Weis AL. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol*. 1999. 19(1): 65–96.
- Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002. 60(3): 258–274.
- Wasser SP, Didukh MY, Mala A, Nevo E, Stamets P, y Eira AF. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun Agaricus (the Himematsutake mushroom) indeed Agaricus blazei Murrill?. *Int. J. Med. Mush*. 2002. 4: 267–290.
- Wasser S, Didukh M y Nevo E. Dietary supplements from culinary-medicinal mushrooms: a variety of regulations and safety concerns for the 21<sup>st</sup> century. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2004. 6: 231-248.
- Wildman R *et al*. *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. 2ed. Wildman Ed., CRC Publisher. 2006. pp 560.
- Willment JA, Gordon S y Brown GD. Characterization of the human B-glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem*. 2001. 276: 43818-43823.
- Yan J, Vetvicka V, Xia Y, Coxon A, Carroll M, Mayadas T y Ross G. The b-Glucan, a “Specific” Biologic Response Modifier that uses antibodies to target tumors for cytotoxic recognition by leukocyte complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *Journal of Immunology*. 1999. 163: 3045–3052.
- Zhang, J. Antitumor polysaccharides from chinese mushroom “yuhuangmo”, the fruiting body of *Pleurotus citrinopileatus*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1994. 58(7): 1195-1201.
- Zhu JS, Halpern GM, Jones K. The scientific rediscovery of a precious ancient Chinese herbal regimen: Cordyceps sinensis: part II. *J Altern Complement Med*. (1998) 4: 429-57.
- Zeisel S. 1999. Regulation of "nutraceuticals". *Science* 285: 1853-1855.

OTROS SITIOS VISITADOS:

- Biotecnología para el uso sostenible de la biodiversidad. 2003. En: <http://www.caf.com>. (Consulta: 27 de octubre de 2007)
- Sistema de Información Estadístico Nacional (SIEN) (<http://www.one.cu>)
- [http://www.meridianmedical.org/ourdoctors\\_rc\\_articles1.htm](http://www.meridianmedical.org/ourdoctors_rc_articles1.htm)
- Regulatory and safety criteria for Functional foods and dietary supplements and Pharmaceutical medicines; the role for Medicinal mushrooms.
- [http://www.icnet.uk/labs/med\\_mush/final\\_pdfs/chapt9.pdf](http://www.icnet.uk/labs/med_mush/final_pdfs/chapt9.pdf). (Consulta: 7 de agosto de 2008).
- Suplementos de hierbas: considere también los riesgos <http://www.nccam.nih.gov>. (Consulta: 10 de agosto de 2008).

Tabla 1. Principales categorías de los alimentos saludables y sus características\* (Bello, 2006).

CATEGORÍA	CARACTERÍSTICAS
Productos alimenticios destinados a una alimentación especial	Diseñados para satisfacer los requerimientos nutritivos particulares de grupos específicos de población.
Alimentos dietéticos para uso médico especial	Destinados a la alimentación especial requerida por situaciones singulares de la fisiopatología de una persona. Deben aplicarse obligatoriamente bajo supervisión médica.
Alimentos Aligerados	Presentan cambios cualitativos y cuantitativos en el contenido de algún nutriente considerado como no recomendable a los niveles aportados por los alimentos convencionales.
Alimentos Enriquecidos	Aquellos a los que se les ha añadido cantidades específicas de nutrientes con el fin de mejorar el contenido normal de los alimentos convencionales.
Alimentos Fortificados	Corresponden a los que llevan adicionados cantidades extras de aquellos nutrientes que no están presentes de manera natural en el alimento convencional.
Alimentos Funcionales	Aquellos que al margen de su valor nutritivo, son incluidos en las dietas alimenticias porque aportan sustancias biológicamente activas, sean o no nutrientes, en cantidades lo suficientemente significativas como para producir efectos positivos sobre alguna función fisiológica relacionada con el estado de salud.
Complementos Alimenticios	Todo producto aplicado con el fin de complementar el contenido de la dieta normal en sustancias

\* Todo Alimento Saludable debe tener las siguientes características:

- mejorar la salud y sus beneficios saludables estar respaldados científicamente.
- tener establecida su IDR por expertos y su ingestión excesiva, no ocasionar efectos nocivos.
- tener una procedencia natural y modo de empleo semejante a los alimentos.
- poseer una clara composición cualitativa y cuantitativa del ingrediente de interés y una metodología analítica detallada para su valoración.

Tabla 2. Principales alimentos comercializados con propiedades preventivas, protectoras o promotoras de la salud (Bello, 2006).

Tipo de alimento	EJEMPLOS
Bebidas	Bebidas revitalizantes, con ginseng, guaraná, cafeína, etc. Bebidas blandas, con malato, citrato cálcico y povidextrosa. Zumos enriquecidos con vitaminas A y D, calcio e hierro.
Derivados cárnicos	Embutidos crudos-curados, enriquecidos con Bifidobacterium. Embutidos crudos-curados, con dextrinas no digeribles. Salchichas de ave, ricas en ácidos grasos $\omega$ -3.
Derivados de cereales	Cereales para desayuno, de avena, maíz, arroz...fortificados con fibra, hierro, calcio, ácidos omega-3, etc., panes enriquecidos con ácido fólico.
Derivados de frutas	Mermeladas ricas en fibra dietética, minerales y vitaminas.
Derivados lácteos	Leches infantiles enriquecidas con ácidos grasos $\omega$ -3, vitaminas y minerales. Yogures que incluyen agentes probióticos y están enriquecidos con calcio, fósforo, zinc, vitaminas A y D, ácido fólico y ácidos omega-3. Yogures con sustancias prebióticas adicionadas, como la lactosacarosa.
Huevos	Huevos de gallina, ricos en ácidos grasos $\omega$ -3 y tocoferoles.
Productos edulcorados	Chocolates con xilosa-oligosacáridos. Chocolates con maltitol, palatinosa y polifenoles de té verde.
Productos grasos	Margarinas enriquecidas con fitosteroles.

Tabla 3. Términos relacionados con la Ciencia de los Alimentos Saludables.

Origen	Definición	Referencia
<b>Alimentos funcionales</b>		
Predominante en Europa	Aquellos que satisfactoriamente han demostrado beneficiar una o más funciones específicas en el organismo de forma relevante para el estado de bienestar y salud o la reducción del riesgo de una enfermedad, más allá de los efectos nutricionales.	Robertfroid, 2000
Según la Reglamentación FOSHU	<u>Alimentos procesados</u> , que contienen ingredientes que desempeñan una función específica en las funciones fisiológicas* del organismo humano, más allá de su contenido nutrimental.	Arai, 1996
<b>Nutracéutico</b>		
Según Sthepen DeFelice (EUA), 1989.	Un alimento o parte de éste que proporciona beneficios médicos o para la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de una enfermedad.	Kalra (2003)
Según Zeisel	Aquel <u>suplemento dietético</u> que proporciona una forma concentrada de un agente presumiblemente bioactivo de un alimento, presentado en una matriz no alimenticia y utilizado para incrementar la salud en dosis que exceden aquellas que pudieran ser obtenidas en el alimento normal.	Zeisel (1999)
Gran Diccionario Terminológico de la Lengua Francesa (2002)	producto fabricado a partir de alimentos pero disponibles en forma de comprimidos, polvos, pociones u otra forma farmacéutica no asociada habitualmente a los alimentos y que posee un efecto fisiológico beneficioso o protector contra enfermedades crónicas	<a href="http://www.olf.gouv.qc.ca/ressources/bibliotheque/GDT_fiches/nutraceutique">http://www.olf.gouv.qc.ca/ressources/bibliotheque/GDT_fiches/nutraceutique</a>
Según Chang y Buswell, para productos de hongos comestibles.	Materiales alimenticios modificados o enriquecidos con beneficios saludables consumidos como parte normal de la dieta, con baja potencia terapéutica.	Chang y Buswell (1996)
<b>Nutricéutico</b>		
Según Chang y Buswell, para productos de hongos comestibles.	Extractos de alimentos, parcialmente refinados y consumidos como suplementos dietéticos en forma de cápsulas o tabletas, con un efecto terapéutico potencial.	Chang y Buswell (1996)

\* Algunas de esas funciones están relacionadas con un óptimo crecimiento y desarrollo, el sistema cardiovascular, los mecanismos antioxidantes, el metabolismo de xenobióticos y el sistema gastrointestinal (Palou y Serra, 2000).

Tabla 4. Tipos de productos nutracéuticos y desarrollo en función de la demanda (Agricultura and Agri-Food Canada, 2002).

No.	USO	%
1	Incremento de la energía y reducción de la fatiga	43,7
2	Regulación intestinal	15,9
3	Fortalecimiento de los huesos	12
4	Cuidado de la piel	6
5	Balance vitamina/minerales	4.8
6	Balance nutricional	4.1
7	Reducción de la caída de los dientes	3.3
8	Control del peso	3.3
9	Reducción de la irritación de la garganta	2.6
10	Prevención de la halitosis	1.8
11	Incremento de la agudeza mental, fortalecimiento del sistema inmune, reducción de la presión ocular, reducción de la anemia, entre otros.	2.5

Tabla 5. Características generales de los productos naturales\* en Cuba (Luna, 2007).

No.	CARACTERÍSTICAS
1	Poseen actividad biológica demostrada, con sus límites previamente establecidos.
2	No presentan principios activos cuya actividad terapéutica, potencial tóxico, indicaciones y posibles contraindicaciones, requieren de un diagnóstico y vigilancia médica.
3	Sólo son permitidos excipientes o aditivos de origen sintético, indispensables por motivos tecnológicos, cuyo equivalente no exceda la ingesta diaria admisible (IDA) y se deban completamente al empleo de técnicas modernas de manufactura. Dichas técnicas deben ser aceptadas desde el punto de vista sanitario por las Normas del Codex Alimentarius o por la FDA adoptadas por nuestro país, las cuales serán declaradas en la etiqueta del producto.
4	Pueden tener adicionados vitaminas, aminoácidos y minerales, si se demuestra que son necesarios como suplementos para cumplimentar las recomendaciones diarias.
5	No existirán principios activos con efectos antagónicos en un mismo producto.
6	No existirán asociaciones de sustancias naturales o especies botánicas con indicaciones heterogéneas.
7	Su indicación propuesta deberá corresponderse con las acciones nutricionales y con el principio activo de las especies botánicas presentes en la fórmula cuali-cuantitativa del mismo.
8	Deberá estar exento en todo lo posible de plaguicidas u otros contaminantes químicos.
9	<p data-bbox="304 1323 1406 1384">Analizado con métodos adecuados de muestreo y examen, el producto natural:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="336 1368 1406 1429">- estará exento de microorganismos patógenos.</li> <li data-bbox="336 1413 1406 1496">- no contendrá ninguna sustancia originada por microorganismos en cantidades peligrosas para la salud.</li> <li data-bbox="336 1480 1406 1563">- no tendrá ninguna otra sustancia venenosa o nociva en cantidades riesgosas para la salud.</li> </ul>

\* Según Luna (2007) son aquellos de origen vegetal, animal o mineral, en su forma primigenia o que solo han sufrido el indispensable tratamiento físico, químico o biológico antes de su correcta manufactura, empaque, preservación o disposición. Son ingeridos con diferentes fines alimenticios, sin que se atribuyan al producto propiedades diferentes a aquellas propias de su principio activo. Deben proporcionar simplemente nutrimentos al hombre o servirle de suplemento alimentario, cumplimentando las recomendaciones diarias de los mismos.

Tabla 6. Compañías dedicadas a la producción de suplementos dietéticos y algunos de los problemas detectados por agencias regulatorias.

ASPECTOS	EJEMPLOS
Compañías farmacéuticas que también producen nutracéuticos	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Monsanto (St Louis, MO),</li> <li>▪ American Home Products (Madison, NJ),</li> <li>▪ DuPont (Wilmington, DE),</li> <li>▪ Abbott Laboratories (Abbott Park, IL),</li> <li>▪ Warner-Lambert (Morris Plains, NJ),</li> <li>▪ Johnson &amp; Johnson (New Brunswick, NJ),</li> <li>▪ Novartis (Basel, Suiza),</li> <li>▪ Metabolex (Hayward, CA),</li> <li>▪ Genzyme Transgenic, PPL Therapeutics, Interneuron (Lexington, KY).</li> <li>▪ NOW Foods de Bloomingdale* (Illinois, EUA) (<a href="http://www.meridianmedical.org">http://www.meridianmedical.org</a>)</li> </ul>
Compañías que producen suplementos derivados de hongos comestibles	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Golden Gourmet Mushrooms, Inc.</i> de EUA, que produce nutracéuticos y alimentos funcionales derivados de setas medicinales (<i>Ganoderma lucidum</i>, <i>Agaricus blazei</i>, <i>Antrodia comphorata</i>, <i>Hericium erinaceus</i>, <i>Grifola frondosa</i>, <i>Coriolus versicolor</i>, <i>Cordyceps sinensis</i>, <i>Pleurotus eryngii</i> e <i>Hypsizgus marmoreus</i>), obtenidas por fermentación en estado sólido (<a href="http://www.goldengourmetmushrooms.com">http://www.goldengourmetmushrooms.com</a>).</li> <li>▪ <i>NAMMEX</i> (North American Medicinal mushroom extracts) también acreditada (<a href="http://www.nammex.com/index.html">http://www.nammex.com/index.html</a>).</li> <li>▪ <i>Nutribem</i>, de México, que produce el suplemento dietético llamado Beta-G®, reconocido a nivel mundial como un excelente inmunoestimulante natural.</li> <li>▪ <i>Recherche Immunotec</i>, en Québec, Canadá (<a href="http://www.nutraceuticalsworld.com">http://www.nutraceuticalsworld.com</a>)</li> </ul>
Problemas detectados en otras compañías	<ul style="list-style-type: none"> <li>- compañías que aseguran vender productos cuyos ingredientes integran la lista GRAS de la FDA, cuando en realidad no es así (Gibson y Taylor, 2005).</li> <li>- denuncias judiciales por no existir correspondencia entre el contenido de ciertos suplementos y lo declarado en la etiqueta.</li> <li>- contaminación de algunos suplementos herbarios están con metales, microorganismos y medicamentos regulados no declarados en la etiqueta (<a href="http://www.nccam.nih.gov">http://www.nccam.nih.gov</a>).</li> <li>- quejas numerosas sobre falsas declaraciones** de los beneficios para la salud de suplementos dietéticos de todas las categorías (<a href="http://www.hsias.org">http://www.hsias.org</a>).</li> </ul>

\* Con un legado de más de 40 años, tiene un personal técnico altamente calificado y laboratorios certificados por la NPA, que garantizan un producto de alta calidad. También oferta los servicios de ensayos analíticos y microbiológicos para esta clase de productos (<http://www.meridianmedical.org>).

\*\* Las declaraciones o alegaciones son la forma de informar al consumidor del beneficio del producto. Deben ser científicamente válidas, claras y verídicas. Existen dos tipos de declaraciones: las declaraciones de propiedades medicinales y las declaraciones de salud. Las declaraciones de propiedades medicinales (exclusivas para medicamentos, prohibidas para alimentos y suplementos dietéticos) implican que el producto tenga la propiedad de tratar, prevenir o curar enfermedades humanas. Las declaraciones de salud indican en el rótulo del producto, o en su publicidad que su consumo proporciona un determinado beneficio de salud o reduce el riesgo de un perjuicio físico específico (Ashwell, 2002).

Tabla 7. Eventos en el marco legislativo estadounidense de mayor importancia relacionados con el desarrollo de los suplementos dietéticos.

PERÍODO	EVENTOS Y CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTALES
1994	<p>El Congreso de los EUA aprueba la <i>DSHEA</i>, propuesta por la FDA.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Daba entera libertad a las pequeñas empresas para crear y vender suplementos dietéticos y publicar en la etiqueta información sobre sus efectos saludables.</li> <li>▪ Hacía responsable al fabricante de la seguridad del producto y de la correspondencia entre el contenido real y lo declarado en la etiqueta.</li> <li>▪ Establecía que para el reconocimiento del suplemento dietético y su consideración como producto seguro*, si tenía un nuevo ingrediente, debía ser sometido a evaluación por la FDA.</li> <li>▪ Para la evaluación se presentaría un expediente con la información necesaria (mucho menor que la exigida para fármacos y aditivos alimentarios), al menos 75 días antes de la comercialización del producto.</li> <li>▪ La información debía publicarse, 90 días como mínimo, antes de entregar el expediente a la FDA (DSHEA, 1994; Omaye, 2004).</li> </ul>
1997	<p>La FDA propone algunas reglas de Prácticas de Producción para los Suplementos Dietéticos (Blendon <i>et al.</i>, 2001).</p>
2007	<p>Elaboración y Entrada en vigor de la Guía de <i>Buenas Prácticas de Producción para Suplementos Dietéticos</i>.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Obliga a que la producción de suplementos dietéticos cumplan las BPP.</li> <li>▪ Establece requisitos mínimos para el personal, la planta de producción, equipamiento, utensilios y demás elementos implicados en la producción.</li> <li>▪ Establece las especificaciones de cuarentena de los suplementos dietéticos devueltos, hasta su revisión por un personal de control de calidad.</li> <li>▪ Exige la investigación de cualquier queja sobre el producto por un personal calificado, más si está relacionada con incumplimiento de las BPP.</li> <li>▪ Requiere una mayor documentación: procedimientos de trabajo, registros, y otros documentos de aseguramiento de la calidad.</li> <li>▪ Su cumplimiento debe asegurar la calidad, así como la ausencia de contaminantes y un correcto etiquetado de estos productos.</li> <li>▪ La FDA ha otorgado varios plazos para su implantación, en dependencia del número de empleados en las empresas fabricantes: las de menos de 500 empleados tendrán hasta junio de 2009 y las de menos de 20, hasta junio de 2010 (Zboraj, 2007).</li> </ul>

\* Producto Seguro: significa que ninguno de sus ingredientes causa un daño significativo o inesperado en el estado de salud del individuo que lo consume cuando el producto es usado dentro de los niveles recomendados en la etiqueta (<http://www.icnet.uk>).

Tabla 8. Aspectos considerados para el desarrollo de un suplemento dietético en Cuba (Luna, 2007).

---

## SUPLEMENTO DIETÉTICO EN CUBA

---

### Características del producto

- ❖ Características etno-botánicas de la especie vegetal concerniente: clasificación taxonómica, parte empleada, modo y época de recolección, mantenimiento, procesos preliminares de manufactura, caracteres micrográficos (histológicos y morfológicos), procedencia (nacional e importada), conocimiento de la fitoquímica de la especie.
- ❖ Composición, Toxicología, Pruebas de Alergenicidad y Microbiología.
- ❖ Declaración de propiedades relativas a la función de un nutriente o aquellos nutrientes esenciales presentes en el producto natural para los cuales se haya establecido un valor de referencia de nutrientes (VNR) en las Directrices del Codex Alimentarius para etiquetado nutricional.
- ❖ Usos alimentarios a que se destina.
- ❖ Referencias Bibliográficas.
- ❖ Etiquetado del producto.

### Requisitos del suplemento dietético \*

- Debe constituir una fuente significativa del nutriente en la alimentación (un 30%).
- La declaración de sus propiedades nutricionales deben basarse en evidencias científicas, las cuales no sugerirán o incluirán ninguna declaración en el sentido de que el nutriente induzca cura, tratamiento o protección contra enfermedades.
- Tendrá la vía oral como vía exclusiva de administración.
- No incluirá en su composición ningún compuesto reconocido como medicamento \*\*.

---

\* Son suplementos dietéticos los alimentos para regímenes especiales destinados a complementar la dieta de una persona que desee tener una ingesta suficiente de nutrientes. Su dosis máxima de nutrientes no debe ser superior a la ingesta diaria recomendada (**IDR**)<sup>1</sup>.

\*\* Son medicamentos los productos farmacéuticos empleados para la prevención, diagnóstico *in vivo*, tratamiento, alivio o cura de una enfermedad o estado patológico. O aquellos que se usan para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a la que fue suministrado.

<sup>1</sup> Ingestión diaria recomendada (IDR): Son los niveles de ingestión de los nutrientes esenciales, que sobre la base de los conocimientos científicos actuales se reconocen en nuestro país como adecuados para cubrir las necesidades de casi todas las personas sanas (CECMED, 2002).

Tabla 9. Niveles básicos de control de calidad en la producción de suplementos dietéticos (FAO, 2007).

ACTIVIDAD	ASPECTOS	OBSERVACIONES
Aseguramiento de la calidad de la materia prima	Identificación correcta de la especie.	Una correcta identificación botánica es uno de los primeros pasos para garantizar la eficacia y seguridad del producto.
	Precisión de las condiciones de cultivo.	De esta forma se asegura que la especie botánica produzca adecuadamente los metabolitos de interés en las cantidades necesarias.
	Cumplimiento de las especificaciones de calidad	Las especificaciones de calidad permiten conocer las características esperadas.
Proceso de producción	Definir el proceso de extracción y formulación	Se definen de manera que se asegure una concentración adecuada del metabolito de interés y que la forma farmacéutica sea la más factible.
	Control de la producción del suplemento dietético.	Los productores se encargan de desarrollar el proceso según los principios de BPL y las normas y regulaciones vigentes.
Estandarización del producto final	Declaración de Especificaciones de pureza	Los productos naturales pueden ser accidentalmente contaminados lo mismo durante su cosecha que durante la producción. En el caso de los productos alimenticios existen niveles de tolerancia para muchas impurezas, pero se aboga para que esta característica no sea transmitida a los productos naturales.
	Identificación y desarrollo de materiales de referencia (MR)	Actualmente la industria de los productos naturales desarrolla sus propios MR, específicos según el producto, ya que no se cuenta con una fuente oficial. Los MR utilizados incluyen desde compuestos químicos aislados bien caracterizados hasta materiales crudos.
	Desarrollo de métodos analíticos para determinar marcadores	La potencia de un producto generalmente puede determinarse por la cantidad del principio activo necesario para producir el efecto terapéutico deseado. Pero en muchos productos botánicos éste no se ha podido identificar totalmente. Es posible que exista más de un principio activo con efecto terapéutico y que además la presencia de otros compuestos sea vital en el efecto del principio activo. La proporción en que éstos se encuentran puede inclusive ser más importante que la cantidad en sí misma. Por este motivo se utilizan los marcadores.

Tabla 10. Principios fundamentales del sistema HACCP\* para la producción de alimentos inocuos (Castillo y Martínez, 2002).

ASPECTOS	OBSERVACIONES
Conducir un análisis de peligros	Se prepara una lista de pasos en el proceso donde pueden existir peligros significativos y se describen las medidas de control. Estos peligros pueden ser provocados por agentes <u>físicos</u> (vidrio, metales, astillas, radioactividad...), <u>químicos</u> (residuos de pesticidas, de antibióticos, aflatoxinas, aditivos...), <u>biológicos</u> (bacterias patógenas, parásitos, virus...) La aparición de muchos tóxicos en plantas y otras fuentes alimenticias se debe a la adición por los productores inadvertidamente durante el proceso o a un inadecuado almacenamiento de la materia prima, durante el cual puede convertirse en sustrato de hongos productores de micotoxinas carcinógenas.
Identificar los Puntos Críticos de Control	Son los puntos, pasos o procedimientos en el proceso donde se puede ejercer control de tal manera que un peligro sea prevenido, eliminado, o reducido hasta niveles aceptables.
Establecer límites críticos	Establecer los criterios que deben cumplirse para cada medida preventiva en un PCC. Por ejemplo: temperatura, pH, concentración de la sal, tiempo, contenido de humedad, etc.
Establecer procedimientos para monitoreo de PCC	El monitoreo es una secuencia planeada de observaciones para evaluar si un PCC se mantiene bajo control. Los resultados del monitoreo se aplican para ajustar el proceso y mantener el control.
Establecer acciones correctivas	Estas permitirán determinar cómo se dispondrá del producto que no cumple con las especificaciones, así como corregir la causa del problema para asegurar que el PCC esté bajo control.
Establecer procedimientos de verificación	La verificación es un proceso que se hace sobre la marcha. Ayuda a asegurar que el plan de HACCP está funcionando según lo programado, evitando que los peligros formen parte del alimento.
Establecer procedimientos para mantener registros y documentación	Se debe hacer una descripción de los PCC, de los peligros y límites críticos, elaborar los procedimientos y registros, plan de monitoreo y definir las personas responsables, así como el encargado de tomar las acciones correctivas y llevar los registros y verificación.

\* Este sistema fue desarrollado inicialmente, en 1959, para asegurar el nivel de inocuidad de alimentos del programa espacial en la NASA. El mismo fue introducido en la industria alimentaria posteriormente debido a su eficacia, una vez celebrada la Conferencia Nacional de Protección de Alimentos de 1971.

Exige además la implementación de varios programas o pre-requisitos relacionados con: las Instalaciones, el Control de proveedores, las Especificaciones, los Equipos, el Saneamiento, el Control de plagas, la Higiene del personal, la Capacitación, el Control químico, la Recepción, almacenamiento y transporte, la Rastreabilidad y retiros del mercado.

Tabla 11. Producción mundial de algunos hongos comestibles medicinales\* cultivados en diferentes años (Cardona, 2003).

ESPECIES DE HONGOS COMESTIBLES	Peso fresco (ton x 10 <sup>3</sup> ) / año				
	1981	1986	1990	1994	1997
<i>Lentinula edodes</i>	180.0	341.0	393.0	826.2	1 564.4
<i>Pleurotus</i> spp.	35.0	169.0	900.0	797.4	875.6
<i>Auricularia</i> spp.	10.0	119.0	400.0	420.1	485.3
<i>Flammulina velutipes</i>	60.0	100.0	143.0	229.8	284.7
<i>Tremella</i> spp.	-	40.0	106.0	156.0	130.5
<i>Grifola frondosa</i>	-	-	7.0	14.2	33.1

\* En la actualidad el mercado está dominado por el hongo ostra y shiitake (un 60%). La mayoría de los hongos comestibles se consumen frescos (un 45%), el resto, en forma procesada (5% desecado y 50 % en conserva). Holanda es el mayor consumidor de estos productos en conserva (39%). Luego continúan China, con un mercado muy sólido (abarca cerca del 80% de la producción mundial del hongo ostra) y Australia que ha devenido en un difícil competidor. La especie *Agaricus* es la de mayor demanda (abarca cerca del 40% de la producción mundial). Sus mayores productores son EE.UU., Francia y China. Europa se erige como el gran importador/consumidor. Alemania importa un 40% de todas las setas de *Agaricus* en conserva, seguido por EE.UU., Francia, Bélgica, Suiza y Noruega. En el Reino Unido, el séptimo mayor mercado, se estimaba que a inicios de siglo, las ventas eran de unos 435 millones de euros (Roach, 2008).

Tabla 12. Uso culinario de hongos comestibles desecados y comercializados por Gourmet Mushrooms & Mushroom Products de EUA (<http://www.goldengourmetmushrooms.com>).

PRODUCTO	COMENTARIO	Cantidad/Precio (oz/USD)
MOREL ( <i>Morchella</i> )	Añade sabor y aroma a cualquier alimento.	4/\$ 40.00
PORCINI ( <i>Boletus edulis</i> )	Una de las setas más finas y deliciosas. Sirve de complemento a todo tipo de plato.	4/\$13.00
SHIITAKE COMPLETO ( <i>Lentinus edodes</i> )	Muy versátil (el “elixir de la vida”). Rica en antioxidantes como Se, ácido úrico, vitaminas (A, E, C y D). Disminuye la presión arterial, los niveles de colesterol y tiene efecto antiviral.	8/\$10.00
Trompeta negra “cantarelo”	Usado para crear sabrosas salsas para las pastas. Muchos prefieren usarlo desecado y no en su forma fresca.	4/\$16.00
HONGO OSTRAS ( <i>Pleurotus ostreatus</i> )	De textura carnosa al cocinarse, tiene un sabor semejante a las ostras. Estudios recientes han demostrado que es capaz de disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre, así como de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el plasma sanguíneo.	8/\$13.00
RARO REISHI ROJO ( <i>Ganoderma lucidum</i> ) Cuerpo fructífero desecado	Es la más rara y valiosa forma de Reishi Rojo. Conocida en China por más de 4000 años. Su nombre significa “hierba de potencia espiritual” y es usada para mantener una buena salud y alcanzar la longevidad.	(4.25 mg) por \$9.95

Tabla 16. Valor nutracéutico de *Pleurotus* spp.\*

FUENTE	METABOLITOS																				
<i>Pleurotus</i> spp.	<p>Los carpóforos contienen, en base seca, un 55% de carbohidratos, 32% de proteína, 2% de grasas y el resto lo constituyen las cenizas.</p> <p>Una gran parte de los ácidos grasos totales (un 72%) son insaturados, lo cual es un importante factor para considerarlos como alimentos saludables (Chang y Miles, 1989).</p> <p>El manitol y la trehalosa son los principales azúcares libres (10-12%). El resto de los carbohidratos se encuentran en forma polimérica, normalmente como fibra cruda. Los carpóforos no contienen almidón, pero sí entre un 5 y un 8% de glucógeno, siendo así un alimento adecuado para diabéticos.</p> <p>Poseen un alto contenido de fibra dietética, característica que le permite su preparación como conservas, ya que pueden soportar tratamientos térmicos drásticos (Andreotti y Tomasicchio, 1975). La fibra dietética también brinda el potencial para utilizar estas setas en casos de hiperlipemia y diabetes (Rajarathnam y Bano, 1991).</p> <p>El contenido de minerales en los carpóforos es más alto que el de muchas frutas y vegetales. Por otra parte, las concentraciones de los metales Pb, Cd, Cu y Zn se encuentran dentro de los límites aceptados por la OMS (El-Kattan <i>et al.</i>, 1991).</p>																				
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Miles y Chang, 1999).	<table border="0"> <tr> <td data-bbox="496 907 933 974">Composición de aminoácidos esenciales (mg/100 g peso seco).</td> <td data-bbox="933 907 1406 974">Composición de vitaminas y minerales (<math>\mu\text{g}</math> /100 g peso seco).</td> </tr> <tr> <td data-bbox="496 974 933 1008">Leucina (390-610)</td> <td data-bbox="933 974 1406 1008">Tiamina (B<sub>1</sub>) (4,8 - 7.8)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="496 1008 933 1041">Isoleucina (266-267)</td> <td data-bbox="933 1008 1406 1041">Niacina (55 - 109)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="496 1041 933 1075">Valina (309-326)</td> <td data-bbox="933 1041 1406 1075">Riboflovina (B<sub>2</sub>) (4,7 -4.9)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="496 1075 933 1108">Triptófano (61-87)</td> <td data-bbox="933 1075 1406 1108">Ácido ascórbico (0.5 - 58)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="496 1108 933 1142">Lisina (250-287)</td> <td data-bbox="933 1108 1406 1142">Ca (33)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="496 1142 933 1176">Treonina (264-290)</td> <td data-bbox="933 1142 1406 1176">P (1348)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="496 1176 933 1209">Histidina (87-107)</td> <td data-bbox="933 1176 1406 1209">K (3793)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="496 1209 933 1243">Arginina (306-334)</td> <td data-bbox="933 1209 1406 1243">Fe (15.2)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="496 1243 933 1276">Total: 2239-2638</td> <td data-bbox="933 1243 1406 1276">Na (837)</td> </tr> </table>	Composición de aminoácidos esenciales (mg/100 g peso seco).	Composición de vitaminas y minerales ( $\mu\text{g}$ /100 g peso seco).	Leucina (390-610)	Tiamina (B <sub>1</sub> ) (4,8 - 7.8)	Isoleucina (266-267)	Niacina (55 - 109)	Valina (309-326)	Riboflovina (B <sub>2</sub> ) (4,7 -4.9)	Triptófano (61-87)	Ácido ascórbico (0.5 - 58)	Lisina (250-287)	Ca (33)	Treonina (264-290)	P (1348)	Histidina (87-107)	K (3793)	Arginina (306-334)	Fe (15.2)	Total: 2239-2638	Na (837)
Composición de aminoácidos esenciales (mg/100 g peso seco).	Composición de vitaminas y minerales ( $\mu\text{g}$ /100 g peso seco).																				
Leucina (390-610)	Tiamina (B <sub>1</sub> ) (4,8 - 7.8)																				
Isoleucina (266-267)	Niacina (55 - 109)																				
Valina (309-326)	Riboflovina (B <sub>2</sub> ) (4,7 -4.9)																				
Triptófano (61-87)	Ácido ascórbico (0.5 - 58)																				
Lisina (250-287)	Ca (33)																				
Treonina (264-290)	P (1348)																				
Histidina (87-107)	K (3793)																				
Arginina (306-334)	Fe (15.2)																				
Total: 2239-2638	Na (837)																				
"pleurano" de <i>Pleurotus ostreatus</i> (cuerpo fructífero)	<p><math>\beta</math>-glucano extraído con NaOH. Administrado a ratas Wistar como parte de la dieta (al 10%) tuvo efectos positivos en el tratamiento de la colitis ulcerativa (Nosàlovà, <i>et al.</i>, 2001). Este compuesto aumenta la actividad glutatión-reductasa y superóxido dismutasa en el hígado y es capaz de disminuir en ratas las lesiones de colon (Bobek y Galbavy, 2001).</p> <p>Se ha encontrado un inhibidor competitivo de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima-A reductasa, enzima que interviene en el proceso biosintético de colesterol. Esta podría ser una explicación para la disminución del nivel de ácidos grasos y colesterol en el hígado y el efecto antiaterogénico favorable, observado experimentalmente en ratas Wistar hembras, tanto normales como con herencia hipercolesterolémica a las que fue administrada como parte de la dieta (Bobek <i>et al.</i>, 1990; Opletal <i>et al.</i>, 1997).</p>																				
"pleurotin" de <i>Pleurotus griseus</i>	Compuesto policíclico con propiedades antibióticas.																				

\* *Pleurotus* spp. incluye especies comestibles de alto valor económico en muchos países. Las más conocidas son: *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. florida*, *P. cornucopiae*, *P. eryngii*, *P. tuber regium*, *P. pulmonarius*, y *P. djamour* (Pardo, 1995).

Tabla 17. Ejemplos de productos elaborados a partir de hongos superiores o derivados.

PRODUCTO	CONTENIDO	OBSERVACIÓN
<p>Nota: Cada uno de ellos se comercializa como <i>Suplemento Dietético</i>, especificando que su propósito no es tratar, diagnosticar, curar o prevenir ninguna enfermedad y que <u>no han sido evaluados por la FDA</u>.</p> <p><b>Productos de <i>Pharmaceutical Mushrooms</i>, una división de <i>Northwest Botanicals, Inc.</i> (Oregon, EUA) (<a href="http://www.pharmaceuticalmushrooms.nwbotanicals.org/products">http://www.pharmaceuticalmushrooms.nwbotanicals.org/products</a>)</b></p>		
Eighth Element™	<i>Cordyceps sinensis</i>	Incrementa la energía celular en un 28.8%. Frasco con 30 ó 60 cápsulas, con 50 ó 600 mg c/u. Tomar dos cápsulas diarias.
Agaricus blazei Murrill	<i>Agaricus Blazei Murrill</i>	Antitumoral e inmunopotenciador Frasco con 90 cápsulas, con 500 mg cada una Tomar durante 1 mes
Maitake Grifola frondosa	<i>Grifola frondosa</i>	Por su gran variedad de β-glucanos tiene gran efecto inmunopotenciador. Estimula la producción de células T. Útil su uso en caso de inmunodeficiencias. Su uso continuado incrementa la defensa natural sin presentarse efectos adversos. Frasco con 90 cápsulas, con 500 mg cada una.
Immune-Assist™ Critical Care Formula	<i>Agaricus blazei</i> : 58.5% β-gluc. (1,6- β-D-glucano). <i>Cordyceps sinensis</i> : 30% β-gluc. y deoxiadenosina y otros nucleósidos. <i>Grifola frondosa</i> : 28% β-gluc. (fracción D). <i>Lentinus edodes</i> : 40 % β-gluc. (incluyendo lentinano y el α-glucano KS-2) <i>Coriolus versicolor</i> : 40% β-gluc. (incluyendo polisacáridos P y K). <i>Ganoderma lucidum</i> : 40% β-gluc. (1-3) (1-6)- β-D-glucano más triterpenoides.	Este producto ha mostrado en varios ensayos clínicos recientes reducir significativamente los efectos adversos de la radiación y la quimioterapia incluyendo la pérdida del apetito, los bajos niveles energéticos, la caída del pelo, la náusea, entre otros. Frasco con 90 cápsulas con 500 mg cada una. Precio: 30 USD
Immune-Assist 247	<i>A. blazei</i> , <i>C. sinensis</i> , <i>G. frondosa</i> , <i>L. edodes</i> , <i>C. versicolor</i> , <i>G. lucidum</i> (semejante a la fórmula anterior) más <i>Cordyceps</i> híbrido y derivado de té verde.	Esta fórmula ha sido seleccionada luego de ensayos clínicos a gran escala con pacientes de SIDA mostrando ser útil en estos casos. Frasco con 90 tabletas con 500 mg cada una. Posología: 3 tabs/día con las comidas.
Ridoxolan Plus	lentinano, PSK, PSP, grifolan, y β-mananos entrecruzados de <i>Cordyceps</i>	Este suplemento dietético combina inmunomoduladores y compuestos antivirales, todos de fuentes naturales. Ha sido probado en varios ensayos clínicos, mostrando ser efectivo y seguro. Útil contra el SIDA, Hepatitis C y la enfermedad de Lyme.
Levolar Forte	Extracto de <i>C. sinensis</i> , CS4 (de <i>C. sinensis</i> ), frac. D de <i>G. frondosa</i> , extracto de <i>Coprinus comatus</i> , Cr, Se...	Diseñado específicamente para contrarrestar los síntomas y causas de la Diabetes y el síndrome X. Frasco con 120 tabletas, con 750 mg cada una. Posología: 4 tabs/día/2 semanas.

Tabla 17. Ejemplos de productos elaborados a partir de hongos superiores o derivados (cont.).

PRODUCTO	CONTENIDO	OBSERVACIÓN
Purica-Immune FX	Mezcla de <i>A. blazei</i> , <i>C. sinensis</i> , <i>G. frondosa</i> , <i>L. edodes</i> , <i>C. versicolor</i> , <i>G. lucidum</i> , Nutricol™ (bioflavonoide concentrado.)	Este producto es rico en beta glucanos, inmunopotenciadores significativos demostrado por numerosos estudios. Frasco con 120 cápsulas. Cada cápsula contiene 250 mg de la mezcla.
Hep-Assist	Extractos en agua caliente y precipitados con etanol de <i>L. edodes</i> , <i>A. blazei</i> , <i>G. frondosa</i> , <i>C. versicolor</i> , <i>G. lucidum</i> y dos tipos de <i>C. sinensis</i> (uno del micelio y otro del medio de cultivo)	Esta mezcla concentrada de 200 β-glucanos isoméricos y nucleósidos de 6 tipos diferentes de hongos medicinales convierte esta fórmula en un producto útil como adyuvante en el tratamiento de la hepatitis B y C. Frasco con 84 cápsulas, con 500 mg. Tomar por 1 mes.
<b>Producido por Diversified Natural Products (DNP), EUA</b> ( <a href="http://www.dnpworld.com/nutraceuticals.html">http://www.dnpworld.com/nutraceuticals.html</a> )		
SES-150	<i>L. edodes</i> y Se	Inmunoestimulante y antioxidante.
<b>Productos IMMUNITION NSC, patente estadounidense con el lema: “Munición. Ayuda nutricional para ganar la Guerra de tu cuerpo” (<a href="http://www.nsc24.com">http://www.nsc24.com</a>)</b>		
NSC-24 Immuniton Original MG Beta Glucan	3 mg de β-1,3/1,6-D-gluc. y β-1,3(D)-glucano de <i>S. cerevisiae</i> (MG β-glucano)	Inmunopotenciador formulado por la Escuela Médica de Estados Unidos y producido bajo patente. Envase con 30 ó 60 unidades
NSC-100 Immuniton Extra Strength MG Beta Glucan	10 mg de MG β-glucano.	Inmunopotenciador que ayuda a restaurar un sistema inmune comprometido, incluyendo aquéllos que llevan tratamiento con quimioterapéuticos y radiaciones. Envase con 30 ó 60 unidades.
NSC-24 <a href="#">Allergy Formula</a> Immuniton	β-glucano, Vit C, extracto de semilla de uva...	Reduce positivamente las reacciones alérgicas.
NSC-24 CoEnzyme Q10 Immuniton	β-glucano, Co Q10	“Un par esencial para una buena salud”. Proporciona energía y potentes efectos antioxidantes.
NSC-24 Circulatory Immuniton	β-glucano, bromelina, CO Q10, Vit C, L-lisina, L-prolina, Magnesio y Potasio.	Brinda un soporte nutricional a la vez que mejora el sistema circulatorio.
<b>Productos 4life (EUA) comercializados a través de (<a href="http://www.productos4life.net">http://www.productos4life.net</a>)</b>		
Transfer Factor Plus Tri-Factor Formula	<i>L. edodes</i> , <i>G. frondosa</i> , <i>Corrdyceps</i> , hexafosfato de inositol, β-sitosterol, y extracto de hoja de olivo.	“Esta combinación brinda un nivel máximo de respaldo inmunitario para tu cuerpo”.
<b>Producto comercializado en Francia (<a href="http://www.anastore.com">http://www.anastore.com</a>)</b>		
Beta-glucanos de levadura con Shiitake y Maitake	β-glucanos (1,3 y 1,6) de: <i>S. cerevisiae</i> , lentinano (de <i>L. edodes</i> ) y <i>G. frondosa</i>	Estimulantes naturales del sistema inmune. Conjunto de β-glucanos concentrados y purificados. Frasco con 60 cápsulas, con 300 mg cada una (174 mg de β-glucanos). Precio: 32,00 €

Tabla 19. Receptores de Reconocimiento de Patrones y sus ligandos (Akira y Takeda, 2004).

RECEPTOR	LIGANDO
TLR 1	Lipoproteínas bacterianas
TLR 2	Zimosano de levaduras, peptidoglicanos, lipoproteínas, glicolípidos, lipopolisacáridos.
TLR 3	ARN viral de doble cadena
TLR 4	Lipopolisacáridos bacterianos
TLR 5	flagelinas bacterianas
TLR 6	Zimosano de levaduras, ácido lipoteicoico, lipopéptidos de micoplasmas
TLR 7	ARN de simple cadena
TLR 8	ARN de simple cadena
TLR 9	Oligonucleótidos CpG
TLR 10	Desconocido
TLR 11	Componentes de bacterias uropatógenicas
Nod 1, Nod 2	Peptidoglicanos
Receptores secuestradores (scavenger) *	Lipoproteínas modificadas de baja densidad, ligandos polianiónicos
Receptores de manosa en macrófagos y otros receptores de lectinas tipo-C.	Azúcares sulfatados, manosa, fucosa, polisacáridos modificados de galactosa, proteínas.
Receptores de complemento tipo 3 **	Partículas de zimosano, <b>beta-glucano</b> .
Receptores tipo <b>dectin</b> ***	

\* **Receptores “scavenger”**: son reconocidos también como receptores de glucanos, aunque su papel aún no está esclarecido.

\*\* **CR3**: el primer receptor identificado es una glicoproteína transmembranal heterodimérica, con alta expresión en neutrófilos, monocitos y células NK y una menor expresión en macrófagos. Presenta en su configuración dos sitios de unión a ligandos. Uno de ellos tiene alta afinidad por el fragmento C3bi de C3 (proteína del complemento) y el otro por carbohidratos, entre ellos  $\beta$ -D-glucanos.

\*\*\* **Dectin-1**: el segundo en ser caracterizado a nivel molecular. Es un receptor transmembranal con tres residuos aminoácidos en su dominio citoplasmático, capaz de reconocer glucanos que contienen uniones  $\beta$ -1,3 y/o  $\beta$ -1,6. Está expresado ampliamente en monocitos/macrófagos y neutrófilos. Aunque se ha observado también su presencia, a bajos niveles, en células dendríticas y subpoblaciones de células T. La unión a este receptor activa una secuencia de señales que contribuyen a la fagocitosis y a la inducción de moléculas efectoras fungicidas.

Existe también otro receptor:

**Lactosilceramida**: el mayor glicosfingolípido presente en los linfocitos polimorfonucleares. Se encuentra en las membranas plasmáticas de muchas células. Se ha sugerido que la interacción de los  $\beta$ -glucanos con este receptor puede inducir la expresión de la proteína inflamatoria de macrófago (MIP)-2, la activación de NFkB, el incremento del estallido oxidativo de neutrófilos y las funciones antimicrobianas. Pero los mecanismos por los cuales se logran estos efectos aún no están esclarecidos (Willment *et al.*, 2001; Adachi *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2004; Akramiené *et al.*, 2007).

Tabla 13. Propiedades medicinales de algunos hongos superiores.

Especies	anti-fúng.	antiinflam.	anti-tumoral	anti-viral	antibact y antiparas	Regula presión sang.	ef. cardiovascular	hipo-colest	anti-diabét	inmuno modul.	tónico p/niños	hepato-protect.	sedante	afro-disíaco	Bronquitis
<i>Auricularia auricula-judas</i>			+			+	X	X							X
<i>Tremella fusiformis</i>		+	+					+	+	+	+				X
<i>Tremella mesenterica</i>						+									+
<i>Schizophyllum commune</i>		X	X		X					X	X	X			
<i>Fomes fomentarius</i>			+		+										
<i>Trametes versicolor</i>			X	X	X						X	X			
<i>Piptoporus betulinus</i>			+		+										
<i>Hericium erinaceus</i>			+							X			X		X
<i>Inonotus obliquus</i>		X	X							X		X			
<i>Lenzites betulina</i>			+				+								
<i>Ganoderma lucidum</i>			+	+	+					+					
<i>Lentinula edodes</i>		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X	
<i>Pleurotus ostreatus</i>			+	+	+			+					+		

Leyenda:

**X** = Producto desarrollado comercialmente (Medicamento o suplemento dietético)

**+** = Producto aún no desarrollado comercialmente.

Tabla 13. Propiedades medicinales de algunos hongos superiores (cont.).

Especies	anti-fúng.	antiinflam.	anti-tumoral	anti-viral	antibact y antiparas	Regula presión sang.	ef. cardiovascular	hipocolesterolemico	anti-diabét	inmuno modul.	tónico p/niños	hepato-protect.	sedante	afrodisíaco	Bronquitis
<i>Flammulina velutipes</i>	+	X	X	+						X					
<i>Pleurotus pulmonarius</i>			+					+							
<i>Oudemansiella mucida</i>	X														
<i>Armillariella mellea</i>						X	X						X		
<i>Hypsizygus marmoreus</i>			X												
<i>Marasmius androsaceus</i>		X											X		
<i>Agaricus bisporus</i>			+							X	X				
<i>Agrocybe aegerita</i>	+		+					+					+		

Leyenda:

X = Producto desarrollado comercialmente (Medicamento o suplemento dietético)

+ = Producto aún no desarrollado comercialmente.

Fuente: Cardona, 2003.

Tabla 14. Uso de hongos superiores medicinales en la producción de suplementos dietéticos.

Hongo	Otros nombres	Fuente	Principio activo	Acción	Bromatología		
					Psac (%)	Pr (%)	Ce (%)
<i>Agaricus blazei</i>	Himenmatsutake (J.) JiSongRong (China) Sol real (común)	Extracto en agua caliente de <i>A. blazei</i> precipitado con etanol	$\beta$ -(1-3)-D-glucano con ramificaciones $\beta$ -(1-4) y $\beta$ -(1-6) glucosídicas.	Efectivo contra la úlcera gástrica. Promueve la mielinización Estimula la síntesis del factor de crecimiento del nervio.	25-28 ( $\beta$ -glucanos)	37.5-50	5-7
<i>Coprinus comatus</i>	Coprinus (Jap.) MaoTouGuiSan (Ch.) Melena lanuda (común)	Extracto en agua caliente de <i>C. comatus</i> precipitado con etanol	$\beta$ -glucanos	Inmunoestimulante	25	37.5-50	5-7
<i>Coriolus versicolor</i>	Kawaratake (Japón) Hongo de nube (Ch.) Cola de pavo (común)	Extracto en agua caliente del cuerpo fructífero de <i>C. versicolor</i> precipitado con etanol	Proteína conjugada con polisacárido	Efectivo contra la hepatitis B	25-30	37.5-50	5-7
<i>Coriolus versicolor</i>		Extracto en agua caliente del micelio de <i>C. versicolor</i> , COV-1, precipitado con etanol	Polisacaropéptido (PSP)	Inmunoestimulante	25	18.5	7
<i>Hericium erinaceus</i>	Yamabushitake (J.) Cabeza de mono (Ch.) Melena de león (común)	Extracto en agua caliente de <i>H. erinaceus</i> precipitado con etanol	$\beta$ -glucanos	En China se usa oficialmente para tratar la úlcera gástrica. Promueve la síntesis del factor de crecimiento del nervio y la mielinización.	20-30	37.5-50	7
<i>Grifola frondosa</i>	Maitake (J.) Flor del árbol gris (Ch.) Maitake (común)	Extracto en agua caliente de <i>G. frondosa</i> precipitado con etanol	Fracción D: $\beta$ -(1-3)-D-glucano con ramificaciones $\beta$ -(1-6)-glucosídicas	Activa las células inmunocompetentes, induce la producción de citoquinas. Como consecuencia, bactericida y anticancerígeno	25 ( $\beta$ -glucanos)	37.5-50	5-7
<i>Ganoderma lucidum</i>	Reishi (Japón) Hongo mágico (China) Reishi (común)	Extracto en agua caliente de <i>G. lucidum</i> precipitado con etanol	$\beta$ -glucanos	Inmunoestimulante y antitumoral	20-30	37.5-50	5-7

Aspectos comunes:

Características organolépticas: Polvo marrón con olor y sabor característicos (excepto Reishi que es rojizo)  
 Tamaño de partícula: 80-100 mesh; Restos: Azúcares libres, aminoácidos; Humedad: 5%; Triterpenos 3%  
 Análisis microbiológico: Conteo aeróbico total: < 5 000/g, *E. coli* y *Salmonella*: no detectables  
 Metales pesados: cumple con las regulaciones de la FDA; Pesticidas: Cumple con la 90/642/EEC

Fuente: Productos MYCOPHARMA® En: <http://www.elitelands.com>

Leyenda:

Psac = Polisacáridos  
 Pr = Proteínas  
 Ce = Cenizas

Tabla 15. Algunos ensayos clínicos realizados con productos que contienen  $\beta$ -D-glucanos derivados de hongos comestibles.

Producto	Indicación	Posología	Muestra (pacientes)	Duración del tratamiento	Resultado
lentinano	carcinoma gástrico	2 mg 4 veces/día, de 2 a 4 veces a la semana	33	6 meses	El 70% de los pacientes mostró una mayor actividad de macrófagos. Se obtuvo mejor respuesta a las 4 semanas.
<i>Agaricus sylvaticus</i>	Efectos adversos gastrointestinales	4,08 mg/kg/día	22	3 meses	Mejóro la función gastrointestinal. Se redujeron los efectos adversos de la quimioterapia.
<i>Coriolus versicolor</i> (extracto)	carcinoma gástrico	3g/día	82	2 meses	Se produjo un aumento de la actividad de células NK e IL-2. Se observaron irregularidades gástricas.
<i>Grifola frondosa</i> (fracción D)+ tabletas del hongo superior crudo	Carcinoma de mama	¿?	15	¿?	Se redujo el tamaño del tumor mamario y se obtuvo una mejora del apetito, así como la reducción del vómito.
<i>Grifola frondosa</i> (fracción D)	Diversos tipos de cáncer	100 mg diarios	8	34 meses	Se observó un aumento de la actividad de células NK.
Grifolano y polvo de <i>G. frondosa</i>	Tumores en estado II a IV, cáncer hepático, mamario y de pulmón.	¿?	¿?	¿?	Administrado conjunto con quimioterapéuticos mejoró la actividad de células competentes. Se observó regresión tumoral.
6 hongos superiores diferentes (desecados)	Diversos tipos de cáncer en estado avanzado (una semana antes de radio y quimioterapia)	4 tabletas 3 v/día (6 g/día)	56	2 meses	Inhibieron la síntesis de proteína carcinogénica, aliviaron reacciones tóxicas producidas por radio y quimioterapias, estimularon la respuesta innata y la actividad de macrófagos.

Leyenda:

¿? = el artículo no especifica ese dato

Fuente: modificado de Costa *et al.*, 2006.

Tabla 18. Actividad inmunomoduladora de compuestos derivados de hongos comestibles.

HONGO	COMPUESTO DERIVADO	EFFECTOS EN EL SISTEMA INMUNE
<b>Actividad inmunomoduladora sobre las células madres hemopoyéticas</b>		
<i>Grifola frondosa</i>	fracción MD	↑ la proliferación y diferenciación de células de la médula ósea en Unidades Formadoras de Colonias Granulocito-Macrófago (CFU-GM) ↑ la recuperación de CFU-GM luego de la administración de Doxorubicina (agente supresor de la hemopoyesis)
<i>Lentinus lepideus</i>	PG101	↑ Estimula la producción secuencial de gran variedad de citocinas proinflamatorias e inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12, GM-CSF, IL-18) ↑ CFU-GM, de unidades precursoras de la línea eritroide, IL-6. ↓ TNF- $\alpha$ en ratones irradiados
<i>Sparassis crispa</i>	SCG	↑ Granulocitos, monocitos, células T y células NK en cavidad peritoneal, bazo e hígado en ratones con leucopenia inducida por ciclofosfamida.
<b>Actividad inmunomoduladora mediada por macrófagos</b>		
<i>Grifola frondosa</i>	Fracción D	↑ IL-1 $\beta$
<i>L. lepideus</i>	PG101	↑ TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12, GM-CSF, IL-18 Activa la expresión de NF- $\kappa$ B
<i>Agaricus blazei</i>	Extract. acuosos de micelio y cuerpo fructífero Fracc. B-4 y B-5	↑ TNF- $\alpha$ ↑ TNF- $\alpha$ , IL-8, NO
<i>Ganoderma lucidum</i>	Polisacárido	↑ IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 (citocinas proinflamatorias relacionadas con la actividad antitumoral)
<i>Grifola frondosa</i>	Grifolano (b-glucano antitumoral)	↑ IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$
<i>Grifola frondosa</i>	MD-fraction	En ratones normales induce una respuesta Th2 dominante activada por macrófagos (se incrementa la inmunidad humoral) Activación de CPAs 4h luego de la administración (inmunidad innata). ↑ iNOS
<i>Grifola frondosa</i>	Mezcla de micelio-medio de cultivo (fermentación sumergida)	↑ la actividad fagocítica de leucocitos (inmunidad innata)
<i>M. esculenta</i>	Galactomannan	↑ la actividad de los macrófagos ↑ la expresión de NF- $\kappa$ B
<i>Phenilus linteus</i>	PL (polisacárido ácido)	↑ NO en macrófagos peritoneales murinos tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> . Modula la concentración de citocinas circulantes aumentadas en ratones tratados con LPS ↓ significativamente la producción de TNF- $\alpha$

### Actividad inmunomoduladora mediada por células NK

<i>G. frondosa</i>	Fracción D	↑ secreción de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ por células esplénicas; la expresión de TNF- $\alpha$ en céls. NK de ratones con tumores implantados. ↑ actividad de céls. NK y el nivel de INF- $\gamma$ indirectamente a través de la producción de IL-12 por macrófagos y CDs en ratones normales.
<i>A blazei</i>	Decocción	↑ actividad de células NK en el bazo de ratones sin estímulo previo.
<i>A blazei</i>	<i>n</i> -hexano Diclorometano Metanol	Mantiene la actividad de células NK en ratones con tumor implantado.
<i>A blazei</i>	ABMK	↑ actividad de células NK en pacientes con cáncer.

### Actividad inmunomoduladora mediada por células dendríticas

<i>Phenilus linteus</i>	PL	↑ maduración fenotípica y funcional de células dendríticas ↑ moléculas de membrana incluyendo MHC I, II, CD80, and CD86, e IL-12p70 en células dendríticas. ↓ actividad endocítica en células dendríticas. ↑ capacidad de células dendríticas para promover la proliferación de células T vírgenes
<i>C versicolor</i>	PSK	Promueve tanto la maduración fenotípica como funcional de las células dendríticas.

### Actividad inmunomoduladora mediada por la vía del complemento

<i>A blazei</i>	Partículas finas del cuerpo fructífero (ABP-F) y del micelio (ABP-M).	Activación de la vía alternativa del complemento.
<i>G lucidum</i>	Extracto básico	Activación de ambas vías del complemento: clásica y alternativa.
<i>G lucidum</i>	Triterpenoides	Actividad anticomplemento
<i>G frondosa</i>	LELFD	Activación de la vía alternativa del complemento.

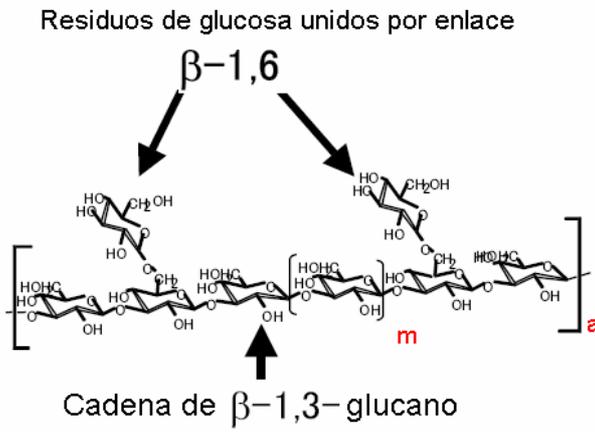
### Actividad inmunomoduladora mediada por las células T

<i>S sclerotiorum</i> IFO 9395	SSG	Respuesta T <sub>H</sub> 1
<i>L edodes</i>	Lentinan	Respuesta T <sub>H</sub> 1
<i>G frondosa</i>	D-fraction	Favorece una Respuesta T <sub>H</sub> 1 a través del incremento en los niveles de IL-12p70 e IFN- $\gamma$ producidos por células dendríticas activadas.
<i>V volvacea</i>	Vvo	↑ el número de citoquinas T <sub>H</sub> 1-específicas (IL-2, IFN- $\gamma$ , LT) T <sub>H</sub> 2-específicas (IL-4, TNF- $\alpha$ e IL-2R).

### Actividad inmunomoduladora mediada por las células B

<i>G lucidum</i>	PL-1, PL-3, PL-4	↑ la proliferación de linfocitos T y B. ↑ título de anticuerpos
<i>G lucidum</i>	PGL	↓ la producción de anticuerpos
<i>G lucidum</i>	GLIS proteoglucano	↑ proliferación de linfocitos esplénicos murinos ↑ activación de linfocitos B, su proliferación, su diferenciación y la producción de inmunoglobulinas.
<i>Phenilus linteus</i>	PL	↑ número de linfocitos esplénicos murinos y la activación de células B
<i>G lucidum</i>	LZ-8	↓ la producción de anticuerpos
<i>Flamulina velutipes</i>	Fve	↓ la producción de anticuerpos

Glucanos Solubles (hongos comestibles)



a, m, n = Número de repeticiones: variables

Glucanos de la pared celular de levaduras (*Candida*)

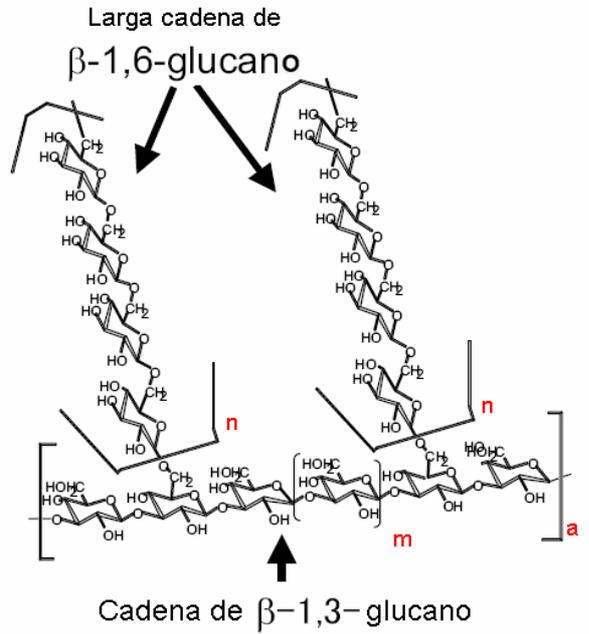


Figura 1. Estructura básica de los  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos (modificado de Adachi y Ohno, 2006).

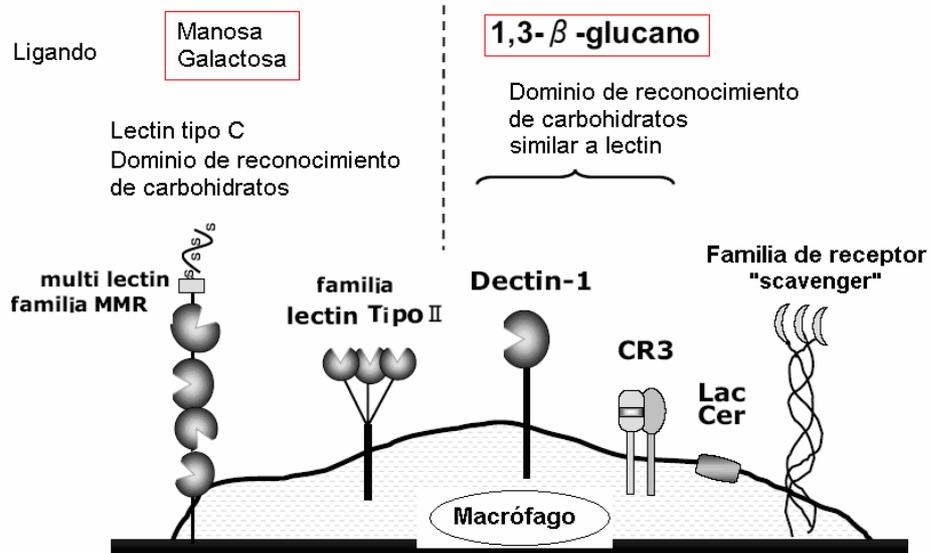


Figura 2. Receptores de reconocimiento de patrones en fagocitos para carbohidratos provenientes de hongos (modificado de Adachi y Ohno, 2006).

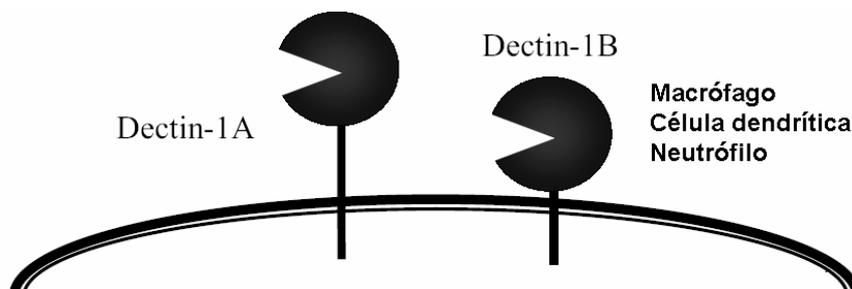


Figura 3. Características moleculares de Dectin-1 (modificado de Willment *et al.*, 2001).

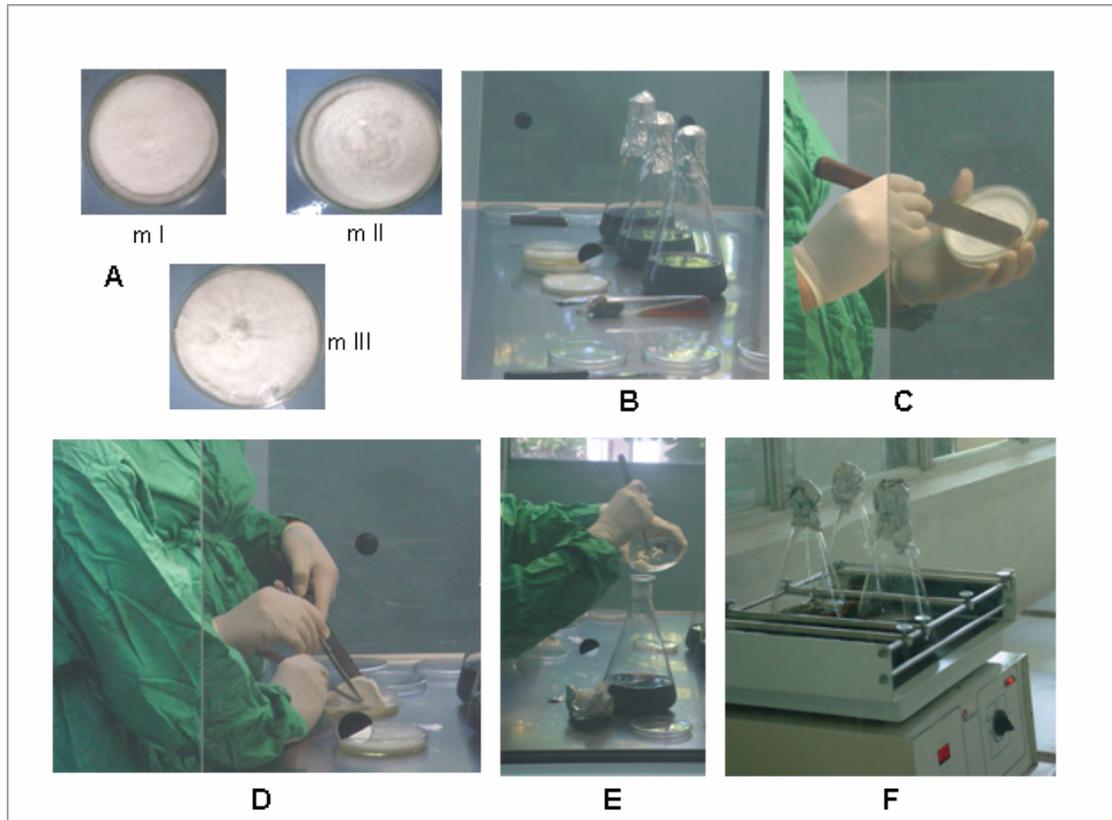


Figura 4. Fotografías de las etapas principales de preparación del cultivo sumergido de *Pleurotus* spp. CCEBI 3024.

Leyenda:

- A = Micelio crecido en placas Petri (inóculos); (m I, II y III).
- B = Preparación para la siembra en medio líquido
- C = Separación del micelio adherido a los bordes de la placa
- D = Recuperación del micelio
- E = Adición del micelio aislado de la placa al medio líquido (YPG)
- F = Crecimiento con agitación en zaranda

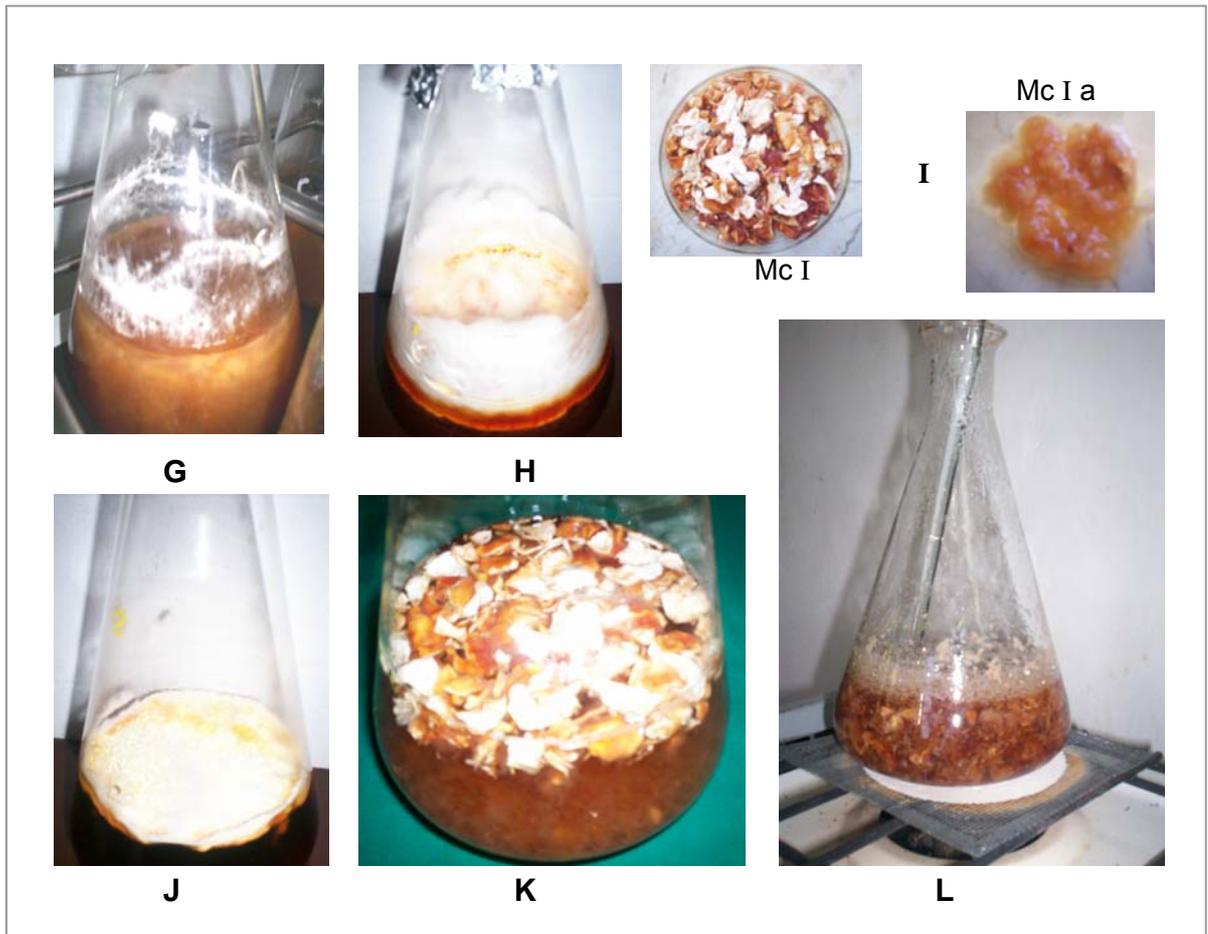


Figura 5. Fotografías de varias etapas de crecimiento en medio líquido de *Pleurotus spp.* CCEBI 3024 y obtención del extracto acuoso por decocción.

Leyenda:

G = Crecimiento de m I a la semana de sembrado.

H = Crecimiento de m I antes de recolectado.

I = Micelio I cosechado (Mc I); micelio amorfo (Mc I a).

J = Crecimiento de m II el mismo día de recolección de m I

K = Adición de Mc I y Mc I a al agua bidestilada, previo a la decocción.

L = Extracción. Decocción del micelio cosechado.

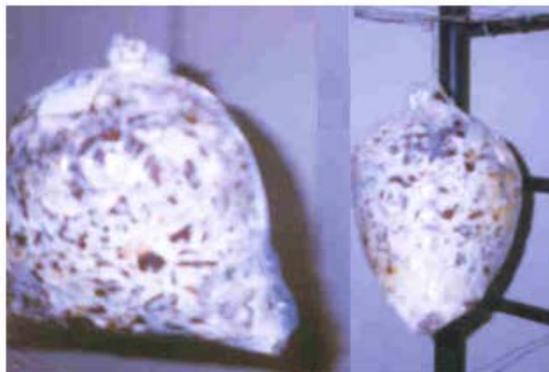
*Pleurotus spp* cultivado por FES



Inóculo



Fructificación



Colonización



Figura 6. Fotografías de algunas etapas de producción por FES de hongos comestibles *Pleurotus spp.* desarrolladas en el CEBI.

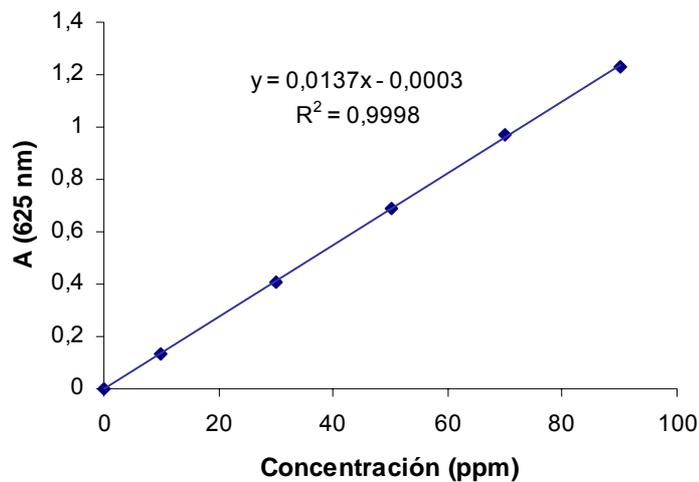


Figura 7. Curva patrón obtenida con la solución de dextrano (100 ug/ml).

Se realizó análisis de regresión lineal para la estimación de la ecuación de regresión. Se comprobó la significación estadística del coeficiente de regresión ( $p < 0,05$ ) y se estimaron sus límites de confianza ( $b \pm t_{0,05} s_b$ ):  $0,0137 \pm 0,0002$ .  $S_b$ : error estándar asociado a  $b$ ;  $t$ : valor del estadístico  $t$  para  $n-2$  grados de libertad.

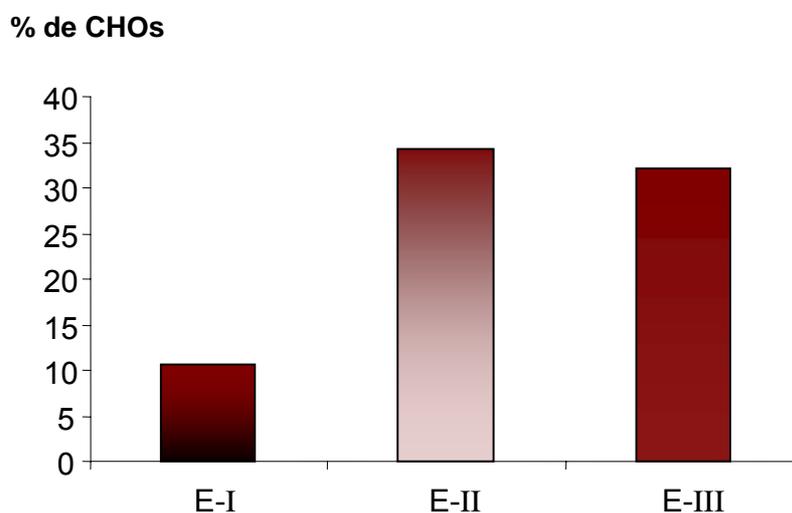
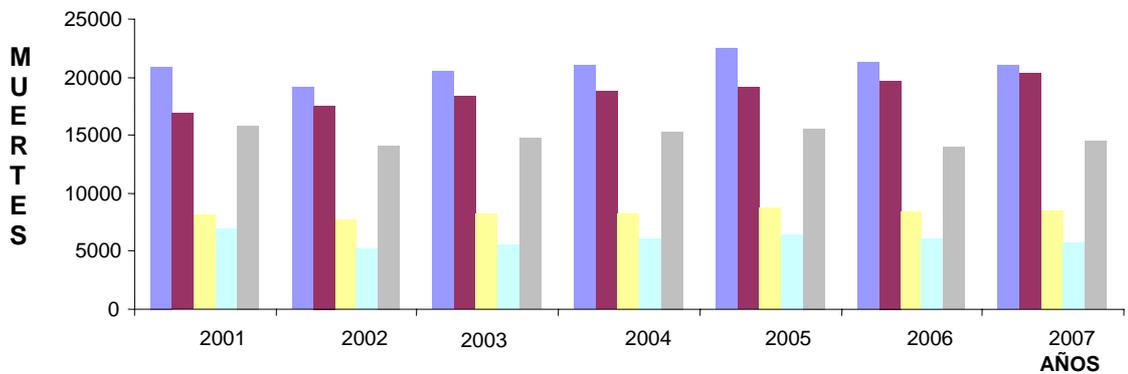


Figura 8. Contenido de carbohidratos (% de CHOs) en los extractos hidrosolubles de micelio de *Pleurotus* cepa CCEBI 3024 aplicando el método colorimétrico antrona-sulfúrico.



Leyenda:

- Enfermedades del corazón
- Enfermedades Cerebrovasculares
- Tumores malignos
- Influenza y neumonía
- Otras\*

Figura 9. Causas de muerte de todas las edades en la Cuba del siglo XXI (Fuente: SIEN).

\* En "Otras" se incluyen además: accidentes, enfermedades crónicas de las vías respiratorias inferiores, enfermedades de las arterias, arteriolas y vasos capilares, diabetes mellitus, lesiones autoinflingidas intencionalmente, cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado.

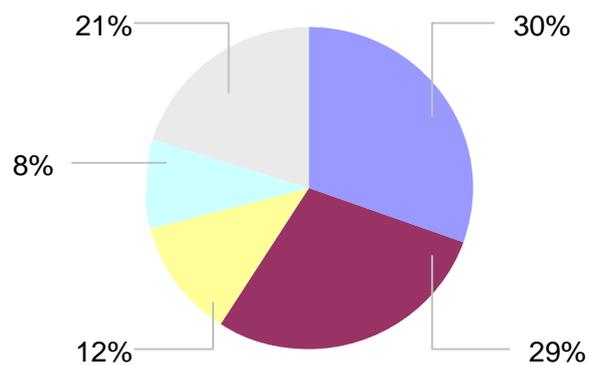


Figura 10. Relación porcentual de las diferentes causas de mortalidad de todas las edades producidas en Cuba en el año 2007 (leyenda semejante a la anterior).

Tabla 20. Comparación entre las dos vías de producción de biomasa de *Pleurotus* spp. según los resultados obtenidos en el CEBI.

ASPECTOS	Producción del micelio por fermentación sumergida	Producción del cuerpo fructífero por fermentación en estado sólido
Sustratos empleados	Medio convencional YPG (levadura, peptona, glucosa, sales, agua destilada).	Para la siembra del inóculo se emplea una menor cantidad de sustrato (semilla de trigo o millo), pero luego la fructificación se efectúa en subproductos de naturaleza agrícola lignocelulósica variada.
Costo de los sustratos	Se utilizan medios microbiológicos de uso común y costo elevado.	El sustrato para la siembra del inóculo se adquiere en moneda nacional.
Composición química del sustrato	Homogénea y simple	Heterogénea y compleja
Equipos necesarios específicos	Cabina de flujo laminar	No se requiere
Tiempo de cultivo	Pocas semanas (aunque deben ser optimizadas las condiciones)	45 días
Rendimiento	De 4 a 20 g de micelio por cada 100 mL de medio empleado.	De 12 a 25 kg de setas frescas por cada 100 kg de sustrato húmedo.
Segundas cosechas	No es posible	Una vez que se ha colectado el cuerpo fructífero la primera vez, pueden realizarse otras dos cosechas sucesivas.
Grado de experiencia	Limitada	Suficiente
Resultados asociados	Utilizado hasta el momento para investigaciones en el campo de la Inmunología Aplicada.	Utilizado como alimento humano, en investigaciones de Inmunología Aplicada y en otras esferas diferentes como la biodegradación y detoxificación.
Referencias disponibles en relación a las condiciones de cultivo	Se cuenta con referencias que describen las condiciones de cultivo de <i>Pleurotus</i> spp. por este método.	Existe una mayor cantidad de referencias que describe detalladamente el proceso de cultivo de las setas de <i>Pleurotus</i> spp.

Tabla 21. Productos naturales elaborados por el Laboratorio Farmacéutico Oriente (actualización: mayo 2008).

Nombre del Producto	Componente Principal	Propiedades Medicinales	Forma Farmacéutica
MANZANISAN	flores de la planta de manzanilla	Tónico digestivo, sedante y antiinflamatorio	comprimidos
INMUNOSAN	hojas de <i>Pettiveria alliacea</i> (anamú)	inmunoestimulante	tabletas
MENPROL	mentol, propóleos, eucaliptol, timol, eugenol.	Refrescante bucal, protector de las vías bucofaríngeas, mejora la halitosis	trociscos
VIPROL (SD)	Propóleos extracto seco	Bioestimulante, reconstituyente, revitalizante, estimulante de sistema inmune	comprimidos
JALCA (SD)	jalea real y calcio	Revitalizante natural enriquecido con calcio, preventivo de la osteoporosis	comprimidos masticables
JALEX (SD)	jalea real desecada	Revitalizante natural	comprimidos masticables
FIBRASAN (SD)	salvado de trigo (fibra insoluble), pectina (fibra soluble)	Fibra dietética. Garantiza un buen funcionamiento intestinal, corrige el estreñimiento, equilibra y complementa los regímenes para adelgazar produciendo sensación de saciedad.	tabletas
VIMANG (SD)	extracto de la corteza de <i>Mangifera indica</i>	Antioxidante	tabletas

Leyenda:

(SD) = Suplemento Dietético

Tabla 22. Identificación de los Puntos Críticos de Control en base al proceso de producción de los hongos comestibles *Pleurotus* spp.

<b>NO.</b>	<b>ETAPA DEL PROCESO</b>	<b>PELIGRO</b>
1	Selección y tratamiento del sustrato	Puede contener metales pesados o algún contaminante químico.
2	Higienización de áreas y personal	Contaminación microbiana
3	Inoculación	Contaminación microbiana
4	Colonización	Problemas organolépticos causados por inadecuada temperatura, iluminación, recambio de aire; contaminación microbiana, ataque de plagas.
5	Fructificación de las setas	Problemas organolépticos, contaminación microbiana, ataque de plagas.
6	Cosecha	Pérdida de propiedades organolépticas
7	Secado de las setas	Contaminación microbiana
8	Empaque	Contaminación microbiana
9	Almacenamiento	Contaminación microbiana
10	Traslado	Rotura del envase, pérdida de producto contaminación microbiana.

Tabla 23. Análisis microbiológico de los medios de cultivo líquidos y los extractos de micelio de *Pleurotus* spp. CCEBI 3024.

<b>MUESTRA</b>	<b>Conteo de colonias de bacterias</b>	<b>Conteo de colonias de hongos</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
Medio 1	5 UFC/mL	No crecimiento	Las características de las colonias eran semejantes.
Medio 2	3 UFC/mL	No crecimiento	Las características de las colonias eran semejantes.
Extracto I	123 UFC/mL	No crecimiento	Se observaron 2 tipos diferentes de colonias.
Extracto II	120 UFC/mL	No crecimiento	Se observaron 5 tipos diferentes de colonias, incluidas las observadas en el Extracto I.

Tabla 24. Análisis cualitativo de los extractos hidrosolubles de Micelio de *Pleurotus* aplicando el método colorimétrico antrona-sulfúrico.

<b>Muestra</b>	<b>Características del Extracto</b>	<b>Color desarrollado</b>	<b>tiempo</b>	<b>Decoloración</b>
<b>Extracto I (E- I)</b>	Color pardo oscuro	Verde intenso	a los 7' aprox.	Luego de ½ h no se observó decoloración significativa.
<b>Extracto II (E- II)</b>	Color pardo claro	Verde poco intenso	a los 7' aprox.	Luego de ½ h no se observó decoloración significativa.
<b>Extracto III (E- III)</b>	Color pardo oscuro	Verde intenso	a los 7' aprox.	Luego de ½ h no se observó decoloración significativa.

Nota: las diferentes soluciones de dextrano, utilizadas para la curva de calibración, mostraron resultados cualitativos semejantes a los obtenidos con los extractos hidrosolubles crudos de micelio.

Tabla 25. Contenido de metales en la muestras de extractos de micelio de *Pleurotus* cepa CCEBI 3024 comparadas con otros alimentos.

METALES	EXTRACTO I (ppm)	EXTRACTO II (ppm)	Niveles máximos permisibles *		
			Ch	Ls	Vs
<b>Fe</b>	7,62	12,69	-		
<b>Ca</b>	6,23	15,29	-		
<b>Mg</b>	34,78	24,60	-		
<b>Zn</b>	2,49	6,71	20,0	100,0	50,0
<b>Cu</b>	No se detecta	No se detecta	10,0	2,0	50,0
<b>Cd</b>	No se detecta	No se detecta	0,1	-	-
<b>Pb</b>	No se detecta	No se detecta	0,5	5,0	4,0

\* Los Niveles máximos permisibles se corresponden con los aprobados por la NC 38-02-06: 87 para contaminantes metálicos en alimentos, específicamente para conservas de champiñón (Ch), Levaduras secas (Ls) y Vegetales secos (Vs).

Tabla 26. Procedimientos Normalizados de Trabajo del CEBI cuya aplicación asegura la calidad en la obtención de la materia prima (setas de *Pleurotus spp.*).

No.	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO	CÓDIGO	No. págs
1	Inoculación de la cepa de <i>Pleurotus spp.</i> en placas Petri.	CEBI/PT/01/03	4
2	Inoculación de la cepa de <i>Pleurotus spp.</i> en tubos de ensayo.	CEBI/HC/PT/01	8
3	Reglas de bioseguridad en el proceso de cultivo de <i>Pleurotus spp.</i>	CEBI/HC/PT/02	7
4	Obtención de inóculos	CEBI/HC/PT/03	7
5	Selección del sustrato	CEBI/HC/PT/04	4
6	Tratamiento del sustrato	CEBI/HC/PT/05	5
7	Siembra del sustrato seleccionado	CEBI/HC/PT/06	5
8	Incubación del sustrato	CEBI/HC/PT/06	5
9	Fructificación de las setas	CEBI/HC/PT/08	5
10	Cosecha	CEBI/HC/PT/09	5

*Anexo 1. Productos inscribibles y no inscribibles ante el CECMED.*

**Productos objeto de inscripción en el Registro de Medicamentos de Origen Natural:**

- ✓ Medicamentos de origen vegetal, mineral y animal, elaborados como especialidades farmacéuticas.

**No serán objeto de inscripción en el Registro de Medicamentos de Origen Natural los siguientes tipos de productos:**

- Plantas medicinales crudas o sus partes, procesadas y envasadas a granel como materia prima farmacéutica.
- Drogas vegetales y/o preparados vegetales considerados como material de partida.
- Sustancias de origen animal utilizadas como material de partida.
- Sustancias de origen mineral utilizadas material de partida.
- Medicamentos de origen natural elaborados en centros de producción local y dispensarios farmacéuticos (estos productos serán autorizados a su uso por el CECMED basados en otros requisitos independientes)
- Medicamentos de origen sintético (estos productos serán sometidos a un Registro independiente por el CECMED)
- Medicamentos Biológicos (estos productos serán sometidos a un Registro independiente por el CECMED)
- Medicamentos Homeopáticos (estos productos serán sometidos a un Registro independiente por el CECMED)
- Medicamentos elaborados en farmacias o centros dispensariales como preparaciones magistrales.
- Desinfectantes técnicos para uso hospitalario (estos productos serán sometidos a un Registro independiente por el CECMED)
- Preparaciones farmacéuticas para ensayos clínicos, las que son objeto de autorización por el CECMED de acuerdo a los procedimientos establecidos al efecto.
- Dispositivos médicos tales como materiales quirúrgicos y otros (estos productos serán sometidos a un Registro independiente por el Centro de Control Estatal de Equipos Médicos)
- Preparados alimenticios, suplementos dietéticos y cualquier otro que por sus indicaciones no sea calificado como medicamento (estos productos serán sometidos a un Registro independiente por el Instituto Nacional de Higiene de los Alimentos)
- Productos cosméticos (estos productos serán sometidos a un Registro independiente por Instituto Nacional de Higiene de los Alimentos)
- Medicamentos de uso veterinario (estos productos serán sometidos a un Registro independiente por el Instituto Nacional de Veterinaria)

Fuente: Regulación No. 28-02. Requisitos para las solicitudes de inscripción, renovación y modificación en el registro de Medicamentos de Origen Natural de uso humano. CECMED. MINSAP.

---

Anexo 2. Productos inscribibles y no inscribibles ante el INHA.

**Productos objeto de inscripción en el Registro Sanitario del INHA:**

- ✓ Productos alimenticios naturales, elaborados y sus materias primas.
- ✓ Preparados alimenticios, suplementos dietéticos, nutricionales y cualquier otro que por sus indicaciones no son calificados como medicamento y se considere alimento.
- ✓ Bebidas alcohólicas y no alcohólicas.
- ✓ Alimentos para regímenes especiales.
- ✓ Los materiales destinados a estar en contacto con alimentos: todos los recipientes, como latas, botellas, cajas de cartón, fundas y sacos o material para envolver o cubrir tal como papel laminado, película, papel encerado, tela, u otros materiales.
- ✓ Ingredientes y aditivos alimentarios.
- ✓ Productos apícolas
- ✓ Tabacos y sucedáneos del tabaco
- ✓ Cosméticos de todo tipo, desodorantes y antitranspirantes, cosméticos infantiles, colonias y perfumes, cosméticos naturales y de origen apícola
- ✓ Productos para la higiene bucal y dental, productos para el bronceado, protección solar y autobronceadores, productos depilatorios, productos para el blanqueo de la piel.
- ✓ Artículos para uso personal (servilletas, papel sanitario, almohadillas sanitarias, pañales desechables, entre otros).
- ✓ Productos para uso doméstico (limpiadores, ambientadores, desengrasantes, entre otros)
- ✓ Productos de la higiene ambiental (desinfectantes para piscinas, fuentes de abastos, filtros, entre otros)
- ✓ Juguetes de diferentes tipos, colores para entretenimiento de los niños, lápices de colores y tizas para escribir, pastas para moldear
- ✓ Libros o álbumes y estampas para niños
- ✓ Bicicletas para niños. Juguetes, juegos y artículos para recreo o para deporte, sus partes y accesorios.
- ✓ Videos juegos del tipo de los utilizados con un receptor de TV.
- ✓ Matasuegras y sombreros de papel, máscaras, etc, artículos de magia para bromas, inocentadas y sorpresas de cualquier clase.
- ✓ Disfraces de materias textiles. Artículos para disfrazarse: máscaras, narices, orejas, barbas, bigotes, pelucas, sombreros, artículos para fiestas, carnaval u otras diversiones, incluidos los de magia y artículos sorpresa.
- ✓ Pelotas, y las pelotas de tenis, los inflables.
- ✓ Patines de ruedas, incluido el calzado con patines fijos.

**Objetos que se consideran No Inscribibles en el Registro Sanitario del INHA:**

- Medicamentos u otros productos naturales o biológicos empleados con fines terapéuticos

Fuente: [http://www.INHA/objetos de registro.htm](http://www.INHA/objetos%20de%20registro.htm)

---

Anexo 3. Etapas para la investigación en Plantas Medicinales. Ministerio de Salud Pública

- 1- Selección de la planta:
  - información bibliográfica
  - resultados de investigaciones en curso
  - disponibilidad de la especie
  - factibilidad del cultivo
  - problema de salud que puede resolver
- 2- Planta a investigar
- 3- Identificación botánica:
  - lugar y hora de la recolección
  - fecha
  - estado dentro del ciclo de la planta
  - parte de la planta
  - nombre del recolector e institución
  - nombre del especialista
  - herbario y datos de su ubicación
- 4- Caracterización fitoquímica mínima de las preparaciones
  - revisión bibliográfica
- 5- Estudio farmacológico
- 6- Estudio toxicológico
  - revisión bibliográfica
- 7- Preparado farmacéutico
- 8- Agrotecnia
- 9- Farmacología II
  - farmacodinamia y farmacocinética
  - dosis efectiva
  - potencia o actividad relativa
  - índice terapéutico
  - mecanismo de acción
  - tiempo de vida media
- 10- Toxicología II
  - toxicidad subcrónica
  - genotoxicidad
  - toxicología de la reproducción
  - otras (toxicidad crónica, carcinogénesis)
- 11- Obtención del principio activo
- 12- Ensayo clínico
- 13- Registro y Normalización CECMED y NMCC (Dirección de Normalización, Metrología y Control de Calidad del MINSAP)
- 14- Farmacovigilancia

Fuente: Guías Metodológicas para la investigación en Plantas Medicinales. Dirección de Ciencia y Técnica. Área Docencia e Investigaciones. Ministerio de Salud Pública. 1997.

Anexo 4. Integrantes de la Alianza Internacional de Asociaciones de Suplementos Dietéticos y Alimenticios.\*

ASOCIACIONES	PAÍS	ENLACE
<b>NNFAJ</b> ( <i>National Nutritional Foods Association of Japon</i> ) - Asociación Nacional de Alimentos Nutritivos de Japón	Japón	<a href="mailto:Info@nnfajapan.com">Info@nnfajapan.com</a>
<b>CHC</b> ( <i>Complementary Healthcare Council</i> ) - Consejo para una Asistencia Médica Complementaria	Australia	<a href="mailto:chc@chc.org.au">chc@chc.org.au</a>
<b>SDCA</b> ( <i>Syndicat de la Diététique et des Compléments Alimentaires</i> ) - Sindicato de la Dietética y de Complementos Alimentarios	Francia	<a href="mailto:jlallain@alliance7.com">jlallain@alliance7.com</a>
<b>SYNADIET</b> ( <i>Syndicat National des Fabricants en Produits Diététiques, Naturels et Compléments Alimentaires</i> ) - Sindicato Nacional de Fabricantes de Productos Dietéticos, Naturales y Complementos Alimentarios	Francia	<a href="mailto:jacques.karlsson@synadiet.org">jacques.karlsson@synadiet.org</a>
<b>AHPA</b> ( <i>American Herbal Products Association</i> ) - Asociación Americana de Productos Herbarios	EUA	<a href="mailto:Ahpa@ahpa.org">Ahpa@ahpa.org</a>
<b>CRN</b> ( <i>Council for Responsible Nutrition</i> ) - Consejo para una Nutrición Responsable	EUA	<a href="mailto:webmaster@crnusa.org">webmaster@crnusa.org</a>
<b>NPA</b> ( <i>Natural Products Association</i> ) - Asociación de Productos Naturales	EUA	<a href="mailto:Natural@NaturalProductsAssoc.org">Natural@NaturalProductsAssoc.org</a>
<b>UNPA</b> ( <i>United Natural Products Alliance</i> ) - Alianza Unida para los Productos Naturales	EUA	<a href="mailto:loren@unpa.com">loren@unpa.com</a>
<b>CHFA</b> ( <i>Canadian Health Food Association</i> ) - Asociación Canadiense para los Alimentos Saludables	Canadá	<a href="mailto:Awilkie@chfa.ca">Awilkie@chfa.ca</a>
<b>EHPM</b> ( <i>European Federation of Associations of Health Product Manufacturers</i> ) - Federación Europea de Asociaciones de Fabricantes de Productos para la Salud.	Comunidad Europea	<a href="mailto:secretariat@ehpm.be">secretariat@ehpm.be</a>
<b>ERNA</b> ( <i>European Responsible Nutrition Alliance</i> ) - Alianza Europea para una Nutrición Responsable	Comunidad Europea	<a href="mailto:secretariat@erna.be">secretariat@erna.be</a>
<b>HFMA</b> ( <i>Health Food Manufacturers' Association</i> ) - Asociación de Fabricantes de Alimentos Saludables	Reino Unido	<a href="mailto:Hfma@hfma.co.uk">Hfma@hfma.co.uk</a>
<b>IHTA</b> ( <i>Irish Health Trade Association</i> ) - Asociación Irlandesa para el Comercio de Salud	Irlanda	<a href="mailto:Info@ihta.org">Info@ihta.org</a>

\* Organismo multinacional, fundado en 1998 (Bruselas, Bélgica), integrado por 58 asociaciones similares de diversos países. El objetivo esencial de esta organización es construir un marco legislativo armonizado para el desarrollo de esta clase de productos, coordinando estrategias y acciones en el marco regulatorio global, ligadas a las iniciativas del Codex Alimentarius.

Fuente: [www.hsias.org/updates/IADSAMarch2008Update.pdf](http://www.hsias.org/updates/IADSAMarch2008Update.pdf) (Actualizado: marzo, 2008).

## Anexo 7. Algunos hongos comestibles y productos derivados.

### *Lentinus edodes*:

De origen asiático, muy consumido tradicionalmente en Oriente (desde hace unos años también en Occidente). Es el segundo hongo comestible más cultivado del mundo. Contiene ácido linoleico, vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C y ergosterol (provitamina D). Se han aislado compuestos inmunomoduladores, antimicrobianos y reductores del nivel de lípidos tales como lentinano (500 kDa), LEM (extracto del micelio de *Lentinus edodes*), KS-2 y eritadina (Wasser, 2000). De ellos, el lentinano ha sido el compuesto más investigado, demostrándose sus propiedades antitumorales, las cuales han resultado superiores a otros polisacáridos fúngicos haciéndolo efectivo para algunos tipos de cáncer, especialmente el carcinoma colorrectal, ovárico y gástrico (Miles y Chang, 1999). En este último caso, se administra por vía endovenosa. También es usado para reducir la inmunotoxicidad provocada por la azidotimidina, fármaco utilizado en el tratamiento de portadores de HIV y enfermos de SIDA. El LEM es otro producto con categoría de medicamento (<http://www.cdeea.com/shitake.htm>).

### *Agaricus blazei*:

Inusualmente delicioso. Solía crecer salvaje y abundantemente en un poblado cerca de Sao Paulo (Brasil). Allí se le atribuían propiedades anticancerígenas y lo recomendaban para varios problemas geriátricos. En 1965, el Dr. japonés Takatoshi Furumoto, la colectó y envió las esporas a Japón (Huang, 1997) ocupando en la actualidad uno de los primeros lugares entre los más consumidos en ese país. Es consumido, prescrito y comercializado en el mundo entero naturalmente y bajo diferentes formas farmacéuticas (Camelini *et al.*, 2005). Según Wasser *et al.* (2002), *Agaricus brasiliensis* es el mismo *Agaricus blazei* que se cultiva ampliamente en Brasil (Ohno *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2002). Se ha concluido que el efecto inmunoestimulante y antitumoral es debido a la presencia del polisacárido 1,3/1,6-β-glucano altamente ramificado (Furukawa *et al.*, 2006). También se ha descubierto en esta seta la presencia de una sustancia antioxidante termoestable (ergotionina) cuya concentración supera en más de 12 y 4 veces la cantidad existente en el germen de trigo y el hígado de pollo (Partos, 2005).

### *Grifola frondosa*

Se han purificado diferentes fracciones con actividad antitumoral. Por ejemplo, el grifolano (aislado del micelio), la fracción D y la fracción MD, obtenida más recientemente. Se ha observado que estos compuestos presentan también un efecto hipocolesterolémico, antidiabético, hepatoprotector, antihipertensivo y en el caso de la fracción MD, un impacto positivo en la salud de pacientes con VIH (Schiff *et al.*, 2004).

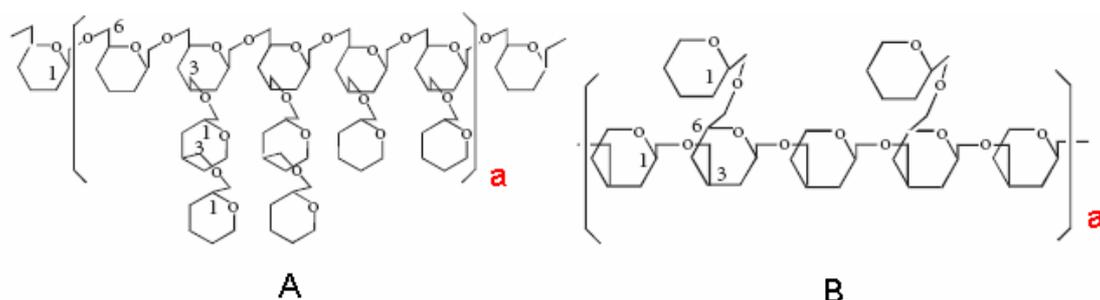


Figura 2. Ejemplos de β-glucanos con actividad inmunomoduladora: A) de *Grifola frondosa* (fracción D, 1000 kD) y B) de *Lentinus edodes* (lentinano, 500 kD) (modificado de Lull *et al.* 2005)

---

Anexo 8. Suplemento dietético derivado de hongos comestibles e información al consumidor.

**Producto:** Beta-glucanos de levadura, Shiitake y Maitake

**Composición** de una cápsula: 174 mg de beta-glucanos distribuidos de la siguiente forma:

- Extracto seco purificado de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) 200 mg, con una concentración del 70% de beta-glucanos (140 mg).
- Shiitake (*Lentinus edodes*) 50 mg, con una concentración del 31% de polisacáridos (15,5 mg).
- Maitake (*Grifola frondosa*) 50 mg, con una concentración del 37% de polisacáridos (18,5 mg).



**Presentación:** 60 cápsulas de 300 mg cada una

**Precio:** 32,00 € el frasco

**Observación:** Estimulante natural del sistema inmune.

En la lucha y prevención del cáncer mediante el método nutricional, se emplean los beta-glucanos para contrarrestar los efectos secundarios de la quimioterapia y para aumentar las defensas de nuestro organismo frente a infecciones oportunistas a consecuencia de la debilitación del sistema inmunitario. Contamos con diferentes fuentes que nos permiten obtener beta-glucanos de tipo 1,3 y 1,6 altamente concentrados y purificados para conseguir un máximo de eficacia y una acción sinérgica.

**Fabricación y Garantía de Calidad:** Este complemento alimenticio está fabricado por un laboratorio que cumple las normas BPP, de acuerdo con la normativa farmacéutica en vigor. Las normas BPP son las Buenas Prácticas de Producción de la Industria Farmacéutica Europea. El contenido en principios activos está garantizado por el método de análisis de la espectrometría de infrarrojos.

Cumple así mismo con la Norma ISO-9001, una norma de calidad internacional. Laboratorios independientes realizan de forma regular análisis de las materias primas y de los productos terminados.

**Consejos de uso:** De 1 a 2 cápsulas al día fuera de las comidas y según las indicaciones de su terapeuta. Para una mejor asimilación, asociar la toma con vitamina C, preferiblemente de origen natural (zumo de fruta).

**Precauciones:** En la ausencia de datos completos relativos a la inocuidad, no utilizar en caso de embarazo o lactancia. No sobrepasar la dosis diaria recomendada.

**Advertencias:** Este producto no puede sustituir a una alimentación equilibrada. En el caso de que se encuentre usted siguiendo un tratamiento médico, es preferible que consulte con su terapeuta. Uso exclusivo para adultos. No dejar al alcance de los niños.

Fuente: <http://www.anastore.com/es/articles/article.php>

Anexo 5. Hongos medicinales (la mayoría comestibles) utilizados tradicionalmente en la cultura oriental.



**Coriolus versicolor**  
(no comestible)



**Cordyceps sinensis**



**Auricularia auricula**



**Agaricus blazei**



**Agaricus bisporus**



**Coprinus comatus**



**Hericium erinaceus**



**Lentinus edodes**  
(Shiitake)



**Pleurotus ostreatus**



**Ganoderma lucidum**  
(Reishi)



**Polyporus spp.**



**Grifola frondosa**  
(Maitake)

Anexo 6. Diferentes Suplementos Dietéticos elaborados a partir de hongos comestibles medicinales.



**Grifola frondosa  
(maitake)**



**Betaglucano  
(de avena)**



**Betaglucano  
(de levadura)**



**Immune-Rx**



**4Life  
Transfer Factor**



**Agaricus blazei**



**IMMUTOL**



**Betaglucano  
(IMMUNITON NSC-24)  
Fórmula Original**



**Betaglucano  
(IMMUNITON NSC-24)  
(para el cuidado de los ojos)**



***INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS  
CENTRO DE TOXICOLOGIA Y BIOMEDICINA  
SANTIAGO DE CUBA***

***PERFIL FÁRMACO-TOXICOLÓGICO  
Hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*)***



## Introducción

El cultivo de setas comestibles es una actividad que se ha desarrollado desde hace más de 200 años y constituye una nueva opción para la alimentación, así como un reto para los cultivadores y promotores de setas. Los recursos genéticos de los hongos son de gran interés en la agronomía, la agricultura, la alimentación humana y animal, en el mejoramiento de las cosechas agrícolas, en el control biológico de los insectos, en la biorremediación y para la obtención y producción de moléculas o componentes con alto valor agregados en las industrias químicas y farmacéuticas <sup>1</sup>.

El basidiomiceto *Pleurotus sp* conocido popularmente como seta, es originario de Brasil y se cultiva en grandes proporciones en Japón y Tailandia por su contenido nutricional rico en proteínas. Es uno de los hongos de pudrición blanca más estudiado y su cultivo como seta comestible a nivel mundial se encuentra entre los más expandidos, por su facilidad para crecer sobre diferentes residuos agroindustriales, por lo simple de su tecnología de cultivo y por la calidad nutricional y organoléptica de su cuerpo fructífero <sup>2</sup>.

Los estudios que la ciencia ha realizado en estos últimos tiempos sobre el hongo ostra, han dejado sentado que es una especie masivamente cultivada con importantes aplicaciones medicinales, biotecnológicas, y medioambientales <sup>3, 4</sup>. Ha despertado gran interés entre la comunidad científica por el efecto beneficioso sobre nuestro organismo, ya que se le han reportado acción antitumoral, antibiótica, antifúngica, hipocolesterolémicas, antiinflamatorias, activador y modulador del sistema inmune, además de ser utilizado para tratamientos de cáncer y HIV <sup>5</sup>. No obstante se han reportado intoxicaciones locales esporádicas tras la ingestión de grandes cantidades de estas setas (hongos) <sup>6-</sup>  
10

## Clasificación taxonómica

**Reino:** Fungi

**División:** Basidiomycota

**Clase:** Homobasidiomycetes

**Orden:** Agaricales

**Familia:** Pleurotaceae

**Género:** *Pleurotus*

**Especie:** *Pleurotus ostreatus*

Otros nombres comunes:

Gírgola, Seta común, Seta de ostra, Orejón, Seta de chopo

## Descripción botánica

*Pleurotus* no presenta ni volva ni anillo tiene esporas blancas, se reconoce por la forma del sombrero a manera de abanico o de espátula, por las características laminillas decurrentes, así como también por la situación del pie, largo y excéntrico o incluso lateral, común a casi todas las especies de *Pleurotus* <sup>11,12</sup>.

Se presenta con un sombrero que, en realidad, es muy variable tanto en la forma como en el color. El sombrero de esta seta es redondeado, con la superficie lisa, abombada y convexa cuando es joven, aplanándose luego poco a poco. Su diámetro oscila entre 5 y 15 cm, dependiendo de la edad del hongo <sup>11</sup>.

En la parte inferior del sombrero hay unas laminillas dispuestas radialmente como las varillas de un paraguas, que van desde el pie o tallo que lo sostiene, hasta el borde. Son anchas, espaciadas unas de otras, blancas o crema, a veces bifurcadas, y en ellas se producen las esporas destinadas a la reproducción de la especie. El pie suele ser corto, algo lateral u oblicuo, ligeramente duro, blanco, con el principio de las laminillas en la parte de arriba y algo peloso en la base. Pueden crecer de forma aislada sobre una superficie horizontal o en grupo formando repisas laterales superpuestas sobre un costado de los árboles <sup>11,12</sup>.

El color es variable, desde gris claro o gris pizarra hasta pardo, tomando una coloración más amarillenta con el tiempo. No obstante el color marfil los caracteriza frecuentemente. Se perfuma según el lugar donde crece, teniendo siempre un olor fino y agradable. La carne de la seta es blanca, de olor algo fuerte, tierna al principio y después correosa <sup>11</sup>.

## Hábitat y distribución:

Es originario de Brasil y se cultiva en grandes proporciones en Japón y Tailandia <sup>2</sup>. Es parásito de otras plantas y presenta un gran crecimiento sobre madera. Crece sobre troncos de distintos árboles, preferentemente sobre robles y hayas en grupos numerosos, además de tocones de árboles de hoja caduca, álamos, chopos y nogales <sup>13</sup>. Es una especie que se caracteriza por tener una estación de crecimiento que se inicia en el otoño; se puede encontrar incluso en invierno creciendo en troncos de planifolios, tanto vivos como muertos <sup>11</sup>. En general los *Pleurotus sp* son cosmopolitas encontrándose presentes en todos los continentes <sup>14</sup>.

## Análisis fitoquímico:

Se han aislado de este hongo compuestos químicos como el ácido tricolómico y *Ostreolisina*. Contiene todos los aminoácidos esenciales (rico en lisina y leucina), vitamina C, vitaminas del complejo B (Tiamina, Riboflavina) y minerales (Potasio, Fósforo, Sodio), ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico. Contienen cantidades relativamente altas de carbohidratos.

### **Composición nutricional:**

Por cada 100 gramos de la parte comestible contienen:

<b>COMPUESTO</b>	<b>CANTIDAD</b>
Proteínas (en peso seco)	10-30%
Carbohidratos	14-57%
Lípidos (en peso seco)	3-5%
ácido oleico	56 %
ácido palmítico	16 %
ácido esteárico	24 %
Tiamina	4,8-7,8 mg
Riboflavina	4,7-4,9 mg
Niacina	55-109 mg
Vitamina C	36-58 mg
Fósforo	1,34 mg
Potasio	3,70 mg
Sodio	838 mg

Fuente: Propiedades nutricionales de las setas de *Pleurotus ostreatus*. Disponible en:

<http://micoterapia.blogspot.com/Propiedades%20nutricionales%20de%20las%20setas%20de%20Pleurotus%20ostreatus>.

### **Propiedades farmacológicas reportadas**

#### *Usos tradicionales (Propiedades atribuidas)*

El consumo frecuente de este hongo es como alimento, con gran valor nutricional y útil en la prevención de las enfermedades que comúnmente ocasionan las dietas inadecuadas. Es reconocido como un alimento funcional, pues además de poseer excelentes cualidades nutricionales, aporta beneficios adicionales para la salud <sup>15, 16</sup>.

Por este motivo es empleado comúnmente en México, donde existe un gran interés en su producción <sup>16</sup>. Este tipo de hongo contiene una apreciable cantidad de carbohidratos que no son del tipo de los almidones (los que engordan). Su contenido de fibra dietética, es también alto, sobretodo de quitina, un polisacárido con propiedades excepcionales en cuanto a que puede absorber fácilmente las grasas en el tracto digestivo. Muchas empresas de productos naturistas y dietéticos comercializan la quitina y sus derivados como el quitosán como productos muy efectivos para evitar la obesidad ocasionada por la absorción de grasas <sup>15, 16</sup>.

También tienen una moderada cantidad de proteína de alta calidad, con todos los aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales, por lo que se podría clasificar a las setas de *Pleurotus ostreatus* junto con las verduras más nutritivas, justo por debajo de las carnes. Poseen un alto contenido de ergosterol, el cual es transformado en vitamina D por acción de los rayos de luz UV al ser deshidratados al sol. Por lo que las setas deshidratadas de esta forma, son empleadas como una buena fuente de esta vitamina, muy importante para la absorción de calcio, sobretodo del fosfato de calcio fundamental para el buen desarrollo de huesos y dientes. Los contenidos de ácido ascórbico

elevados, constituyen una buena fuente de antioxidantes y agentes reductores para el uso de medicamentos y complementos nutricionales, los cuales pueden ser utilizados en el tratamiento del escorbuto, la diabetes, hipoglucemia, cáncer, etc <sup>15, 16</sup>.

Existen referencias antiguas, donde se reporta a los *Pleurotus* como hongos cuyas propiedades pueden utilizarse para disipar los enfriamientos, relajar los tendones y las venas, su parte útil son los cuerpos fructíferos, los cuales tienen un sabor dulzón y suave textura. De acuerdo con la sabiduría oriental, las setas previenen la hipertensión y la aterosclerosis. Proporcionan longevidad y vigorizan el organismo, ayudando a las personas a recuperarse de la fatiga, previenen las crudas después de la borrachera, evitan el estreñimiento, y por supuesto fortalecen las capacidades sexuales <sup>16, 17</sup>.

En México y parte de Centroamérica, también se ha reportado el uso de algunas especies de *Pleurotus*, con fines terapéuticos, entre estas especies se han reportado las siguientes: *Pleurotus smithii*, *P. Ostreatoreosus* y *P. ostreatus*, se menciona el uso de estos hongos para el tratamiento de la hipertensión, como diurético, en la reducción del colesterol y como afrodisíaco <sup>16, 17</sup>.

#### *Propiedades farmacológicas demostradas:*

En el campo de la medicina y terapéutica se reporta que posee acción antitumoral, antibiótica, antifúngica, hipocolesterolemicas, antiinflamatorias, activador y modulador del sistema inmune. Han sido utilizados ampliamente para tratamientos de cáncer y HIV <sup>5, 18</sup>. Otras experiencias y estudios, señalan algunas propiedades muy favorables a la salud humana, en la lucha contra la obesidad, el colesterol y estados de hipertensión <sup>5</sup>. Estas aplicaciones terapéuticas generalmente se le atribuyen a la presencia de polisacáridos (Pleuran→ ( $\beta$ -1,3- y  $\beta$ -1,6-glucano)) contenidos en la pared celular de este hongo, los cuales tienen una gran capacidad de combatir una amplia gama de afecciones.

#### Efecto antitumoral

Las propiedades demostradas en investigaciones de hongos con fines medicinales se ha centrado fundamentalmente en los polisacáridos que se encuentran en su pared celular conocidos como  $\beta$ -1,3- y  $\beta$ -1,6-glucanos. Los polisacáridos de setas, han demostrado efectos anticarcinogénicos en animales y seres humanos. Aunque el mecanismo de su acción antitumoral todavía no está totalmente claro, éstos  $\beta$ - glucanos parecen mediar su actividad antitumoral por la activación o el aumento del sistema inmune, activando los leucocitos y la producción de los citoquinas inflamatorias <sup>19</sup>.

La inmunopotenciación por glucanos han demostrado actividad antitumoral significativa *in vitro*. Los receptores Glucano-específicos están presentes en las membranas de células fagocíticas de varias especies y se ha descrito una potente activación *in vitro* de la función del neutrófilo, incluyendo un aumento de la fagocitosis <sup>20, 21</sup>. Estos glucanos no son tóxicos para las células neoplásicas, sino que suprimen su desarrollo estimulando el sistema inmune. Los  $\beta$ -D-glucan estimulan localmente la división y diferenciación de linfocitos T y B, y también activan otras células, entre ellas los macrófagos y granulocitos <sup>22</sup>. Se ha estudiado el mecanismo por el cual los polisacáridos de setas enteras y compuestos de setas aislada pueden ejercer efectos antitumorales, y la evidencia indica que pueden estar potenciado el número de células y sus funciones en el sistema inmune, incluyendo macrófagos, células asesinas naturales, y varias células T <sup>23</sup>.

Estos polisacáridos contenidos en *Pleurotus ostreatus*, se les ha encontrado una importante capacidad antitumoral, es decir, se ha comprobado a nivel laboratorio que estas sustancias son capaces de retardar y disminuir el tamaño de algunos tipos de tumores, además de prevenir la formación de estos. Seguramente el mecanismo consiste en que estos polisacáridos actúan como potenciadores de las células de defensa que posteriormente destruyen las células cancerosas sin ocasionar efectos colaterales al enfermo <sup>16</sup>. Sin embargo, en experiencias con animales, los  $\beta$ -glucanos han demostrado que su actividad es variada contra sarcomas, cáncer mamario, algunos cánceres químicamente inducidos, adenocarcinoma, cáncer de colon y algunas leucemias. Además, los efectos antitumoral de los  $\beta$ -glucanos naturales parecen absolutamente bajos. Para mejorar su actividad, algunos investigadores han producido glucanos químicamente modificados y se han patentado para este uso, como el obtenido por Tanaka por diacetilación de  $\beta$ - glucanos extraídos de setas <sup>24</sup>.

#### Efectos antivirales:

Los mismos mecanismos que estimulan el sistema inmune del organismo, actúan de la misma manera para combatir algunos agentes infecciosos, tanto virales como bacterianos, el hecho de que se puedan activar mediante estos polisacáridos ciertos sistemas de defensa puede contribuir como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades de deficiencia inmunológica como el SIDA, y otras enfermedades de origen autoinmune como la Artritis reumatoide o el Lupus <sup>25</sup>. Se ha encontrado que el micelio del *Pleurotus* contiene una mezcla de diferentes polisacáridos de bajo peso molecular y sustancias similares a la Zeatina, las cuales contienen citoquinina, estas son sustancias similares a fitohormonas que se sabe tienen efectos antivirales y que no causan efectos colaterales ni toxicidad en pacientes enfermos <sup>25</sup>. El alto contenido del ácido glutámico en muchos hongos comestibles, que es un aminoácido que se sabe tiene un efecto estimulante del sistema inmunológico, se encuentra en concentraciones particularmente altas en las setas y en una forma natural del glutamato monosódico es una sal que se utiliza para dar realce a diferentes tipos de alimentos y platillos.

#### Efecto antiinflamatorio:

Tienen también propiedades antiinflamatorias, se han hecho investigaciones en donde se aislaron glicopéptidos (lectinas) que contienen aminoácidos ácidos con glucosa, arabinosa, galactosa, manosa, y xilosa, en la cadena de carbohidratos, con excelente capacidad fungicida y antibiótica, estos componentes han sido aislados tanto del micelio como de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* <sup>25</sup>. Se ha reportado que estas sustancias han sido útiles en el control de algunas enfermedades de las plantas.

Otras importantes sustancias con actividad antibiótica son los componentes aromáticos volátiles que caracterizan a la mayoría de las especies de *Pleurotus* o Setas, estos son componentes de 8 carbonos en su estructura molecular, y son las moléculas que originan el aroma y sabor característico que distingue a este tipo de hongos, estas sustancias han demostrado tener una fuerte capacidad antibacteriana y por tanto antiinflamatoria contra diferentes tipos de agentes infecciosos <sup>16</sup>.

### Control del colesterol:

Los (1,3) $\beta$ -D – glucanos, son fibras dietéticas solubles presentes en las setas de *Pleurotus ostreatus*, con elevados beneficios para la salud, que incluye disminución del colesterol de la sangre<sup>26-28</sup>. Estos polisacáridos ayudan a reducir los factores de riesgo para enfermedades degenerativas, tales como obesidad<sup>29</sup>, hiperlipidemia<sup>30-32</sup>, hipercolesterolemia<sup>33,34</sup>, y enfermedades cardiovasculares<sup>35</sup>.

Se ha demostrado a nivel experimental con ratas de laboratorio que el consumo frecuente de setas disminuye el nivel de ácidos grasos en sangre y el colesterol en el hígado, por otro lado en estos experimentos se detectó un aumento en la relación fosfolípidos-colesterol lo cual sugiere un efecto antiaterogénico favorable, es decir que puede ayudar a prevenir el endurecimiento de las arterias y como consecuencia la prevención de posibles enfermedades cardiovasculares lo cual también podría ocurrir en seres humanos<sup>36</sup>.

Resultados de un número de ensayos a doble-ciego con  $\beta$ -glucan derivados de la avena o levadura indican reducciones típicas (el 10% para el colesterol total y el 8% para el colesterol de LDL ("malo")), con elevaciones en el colesterol de HDL ("bueno") que se extiende a partir de cero hasta el 16%<sup>28, 37, 38</sup>.

Por otro lado, en los cuerpos fructíferos del *Pleurotus ostreatus*, se ha encontrado en forma natural una sustancia que baja el colesterol, los triglicéridos y las lipoproteínas de muy baja densidad de la sangre de nombre Lovastatin o Lovastatina cuyo uso ha sido aprobado en los Estados Unidos por la FDA y que se utiliza como principio activo de diferentes medicamentos recetados comúnmente por los médicos para el tratamiento de la hipercolesterolemia, el más conocido de estos es el Mevacor<sup>39</sup>. Por otro lado, las setas contienen también Mevinolin y otras sustancias relacionadas que son potentes inhibidores de la HMG CoA reductasa principal enzima responsable en la biosíntesis del colesterol<sup>39</sup>.

### Efecto inmunoestimulante

En años recientes, se ha prestado una atención creciente a varios tipos de polisacáridos inmunomoduladores aislados de las paredes celulares de hongos y de levaduras. Una variedad amplia de polisacáridos de setas se han descrito como modificantes de la respuesta biológica<sup>40, 41</sup>, actuando a través de los mecanismos mediados por el sistema inmune, incluyendo el estímulo de funciones no específicas de la misma. Estos efectos estimulantes, ejercen un efecto beneficioso sobre una variedad de estados experimentales de enfermedades de origen bacteriano, viral, micótico, y parasitario<sup>42</sup>. En este contexto, se le atribuye este efecto a los  $\beta$ -glucanos contenidos en la pared celular<sup>42, 43</sup>. Este polisacárido ha demostrado que posee actividad fagocitaria<sup>44</sup>, actividad citotóxica en macrófagos, y otras actividades biológicas<sup>42, 45</sup>.

Existen muchas controversias alrededor de los principios bioquímicos y moleculares de la actividad inmunostimuladora de los  $\beta$ -glucanos. Según algunos informes<sup>46</sup>, un alto peso molecular, una triple hélice<sup>47, 48</sup>, y un patrón de ramificación con  $\beta$ -(1,6) son parámetros estructurales esenciales, mientras que otros autores sugieren las hélices simples<sup>49, 50</sup>. Por otra parte, se ha demostrado que la actividad de inmunopotenciación<sup>51</sup>, no exhibe este patrón de ramificación.

Otros estudios llegaron a la conclusión que las estructuras helicoidales no son esenciales ni incluso ventajosas para la actividad inmunológica de los  $\beta$ - glucanos <sup>52</sup>. Demleitner *et al.* reportó que el tipo del acoplamiento  $\beta$  -(1,3)-glicosídico es el requisito más importante para la actividad <sup>53</sup>. Un estudio sugiere que la hélice simple sea más potente que la hélice triple como agente antitumoral <sup>51</sup>. En cualquier caso, la expresión de la actividad inmunológica presupone interacciones directas entre el polisacárido y los macrófagos u otras células de los sistemas biológicos estudiados <sup>51, 52</sup>. Estas interacciones son dependientes en los parámetros estructurales y moleculares de  $\beta$ -glucanos solubles.

#### Efecto hepatoprotector:

En otros experimentos que se realizaron con ratas de laboratorio a las que se suministró setas deshidratadas en un 2%, con una dieta rica en grasa, durante 6 meses, se demostró que lograron bajar los niveles de colesterol y triglicéridos en un 65-80%, en comparación con las ratas control. A nivel histológico se encontró que el depósito de grasa en el hígado era mucho menor con lo que se puede hablar también de un efecto hepatoprotector. Este efecto fue probado posteriormente en ratas sometidas a una dieta con alcohol etílico, y el resultado de los estudios demostró en las ratas que consumieron *Pleurotus* (setas) lograron una protección de la estructura hepática de hasta el 40% <sup>16,17</sup>.

#### Efecto antihipertensión:

Además de que la disminución del contenido de colesterol en el plasma sanguíneo por si solo tiende a hacer que la presión arterial disminuya, se sabe también que una dieta rica en potasio puede ayudar a disminuir la hipertensión arterial, casi todos los hongos comestibles son ricos en este mineral y las setas no son ninguna excepción. También se ha demostrado que la ingesta de setas, permite una mejor absorción de minerales a nivel intestinal, esto debido a la presencia de metaloproteínas <sup>15-17</sup>.

#### Efecto antioxidante:

Los hongos de la pudrición blanca, a los que pertenecen los *Pleurotus*, poseen sustancias con propiedades antioxidantes, por lo que pueden constituir una fuente potencial de bio-antioxidantes, o de preparaciones complejas con propiedades antioxidantes <sup>15-17</sup>.

### **Estudios farmacológicos reportados.**

#### *Estudios farmacológicos reportados en animales de experimentación.*

Se realizó un estudio para investigar la actividad antioxidante del *Pleurotus ostreatus* en ratas Wistar machos a las que se les indujo daño hepático con tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>). Cuando las ratas con hepatotoxicidad inducida por CCl<sub>4</sub> fueron tratadas con el extracto del *Pleurotus ostreatus* los niveles de transaminasas (TGO, TGP) y de fosfatasa alcalina se invirtieron a casi valores normales, mientras que la concentración hepática de glutatión reducido (GSH), catalasa, superóxido dismutasa, y glutatión peroxidasa fueron aumentados perceptiblemente (p<0.05) comparado a las ratas expuestas al CCl<sub>4</sub>. Los estudios histopatológicos confirmaron el efecto hepatoprotector que

confirió el extracto del *P. ostreatus*. Estos resultados sugieren que un extracto del *P. ostreatus* puede aliviar perceptiblemente la hepatotoxicidad inducida por CCl<sub>4</sub> en la rata <sup>54</sup>.

Otro estudio realizado en ratas envejecidas refiere que el extracto de este hongo puede mejorar el estado antioxidante durante el envejecimiento, reduciendo al mínimo la ocurrencia de los desórdenes asociados a la edad provocados por los radicales libres <sup>55</sup>.

Se reporta además que el  $\beta$ -glucano aislado del *P. ostreatus* evidencia diversos efectos sobre el sistema inmune en ratones. La administración de dicha sustancia en diversos sitios estimuló perceptiblemente la respuesta de hipersensibilidad retardada. El aumento en actividad fagocitaria por los leucocitos de la sangre comenzó en la 1ra semana después del tratamiento con el  $\beta$ -glucano aislado de este hongo. Los valores del índice de la actividad fagocítica fueron influenciados perceptiblemente solamente después de la inyección del  $\beta$ -glucano. Los resultados del estudio indican que el  $\beta$ -glucano extraído del *Pleurotus ostreatus*, podría emplearse como una sustancia inmunomoduladora <sup>56</sup>. En una investigación reciente en Cuba <sup>57</sup>, se reportó que efectos de la administración endovenosa a dosis única (100 mg/kg) de un extracto acuoso (F-I) del micelio de *Pleurotus spp* obtenido por cultivo sumergido, sobre la hemopoyesis y el sistema fagocítico mononuclear (SFM) en ratones Balb/c. Los resultados evidenciaron una estimulación bifásica de la hemopoyesis medular con máximos a las 24 h y 12 días, un comportamiento trifásico del conteo total de leucocitos a las 12 h, 3 y 12 días, así como un incremento de celularidad del bazo en el período de 6-12h, con relación al grupo control, tratado con solución salina fisiológica. La actividad del SFM a las 48h también fue potenciada, reflejado en la disminución del tiempo de vida media del carbón coloidal y un incremento del índice fagocítico en el grupo administrado con F-I. Según el estudio, la modulación de la hemopoyesis y la activación del SFM por la administración endovenosa de F-I, podría estar relacionada con la presencia de  $\beta$ -D-glucanos. No se evidenció toxicidad, sólo se detectó un aumento en el peso relativo de los órganos relacionados con el SFM (bazo, hígado y pulmones). Los resultados sugieren que F-I es capaz de activar mecanismos de la inmunidad innata. Su conocimiento es de interés en la búsqueda de opciones terapéuticas para pacientes inmunodeprimidos, y para el tratamiento del cáncer <sup>57</sup>.

## Estudios reportados en humanos

Se ha postulado que la seta posee un efecto beneficioso al disminuir los niveles de glucosa y colesterol en sangre en pacientes diabéticos. Se realizó un estudio donde se determinó que el *Pleurotus ostreatus* redujo perceptiblemente la glucosa en sangre, la presión arterial, triglicéridos y el colesterol de pacientes diabéticos sin ningún efecto deletéreo sobre el hígado y el riñón <sup>58</sup>.

## Estudios toxicológicos reportados

Se ha informado sobre un estudio donde se evaluó la actividad mutagénica de *Pleurotus ostreatus*. Los resultados del análisis del extracto no mostraron actividad mutagénica en el test de Ames, ni en las células de mamífero CHO-K1. No obstante en los extractos del *Pleurotus ostreatus* se observó una actividad mutagénica débil en el ensayo de CHO/HPRT en la presencia de un sistema de activación metabólico (S-9) <sup>59</sup>. Por otro lado, Delaney y colaboradores <sup>60</sup> evaluaron el potencial genotóxico de preparaciones concentradas de  $\beta$ -glucano, empleando el test de micronúcleos en ratones. Se obtuvo que en el nivel de dosis límite de 2000 mg/kg de peso corporal no se observa

toxicidad evidente. Al comparar los ratones tratados con aceite de maíz con los ratones tratados con 2000 mg/kg de  $\beta$ -glucano concentrado, se manifestó que la incidencia de MPE no fue estadísticamente diferente en 24 o 48 h después de la exposición. En contraste, en los ratones tratados con Mitomicina C, la incidencia de MPEs fue perceptiblemente más alta comparada al control negativo. La incidencia del MPEs en el nivel de dosis más alto no fue perceptiblemente diferente de las observadas en los controles negativos, indicando que preparaciones concentradas de  $\beta$ -glucano no causaron citotoxicidad<sup>60</sup>.

En una evaluación toxicológica a dosis repetida en ratones CD 1 a un alimento concentrado de  $\beta$ -glucano, no se observó evidencias de toxicidad en los signos clínicos, parámetros hematológicos, pesos de los órganos, e inmunopatología (el análisis histopatológico se centró en órganos del sistema inmune) de los ratones que consumieron la cebada concentrada con  $\beta$ -glucano por 28 días o después del período de recuperación. Los resultados de este estudio demostraron que el consumo de cebada concentrada con  $\beta$ -glucano no causa efectos inflamatorios u otros efectos adversos en los ratones CD-1<sup>61</sup>.

Debido a que el (1,3)- $\beta$ -D-glucano se une a receptores específicos en células fagocíticas, e induce cambios en su metabolismo, estudios disponibles sugieren que estos cambios se expresen como alteraciones de los mecanismos de defensa<sup>62</sup>. Un estudio informó que la inhalación de (1,3)- $\beta$ -D-glucano causa en seres humanos, síntomas en el tracto respiratorio alto (alergia y asma) e inducción de citoquinas. Se han descrito relaciones entre la cantidad de (1,3)- $\beta$ -D-glucano y el grado de síntomas respiratorios, así como cambios en la función pulmonar y marcadores inflamatorios<sup>62</sup>. En la vista de los mecanismos implicados en el desarrollo normal del sistema inmune, los niños parecen ser un grupo de riesgo particular en la exposición (1,3)- $\beta$ -D-glucano<sup>62</sup>. Ljungman y colaboradores<sup>63</sup>, notificaron que los  $\beta$ -glucanos por su potente capacidad para inducir reacciones inflamatorias no específicas, desempeñan un papel importante en los síntomas respiratorios bioaerosol-inducidos, observados en ambientes ocupacionales y residenciales. Se estudio la capacidad de (1,3)-  $\beta$ -D-glucano para estimular la generación de óxido nítrico y la expresión de mRNA de citoquinas en macrófagos alveolares de ratas (AMs) y macrófagos murinos. La exposición a (1,3)-  $\beta$ -D-glucano (20, 100 and 500 mg/ml) indujo un aumento dosis-dependiente en la expresión del mRNA sintetasa de óxido nítrico y la síntesis de óxido nítrico en ambos medios celulares. La expresión del mRNA de otros mediadores inflamatorios tales como interleukin-1b, interleukin-6, factor de necrosis tumoral y cyclooxygenase-2 también fue aumentada en la exposición al  $\beta$ -glucano. La capacidad de (1,3)-  $\beta$ -D-glucano (500 mg:ml) para inducir la síntesis del mRNA de estos mediadores son comparables al de la endotoxina (1 mg/ml). Estos resultados implican que (1,3)-  $\beta$ -D-glucano estimula la generación de óxido nítrico, citoquinas y de prostaglandinas en macrófagos y sugiere la posibilidad que éste puede contribuir a los síntomas respiratorios bioaerosol-inducidos vistos en individuos expuestos<sup>63</sup>.

Se ha reportado también intoxicaciones locales esporádicas luego de la ingestión en animales y humanos de grandes cantidades de hongo ostra fresco, lo que sugiere su toxicidad está asociada moléculas de proteínas termolábiles<sup>7</sup>. Bernheimer y Avigad en 1979 revelaron que *Pleurotus ostreatus* produce una proteína la cual fue hemolítica para eritrocitos de mamíferos<sup>6</sup>.

Además se han realizado estudios de toxicidad aguda en ratones<sup>64</sup>, por vía oral e intraperitoneal, de las setas comestibles de *Pleurotus ostreatus*. El examen de los órganos disecados reveló

hemorragias en el intestino, el hígado, el pulmón y el riñón. El examen histopatológico reveló cambios significativos principalmente en el hígado, que tomó la forma de inflamación y de microabscesos. Estos resultados coinciden con los resultados clínicos disponibles después de la ingestión humana y animal de esta seta en Iraq <sup>64</sup>.

Se extrajo la Ostreolisina (proteína acidica de 15 kDa) de *Pleurotus ostreatus* y se inoculó en ratones, registrándose un aumento de la presión arterial segundos después de su administración, posteriormente se obtuvo una caída de la presión acompañada de bradicardia, isquemia miocárdica y extrasístole ventricular. Se infiere que la Ostreolisina indujo lisis de los eritrocitos de las ratas in vitro e in vivo por incremento de potasio serico. No obstante la acción directa de esta proteína en la circulación coronaria no debe ser excluida, la hiperkalemia resultante de su actividad hemolítica probablemente desempeña un rol importante en su toxicidad. La acción letal y toxicidad cardiorrespiratoria de esta proteína muestran que puede ser la causa de los efectos adversos reportados del *Pleurotus ostreatus* <sup>65</sup>.

Por otro lado, fueron estudiados por Rebolj K, et al en el año 2007 los efectos de la Ostreolisina in vivo e in vitro, y se obtuvo que se induce un incremento de la presión arterial y citotoxicidad en cultivos celulares <sup>66</sup>. Estos efectos pueden contribuir a interpretar los efectos cardiotóxicos que se reportan.

### **Otros estudios reportados**

Recientes investigaciones han caracterizado la Ostreolisina extraída del *Pleurotus ostreatus* de acuerdo a sus transiciones conformacionales asociadas a sus características funcionales (unión a membranas, actividad hemolítica en las vesículas lipídicas). Se obtuvo que a 25 °C y pH entre 6 - 9, el ostreolisina adoptó una conformación monomérica y termodinámica estable, caracterizada por la estructura terciaria rígida. Con pH entre 2-3, la proteína experimentó una transición irreversible con deformación de su estructura terciaria. Los estudios demostraron que, el estado nativo compacto era necesario para la unión de las vesículas lipídicas, donde su rango óptimo de pH es a partir de 6 a 7, y para la formación y hemólisis del poro, máximo entre pH 7 y 8 <sup>67-71</sup>.

También, otros autores reportan sobre la interacción de la Ostreolisina con las membranas lipídicas y la modulación de lisofosfolípidos. Se comparó sus efectos sobre las células mamíferas, en las vesículas preparadas con los lípidos puros o los extractos totales del lípido, y en dispersiones de lisofosfolípidos o de ácidos grasos. En concentraciones nanomolares, la proteína provocó la lisis de eritrocitos humanos y bovinos por un mecanismo coloide-osmótico, compatible con la formación de poros del diámetro de 4 nm, y era citotóxica a las células mamíferas del tumor. Una búsqueda para los inhibidores del lípido de la hemólisis reveló un efecto fuerte de lisofosfolípidos y de ácidos grasos, ocurriendo debajo de su concentración micelar crítica. Este efecto era distinto de la capacidad de la Ostreolisina de unirse y permeabilizar las membranas del lípido. En hecho, el permeabilización de vesículas ocurrió solamente cuando fueron preparadas con los lípidos extraídos de eritrocitos, y no con los lípidos extraídos del *Pleurotus ostreatus* o de mezclas puras de lípido, incluso si los lisofosfolípidos o los ácidos grasos eran incluidos. Interacción con las vesículas del lípido, y su permeabilización, correlacionado con un aumento en la fluorescencia intrínseca y el contenido alfa-helicoidal de la proteína, y con la agregación, que no fueron detectadas con los lisofosfolípidos. Aparece que un aceptador desconocido del lípido o un complejo específico del

lípidos está requerido para unir, la agregación y la formación del poro. El efecto inhibitorio de lisofosfolípidos puede reflejar un papel regulador de estos componentes en la acción fisiológica del Ostreolisina y de proteínas relacionadas<sup>69</sup>.

## Referencias Bibliográficas

1. Labarere J, Menini U. Characterization, Conservation- evaluation and utilization of mushroom genetic resources for food and agriculture. Bondeaux. France. 2000.
2. Sánchez JE, Royse J. La biología y el cultivo de *Pleurotus sp.* ECOSUR /LIMUSA, México. 2002.
3. Kues U, Liu Y. Fruiting body production in basidiomycetes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2000; 54 (2): 141–152.
4. Cohen R, Persky L, Hadar Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002; 58 (5): 582–594.
5. Brizuela MA, García L, Pérez L, Mansur M. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Rev Iberoam Micol, 1998; 15: 69-74.
6. Bernheimer AW, Avigad LS. Cytolytic protein from the edible mushroom, *Pleurotus ostreatus*. Biochim. Biophys. Acta. 1979; 585 (3): 451–461.
7. Al-Deen IH, Twaij HA, Al-Badr AA, Istarabad TA. Toxicologic and histopathologic studies of *Pleurotus ostreatus* mushroom in mice. J. Ethnopharm. 1987; 21 (3): 297–305.
8. Schachter EN, Zuskin E, Goswami S, Castranova V, Arumugam U, Whitmer M, et al. Pharmacological study of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) extract on isolated guinea pig trachea smooth muscle. Lung 2005; 183 (1): 63–71.
9. Sepcvić K, Berne S, Potrich C, Turk T, Macvek P, Menestrina G. Interaction of ostreolysin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, with lipid membranes and modulation by lysophospholipids. Eur. J. Biochem. 2003; 270 (6): 1199–1210.
10. Sepcvić K, Berne S, Rebolj K, Batista U, Plemenitas A, Sentjurc M, Macvek P. Ostreolysin, a pore-forming protein from the oyster mushroom, interacts specifically with membrane cholesterol-rich lipid domains. FEBS Lett. 2004; 575 (1–3): 81–85.
11. Guzmán G, Mata G, Salmenes D, Soto V, Guzmán D. El cultivo de los hongos comestibles. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. 1993; 32(5): 21–45.
12. *Pleurotus*. Disponible en: <http://www.fichas.infojardin.com/hortalizas-verduras/pleurotus-girgola-seta-comun-ostra-hongos-ostras.htm> -. [consulta 15 marzo 2008].

13. Pleurotus ostreatus. Disponible en: [www.telecable.es/personales/jmmm1/MICOLOGIA/pleurotus\\_ostreatus.htm](http://www.telecable.es/personales/jmmm1/MICOLOGIA/pleurotus_ostreatus.htm). [consulta 15 marzo 2008].
14. Gunde N, Plemenitas A. Hypocholesterolemic activity of the genus *Pleurotus*. Perspectives of medicinal mushroom in healthcare and nutrition in the 21<sup>st</sup> Century. 12-14 september Kiev, Ukraine. Abstract in International Journal of medicinal Mushroom. 2001; 3(2-3): 91.
15. Gunde N, Cimerman N. Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (Agaricales s.l., Basidiomycetes). Int J of Med Mushrooms. 1999; 1(1):69-80.
16. Yañez E. Propiedades medicinales y nutrimentales de los hongos comestibles. Disponible en: <http://micoterapia.blogspot.com/2006/10/propiedades-medicinales-y.html>. [Última actualización: 26 Octubre 2006]. [consulta: 15 marzo 2008].
17. Guzman, G. Genus *Pleurotus* (Jacq.:Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): Diversity, Taxonomic Problems, and Cultural and Traditional Medicinal Uses. Int J of Med Mushrooms. 2000 ; 2(2): 95-123.
18. Beelman RB, Royse D, Chikthimmah N. Bioactive Components in *Agaricus Bisporus* (J. LGE) Imbach of Nutritional, Medicinal, or Biological Importance. Int. J. of Medicinal Mushrooms. 2003; 5: 321-337.
19. Xiao Z, Trincado CA, Murtaugh MP. b-Glucan enhancement of T279 cell IFN-gamma response in swine. Vet Immunol Immunopathol 2004; 102: 315-320.
20. Couso N, Castro R, NoyaM, Obach A, Lamas J. Location of superoxide production sites in turbot neutrophils and gilthead seabream acidophilic granulocytes during phagocytosis of glucan particles. Dev Comp Immunol 2001; 25: 607-18.
21. Chen D, Ainsworth AJ. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. J Fish Dis 1992; 15(4): 295-304.]
22. Chihara G. (1987) Antitumor and metastasis-inhibitory activities of Lentinan as an immunomodulator: an overview. Cancer Detect. Prev. 1, 423-443.).
23. Borchers AT, Keen CL, Gershwin ME. (2004) Minireview: Mushrooms, tumors and immunity: an update. Proc Soc Exp Biol Med. 229, 393-406.).
24. Tanaka, T.: JP2004010605 (2004).
25. Noda-Shokkin. A preparation for kidney treatment possessing antiinflammatory activity, obtained from Basidiomycetes, e.g. *Lentinus*, *Pleurotus*, *Flammulina*, and *Tricholoma*. Patent JPJ 61171428 (1986).

26. Kahlon TS, Chow FI, Knuckles BE, Chiu MM. Cholesterol lowering in hamsters of  $\beta$ -glucan-enriched barley fraction, dehulled whole barley, rice bran, and oat bran and their combinations. *Cereal Chem* 1993; 70: 435-440.
27. Newman RK, Klopfenstein CF, Newman CW, Guritno N, Hofer PJ. Comparison of the cholesterol lowering properties of whole barley, oat bran and wheat red dog in chicks and rats. *Cereal Chem* 1992; 69: 240-244.
28. Behall KM, Scholfield DJ, Hallfrisch J. Effect of beta-glucan level in oat fiber extracts on blood lipids in men and women. *J Am Coll Nutr* 1997; 16:46-51.
29. Bourdon I, Yokoyama W, Davis P, *et al.* Postprandial lipid, glucose, insulin, and cholecystokinin responses in men fed barley pasta enriched with beta-glucan. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:55-63.
30. Pick ME, Hawrysh ZJ, Gee MI. Oat bran concentrate bread products improve long-term control of diabetes: a pilot study. *J Am Diet Assoc* 1996; 96: 1254-61.
31. Burley VJ, Leeds AR, Bundell JE. The effect of high and low fibre breakfast in hunger satiety, and food intake in a subsequent meal. *Int J Obesity* 1987; 11: 87-93.
32. Jenkins DJA, Wolever TMS, Kalmusky J, *et al.* Low glycaemic index carbohydrate foods in the management of hyperlipidaemia. *Am J Clin Nut* 1985; 42: 604-617.
33. Maki KC, Davidson MH, Ingram KA, Veith PE, Bell M, Gugger E. Lipid responses to consumption of a beta-glucan containing ready-to-eat cereal in children and adolescents with mild-to moderate primary hypercholesterolemia. *Nutr Res* 2003; 23: 1527-1535.
34. Yang JL, Kim YH, Lee HS, Lee MS, Moon YK. Barley betaglucan lowers serum cholesterol based on the up-regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase activity and mRNA abundance in cholesterol fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2003; 49: 381-387.
35. Keogh GF, Cooper GJS, Mulvey TB, *et al.* Randomised controlled crossover study of the effect of a highly  $\beta$ -glucan enriched barley on cardiovascular disease risk factors in mildly hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nut* 2003; 78: 711-718.
36. Bobek, P., *et al.* Dose and time dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats. *Nutrition*. 1998; 14(3):282-286.
37. Bell S, Goldman VM, Bistrrian BR, *et al.* Effect of  $\beta$ -glucan from oats and yeast on serum lipids. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1999; 39:189-202.
38. Braaten JT, Wood PJ, Scott FW, *et al.* Oat beta-glucan reduces blood cholesterol concentration in hypercholesterolemic subjects. *Eur J Clin Nutr* 1994b; 48: 465-474.

39. Gunde-Cimerman, N., and Plemenitas, A. Hyporcholesterolemic Activity of the Genus *Pleurotus* (Fr.) Karst. (Agaricales s.l., Basidiomycetes). *Perspectives of Medicinal Mushrooms in Healthcare and Nutrition in the 21st Century*. 2001;12-14.
40. Borchers AT, Stern JS, Hackman RM, Keen CM, Gershwin ME. Mushrooms, tumors, and immunity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 221: 281-293.
41. Brown GD, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity* 2003; 19: 311-315.
42. Bohn JA, Be Miller JN. b-(1→3)-Glucan as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr Polym* 1995; 28:3-14.
43. Manners DJ, Masson AJ, Patterson AJ. The structure of a  $\beta$ -(1,3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochemistry* 1973; 135: 19-30.
44. Sandula J, Machova E, Hribalova V. Immunomodulatory activity of particulate yeast  $\beta$ -1,3-D-glucan and its water-soluble derivatives. *Int J Biol Macromol* 1995; 17: 323-326.
45. Tsiapali E, Whaley S, Kalbfleisch J, Ensley H, Browder W, Williams DL. Glucans and related natural polymers exhibit weak solution free radical scavenging activity, but stimulate free radical activity in a murine macrophage cell line. *Free Rad Biol Med* 2001; 30: 393-402.
46. Ohno N, Asada N, Adachi Y, Yadomae T. Enhancement of LPS triggered TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) production by (1,3)- $\beta$ -D-glucans in mice. *Biol Pharm Bull* 1995; 18: 126-133.
47. Mueller A, Raptis J, Rice PJ, Kalbfleisch JH, Stout RD, Ensley HE, Browder W, Williams DL. The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1→3)- $\beta$ -D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. *Glycobiology* 2000; 10: 339-346.
48. Young S-H, Robinson VA, Barger M, Frazer DG, Castranova V. Partially opened triple helix is the biologically active conformation of 1,3- $\beta$ -glucans that induces pulmonary inflammation in rats. *J Toxicol Environ Health A* 2003; 66: 551-563.
49. Saito H, Ohki T, Takasuka N, Sasaki T. A <sup>13</sup>C NMR-spectral study of a gel-forming, branched (1,3)- $\beta$ -D-glucan, (Lentinan) from *Lentinus edodes*, and its acid-degraded fractions, structure, and dependence of conformation on the molecular weight. *Carbohydr Res* 1977; 58: 293-305.
50. Gomma K, Kraus J, Franz G, Roper H. Structural investigations of glucans from cultures of *Glomerella cingulata*. *Carbohydr Res* 1991; 217: 153-161.
51. Saito H, Yoshioka Y, Uehara N, Aketagawa J, Tanaka S, Shibata Y. Relationship between conformation and biological response for (1,3)- $\beta$ -glucans in the activation of coagulation

- Factor G from limulus amebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. *Carbohydr Res* 1991; 217: 181-190.
52. Kulicke WM, Lettau AI, Thielking H. Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1,3)  $\beta$ -D-glucans. *Carbohydr Res* 1997; 297: 135-143.
53. Demleitner S, Kraus J, Franz G. Synthesis and antitumour activity of derivatives of curdlan and lichenan branched at C-6. *Carbohydr Res* 1992; 226: 239-246.
54. Jayakumar T, Ramesh E, Geraldine P. Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol.* 2006 Dec; 44(12):1989-96.
55. Jayakumar T, Thomas PA, Geraldine P. Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Exp Gerontol.* 2007 Mar; 42(3):183-91.
56. Paulík S, Svrcek A, Mojzisev J, Durove A, Bensek Z, Huska M. The immunomodulatory effect of the soluble fungal glucan (*Pleurotus ostreatus*) on delayed hypersensitivity and phagocytic ability of blood leucocytes in mice. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1996 May; 43(3):129-35.
57. Humberto J. Morris, Gabriel Llauradó, Yamila Lebeque, Roberto Fontaine, Miguel Alcántara. Efectos inmunomoduladores de un extracto de *Pleurotus Spp.* administrado a dosis única a ratones Balb/C. V Congreso Nacional de Inmunología y Bodiagnstico 2006. Hosp. Clínico Quirúrgico Docente Juan Bruno Zayas, Santiago de Cuba. 2-3 Febrero 2006.
58. Khatun K, Mahtab H, Khanam PA, Sayeed MA, Khan KA. Oyster mushroom reduced blood glucose and cholesterol in diabetic subjects. *Mymensingh Med J.* 2007 Jan;16(1):94-9.
59. Morales P, Bermúdez E, Sanz B, Hernández PE. A study of the mutagenicity of some commercially canned Spanish mushrooms. *Food Chem Toxicol.* 1990 Sep; 28(9):607-11.
60. Delaney B, Vogel N, Krul C. Evaluation of the in vivo genetic toxicity of concentrated barley  $\beta$ -glucan. *Food and Chemical Toxicology* 42 (2004)155–156.
61. Delaney B, Carlson T, Zheng G, Hess R, Knutson N, Frazer S, et al. Repeated dose oral toxicological evaluation of concentrated barley  $\beta$ -glucan in CD-1 mice including a recovery phase. *Food and Chemical Toxicology* 41 (2003) 1089–1102.
62. Ragnar Rylander, Rong-Hwa Lin. (1.3)- $\beta$ -D-glucan — relationship to indoor air-related symptoms, allergy and asthma. *Toxicology* 152 (2000) 47–52.

63. Ljungman A, Leanderson P, Tagesson C. (1,3)- $\beta$ -D-Glucan stimulates nitric oxide generation and cytokine mRNA expression in macrophages. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 5 (1998) 273–271.
64. Al-Deen IH, Twaij Ha, Al-Badr AA, Istarabadi TA. Toxicologic and histopathologic studies of *Pleurotus ostreatus* mushroom in mice. *J Ethnopharmacol.* 1987 Dec; 21(3):297-305.
65. Zuzek MC, Macek P, Sepcic K, Cestnik V, Frangez R. Toxic and lethal effects of ostreolysin, a cytolytic protein from edible oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), in rodents. *Toxicon.* 2006 June; 48: 264–71.
66. Rebolj K, Batista U, Sepcic K, Cestnik V, Macek P, Frangez R. Ostreolysin affects rat aorta ring tension and endothelial cell viability in vitro. *Toxicon.* 2007; 49 : 1211–3.
67. Berna S, Sepcic K, Anderluh G, Turk T, Macek P, Poklar Ulrih N . Effect of pH on the pore forming activity and conformational stability of ostreolysin, a lipid raft-binding protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochemistry.* 2005 Aug 23; 44(33):11137-47.
68. Sepcic K, Turk T, Anderluh G, Berna S. Ostreolysin, a pore-forming protein from the oyster mushroom, interacts specifically with membrane cholesterol-rich lipid domains. *FEBS Lett.* 2004 Sep; 575 (1-3): 81-5.
69. Sepčić K, Berna S, Potrich C, Turk T, Macek P, Menestrina G. Interaction of ostreolysin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, with lipid membranes and modulation by lysophospholipids. *Eur J Biochem.* 2003 Mar; 270 (6): 1199-210.
70. Sepcic K, Turk T, Macek P. Steroid structural requirements for interaction of ostreolysin, a lipid-raft binding cytolytic protein, with lipid monolayers and bilayers. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Oct; 1758 (10): 1662-70. Epub 2006 Jun 7.
71. Sepčić K, Berna S, Turk T, Macek P. Pleurotolysin, a novel sphingomyelin-specific two-component cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, assembles into a transmembrane pore complex. *J Biol Chem.* 2004 Jun 2005; 279(26): 26975-82. Epub 2004 Apr 14.

**Servicio de Consultoría Farmacotoxicológica. Realizado por:**

Lic. Jorge Díaz Bestard \_\_\_\_\_

Lic. Beatriz Macías Peacok \_\_\_\_\_

MsC. Clara Azalea Berenguer Rivas \_\_\_\_\_

**Revisado por:** Dr. Ernesto Álvarez Fontanet  
Vicedirector de Investigaciones \_\_\_\_\_

Anexo 14. Documento elaborado por la Vicepresidenta del Consejo de Administración Provincial avalando ante el CITMA los beneficios para el territorio del desarrollo de la tecnología de producción de setas comestibles en el campo de la nutrición y el medio ambiente.

AVAL

Santiago de Cuba, 11 de Mayo del 2001  
"Año de la Revolución Victoriosa en el Nuevo Milenio"

A: *Agencia de Medio Ambiente*  
*Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente*

Por medio de la presente nos complace poner en su conocimiento que el proyecto Setas comestibles. Tecnología limpia presentado por el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Universidad de Oriente, reviste para nuestro territorio un gran interés, al estar enmarcado en los esfuerzos que se llevan a cabo en el país en la formulación de tecnologías limpias de impacto ambiental, social y económico. En particular, el proyecto aborda el desarrollo de una tecnología de producción de setas comestibles a partir de subproductos agrícolas para obtener alimento animal y humano, que permitirá ofrecer un tratamiento efectivo a residuos abundantes en nuestro territorio, como los procedentes de la agroindustria cafetalera, con un efecto protector en relación al medio ambiente. Permite la obtención, además, de un alimento de uso humano de gran valor nutricional como nueva oferta para los pobladores de nuestra ciudad y como subproducto de la tecnología, se genera un suplemento para la alimentación animal.

Sin más,

Cordiales saludos,

  
\_\_\_\_\_  
Lic. Mariluz Saborit Mendoza  
Vicepresidenta Consejo de Administración Provincial



Anexo 11. Licencia Sanitaria otorgada en el 1997 por el Laboratorio Provincial de Higiene y Epidemiología al CEBI para la producción de Pleurotus spp.

 Mod. 79 - 02 REPUBLICA DE CUBA MINISTERIO DE SALUD PUBLICA HIGIENE		LICENCIA SANITARIA									
UNIDAD: <i>C.P.H.E.M.</i>	MUNICIPAL: <i>Stgo</i>	PROVINCIAL: <i>Stgo</i>	001-97								
POR LA PRESENTE SE CONCEDE AUTORIZACION SANITARIA AL ESTABLECIMIENTO, LOCAL O TRANSPORTE											
NOMBRE - RAZON SOCIAL O NUMERO <i>Centro de Biotecnología Ind (CEBI)</i>		GIRO Y/O ACTIVIDAD <i>Biotecnología Industrial</i>									
TIPOS DE PRODUCTOS QUE MANIPULA <i>Hongos comestibles género Pleurotus</i>											
DIRECCION - CALLE, CARRETERA O FINCA <i>Cametera Quebitas</i>		No. o Km. <i>7a</i>	LOCALIDAD <i>Universidad Cto</i>								
MUNICIPIO <i>Stgo</i>		PROVINCIA <i>Stgo</i>									
ADMINISTRADOR - 1er. APELLIDO: <i>Bermudes</i>	2do. APELLIDO: <i>Savon</i>	NOMBRE: <i>Rosa Catalina</i>	DIRECCION - CALLE, CARRETERA O FINCA <i>Edif. 19 Apto 1 Eca B Miam 2</i>								
No. o Km. y		LOCALIDAD <i>Ptto Abel Sta Maria</i>	MUNICIPIO <i>Stgo</i>								
PROVINCIA <i>Stgo</i>											
EXPEDIDA EN <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; width: 25%;">12</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; width: 25%;">03</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; width: 25%;">97</td> <td style="border: 1px solid black; width: 25%;"></td> </tr> <tr> <td style="font-size: 8px; text-align: center;">DIA</td> <td style="font-size: 8px; text-align: center;">MES</td> <td style="font-size: 8px; text-align: center;">AÑO</td> <td></td> </tr> </table>				12	03	97		DIA	MES	AÑO	
12	03	97									
DIA	MES	AÑO									
OBSERVACIONES: 1 Este Licencia deberá fijarse en lugar visible y mostrarse cuantas veces lo solicite un funcionario actuante del Ministerio de Salud Pública. 2 Su validez es exclusiva para el Local, Establecimiento o Transporte que ampara esta Licencia y deberá renovarse si se cambia de giro, tipo de producto o Local. 3 Esta Licencia ampara las condiciones Sanitarias de este Local, Establecimiento o Transporte, existentes en la fecha de su expedición y podrá retirarse cuando las autoridades sanitarias estimaren que se están incumpliendo las disposiciones sanitarias vigentes. 4 Esta Licencia es puramente sanitaria y no exime del cumplimiento de las obligaciones complementarias.											
											

Anexo 10. Certificado de Registro de marca para la comercialización de las setas comestibles otorgado en 1996 por la Oficina Nacional de Invenciones, Información Técnica y Marcas de la República de Cuba.

RESOLUCION N. 1039/96



Decreto-Ley de la Oficina Nacional de Invenciones, Información Técnica y Marcas de la República de Cuba

REPUBLICA DE CUBA

El Director de la Oficina Nacional de Invenciones, Información Técnica y Marcas en uso de sus facultades y de acuerdo con lo establecido en las disposiciones legales vigentes, concede el presente

CERTIFICADO  
DE  
REGISTRO DE MARCA

a favor de: CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL y ESTACION CENTRAL DE INVESTIGACIONES DE CAFE Y CACAO, domiciliadas en Ave. Patricio Lumumba s/n, Santiago de Cuba, República de Cuba y en Finca "La Mandarina", cruce de los Baños, Santiago de Cuba, República de Cuba; respectivamente.

CERTIFICADO Nro. 123 375 válido hasta el 04 de octubre del 2005.

**NORAS**

Dado en la Ciudad de La Habana, a 11 de marzo de 1996.



Lic. América N. Santos Riveras  
Directora

Anexo 13. Renovación de la Licencia Sanitaria otorgada al CEBI para la comercialización de las setas NORA'S hasta el año 2009.



**INSTITUTO DE NUTRICION  
E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS**  
Centro Colaborador de la OMS



Calzada de Infanta 1158, La Habana 10300, Cuba  
Telefax: (537) 8708947, Tel: (537) 8794165, E-mail: inha@infomed.sld.cu

EL DIRECTOR DEL INSTITUTO DE NUTRICIÓN E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS DEL MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA DE LA REPÚBLICA DE CUBA, EN USO DE LAS FACULTADES QUE LE ESTAN CONFERIDAS:

**CERTIFICA**

Que el producto SETAS COMESTIBLES (PLEUROTUS ENCURTIDO)  
Marca: NORA'S, cuyo productor suministrador  
es CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL  
procedente de SANTIAGO DE CUBA, ha sido sometido a análisis y evaluación  
del REGISTRO NACIONAL de acuerdo a lo establecido en la legislación vigente,  
encontrándose el mismo APTO para el uso consumo humano y por lo tanto se  
aprueba y autoriza por período de 3 AÑOS a partir del día de hoy con la Licencia  
Sanitaria No. 050/06.

Observaciones: \_\_\_\_\_

**UNIVERSIDAD DE ORIENTE**

Dado en la Ciudad de La Habana, 25 días del mes de Mayo del 2006.

Tomo: XLIV

Folio: 050

Dr. \_\_\_\_\_

Director



Anexo 16. Oferta de venta donde se describen algunas características organolépticas y valor nutritivo de las setas NORA'S.



### OFERTA DE VENTA

**PRODUCTO:** HONGO OSTRAL (*Pleurotus ostreatus*)  
**TIPO DE SUMINISTRO:** SETAS FRESCAS

#### ESPECIFICACIONES DE LA CALIDAD

**SUPERFICIE** LISA Y HÚMEDA

**COLOR:** BLANCUZCO GRISÁCEO

**TAMAÑO:** 2 – 10 cm

**APARIENCIA:** NO PRESENCIA DE MARCHITEZ, NO PRESENCIA DE MOHO, NO DESHIDRATACIÓN DE LOS BORDES DEL PILEO, NO CRECIMIENTO ALGODONOSO EN LA SUPERFICIE DEL PILEO, NO PRESENCIA DE DAÑOS POR INSECTOS.

PROTEÍNA CRUDA .....	26 – 28,9 %
PROTEÍNA REAL .....	15-19 %
CARBOHIDRATOS .....	42,87 – 52,67 %
GRASAS .....	4,26 – 8,26 %
FIBRAS .....	7,2 – 20,73 %
DIGESTIBILIDAD .....	79,31 – 81,89 %
VALOR ENERGÉTICO .....	20,65 kJ / g
MAGNESIO .....	0,03 %
HIERRO .....	0,05 %
POTASIO .....	4,8 – 5,2 %
SODIO .....	1,5 %

**CONSERVACIÓN:** REFRIGERACIÓN A 5 °C

#### COMERCIALIZACIÓN

**FORMA DE ENVASE:** BOLSAS PLÁSTICAS

**DURABILIDAD:** SEÑALADA EN LA ETIQUETA

**PRECIO DE VENTA:** 5,00 CUC / kg

#### PUEDE LOCALIZARNOS EN:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE, FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL. AVE. PATRICIO LUMUMBA S/N. CP: 90500. TELÉFONO: 632095

Anexo 12. Certificado de Renovación de la marca NORA'S otorgado al CEBI y a la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao para la comercialización de las setas comestibles.



REPÚBLICA DE CUBA

El Director de la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial,  
en uso de sus facultades y de acuerdo con lo establecido  
en las disposiciones legales vigentes,  
otorga el presente:



## **Certificado de Renovación de Marca.**

**A favor de:** CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y ESTACION  
CENTRAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ Y CACAO

**Con domicilio en:** avenida Patricio Lumumba sin número, Finca la Mandarina,  
Cruce de los Baños, Santiago de Cuba, Santiago de Cuba, República de Cuba.

**CERTIFICADO NÚMERO: 123375**

**Válido por diez años y vigente hasta el: 4 de octubre de 2015.**  
**Consistente en: la denominación NORA'S con grafismo especial y en  
caracteres gruesos.**

**Para distinguir productos** solicitados en la clase 29  
de la Clasificación Internacional de Productos y Servicios para el Registro de las Marcas.

**Dado en La Habana, a 12 de abril de 2006.**

  
Ing. María de los Angeles Sánchez Torres  
Directora General  
Oficina Cubana de la Propiedad Industrial

