



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C.**

**“Relación entre el Contenido de Compuestos Fenólicos,
Capacidad Antibacteriana y Antiviral de Extractos de Hongos
Phellinus spp.”**

por:

I.B. Juan Manuel Leyva

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora.

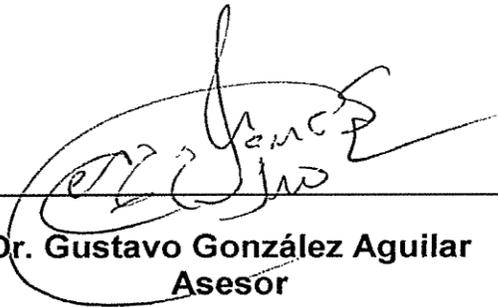
Agosto 2013

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis del Ing. Juan Manuel Leyva, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



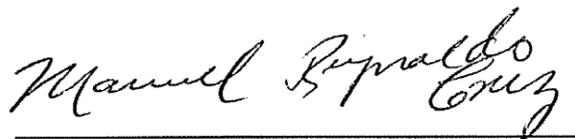
Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala
Director de Tesis



Dr. Gustavo González Aguilar
Asesor



Dra. Verónica Mata Haro
Asesor



M.C. Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

La publicación en comunicaciones científicas o divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos a CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de la tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. por brindar sus instalaciones.

A la Coordinación de Ciencia y Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal

A mi director de tesis Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por su ayuda y disposición para la realización del proyecto.

A mi comité de tesis Dra. Verónica Mata Haro, Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar y M.C. Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela por su apoyo y disposición durante la realización del proyecto.

DEDICATORIAS

Quiero agradecer primeramente a Dios por darme todo lo que tengo en la vida.

Dedico este trabajo a la familia que he formado durante mi estancia en CIAD, a los amores de mi vida, mi esposa Fabiola A. Cabral Torres y mi pequeña hija Sofía Valentina Leyva Cabral. A mis madres Nora P Leyva Coronel y María G. Coronel Duarte por darme la vida y por enseñarme a salir adelante en ella, por ser ellas mi mayor ejemplo, gracias por todo; a mi hermana Victoria Alejandra Leyva. Familia quiero recordarles que ustedes son lo que amo en la vida. A todos mis tíos (a) y Primos (a).

A mis amigos Luis Alberto Ortega Ramírez, Julio Cesar López Romero, Sergio Iván Castro Arredondo y Carlos E. Gálvez Arana los cuales han sido una parte importante durante todo este tiempo compartiendo momentos de alegría a pesar de los problemas. A mis compañeros de laboratorio Isela Rodríguez, Javier Vázquez, Rosy Ayala y Thalía Bernal, por hacer del laboratorio un lugar agradable. A todas aquellas personas que de una u otra manera formaron parte de mi vida en estos momentos gracias.

† Dedico este trabajo a la memoria de mi abuelo Arnulfo Leyva Pérez (27•01•30/29•04•12) quien fue un padre para mí y a mi primo Carlos Miguel Fierro Leyva (17•09•80/30•01•13) que en paz descansen.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Enfermedades Transmitidas por Alimentos	3
Hongos <i>Phellinus</i> Como Fuente Potencial de Compuestos Fenólicos.....	6
Actividad Antibacteriana de Extractos de Hongos <i>Phellinus</i> Ricos en Compuestos Fenólicos	10
Actividad Antiviral de Compuestos Fenólicos	12
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	21
Objetivo General	21
Objetivos Específicos.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Colecta e Identificación de Hongos <i>Phellinus</i> spp.....	22
Extracción de los Compuestos Fenólicos.....	22
Cuantificación de los Compuestos Fenólicos	24
Fenoles Totales	24
Flavonoides Totales	24
Actividad Antibacteriana	24
Actividad Antiviral.....	25
Análisis Estadístico	26
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	28
Cuantificación de los Compuestos Fenólicos	28
Capacidad Antibacteriana	31
Actividad Antiviral.....	40

Contenido (continuación)

CONCLUSION.....	49
RECOMENDACIONES.....	50
REFERENCIAS.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Compuestos fenólicos de <i>Phellinus baumii</i>	9
2. Mecanismo antibacteriano propuesto de los compuestos fenólicos.	11
3. Mecanismo antiviral de compuestos fenólicos.	18
4. Curvas de sensibilidad bacteriana de <i>E. coli</i> , <i>S. Choleraesuis</i> y <i>L. monocytogenes</i> de los extractos de hongos de <i>Phellinus</i> spp. a) <i>E. coli</i> O157:H7; b) <i>S.</i> <i>Choleraesuis</i> ; c) <i>L. monocytogenes</i>	37
5. Posible mecanismo de acción antibacteriano y antiviral de extractos de hongos <i>Phellinus</i> spp.	47

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Principales brotes de bacterias patógenas por el consumo de alimentos contaminados en Estados Unidos de América.	4
2. Brotes virales recientes por el consumo de alimentos contaminados en Estados Unidos de América.	13
3. Presencia de virus en empacadoras del noroeste de México.	15
4. Actividad antiviral de diversos compuestos fenólicos.	16
5. Características morfológicas de <i>P. badius</i> , <i>P. fastuosus</i> y <i>P. grenadensis</i>	23
6. Contenido de fenoles y flavonoides totales de extractos de <i>Phellinus</i> spp.	29
7. Concentración mínima inhibitoria de extractos de hongos <i>Phellinus</i> spp.	32
8. Efecto de la adición de extractos de hongos <i>Phellinus</i> spp. sobre los Parámetros cinéticos de crecimiento en <i>E. coli</i> , <i>S. Choleraesuis</i> y <i>L. monocytogenes</i>	36
9. Correlaciones de Pearson fenoles y flavonoides totales vs capacidad antibacteriana	41
10. Actividad antiviral de extractos de hongos <i>Phellinus</i> spp.	42
11. Correlación de Pearson entre el contenido de compuestos fenólicos de los extractos de hongos <i>Phellinus</i> y la actividad antiviral.	44

RESUMEN

El estudio de las propiedades bioactivas de compuestos fenólicos de origen natural es relevante para sustentar su uso en industrias como la alimentaria, farmacéutica y cosmética. Comúnmente las plantas son la fuente principal de obtención de dichos compuestos; sin embargo, algunos hongos macroscópicos del género *Phellinus* representan una fuente potencial de éstos. Por ello, el objetivo de este trabajo fue analizar la relación entre el contenido de compuestos fenólicos, capacidad antibacteriana y antiviral de extractos de los hongos *Phellinus badius*, *Phellinus grenadensis* y *Phellinus fastuosus*. Los extractos obtenidos de *P. badius*, *P. grenadensis* y *P. fastuosus* presentaron un contenido de fenoles totales de 209.76, 111.40, y 96.96 mg de ácido gálico/g, y flavonoides totales de 27.61, 13.12, y 10.40 mg de quercetina/g, respectivamente. Estas tendencias en el contenido de compuestos fenólicos se reflejaron en la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos (*P. badius*, *P. grenadensis* y *P. fastuosus*) contra *Escherichia coli* O157:H7 (13, 20, 27 mg/mL), *Salmonella Choleraesuis* (20, 30, 15 mg/mL), *Listeria monocytogenes* (10, 15, 25 mg/mL), retrasando la fase lag (λ), la tasa máxima de crecimiento (μ_{\max}) y el valor máximo del eje Y (y_{\max}). Se encontraron correlaciones significativas ($P < 0.05$) entre el contenido de fenoles y flavonoides totales vs CMI de *E. coli* ($R = 0.888$, $R = 0.904$) y *L. monocytogenes* ($R = 0.805$, $R = 0.826$). Sin embargo, no se observó el mismo comportamiento contra *S. Choleraesuis* ($R = 0.055$, $R = 0.029$) ($P > 0.05$). Para la actividad antiviral se obtuvieron porcentajes de reducción en las unidades formadoras de placas líticas (UFP) de los bacteriófagos MS2 y Φ -X174 en *P. badius* (41 y 38 %), *P. grenadensis* (37 y 33 %) y *P. fastuosus* (29 y 27 %), respectivamente. En este contexto, se visualiza la relación existente entre el contenido de compuestos fenólicos de los extractos de los hongos *Phellinus* con sus propiedades antibacterianas y antivirales.

Palabras clave: Hongos macroscópicos, concentración mínima inhibitoria, patógenos, bacteriófago.

ABSTRACT

The study of the bioactive properties of naturally occurring phenolic compounds is relevant to support its use in industries such as food, pharmaceuticals and cosmetics. Plants are frequently the primary source for obtaining those compounds; however, some macroscopic fungi of the genus *Phellinus* represent also a potential source of these phenolic compounds. Therefore, the aim of this study was to analyze the relationship among the content of phenolic compounds, antibacterial and antiviral capacity of mushroom extracts from *Phellinus badius*, *Phellinus grenadensis* and *Phellinus fastuosus*. The extracts obtained from *P. badius*, *P. grenadensis* and *P. fastuosus* had a total phenolic content of 209.76, 111.40, and 96.96 mg gallic acid equivalent/g, and total flavonoids 27.61, 13.12, and 10.40 mg of quercetin equivalent/g, respectively. These trends in phenolic content were reflected in the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extracts (*P. badius*, *P. grenadensis* and *P. fastuosus*) against *Escherichia coli* O157: H7 (13, 20, 27 mg/mL), *Salmonella Choleraesuis* (20, 30, 15 mg/mL), *Listeria monocytogenes* (10, 15, 25 mg/mL), delaying the lag phase (λ), the maximum growth rate (μ_{\max}) and Y-axis maximum value (y_{\max}). Significant correlations ($P < 0.05$) were found among the content of total phenols and flavonoids CMI vs. *E. coli* ($R = 0.888$, $R = 0.904$) and *L. monocytogenes* ($R = 0.805$, $R = 0.826$). However, this behavior was not observed against *S. Choleraesuis* ($R = 0.055$, $R = 0.029$) ($P > 0.05$). The antiviral activity was expressed as the PFU reduction percentages for bacteriophages MS2 and Φ -X174; in *P. badius* (41 and 38%), *P. grenadensis* (37 and 33%), and *P. fastuosus* (29 and 27%), respectively. In this context, it is shown the relationship among the content of the phenolic extracts from *Phellinus* fungi with their antibacterial and antiviral properties.

Keywords: macroscopic mushrooms, minimum inhibition concentration, pathogens, bacteriophage.

INTRODUCCIÓN

Una gran cantidad de compuestos antimicrobianos se han obtenido a partir de la búsqueda potencial en fuentes naturales (Balakumar *et al.*, 2011). Esto, debido a la demanda de los consumidores que desean fuentes naturales de compuestos bioactivos (Brul y Coote, 1999). Lo anterior ha provocado la disminución de la popularidad de los antimicrobianos sintéticos en la industria farmacéutica y de alimentos (Pokorný, 1991). Estudios recientes, se han centrado en los hongos macroscópicos del género *Phellinus* como fuente de compuestos bioactivos (Palacios *et al.*, 2011, Thetsrimuang *et al.*, 2011, Muszyńska y Sułkowska-Ziaja, 2012). Dichos compuestos presentan propiedades que se han atribuido a la actividad de ciertas moléculas como compuestos fenólicos, vitaminas y alcaloides. En este sentido, los compuestos fenólicos son considerados altamente bioactivos debido a su actividad antioxidante, antimicrobiana, antiviral, entre otras propiedades (Badalyan *et al.*, 2008, Thetsrimuang *et al.*, 2011).

Los compuestos fenólicos han sido estudiados en una gran cantidad de trabajos desde diferentes perspectivas. Se han observado las propiedades biológicas de los compuestos fenólicos tanto en plantas, hongos, y humanos, así como por su adición en matrices alimenticias (George *et al.*, 2004, Wong y Chye, 2009, Rauter *et al.*, 2012). Estos compuestos son sintetizados en plantas y hongos para la protección contra bacterias, virus o depredadores, ya que tienen propiedades antimicrobianas (Tapas *et al.*, 2008, Edziri *et al.*, 2011, Patel *et al.*, 2011, Vaz *et al.*, 2011). Los compuestos fenólicos presentes en los alimentos enriquecidos protegen a estos del ataque de microorganismos patógenos y aumentan su potencial antioxidante que otorga calidad nutricional a los alimentos y mayor vida de anaquel (Cushnie y Lamb, 2006). Por otro lado, el consumo humano de estos compuestos y el estado antioxidante ayuda a la protección contra ciertas enfermedades crónicas degenerativas (Álvarez Castro y Orallo Cambeiro, 2003, Manach *et al.*, 2004, Kanazawa, 2011).

Otra fuente natural de compuestos fenólicos son los hongos del género *Phellinus* (De Silva et al., 2012). Se caracterizan por sintetizar estos compuestos en mayor concentración puesto que son conocidos como hongos de podredumbre blanca, lo cual significa que estos hongos crecen en árboles vivos y utilizan como fuente de carbono la lignina presente en el árbol dejando de lado la celulosa la cual es incolora a diferencia de la lignina. Esta lignina es degradada y utilizada para formar nuevos compuestos que dan forma al cuerpo fructífero de estos hongos. En un estudio con *Polyporus hispidus* se evaluó el efecto de la luz en enzimas de fenilpropanoides obteniendo que existe un efecto de la luz sobre enzimas como fenilalanina amonioliasa y tirosinasa, sin embargo, éstas siguen presentando actividad (Nambudiri et al., 1973). La actividad de estas enzimas indican la formación de compuestos fenólicos ya que son las responsables de la síntesis de estos compuestos (Burbulis y Winkel-Shirley, 1999). En distintos estudios se ha evaluado el perfil de compuestos fenólicos de *Phellinus linteus* por medio de HPLC presentando una gran variedad de estos compuestos dentro de los que destacan hispidina y derivados de éste a los cuales se les atribuye diversas propiedades y a ello se debe su uso en la medicina tradicional en China (Jung et al., 2008, Kojima et al., 2008).

Mediante una colecta realizada en el municipio de Álamos, Sonora, México, se obtuvieron ejemplares de hongos *Phellinus*, e identificados mediante la colaboración del Laboratorio de Biotecnología de Hongos en CIAD basándose en la metodología de Gilbertson y Ryvardeen (1987). Entre las especies identificadas destacan *P. badius*, *P. grenadensis* y *P. fastuosus* como los principales hongos encontrados, los cuales fueron considerados como interesantes objetos de estudio, debido a las propiedades bioactivas como antibacterianos y antivirales atribuidas en estudios previos a hongos del Género *Phellinus*. En este contexto, el objetivo de este trabajo es analizar la relación existente entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antibacteriana con la actividad antiviral de extractos de hongos *Phellinus* spp.

ANTECEDENTES

Enfermedades Transmitidas por Alimentos

Uno de los principales problemas de salud mundial son las enfermedades transmitidas por alimentos (Koppmann, 2012). En México no se cuenta con un registro de la causa de los brotes producidos por el consumo de alimentos contaminados, sin embargo, no significa que éste no sea un problema. Por otra parte, el Center for Science in the Public Interest, Estados Unidos de América (EUA) mantiene un registro de los brotes relacionados con alimentos destacando a *Salmonella*, *E. coli* y *Listeria* como las principales bacterias causantes de brotes con resultados fatales en algunas personas. En el Cuadro 1 se presentan los principales brotes relacionados a enfermedades transmitidas por alimentos en EUA (Center for Science in the Public Interest, 2007).

Las bacterias del género *E. coli* son bacilos Gram-negativos, y pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Son anaeróbicas facultativas, móviles por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forman esporas, capaces de fermentar la glucosa y la lactosa. Esta bacteria es un habitante común de los intestinos de todos los animales, incluyendo el de humanos. Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo. Además produce vitaminas B y K. Una tipificación incluye la determinación de los antígenos somáticos (O), capsulares (K), flagelares (H) y de fimbria (F), los cuales son también factores de colonización y sirven como adhesinas en el hospedero durante la unión a glicoproteínas. Los serotipos se asocian con virulencia como es el caso de *E. coli* O157:H7. Especies de *E. coli* pueden ser enterotoxigénica, enteropatogénica, enteroinvasiva, enterohemorrágica y enteroadherente o

Cuadro 1. Principales brotes de bacterias patógenas por el consumo de alimentos contaminados en Estados Unidos de América.

Fecha	Bacteria	Número de casos	Estados	Alimento
Julio 2013	<i>Listeria</i> sp.	5	4	Queso
Mayo 2013	<i>Salmonella</i> Montevideo	8	6	Pasta de ajonjolí
Abril 2013	<i>Salmonella</i> Saintpaul	81	18	Pepinos mexicanos
Abril 2013	<i>Escherichia coli</i> O121	35	19	Pollo y quesadillas
Marzo 2013	<i>Salmonella</i> Heidelberg	128	13	Pollo
Enero 2013	<i>Salmonella</i> Typhimurium	16	5	Carne molida
Noviembre 2012	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	28	5	Ensalada
Abril 2012	<i>Escherichia coli</i> O26	29	11	Trébol
Diciembre 2011	<i>Listeria monocytogenes</i>	146 (30)	28	Melón

Fuente: Center for Science in the Public Interest, 2013

enteroagregativa, de ahí es que no se conoce bien su mecanismo de infección, lo que implica un mayor riesgo en los brotes producidos por *E. coli* (Mainil, 2012).

Recientes brotes de infección por *E. coli* O157:H7 en distintos alimentos han tenido lugar en Estados Unidos de América (EUA). En noviembre del 2012, 28 personas en 5 estados de EUA enfermaron a causa del consumo de ensaladas contaminadas, donde 12 personas fueron hospitalizadas y dos han desarrollado el síndrome urémico hemolítico. Por otra parte en marzo del 2011 se retiró del mercado estadounidense más de 10 toneladas de bolonia por presunta contaminación con *E. coli* O157:H7, al igual que el brote por el consumo de avellanas en ese mismo mes. Sin embargo, otras cepas de *E. coli* han presentado nuevos brotes como *E. coli* O121 en abril del presente año en alimentos congelados, esto causó un total de 35 enfermos en 19 estados de EUA (Center for Science in the Public Interest, 2007).

Otro género bacteriano de la familia *Enterobacteriaceae* es *Salmonella*. Está integrada por bacilos Gram negativos anaerobios facultativos. Poseen, por lo tanto, las características generales de las enterobacterias: son fermentadores de la glucosa, catalasa positiva, oxidasa negativo y suelen ser móviles; a excepción de la especie *Salmonella* Gallinarum, que es inmóvil. El género *Salmonella* tiene tres tipos de antígenos: somático (O), flagelar (H) y capsular (K). La nomenclatura de *Salmonella* es compleja, sin embargo, se ha optado por seguir una antigua propuesta de Kaufmann, con las más recientes modificaciones (formuladas desde el Centro de Referencia colaborador de la OMS, en el Instituto Pasteur); así, el género se divide en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, diferenciables entre sí por características metabólicas tales como la hidrólisis del orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), el crecimiento en presencia de KCN y otras. *Salmonella enterica* se subdivide, a su vez, en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houenae*, e *indica* que corresponden a los antiguos subgéneros. Estas subespecies son diferenciables bioquímicamente (Steenackers *et al.*, 2012).

Salmonella presenta diferencias en cuanto a la especificidad del hospedero; mientras algunos serotipos no tienen una estricta adaptación a un huésped, siendo capaces

de producir enfermedades con diversas características en distintas especies animales y en el hombre, otros serotipos sí son específicos, como *S. Gallinarum* para las aves o *S. Typhi* en el caso del hombre. Las salmonelosis humanas pueden clasificarse en dos grandes grupos: por un lado, las debidas a serotipos estrictamente humanos, que causan habitualmente síndromes tifoídicos con presencia de bacterias en la sangre, y las debidas a serotipos ubicuos, que provocan diarrea, vómitos y fiebre. La duración y entidad de esta enfermedad es variable, dependiendo del estado general del huésped, pudiendo ocasionalmente causar enfermedades generalizadas. La fiebre tifoidea, la más grave de las salmonelosis, continúa siendo un problema mayor en muchos países en vías de desarrollo. Si bien resulta difícil conocer su impacto real, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que anualmente se registran diecisiete millones de casos con unas seiscientos mil muertes (Taskila *et al.*, 2012).

Tan solo en lo que va del año 2013 han resultado 4 brotes relacionados con *Salmonella*. En mayo del presente año se encontró pasta contaminada con *Salmonella* Montevideo y *Salmonella* Mbandaka (Center for Science in the Public Interest, 2007). Este brote trajo como resultado 8 pacientes en 6 estados diferentes de EUA. *Salmonella* Saintpaul produjo un brote en pepinos mexicanos contaminados causando 81 personas infectadas y 16 hospitalizados, en 18 estados de EUA. Un total de 128 personas en 13 estados de EUA presentaron infección por *Salmonella* Heidelberg después de consumir pollo contaminado. En enero el consumo de carne molida contaminada con *Salmonella* Typhimurium dio como resultado un total de 16 personas infectadas. A pesar de los avances tecnológicos en la industria los brotes por *Salmonella* siguen siendo un riesgo para el consumidor debido a la diversidad de alimentos contaminados, lo cual hace interesante el estudio de compuestos capaces de inhibir el crecimiento de *Salmonella*.

Hongos *Phellinus* Como Fuente Potencial de Compuestos Fenólicos

El uso de agentes antimicrobianos en la industria de alimentos es muy común para extender la vida útil de diferentes productos. Los antimicrobianos son compuestos de

origen natural o sintético que actúan inhibiendo y/o disminuyendo el crecimiento de los microorganismos (Hancock, 2005). El uso excesivo de antimicrobianos sintéticos en alimentos ha generado rechazo por parte de los consumidores, por lo que en los últimos años se ha incrementado la demanda de antimicrobianos naturales. Dichos compuestos pueden ser extraídos de una amplia gama de tejidos vegetales. Uno de los grupos más estudiados como antimicrobianos naturales son los compuestos fenólicos (Daglia, 2012).

Por otro lado, los hongos del género *Phellinus*, son conocidos por su uso en la medicina tradicional de la cultura China (Muszyńska y Sułkowska-Ziaja, 2012). Los cuerpos fructíferos de estos hongos representan una fuente importante de fenoles, flavonoides, vitaminas y alcaloides con capacidad antioxidante y antibacteriana (Balakumar *et al.*, 2011). Adicionalmente se ha considerado el cultivo sumergido de estos hongos para la obtención de extractos ricos en compuestos fenólicos (Jung *et al.*, 2008). El potencial biotecnológico de estos hongos se refleja en el reciente aumento del número de patentes de sus aplicaciones como fuente de antioxidantes y antimicrobianos en farmacia y cosmética. Se patentó el uso del compuesto phellinsina aislado de extractos de *Phellinus* sp. para su uso en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares inhibiendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), con uso médico y alimentario (Kim *et al.*, 2010). Otra de las patentes publicadas es la generación de extractos inmunomoduladores a partir de cultivos sumergidos de una mezcla de hongos, de los cuales resaltan *Phellinus pini* y *Phellinus linteus* (Kristiansen, 2006). Adicionalmente se ha patentado el efecto antimicrobiano y antioxidante de extractos de distintos hongos (*P. linteus*) y plantas con la finalidad de tratar el acné y fotoenvejecimiento (Maloney y Barger, 2010). Una aplicación en la industria alimentaría se refleja en la patente que plantea la adición de extractos de micelio de distintos hongos dentro de estos *P. linteus* para la formulación de una bebida tipo café con potencial antioxidante, el cual fue probada sobre líneas celulares de cáncer (Hammond *et al.*, 2010).

Los compuestos presentes en hongos *Phellinus* se caracterizan por tener estructuras más complejas que las observadas en los aislados a partir de plantas y frutos

(Wu *et al.*, 2011). Lo anterior es debido a que en algunos casos los compuestos reportados en los estudios no habían sido mencionado en trabajos previos y no cuentan con un nombre común para su identificación (Gowdaman *et al.*, 2007, Wu *et al.*, 2011). Tomando en cuenta la morfología tan diversa de los basidiomicetos podemos obtener desde ácidos fenólicos hasta procianidinas oligoméricas las cuales no suelen ser tan abundantes en frutos (Gowdaman *et al.*, 2007). Sin embargo, son pocos los estudios enfocados a la identificación de los compuestos fenólicos con actividad antimicrobiana en los extractos obtenidos a partir de hongos.

En estudios recientes con hongos *Phellinus merrilli*, se identificaron distintos compuestos fenólicos como hispidina, inotilona e hispolon (Huang *et al.*, 2011). Este último, es el compuesto de mayor actividad biológica encontrado en extractos de este hongo al que se le atribuye la actividad antioxidante, analgésica, hepatoprotectora e inhibidora de algunas enzimas como aldosa reductasa y α -glucosidasa (Chang *et al.*, 2007, Chang *et al.*, 2007, Chang *et al.*, 2010). En un estudio realizado por Liang y colaboradores (2010), evaluó la actividad antioxidante de extractos de *Phellinus linteus*. Dicha actividad fue atribuida principalmente al alto contenido de compuestos fenólicos comparado con otros antioxidantes como carotenoides, tocoferoles y vitamina C. Sin embargo, no se realizó un estudio de los compuestos fenólicos mayoritarios obtenidos en el extracto. Por ello, es que aún se estudian estas especies ya que se sabe poco de estas en cuanto a la producción de metabolitos secundarios principalmente compuestos fenólicos.

En un estudio realizado por Wu y colaboradores (2011) sobre *Phellinus baumii* se encontraron distintos compuestos fenólicos (Figura 1) de los cuales no se tienen reporte en otros estudios. La investigación química del hongo ha dado lugar a la caracterización de cinco derivados de hispidina, phellibauminas A-E (1-5), así como dos pares de dihidroflavonas epiméricas bencilo no equivalentes, metilfelligrina A (9), epifelligrina A (10), metilfelligrina B (11), y B-epi metilfelligrina (12), junto con cinco compuestos conocidos, interfungina B (6), felligridina H (7), felligridimero A (8), un felligrina (13), y epifelligrina A (14). Fellibaumina A (1) era un derivado novedoso hispidínico con una única unidad de 3,4-dihidroxybenzofurano.

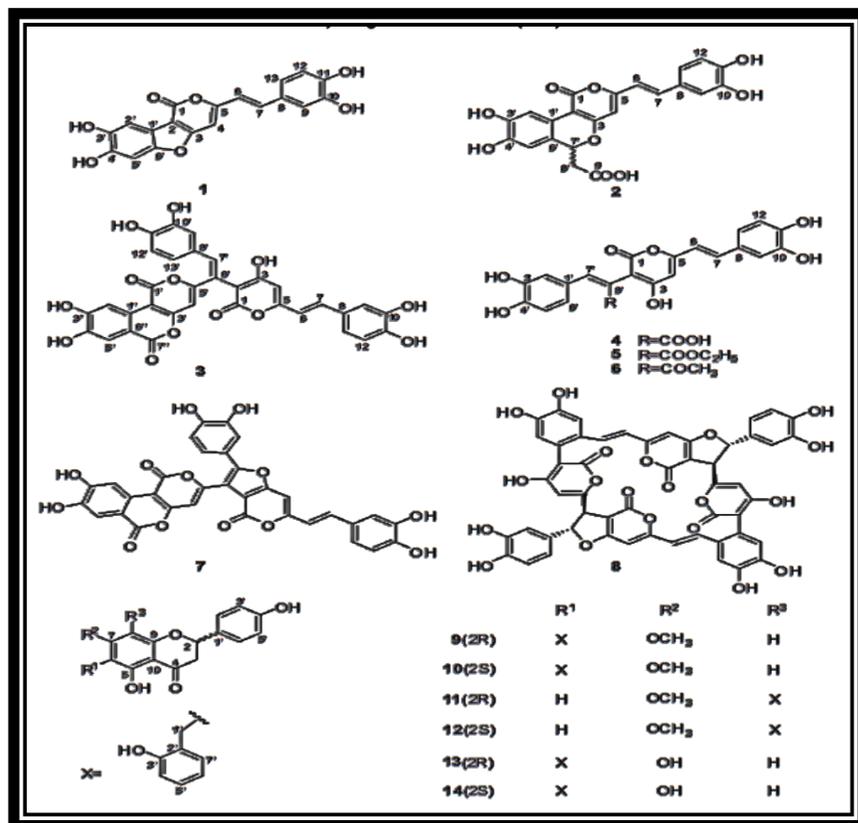


Figura 1. Compuestos fenólicos de *Phellinus baumii*

(Wu *et al.*, 2011).

Algunos compuestos fenólicos fueron identificados en el trabajo realizado por Estevinho y colaboradores (2008). En dicho trabajo, se identificaron ácidos fenólicos como: ácido protocateico, p-hidroxicinámico, cafeico, clorogénico, p-cumárico y ácido elágico. Por otra parte, también se pudieron identificar algunos flavonoides, tales como: naringenina, kampferol, pinocembrina y crisina. Dichos compuestos tuvieron efecto antimicrobiano el cual será descrito más adelante. Como se puede observar en la heterogeneidad de los estudios en los que poco se sabe acerca de los compuestos fenólicos en lo correspondiente a hongos y en especial del género *Phellinus*, es importante estudiar los compuestos presentes en estos. Ayala-Zavala y colaboradores (2012), evaluaron el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de distintos hongos como *Phellinus merrillii*, *P. baumii*, *P. grenadensis* y *P. badius* obteniendo un alto contenido de fenoles totales, sin embargo, no se realizó identificación de los principales compuestos fenólicos.

Actividad Antibacteriana de Extractos de Hongos *Phellinus* Ricos en Compuestos Fenólicos

Debido a que se desconoce el mecanismo de acción antibacteriano de los compuestos fenólicos algunos autores hipotetizan que podría actuar a dos niveles. El primero es sobre la membrana citoplasmática, en la cual los compuestos fenólicos interactúan con las proteínas que funcionan como estructurales en la membrana y sobre proteínas receptoras de señales. Sin embargo, estos compuestos pueden permear y una vez en el interior celular estos producen un gradiente de protones contrario lo que afecta la homeostasis de la célula y con ello una ruptura de la membrana, y la salida de protones y del contenido citoplasmático (Juven *et al.*, 1998, Brul y Coote, 1999, Raybaudi-Massilia *et al.*, 2009). O bien, los compuestos fenólicos pueden interactuar con proteínas relacionadas con la síntesis de compuestos de interés celular para su movilidad o bien para la replicación del ADN (Figura 2) (Brul y Coote, 1999, Raybaudi-Massilia *et al.*, 2009).

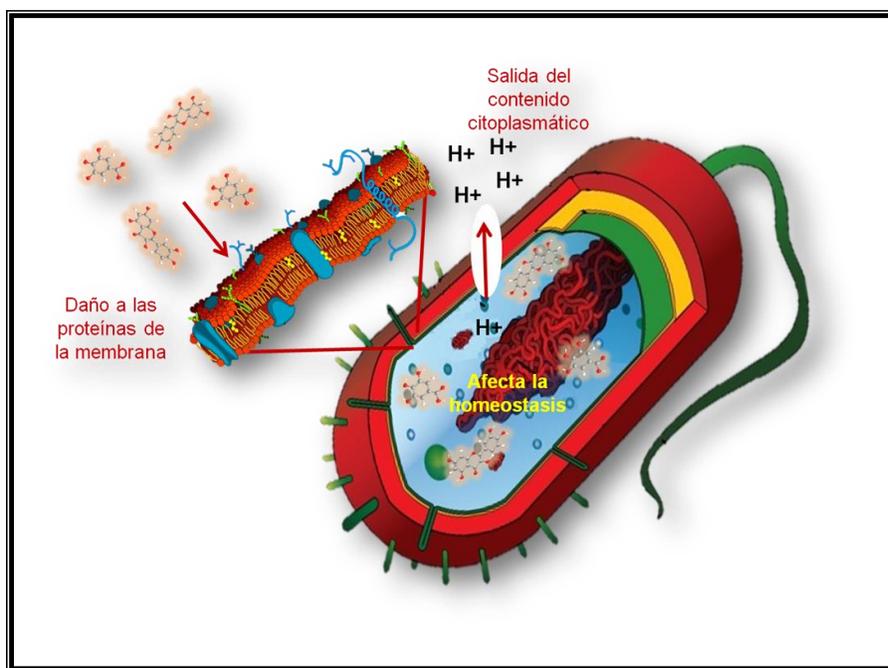


Figura 2 Mecanismo antibacteriano propuesto de los compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos en primera instancia actúan sobre la membrana inhibiendo enzimas o afectando la permeabilidad de la membrana causando canales, permitiendo con esto el paso de algunos fenoles al interior de la bacteria en donde inactivan enzimas necesarias para la reproducción y afectan la homeostasis por su carácter ácido. Esto ocasiona la salida del contenido citoplasmático y la muerte de la bacteria.

Dulger y colaboradores (2005), realizaron un estudio con extractos elaborados con distintos solventes (acetato de etilo, acetona, cloroformo, y etanol) de *Phellinus torulosus*. Se evaluó la actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en disco (mm de inhibición). Los resultados mostraron un mayor efecto antimicrobiano en el caso del extracto etanólico presentando halos de inhibición casi en la totalidad de las bacterias tratadas hasta de 20 mm, no así para el caso de *Salmonella Typhi*. Por lo que se puede observar que el solvente presentó un efecto en la actividad antimicrobiana favoreciendo en este caso el extracto etanólico.

Actividad Antiviral de Compuestos Fenólicos

La contaminación de los alimentos a través de los virus es considerado actualmente como la principal fuente de enfermedades infecciosas vía alimentaria (Rodrigo *et al.*, 2007). Estos virus pertenecen a una diversidad de familias, pero presentan algunas características comunes entre ellos. La mayor parte contienen como genoma ARN y están rodeados por una cubierta proteica denominada cápside. Son virus desnudos que carecen de cubierta lipídica, con estructura icosaédrica y con un tamaño que oscila entre los 20 y 80 nm. Los virus requieren de células huésped para su multiplicación (Rodrigo *et al.*, 2007). Es por ello que a diferencia de las bacterias, los virus no pueden multiplicarse en el alimento. Tan solo en los Estados Unidos el consumo de alimentos contaminados alcanzan 9.4 millones de casos reportados (Scallan *et al.*, 2011). De los cuales, 5.5 millones fueron atribuidos a infecciones virales, 3.6 millones a bacterias y 300 mil casos a parásitos. De las infecciones por virus, norovirus es el principal causante de enfermedades transmitidas por alimentos, seguido de hepatitis A, rotavirus y astrovirus (Cuadro 2).

En un estudio reciente se evaluó la presencia de norovirus del genogrupo I, hepatitis A y rotavirus en empacadoras del noroeste de México (Felix-Valenzuela *et al.*, 2012). En las cuales se muestrearon cilantro, perejil, cebolla, lechuga, col y chile jalapeño, así como las superficies de trabajo y el agua usada para la desinfección. Se

Cuadro 2. Brotes virales recientes por el consumo de alimentos contaminados en Estados Unidos de América.

Fecha	Virus	Número de casos	Alimento/Lugar
Junio 2013	Hepatitis A	143	Granada y berries
Noviembre 11	Norovirus genogrupo II	38	Escuela
Noviembre 11	Norovirus genogrupo II	12	Restaurant
Noviembre -11	Norovirus genogrupo II	10	Ensalada de frutas
Octubre 2011	Norovirus genogrupo II	8	Limonadas
Abril 2011	Hepatitis A	7	Restaurante
Marzo 2011	Norovirus genogrupo II	44	Restaurante
Noviembre 10	Hepatitis A	6	Pasteles

Fuente: Centers for Disease Control and Prevention, 2013.

obtuvo un total de 46 muestras de las cuales 23 dieron positivo a los distintos virus (Cuadro 3). Para el caso de norovirus del genogrupo I un total de 6 muestras dieron positivas, de las cuales 4 fueron superficies de bandas y equipos de empaques muestreadas, mientras que para cebolla con 2 muestras. Hepatitis A fue positivo a 13 muestras, tanto agua (1), super(2), perejil (1) y cebolla (4). Siendo rotavirus quien presentó el mayor número de muestras con 15 de ellas, agua (4), superficies (5), cilantro (1), perejil (1) y cebolla (4). Esto nos indica la alta prevalencia de dichos virus en matrices alimentarias y sobretodo acerca de los métodos de inocuidad que no son suficientes para asegurar al alimento libre de virus.

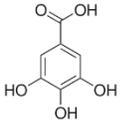
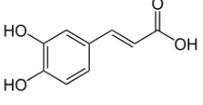
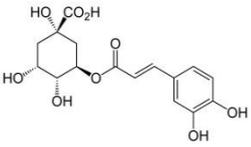
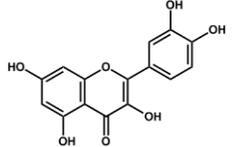
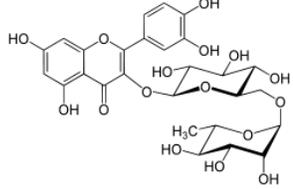
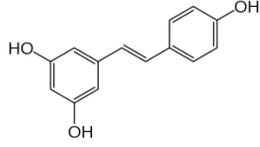
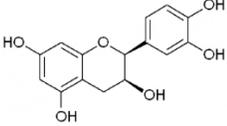
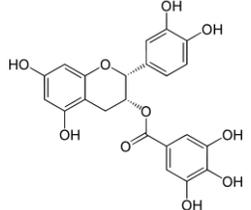
Los compuestos fenólicos presentan actividad antiviral, sin embargo, no es bien conocido su mecanismo (Cuadro 4). En diversos trabajos se mencionan a los hongos como la principal fuente de compuestos eficaces para inhibir la transcriptasa inversa y proteasa del virus de inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I), sin embargo, poca es la literatura que lo sustente (Roupas *et al.*, 2012). Estudios antivirales en extractos de plantas han sido recientemente evaluados (Suárez *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2013). Tomando en cuenta estos trabajos realizados en plantas se propone el siguiente mecanismo antiviral (figura 3). Este consiste en la inhibición del virus por medio de compuestos fenólicos, de tal manera que estos compuestos se adhieren a proteínas receptoras impidiendo se una a la célula huésped. Wang y colaboradores (2009) realizaron un estudio *in vitro* de la actividad antiviral de ácidos fenólicos (clorogénico, cafeico y quínico). En él se pudo observar un bajo contenido de ADN en la célula huésped en el interior y exterior de la célula. Además observó la presencia de antígenos en la superficie del huésped. Otro estudio realizado por Kim y colaboradores (2010) en virus de influenza A por medio de derivados de isoquercetina de plantas, en el cual se evaluaron distintos flavonoides y se determinó la dosis necesaria para inhibir la replicación de virus en un 50% y la dosis toxica para matar al 50% de las células (IC_{50}). Se observaron dosis muy bajas a las cuales presentaron eficiencia sobre el virus.

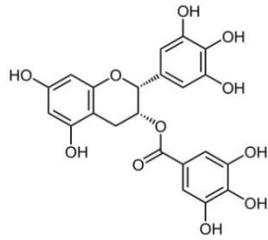
Cuadro 3. Presencia de virus en empacadoras del noroeste de México.

Muestra	Número de muestras	Muestras positivas	Presencia de virus		
			VHA	RV	NV
Agua	5	4	1	4	0
Superficies	9	9	5	5	4
Cilantro	5	2	2	1	0
Perejil	2	1	1	1	0
Cebolla	18	7	4	4	2
Lechuga	3	0	0	0	0
Col	2	0	0	0	0
Jalapeño	2	0	0	0	0
Total de muestras	46	23	13	15	6

Fuente: Felix-Valenzuela *et al.*, 2012. VHA, virus de hepatitis A; RV, rotavirus; NV, norovirus del genogrupo I.

Cuadro 4. Actividad antiviral de diversos compuestos fenólicos.

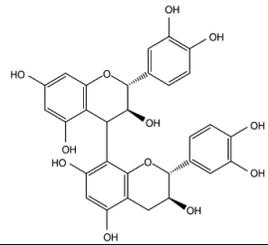
Estructura	Nombre	Actividad antiviral	Referencia
	Ácido gálico	Herpes simple tipo I Herpes simple tipo II	(Kratz <i>et al.</i> , 2008, Gescher <i>et al.</i> , 2011, Özçelik <i>et al.</i> , 2011)
	Ácido cafeico	Hepatitis B Herpes simple tipo I	(Wang <i>et al.</i> , 2009, Özçelik <i>et al.</i> , 2011)
	Ácido clorogénico	Hepatitis B Herpes simple tipo I	(Wang <i>et al.</i> , 2009, Özçelik <i>et al.</i> , 2011)
	Quercetina	Influenza A Influenza H1N1 Influenza H9N2 Herpes simple tipo I	(Ge <i>et al.</i> , 2010, Kim <i>et al.</i> , 2010, Özçelik <i>et al.</i> , 2011)
	Rutina	Influenza A	(Kim <i>et al.</i> , 2010)
	Resveratrol	Influenza A	(Kim <i>et al.</i> , 2010)
	Epicatequina	Herpes simple tipo I	(Gescher <i>et al.</i> , 2011)
	Galato de epicatequina	Herpes simple tipo I	(Gescher <i>et al.</i> , 2011)



Galato de epigalocatequina

Herpes simple
Influenza A
Adenovirus

(Friedman, 2007, Kim *et al.*, 2010)



Procianidina B2

Herpes simple tipo I
Adenovirus

(Friedman, 2007, Gescher *et al.*, 2011)

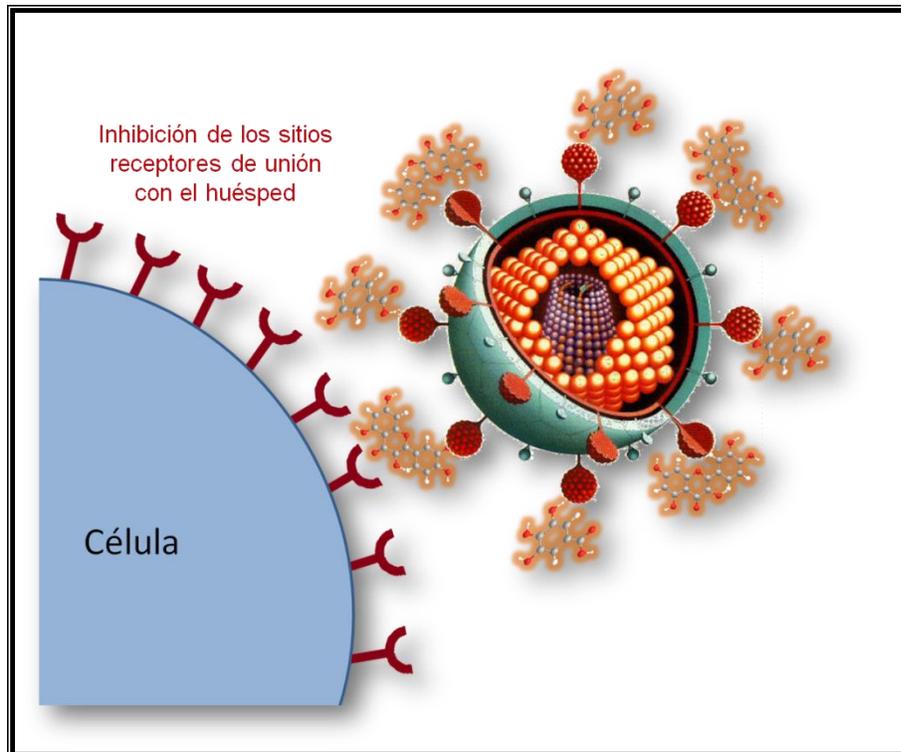


Figura 3 Mecanismo antiviral de compuestos fenólicos.

De manera natural los procesos de infección viral inician con el reconocimiento y unión entre los receptores de la célula huésped y los ligandos del virus permitiendo de esta manera la entrada de del material genético a la célula hospedera, sin embargo, en presencia de compuestos fenólicos estos receptores y ligandos se ven bloqueados, inhibiendo el proceso de infección viral.

Los compuestos fenólicos de hongos *Phellinus* spp. podrían ser una fuente potencial de antibacterianos y antivirales debido a su alto contenido en estos compuestos. Debido a los problemas de resistencia a antibióticos y que son causa de enfermedades transmitidas por alimentos. Sin embargo, la falta de estudios es una limitante para el conocimiento potencial de estos hongos. Por ello, es necesario estudiar los compuestos fenólicos presentes en los hongos del género *Phellinus* spp., así como su actividad antibacteriana y antiviral.

HIPÓTESIS

El contenido de compuestos fenólicos de extractos de hongos *Phellinus* (*badius*, *fastuosus* y *grenadensis*), se relaciona con su capacidad antibacteriana y antiviral.

OBJETIVOS

Objetivo General

- ✓ Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos y evaluar la actividad antibacteriana y antiviral de extractos de hongos *P. badius*, *P. fastuosus* y *P. grenadensis*.

Objetivos Específicos

- ✓ Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos en extractos de *P. badius*, *P. fastuosus* y *P. grenadensis*.
- ✓ Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de *P. badius*, *P. fastuosus* y *P. grenadensis*.
- ✓ Determinar el potencial antiviral *in vitro* de los extractos de *P. badius*, *P. grenadensis* y *P. fastuosus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta e Identificación de Hongos *Phellinus* spp.

Los hongos *Phellinus* spp. fueron recolectados en la sierra del municipio de Álamos, Sonora en octubre del 2010, posteriormente llevados a la ciudad de Hermosillo Sonora al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., para sus posteriores análisis. La identificación taxonómica de los hongos *P. badius* *P. fastuosus* y *P. grenadensis*, se realizó de acuerdo a la metodología basada por Gilbertson y Ryvarden (1987), realizando cortes tanto en el himenio como en el cuerpo fructífero a las cuales se le determinaron la presencia de setas, el tamaño, color y número de esporas (mm), así como el número de poros (mm), la reacción en KOH y la forma del hongo en estudio (Cuadro 5).

Extracción de los Compuestos Fenólicos

Se tomaron 10 g de muestra de *P. badius*, *P. grenandensis* y *P. fastuosus*. Se colocaron en recipientes conteniendo 100 mL de metanol:agua (7:3), macerándose en oscuridad por 10 días. Después de este tiempo, el extracto se filtró y el metanol del filtrado fue retirado usando un evaporador a presión reducida y temperatura de 45 °C, llevándolo a sequedad, para posteriormente someterlo a una hidrólisis alcalina con NaOH 4 M por 4 h en ausencia de luz. Después se realizó una hidrólisis ácida con HCl 4 M hasta alcanzar un pH de 2. Las muestras se congelaron y fueron liofilizadas obteniendo el

Cuadro 5. Características morfológicas de *P. badius*, *P. fastuosus* y *P. grenadensis*.

	<i>Phellinus fastuosus</i>	<i>Phellinus grenadensis</i>	<i>Phellinus badius</i>
Nombre científico	<i>Phellinus fastuosus</i> (Lév.) Ryv	<i>Phellinus grenadensis</i> (Murr.) Ryv	<i>Phellinus badius</i> (Berk. Ex Cke)
División	<i>Basidiomycota</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Basidiomycota</i>
Familia	<i>Hymenochaetaceae</i>	<i>Hymenochaetaceae</i>	<i>Hymenochaetaceae</i>
Setas	Ausente	Ausente	Ausente
Tipo de spora	Elipsoide a subglobosas	Ovaladas a elipsoide	Subglobosas a globosas
Basidiocarpo	Piliado	Piliado	Piliado
Esporas en KOH	Marrón	Marron oscuro	Amarrillas a café.
Tamaño de esporas(µm)	5 x 6	3 x 6	5 x 4
Número de poros (mm)	8	6	3
Forma del hongo	Aplanado a ungulado	Ungulado	ungulado

Fuente: Gilbertson y Ryvarden, 1987.

extracto en polvo, del cual, se determinó el rendimiento en base a los 10 g de muestra inicial (Oboh y Rocha, 2007)

Cuantificación de los Compuestos Fenólicos

Fenoles Totales

Los fenoles totales se determinaron de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton y Rossi (1965). La absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro UV-Visible (Varian Cary 50 Bio) a una longitud de onda de 765 nm. Ésta técnica se aplicó a cada una de las muestras por triplicado, la concentración de fenoles se calculó con base a la curva de calibración y se expresó como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mgEAG/g).

Flavonoides Totales

La determinación de flavonoides totales se realizó por el método descrito por Zhishen y colaboradores (1999). La absorbancia de las muestras fue evaluada a una longitud de onda de 415 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Visible (Varian Cary 50 Bio), esto se realizó para cada uno de los extractos preparados anteriormente y por triplicado. La absorbancia de cada muestra se comparó con una curva estándar de quercetina. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina por gramo de extracto (mgEQ/g).

Actividad Antibacteriana

La actividad antibacteriana de los extractos de hongos *Phellinus* spp. se evaluó contra distintas bacterias gram positivas (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) y bacterias gram negativas (*Salmonella enterica*

subsp. *enterica* serovar. Choleraesuis ATCC 14028 y *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43890) por el método de microdilución en caldo. Para ello, se tomaron 5 μL con una concentración de 1×10^5 UFC/ml del inóculo y 295 μL del extracto, se probó un rango de concentraciones entre 5-35 mg/mL, los límites establecidos fueron considerados en base a la turbidez de los extractos, con intervalos de 1 mg/mL, utilizando como diluyente caldo soya tripticasa (CST) y se colocó en una microplaca por triplicado a 37 °C durante 24 h. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó de manera visual comparando los pozos y tomando como CMI aquel que no presentó turbidez mayor a la del CST puro. Posteriormente, las CMI fueron corroboradas por medio de cinéticas de crecimiento en la cual se probó el testigo (inóculo y CST). La absorbancia se estableció a 600 nm con agitación orbital durante 30 segundos antes de cada lectura. Se realizaron 49 mediciones individuales durante un período de 24 horas. La CMI se expresó como la concentración más baja del extracto que inhiba el crecimiento visible de un microorganismo después de la incubación. Para conocer el efecto de los extractos sobre las diferentes fases del desarrollo bacteriano se utilizó la función de Baranyi y colaboradores (1993) para determinar cambios en los parámetros cinéticos: como el retraso de la fase lag (λ , h); la tasa máxima de crecimiento (μ_{max} , h^{-1}); el valor máximo del eje Y (y_{max} , DO_{600}) y el coeficiente de determinación (R^2).

Actividad Antiviral

La actividad antiviral de los extractos de hongos *Phellinus* spp. fue evaluada contra dos bacteriófagos MS2 y Φ -x174 con su respectiva bacteria huésped *E. coli* B-15597 y *E. coli* CN-13. Ambos bacteriófagos fueron considerados debido a que representan virus con diferencias en su tipo de material genético así como en su estructura proteica. El bacteriófago MS2 es un virus de ARN monocatenario desnudo con cápside. Éste tipo de virus es similar a enterovirus, contribuyentes de enfermedades transmitidas por alimentos, por lo cual, dicho bacteriófago es un buen indicador de la

actividad antiviral de los extractos. Mientras que el bacteriófago Φ -x174 es un virus de ADN monocatenario desnudo sin cápside.

Para determinar el efecto antiviral de los extractos de hongos se realizó la técnica de formación de placas líticas. Consiste en colocar 1 mL de la solución viral de 2 logaritmos de unidades formadoras de placas líticas por mililitro (UFP/mL) en un vial de cada bacteriófago, y se añadió 100 μ L del extracto (10 mg/mL) de cada hongo, respectivamente. Se obtuvo una concentración final en el vial de 0.9 mg/mL de cada extracto, se agitó vigorosamente durante 5 minutos. Se consideró un testigo el cual consistió en agregar al vial 1 mL de la solución viral y 100 μ L de caldo soya tripticasa (CST), control negativo para descartar el efecto antibacteriano de los extractos, lo cual consistió en añadir al vial 1 mL de CST y 100 μ L de cada extracto en presencia de los inóculos bacterianos. Por último se usó un blanco el cual consistió en agregar 1100 μ L de CST al vial para evaluar el crecimiento normal de la bacteria. Mediante la técnica de doble capa de agar se realizó la evaluación antiviral la cual consistió en vaciar a las placas Petri 8 mL de agar soya tripticasa y se dejó solidificar. Posteriormente, se procedió a añadir la siguiente capa la cual consiste en un agar suave de soya tripticasa con un 0.8 % de agar, a la cual se le agregó 1 mL del inóculo respectivo para cada bacteriófago evaluado (1×10^5 UFC/mL) y se añadió a las placas Petri, seguido de agregar 1 mL de los viales para cada tratamiento descrito anteriormente así como blanco testigo y testigo negativo y se incubó por 24 h a 37 °C, esto se realizó para cada bacteriófago y extracto utilizado por triplicado. Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción en las UFP del bacteriófago comparando con el testigo.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un diseño completamente al azar para estimar diferencias significativas entre los factores. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) teniendo como único factor a los extractos de hongos (*P. badius*, *P. grenadensis*, y *P. fastuosus*) y como variables de respuesta el contenido de fenoles

totales, flavonoides totales, la CMI, λ , μ_{\max} , y y_{\max} de cada bacteria (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, y *S. Choleraesuis*) y el porcentaje de reducción viral de cada bacteriófago (MS2 y Φ -x174). Además, se realizó un método de comparación de medias por medio de la prueba de Tukey-Kramer para indicar las diferencias entre los extractos. Se llevó a cabo un análisis de correlaciones de Pearson para evaluar la posible relación existente entre el contenido de fenoles y flavonoides totales vs la capacidad antibacteriana y actividad antiviral. Los análisis se hicieron en el paquete estadístico NCSS versión 2007

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Cuantificación de los Compuestos Fenólicos

En el Cuadro 6 se muestra el rendimiento obtenido de cada extracto el cual fue similar para todos los extractos obtenidos ($P>0.05$). Además, se puede observar el contenido de fenoles y flavonoides totales los cuales presentaron diferencias entre especies ($P<0.05$). El extracto de *P. badius* presentó el mayor contenido de fenoles y flavonoides totales con valores de 209.76 mgEAG/g y 27.61 mgEQ/g, respectivamente, seguido de *P. grenadensis* (111.40 mgEAG/g y 13.12 mgEQ/g) y *P. fastuosus* (96.96 mgEAG/g y 10.40 mgEQ/g).

Para contrastar el contenido de compuestos fenólicos de los extractos de hongos *Phellinus* con otros hongos se muestra el trabajo realizado por Reis y colaboradores (2011). En él analizaron el contenido de fenoles y flavonoides totales como los compuestos responsables de la actividad antioxidante de los extractos, sin embargo, no fueron evaluados como antibacterianos. Siendo para *Amanita porphyria* el contenido de fenoles totales de 57.76 mgEAG/g y de flavonoides totales de 11.46 mgEQ/g, para *Collybia fusipes* de 20.44 mgEAG y 4.82 mgEQ/g, *Hebeloma sinapizans* 39.27 mgEAG/g y 4.82 mgEQ/g, *Inocybe splendens* de 10.67 mgEAG/g y 1.50 mgEQ/g, *Lactarius hepaticus* de 20.55 mgEAG/g y 7.07 mgEQ/g, *Lentinus tigrinus* de 17.30 mgEAG/g y 3.77 mgEQ/g, *Piptoporus betulinis* de 34.94 mgEAG/g y 6.79 mgEQ/g, *Pluteus murinus* de 9.62 mgEAG/g y 1.73 mgEQ/g, y *Russula emetica* de 73.18 mgEAG/g y 5.82 mgEQ/g. Comparando con los resultados obtenidos, se puede observar un mayor contenido de fenoles y flavonoides totales en los extractos de hongos *Phellinus*,

Cuadro 6. Contenido de fenoles y flavonoides totales de extractos de *Phellinus* spp.

Hongo	Rendimiento	Fenoles (mgEAG/g)	Flavonoides (mgEQ/g)
<i>P. badius</i>	18.4 ^{a*}	209.76 ^a	27.61 ^a
<i>P. grenadensis</i>	17.5 ^a	111.40 ^b	13.12 ^b
<i>P. fastuosus</i>	18 ^a	96.96 ^b	10.40 ^b

* Diferente literal en una misma columna indican diferencia significativa (P<0.05).

lo cual indica la capacidad de almacenar en su cuerpo fructífero una mayor cantidad de estos compuestos que otros hongos.

Esta diferencia en el contenido de compuestos fenólicos ha sido mencionada por algunos autores. Los hongos *Phellinus* son la principal fuente de compuestos fenólicos en hongos, de estos se aisló el primer compuesto fenólico (hispidina) del cual hoy en día se conocen diversos compuestos derivados de este únicamente encontrados en hongos de éste género (De Silva *et al.*, 2012). Esta capacidad de acumular compuestos fenólicos en sus cuerpos fructíferos puede deberse al ciclo vital de estos mismos, ya que estos hongos son considerados parásitos para árboles (Luley, 2006). Son conocidos por causar podredumbre blanca al árbol, es decir, son hongos que utilizan como fuente de carbono la lignina presente en el árbol dejando por un lado la celulosa la cual se puede observar en un polvo blanquecino; son iniciadores de la pudrición del árbol, cuando el árbol aun no presenta daño, lo que hace disponer de una mayor cantidad de lignina; la podredumbre del árbol se da en el duramen, es decir en el centro del tronco, por lo que todo esto da como resultado un cuerpo fructífero leñoso debido a que degrada la lignina y la incorpora formando el cuerpo fructífero generando nuevos compuestos fenólicos derivados de la degradación de la lignina del árbol. A diferencia de otros hongos de pudrición blanca utilizados en la medicina tradicional como el género *Ganoderma* el cual presenta un cuerpo fructífero poco leñoso debido a que este se da en la etapa final de la podredumbre del árbol, produce podredumbre de zoca, es decir, en la parte baja del tronco y raíz, esto indica una menor disponibilidad de lignina lo cual se refleja en su cuerpo fructífero y en el contenido de compuestos fenólicos.

En *Phellinus linteus* se encontró que son los compuestos fenólicos los mayoritarios en cuanto a compuestos antioxidantes con valor de 140.2 mgEAG/g. En otro estudio con *P. merrillii*, *P. fastuosus*, *P. grenandensis* y *P. badius*, la fracción no polar extraída con acetato de etilo mostró los mejores resultados en cuanto al contenido de fenoles totales con valores de 873.66, 422.65, 300.90, y 33.30 mgEAG/g, y flavonoides totales de 291.71, 214.66, 105.05, y 115.02 mgEQ/g, respectivamente (Ayala-Zavala *et al.*, 2012). Se puede observar que el contenido de fenoles totales es menor en los trabajos

mencionados que en este trabajo con excepción de éste último. Lo cual podría deberse a la zona geográfica y tipo de árbol donde se colectó, a la diferencia entre especies, y no menos importantes el tipo de extracción realizada, lo cual puede favorecer a los extractos evaluados en este trabajo reflejándose en el alto contenido de compuestos fenólicos. Con esto se muestra el alto contenido de compuestos fenólicos presentes en extractos de hongos del género *Phellinus*, los cuales estos mismos extractos han presentado ciertas propiedades antibacterianas y antivirales.

Capacidad Antibacteriana

La CMI obtenidas de cada extracto para las distintas cepas se muestra en el Cuadro 7. Para la bacteria *E. coli* O157:H7 se observa que el extracto que presentó la menor CMI fue *P. badius* con 13 mg/mL, seguido de *P. grenadensis* el cual fue 1.54 veces más que en *P. badius*, mientras que en *P. fastuosus* fue de 2.08 veces mayor comparado con *P. badius*. Manteniendo este comportamiento en la actividad antibacteriana podemos observar los resultados obtenidos en *L. monocytogenes* en el cual *P. badius* presentó una CMI de 10 mg/mL, seguido de *P. grenadensis* con una CMI 1.5 veces mayor que *P. badius*, y *P. fastuosus* de 2.5 veces mayor que en *P. badius*. Esta tendencia en la actividad antibacteriana se ve reflejada en el contenido de compuestos fenólicos, los cuales son los responsables de dicha actividad antibacteriana. Sin embargo, ésta tendencia no se vio reflejada en *S. Choleraesuis* en la cual el extracto de *P. fastuosus* fue quien presentó la menor CMI siendo de 15 mg/mL, seguido de *P. badius* siendo 1.33 veces mayor a *P. fastuosus*, y para *P. grenadensis* fue 2 veces mayor con respecto a *P. fastuosus*. Esto puede deberse más que al contenido de compuestos fenólicos al tipo de ellos, en el cual pudiera variar con respecto al resto de los extractos, para ello sería necesario realizar la identificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos. Por otra parte, la bacteria *S. aureus* presentó resistencia a los extractos evaluados a una concentración de 35 mg/mL, la cual no se aumentó por efecto de la turbidez presentada en los extractos al ser evaluados a una mayor concentración.

Cuadro 7. Concentración mínima inhibitoria de extractos de hongos *Phellinus* spp.

CMI (mg/mL)				
Extracto	<i>E. coli</i>	<i>S. Choleraesuis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
<i>P. badius</i>	13 ^{a*}	20 ^b	10 ^a	>35
<i>P. grenadensis</i>	20 ^b	30 ^c	15 ^b	>35
<i>P. fastuosus</i>	27 ^c	15 ^a	25 ^c	>35

*Distinta literal en una misma columna indica diferencias significativas (P<0.05).

Este efecto observado sobre la resistencia de *S. aureus*, así como la efectividad contra el resto de las cepas evaluadas podría deberse a la morfología en particular de cada cepa expuesta a los extractos. Donde *E. coli* y *S. Choleraesuis* son bacterias Gram negativas, mientras que *L. monocytogenes* es una bacteria Gram positiva, a pesar de esta diferencia se pueden encontrar ciertas similitudes como que las 3 bacterias son bacilos y además son peritricas, es decir presentan flagelos en todo su cuerpo. Estas similitudes no las comparten con *S. aureus* puesto que es un coco átrico, sin embargo su mecanismo de defensa se puede deber principalmente a que forman agregados de células bacterianas y con esto constituyen un recubrimiento con exopolisacáridos que confieren propiedad de defensa. Esto mismo se observó en un estudio con distintas cepas de *S. aureus* sensible a antibióticos β -lactámicos y resistente a los mismos y se evaluó con distintos flavonoides obteniendo como resultados que las células de *S. aureus* formaban agregados que le otorgaba cierta resistencia a estos compuestos más allá de la reducción aparente del número de células por efecto de los agregados formados (Stapleton *et al.*, 2007, Cushnie y Lamb, 2011).

Comparando la actividad antibacteriana evaluada en este estudio con otras especies de hongos, podemos observar el siguiente estudio donde evaluaron la actividad antibacteriana de *Phellinus rimosus*, *Navesporus floccosa* y *Ganoderma lucidum* por medio de la técnica de difusión en disco (Sheena *et al.*, 2003). Debido a la diferencias entre métodos en este trabajo se utiliza una escala para evaluar la efectividad del extracto ante las bacterias tomando en cuenta la zona de inhibición en la cual determinaron como eficaz a una zona de inhibición mayor a 20 mm, moderadamente eficaz entre 16-20 mm, y poco eficaz menor de 15 mm, la cual, usaremos para realizar las comparaciones con nuestros resultados. *P. rimosus* se evaluó a una concentración de 0.8 mg/mL presentando halos de inhibición contra *E. coli* de (16.3 mm), *S. aureus* (12.3 mm), *S. Tiphymurium* (12.6 mm), y *B. subtilis* (18.3 mm), seguido de *N. floccosa* con halos de inhibición contra *E. coli* de (12.0 mm), *S. aureus* (16.6 mm), *S. Tiphymurium* (14.3 mm), y *B. subtilis* (19.0 mm), y *G. lucidum* presentó halos de inhibición contra *E. coli* de (10.0 mm), *S. aureus* (0 mm), *S. Tiphymurium* (10.0 mm), y *B. subtilis* (12.3 mm). Lo cual, muestra una moderada eficacia para los extractos, sin embargo, se puede observar una menor

concentración para el extracto de *P. rimosus*, por otro lado, no se realizaron estudios del contenido de compuestos fenólicos por lo que se desconoce la presencia de éstos en los extractos. Los resultados en nuestro estudio presentaron mayor eficacia debido a que se obtuvo la CMI, mientras que la literatura muestra una moderada y baja eficacia contra bacterias similares.

Tomando en cuenta el comportamiento obtenido en las CMI de *Salmonella Choleraesuis* podemos comparar con estudios similares en donde evaluaron la actividad antibacteriana de extractos metanólicos y acuosos de *Phellinus* sp. contra bacterias gram positivas (*S. aureus* y *Sstreptococcus mutans*) y gram negativas (*E. coli* y *S. Typhi*) (Balakumar *et al.*, 2011). Los resultados mostraron que el extracto metanólico presentó resistencia sobre *S. Typhi* y eficaz a moderada sobre el resto de las bacterias evaluadas, mientras que el extracto acuoso fue eficaz contra las bacterias evaluadas. Esta resistencia del extracto metanólico concuerda con los resultados obtenidos en la resistencia a *Salmonella*, sin embargo, en nuestro estudio se logró obtener la CMI en el rango establecido. Un estudio similar con *Phellinus torulosus* evaluó la actividad antibacteriana contra cepas gram positivas (*L. monocytogenes* y *B. cereus*) y gram negativas (*E. coli* y *S. Typhi*) en extractos etanólicos, acetato de etilo, acetona y cloroformo. Los resultados mostraron resistencia sobre bacterias gram negativas. Por lo tanto en ambos trabajos se muestra resistencia sobre *Salmonella* a excepción del extracto acuoso, lo que podría indicar sensibilidad a compuestos polares los cuales podría presentarse en mayor proporción en el extracto de *P. fastuosus*, sin embargo, en nuestro estudio se obtuvieron CMI en el rango de concentraciones establecidas debido a la hidrólisis llevada a cabo durante el proceso de extracción.

Retomando la resistencia mostrada en *S. aureus* a los extractos de *Phellinus*, se puede observar un estudio similar donde evaluaron la actividad antibacteriana sobre *S. aureus* y *S. epidermis* en extractos de *Phellinus igniarius* (Sittiwet y Puangpronpitag, 2008). Estos fueron evaluados a 100 mg/mL obteniendo baja eficacia en *S. aureus* con una zona de inhibición de 9 mm y resistencia a *S. epidermis* al no presentar zona de inhibición. Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro trabajo al no obtener

la CMI a 35 mg/mL, lo cual concuerda a su vez con lo anteriormente mencionado acerca de la tendencia de *S. aureus* a la formación de agregados para producir un recubrimiento de exopolisacáridos que le otorgan resistencia a diversos compuestos (Stapleton *et al.*, 2007).

Mediante la función de Baranyi (1993) se determinaron los cambios en los parámetros cinéticos de λ , μ_{\max} , y y_{\max} (Cuadro 8) para cada bacteria expuesta a los distintos extractos de *Phellinus* spp. La fase lag (λ) es la etapa de adaptación de las bacterias al nuevo ambiente en el cual las bacterias no presentan crecimiento, por ello, durante esta etapa la tasa de crecimiento es baja. Esto puede facilitar la inactivación o inhibición, tal como se observó durante los distintos tratamientos, en los que se logró retardar la fase lag en *E. coli* 4.4 veces con respecto al testigo para el extracto de *P. badius*, 2.3 veces para *P. grenadensis*, y 2.7 veces para *P. fastuosus* (Figura 4a). Lo anterior indica que la adición del extracto afectó la capacidad de adaptación de la bacteria al medio en distintas proporciones por efecto de la concentración del extracto, el cual, podría estar afectando a la membrana al no permitir la absorción de nutrientes mediante los distintos mecanismos de difusión al interior de la célula, sin embargo es necesario realizar estudios que permitan obtener mayor información referente a lo mencionado.

Por otro lado, la tasa máxima de crecimiento (μ_{\max}) también se vio afectada por efecto de la adición de los extractos, la cual indica, el crecimiento máximo obtenido durante la fase exponencial, *E. coli* presentó una reducción del 62 % de la tasa máxima de crecimiento con respecto al testigo para *P. badius*, 57 % para *P. grenadensis*, y 52 % para *P. fastuosus*. Se observó que el extracto fue capaz de afectar la capacidad de reproducción de la bacteria inhibiendo posiblemente la actividad y producción de enzimas necesarias para la reproducción lo que indica un daño al interior de la bacteria producto del retardo de λ . Para el valor máximo en el eje Y (y_{\max}), el cual indica el mayor crecimiento obtenido durante las 24 h de incubación y corresponde al final de la fase exponencial. Se observa una disminución del 85 % con respecto al testigo para *P. badius*, seguido de un 80 % para *P. grenadensis*, y 76% para *P. fastuosus*. El valor de y_{\max} indica el crecimiento máximo obtenido el cual se encuentra al término de la fase exponencial y

Cuadro 8. Efecto de la adición de extractos de hongos *Phellinus* spp. sobre los Parámetros cinéticos de crecimiento en *E. coli*, *S. Choleraesuis* y *L. monocytogenes*.

Bacteria	Extracto	λ (h)	μ_{\max} (h ⁻¹)	y_{\max} (DO 600 nm)	R ²
<i>E. coli</i> O157:H7	Testigo	3.4 ^{d*} ± 0.102	0.209 ^d ± 0.006	2.463 ^d ± 0.074	0.98
	<i>P. badius</i>	18.5 ^a ± 0.555	0.079 ^a ± 0.002	0.468 ^b ± 0.014	0.96
	<i>P. grenadensis</i>	11.2 ^c ± 0.336	0.100 ^c ± 0.003	0.593 ^c ± 0.018	0.81
	<i>P. fastuosus</i>	12.6 ^b ± 0.378	0.089 ^b ± 0.003	0.376 ^a ± 0.011	0.96
<i>S. Choleraesuis</i>	Testigo	9.8 ^d ± 0.294	0.383 ^d ± 0.011	1.291 ^d ± 0.039	0.99
	<i>P. badius</i>	18 ^c ± 0.540	0.005 ^a ± 0.000	0.082 ^a ± 0.002	0.98
	<i>P. grenadensis</i>	21 ^a ± 0.630	0.079 ^c ± 0.002	0.288 ^c ± 0.009	0.92
	<i>P. fastuosus</i>	19.8 ^b ± 0.594	0.037 ^b ± 0.001	0.161 ^b ± 0.005	0.99
<i>L. monocytogenes</i>	Testigo	4.5 ^d ± 0.135	0.230 ^d ± 0.007	2.349 ^c ± 0.070	0.98
	<i>P. badius</i>	10.6 ^b ± 0.318	0.131 ^c ± 0.004	0.411 ^a ± 0.012	0.84
	<i>P. grenadensis</i>	9.2 ^c ± 0.276	0.037 ^a ± 0.001	0.401 ^a ± 0.012	0.85
	<i>P. fastuosus</i>	13.8 ^a ± 0.414	0.063 ^b ± 0.002	0.591 ^b ± 0.018	0.98

* Distinta literal entre columna para cada bacteria indica diferencias ($P \leq 0.05$) por bacteria. λ corresponde a la fase de adaptación o fase lag, μ_{\max} corresponde a la tasa máxima de crecimiento, y_{\max} el valor máximo obtenido en el eje Y correspondiente a la absorbancia máxima que representa el crecimiento bacteriano.

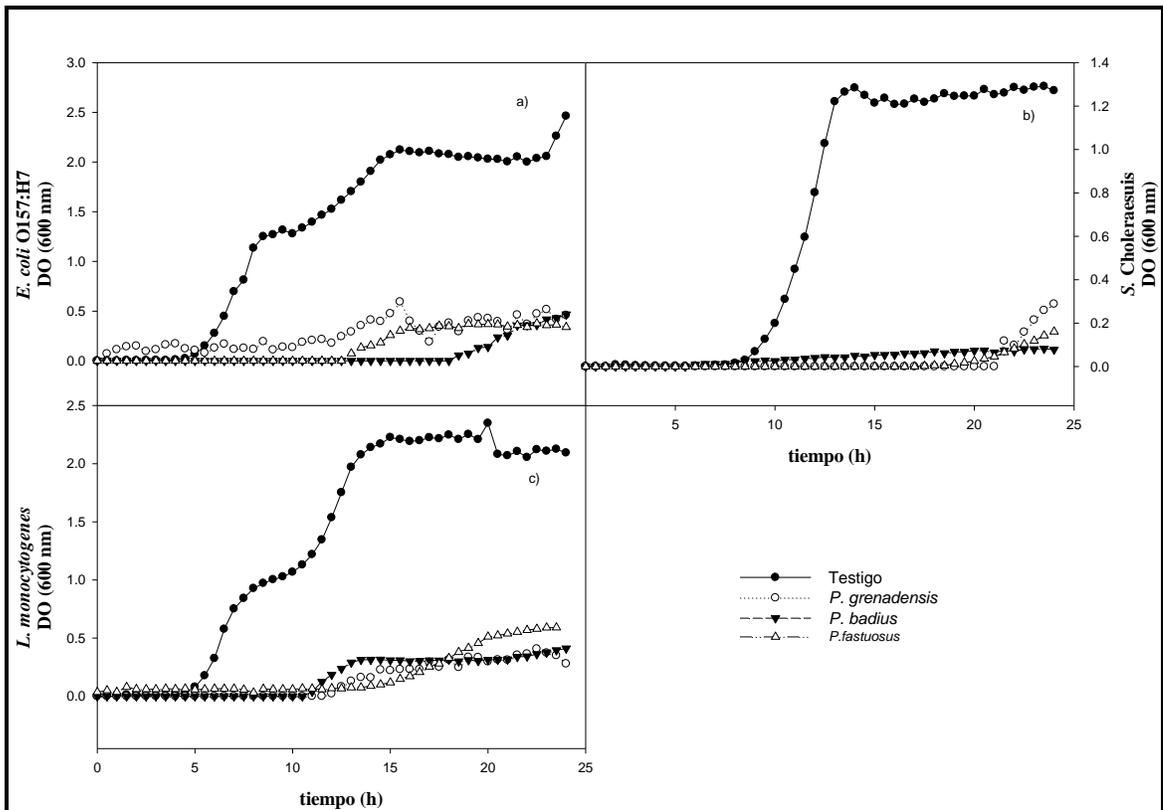


Figura 4. Curvas de sensibilidad bacteriana de *E. coli*, *S. Choleraesuis* y *L. monocytogenes* de los extractos de hongos de *Phellinus* spp. a) *E. coli* O157:H7; b) *S. Choleraesuis*; c) *L. monocytogenes*.

este valor está relacionado con los parámetros mencionados anteriormente al prolongar λ y causar una disminución de μ_{\max} el valor de este se ve disminuido, de ahí que los valores presenten las mismas tendencias que los parámetros anteriores.

Los parámetros cinéticos fueron calculados de la misma manera para *S. Choleraesuis* en los cuales se observa que λ se retardo 1.4 veces para el extracto de *P. badius* comparado con el testigo, 1 vez para *P. grenadensis*, y 0.8 veces para *P. fastuosus*. De la misma manera μ_{\max} se afectó, causando disminución hasta en un 99 % para el extracto de *P. badius*, seguido de *P. grenadensis* con un 90 %, y *P. fastuosus* con un 80 %. En la Figura 4b se observa los distintos comportamientos en el cual el extracto de *P. badius* pueda presentar un efecto bactericida al verse afectada μ_{\max} en un 99 %, y un efecto bacteriostático para *P. grenadensis* y *P. fastuosus* ya que se obtuvo un retraso en λ y una disminución de μ_{\max} . Este comportamiento se puede ver reflejado en los altos porcentajes de reducción de y_{\max} , el cual fue de 93 % para *P. badius* comparado con el testigo, seguido de *P. grenadensis* con un 87 %, y por ultimo *P. fastuosus* con un 77 %. Lo cual indica que el extracto de *P. badius* presentó los mejores resultados en cuanto a los parámetros cinéticos evaluados, pudiendo presentar un efecto bactericida sobre *S. Choleraesuis*.

En lo relativo a los parámetros cinéticos para *L. monocytogenes* obtenidos de la adición de extractos de *Phellinus* spp. Se puede observar un retraso en λ de 1.4 veces para *P. badius* con respecto al testigo, 1.3 veces para *P. grenadensis*, y 2.1 veces para *P. fastuosus*. Mientras que μ_{\max} presentó una disminución del 43 % *P. badius*, 84 % *P. grenadensis*, y 81 % en *P. fastuosus*. El valor de y_{\max} disminuyó en un 82 % para *P. badius*, 83 % en *P. grenadensis*, y 75 % en *P. fastuosus*. Lo cual, muestra un efecto bacteriostático al retardarse λ y disminuir μ_{\max} , sin embargo, a pesar de que *P. fastuosus* presentó el mayor retraso de λ y una reducción de μ_{\max} del 81%, este presentó una fase exponencial extendida lo cual se refleja en el valor de y_{\max} siendo mayor para este que para *P. badius* y *P. grenadensis* (Figura 4c). Más allá de los mecanismos de acción que los extractos presenten se puede observar una eficacia similar para el extracto de *P. badius* y *P. grenadensis* debido a que presentan una y_{\max} similar. Esto evidencia el

mecanismo de acción de los compuestos fenólicos los cuales deben su efecto a la concentración siendo a bajas concentraciones bacteriostáticos y al aumentar ésta se vuelve bactericida, esto coincide con lo analizado por Cushnie y Lamb (2011).

En otro estudio donde realizaron extractos de repollo para evaluar los parámetros cinéticos sobre *L. monocytogenes* y *Salmonella* Abony, se observó un comportamiento similar al mostrado en nuestro estudio por efecto de la concentración (Jaiswal *et al.*, 2011). Para *L. monocytogenes* se observa que la concentración al 2.8 % y 1.4 % no presentaron crecimiento, mostrando un efecto bactericida al igual que en algunos de los casos evaluados en nuestro trabajo y el resto de las concentraciones afectando el crecimiento de la bacteria en diferentes proporciones. Mientras que en *S. Abony* se observó un efecto bacteriostático para todas las concentraciones evaluadas causando un retraso de la fase lag hasta de 4 h y una disminución de μ_{\max} hasta en un 60 % comparado con el testigo. Estos comportamientos sobre distintas bacterias coinciden con lo observado en nuestro trabajo el cual presenta diferentes mecanismos de acción sobre las distintas bacterias evaluadas lo que corrobora los mecanismos de acción de los compuestos fenólicos, los cuales pueden actuar como bacteriostático o bactericida variando la concentración de estos.

En otro estudio evaluaron la actividad antibacteriana de compuestos fenólicos sobre *L. monocytogenes* mediante curvas de sensibilidad (Rodríguez Vaquero *et al.*, 2007). Los compuestos fenólicos probados fueron ácido cafeico, ácido gálico, ácido protocateico y ácido vanílico a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No hubo crecimiento de la bacteria al añadir ácido cafeico, mostrando un efecto bactericida, mientras que el ácido gálico y ácido protocateico presentan un efecto similar al inhibir el crecimiento en un 50 %, lo cual puede deberse a la similitud en sus estructuras. El ácido vanílico presentó el menor efecto inhibitorio al retardar el crecimiento en un 40 % aproximadamente. Esto evidencia los diferentes mecanismos de acción de los compuestos fenólicos de acuerdo a su estructura y arreglo tridimensional, lo cual, al tener un extracto con una diversidad de compuestos fenólicos potencia los mecanismos de acción mediante un efecto sinérgico entre los compuestos presentes en los extractos de *Phellinus* spp.

Se realizaron correlaciones de Pearson entre el contenido de fenoles y flavonoides totales con las CMI de las bacterias, con la finalidad de obtener información que sustente que los compuestos fenólicos presentes en los extractos de *Phellinus* spp son los responsables de la actividad antibacteriana observada anteriormente. Las correlaciones obtenidas muestran que existe relación con los compuestos fenólicos y la capacidad antibacteriana (Cuadro 9). Para el contenido de fenoles totales se obtuvieron correlaciones de 0.8880 para *E. coli* (P<0.0013), *L. monocytogenes* de 0.8050 (P<0.0088), y *S. Choleraesuis* de 0.0552 (P>0.880), mientras que las correlaciones en flavonoides fueron de 0.9040 para *E. coli* (P<0.0008), *L. monocytogenes* de 0.8260 (P<0.0061), y *S. Choleraesuis* de 0.0291 (P>0.9410). Observándose un alto coeficiente de correlación para *E. coli* y *L. monocytogenes* con una baja probabilidad indicando la relación entre los compuestos fenólicos y la capacidad antibacteriana, sin embargo, para *S. Choleraesuis* los coeficientes de correlación son bajos con una alta probabilidad indicando que no existe relación entre el contenido de compuestos fenólicos con la capacidad antibacteriana mostrada, lo cual, se pueda deber al tipo de compuestos fenólicos presentes en el extracto de *P. fastuosus* causando mayor susceptibilidad *S. Choleraesuis*, tal como se vio en los estudios previos mencionados en donde el extracto acuoso fue el que presentó eficacia sobre *S. Typhi*.

Actividad Antiviral

Los extractos de hongos *Phellinus* presentaron actividad antiviral (Cuadro 10) para el bacteriófago MS2 y Φ -X174. El extracto que presentó el mayor porcentaje de inhibición sobre el bacteriófago MS2 fue el extracto de *P. badius* con 41 % de reducción comparado con el testigo, seguido de *P. grenadensis* con un 37 % de reducción y por ultimo *P. fastuosus* con un 29 % de reducción. Para el caso del bacteriófago Φ -X174 se observó la misma tendencia al presentar mayor actividad antiviral el extracto de *P. badius* con un 38 % de reducción comparado con el testigo, seguido de *P. grenadensis* (33 %

Cuadro 9. Correlaciones de Pearson fenoles y flavonoides totales vs capacidad antibacteriana

Parámetros correlacionados	Coefficiente de correlación (r)	Probabilidad (P)
Fenoles vs CMI		
<i>E. coli</i>	0.8880	0.0013
<i>S. Cholerasuis</i>	0.0552	0.8880
<i>L. monocytogenes</i>	0.8050	0.0088
Flavonoides vs CMI		
<i>E. coli</i>	0.9040	0.0008
<i>S. Cholerasuis</i>	0.0291	0.9410
<i>L. monocytogenes</i>	0.8260	0.0061

Cuadro 10. Actividad antiviral de extractos de hongos *Phellinus* spp.

Extracto	MS2		Φ-X174	
	UFP/mL	Reducción (%)	UFP	Reducción (%)
Testigo	107 ^{d*} ± 3.969		106 ^d ± 4.041	
<i>P. badius</i>	63 ^a ± 1.607	41 ^a ± 0.669	66 ^a ± 2.517	38 ^a ± 0.072
<i>P. grenadensis</i>	67 ^b ± 2.363	37 ^b ± 0.143	71 ^b ± 2.784	33 ^b ± 0.084
<i>P. fastuosus</i>	76 ^c ± 2.646	29 ^c ± 0.169	78 ^c ± 3.014	27 ^c ± 0.152

* Distinta literal indica diferencia entre columna. UFP unidades formadoras de placas líticas.

de reducción) y *P. fastuosus* (27 % de reducción). Con esto se puede observar que los extractos de hongos *Phellinus* presentan actividad antiviral que se puede deber principalmente al contenido de compuestos fenólicos presentes en los extractos, además, un análisis de la técnica nos proporciona información del mecanismo de acción antiviral de los extractos ya que los tratamientos fueron llevados a cabo mediante el contacto previo de la solución viral con el extracto, por lo tanto las interacciones para llevar a cabo la inhibición se debe al bloqueo de los ligandos presentes en el virus por medio de los compuestos presentes en el extracto. Lo que se puede observar en las correlaciones descritas a continuación.

Las correlaciones de Pearson obtenidas para el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antiviral se muestran en el Cuadro 11. La correlación del contenido de fenoles totales y la actividad antiviral para el bacteriófago MS2 fue de 0.837 (P=0.005) y en el caso del bacteriófago Φ -X174 de 0.887 (P=0.001). En el caso de flavonoides totales con la actividad antiviral sobre el bacteriófago MS2 fue de 0.852 (P=0.004) y para Φ -X174 de 0.902 (P=0.001). Como se pudo observar las correlaciones fueron altas con una probabilidad menor al 0.05 lo que puede indicar que el contenido de compuestos fenólicos presentes en los extractos de hongos *Phellinus* son los responsables de la actividad antiviral al observarse que a mayor contenido de compuestos fenólicos mayor es el porcentaje de reducción de los bacteriófagos evaluados.

Estudios similares al nuestro evaluaron la actividad antiviral contra los bacteriófagos MS2 y Φ -X174 observando un comportamiento similar al nuestro. En donde el bacteriófago MS2 fue más sensible que Φ -X174 en jugos de arándano y procianidinas a distintos tiempos de contacto (Su *et al.*, 2010). Además, evaluaron la eficacia contra otros virus como norovirus murino (MNV-1) y calicivirus felino (FCV-F9) y se observó mediante microscopía electrónica de barrido que tanto el jugo de arándano como las procianidinas produjeron cambios en la morfología del virus lo que provocó la inhibición de la infección viral. De igual manera, distintos compuestos aislados de plantas fueron evaluados contra virus de herpes simple (Gescher *et al.*, 2011),

Cuadro 11. Correlación de Pearson entre el contenido de compuestos fenólicos de los extractos de hongos *Phellinus* y la actividad antiviral.

Parámetros correlacionados	Coefficiente de correlación (r)	Probabilidad (P)
Fenoles vs antiviral		
MS2	0.837	0.005
Φ-X174	0.887	0.001
Flavonoides vs antiviral		
MS2	0.852	0.004
Φ-X174	0.902	0.001

obteniendo una alta eficacia en moléculas grandes como procianidinas observándose un efecto sobre el tamaño de la molécula, a mayor tamaño molecular mayor fue el efecto antiviral, presentando la menor actividad antiviral ácido gálico debido a la simplicidad de su estructura. Efectos similares podrían presentarse en los extractos evaluados de hongos de *P. badius*, *P. grenadensis* y *P. fastuosus*, los cuales debido a su cuerpo fructífero leñoso se pueden encontrar taninos condensados y lignanos, los cuales fueron hidrolizados durante el proceso de extracción dando lugar a moléculas de menor tamaño como galotaninos y procianidinas con actividad antiviral.

Extractos metanólicos y acuosos de la planta *Lactuca sativa* fueron evaluados como antioxidantes y antiviral (Edziri *et al.*, 2011). El extracto metanólico mostró el mayor contenido de compuestos fenólicos con 235 mg equivalentes de catequina (EC)/mL y con un IC₅₀ de 3.5 µg/mL del radical libre 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), mientras que en el extracto acuoso se observó un menor contenido de compuestos fenólicos (mgEC/mL) y mayor IC₅₀ (4.1 µg/mL). Sin embargo al evaluar la actividad antiviral contra citomegalovirus humano no se observó efecto de la actividad antioxidante sobre la actividad antiviral mostrando en ambos extractos un IC₅₀ de 200 µg/mL. En otro estudio, se evaluaron 3 flavonoides glicosilados aislados de extractos de hojas de la planta *Ficus benjamina*, quercetina 3-O-rutinosido, kaempferol 3-O-rutinosido y kaempferol 3-O-robinobiosido, y se comparó con quercetina y kaempferol en la efectividad de inhibición del virus de herpes simple (Yarmolinsky *et al.*, 2012). Se observó que los compuestos glicosilados presentaron un EC₅₀ menor kaempferol 3-O-robinobiosido (0.9 µM), quercetina 3-O-rutinosido (1.5 µM) y kaempferol 3-O-rutinosido (3.0 µM) comparado con los compuestos agliconados de quercetina (60 µM) y kaempferol (25 µM). Esto indica que no existe relación entre la actividad antioxidante y la actividad antiviral debido a que los compuestos agliconados presentan mayor actividad antioxidante. En otro estudio se evaluaron extractos con distintos solventes (metanol, butanol y acetato de etilo) de la planta *Geranium sanguineum* contra virus de influenza A (Sokmen *et al.*, 2005). El extracto metanólico presentó el menor IC₅₀, así como el mayor contenido de taninos y la menor actividad antioxidante. Con ello se observa que la eficacia antiviral no presenta relación con la actividad antioxidante, pero si con el

contenido de compuestos fenólicos. Esta misma relación se observó en nuestro estudio debido a la alta correlación obtenida entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antiviral.

Diversos autores mencionan varios posibles mecanismos de inhibición viral en distintas etapas del proceso de infección inhibiendo la acción de los ligandos y evitando se lleve a cabo la infección (Mukhtar *et al.*, 2008, Savi *et al.*, 2010, Qiu y Chen, 2012, Li *et al.*, 2013). Otra posibilidad es por la inactivación de enzimas necesarias para la replicación del virus. Por ello, es necesario realizar estudios utilizando técnicas que pueden ayudar a elucidar los mecanismos de acción de los extractos evaluados de *Phellinus*. En este trabajo solo se puede observar un mecanismo de acción debido a la técnica evaluada, la cual se da por bloqueo de los ligandos del virus evitando se inicien los procesos de infección, sin embargo, sería interesante evaluar un método que nos permita observar un mecanismo de acción diferente al mostrado en este trabajo.

En la Figura 5 se muestra un esquema general de la actividad biológica evaluada en este trabajo y sus posibles mecanismos de acción antibacterianos y antivirales de extractos de hongos *Phellinus*.

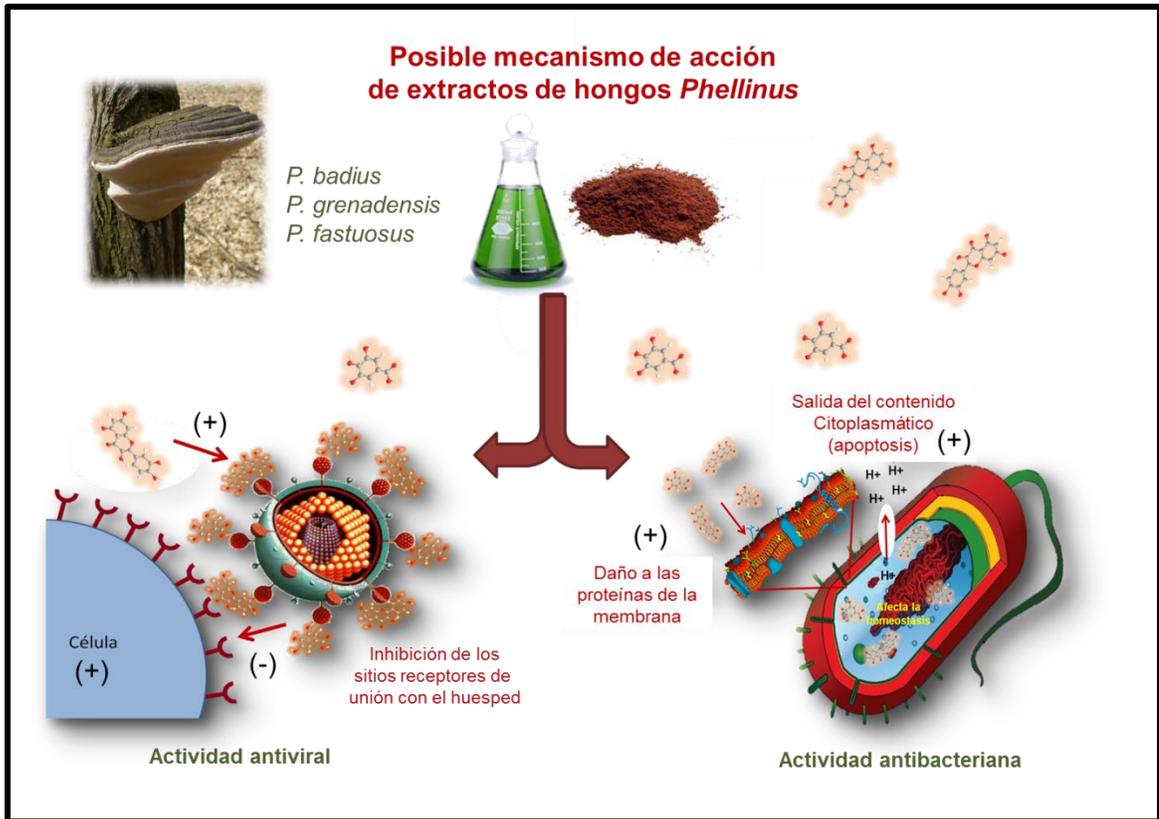


Figura 5. Posible mecanismo de acción antibacteriano y antiviral de extractos de hongos *Phellinus* spp.

En este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana y antiviral de extractos ricos en compuestos fenólicos de hongos *P. badius*, *P. grenadensis* y *P. fastuosus*. Dichas actividades bioactivas fueron atribuidas a la presencia de compuestos fenólicos de los cuales se proponen los diferentes mecanismos de acción tanto antibacteriano como antiviral. Para la actividad antibacteriana se propone que los compuestos fenólicos presentes en los extractos actúan a diferentes niveles debido a la diversidad de compuestos presentes en los extractos; primeramente algunos compuestos pueden estar interactuando con proteínas de membrana mediante puentes de hidrógeno, o bien, afectando la permeabilidad de la membrana lo cual se podría relacionar sobre el efecto bacteriostático que presentaron en algunos casos los extractos, permitiendo el paso al interior de la célula en donde pueden interactuar con proteínas afectando la actividad de esta o bien afectar la homeostasis por su carácter ácido, pudiéndose deber a un efecto bactericida al afectar la producción de energía, la capacidad de reproducción o inducir

apoptosis en la bacteria. De la misma manera, la actividad antiviral de los extractos fue atribuida a la presencia de compuestos fenólicos en la cual la actividad antiviral se debió a la inactivación de los ligandos del virus por contacto previo del extracto con el virus, bloqueando de esta manera la unión entre los ligandos y los receptores celulares del hospedero, logrando evidenciar de esta manera las propiedades biológicas de los extractos de hongos *Phellinus* spp.

CONCLUSION

Se obtuvieron extractos con un alto contenido de compuestos fenólicos, siendo mayor para el extracto de *P. badius* seguido por *P. grenadensis* y *P. fastuosus*.

Los extractos de hongos *Phellinus* presentaron actividad antibacteriana afectando las diferentes fases de crecimiento en las principales bacterias enteropatógenas como *E. coli* O157:H7, *S. Choleraesuis* y *L. monocytogenes*, la cual fue mayor para el extracto de *P. badius*, seguido de *P. grenadensis* y *P. fastuosus*, a excepción de *S. aureus* quien presentó resistencia a los extractos evaluados.

Los extractos de *Phellinus* spp. presentaron actividad antiviral ante los bacteriófagos MS2 y Φ -X174, siendo el extracto de *P. badius* quien presentó la mayor actividad antiviral.

Derivado del análisis de correlaciones se considera que los compuestos fenólicos presentes en los extractos de hongos de *P. badius*, *P. grenadensis* y *P. fastuosus* otorgaron capacidad antibacteriana contra cepas enteropatógenas y actividad antiviral, lo cual puede ser considerado para futuras aplicaciones en alimentos, farmacéutica y medicina.

RECOMENDACIONES

Identificar los compuestos fenólicos presentes en los extractos estudiados, así como profundizar en el estudio de sus mecanismos antibacterianos y antivirales.

Realizar estudios de estos hongos en medios de cultivo sumergidos para verificar la capacidad de síntesis de los compuestos fenólicos y dirigir dichos estudios a la producción en masa de estos compuestos.

Estudiar otras propiedades bioactivas y pruebas de citotoxicidad para la obtención de compuestos con uso potencial en industrias alimentarias, médicas y farmacéuticas.

REFERENCIAS

- Álvarez Castro E. y Orallo Cambeiro F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Offarm* 22(10): 130-140.
- Ayala-Zavala J.F., Pérez-Carlón J.J., Esqueda M., González-Aguilar G.A., Leyva J.M., Cruz-Valenzuela M.R. y Moctezuma E. (2012). Polar fractionation affects the antioxidant properties of methanolic extracts from species of Genus *Phellinus* Quel.(Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 14(6): 563-573.
- Badalyan S., Isikhuemhen O.S. y Gharibyan M.G. (2008). Antagonistic/antifungal activities of medicinal mushroom *Pleurotus tuberregium* (Fr.) Singer (*Agaricomycetidae*) against selected filamentous fungi. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 10(2): 155-162.
- Balakumar R., Sivaprakasam E., Kavitha D., Sridhar S. y Kumar J.S. (2011). Antibacterial and antifungal activity of fruit bodies of *Phellinus* mushroom extract. *International Journal of Biosciences* 1(3): 72-77.
- Baranyi J., Roberts T. y McClure P. (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology* 10(1): 43-59.
- Brul S. y Coote P. (1999). Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* 50(1): 1-17.
- Burbulis I.E. y Winkel-Shirley B. (1999). Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(22): 12929-12934.
- Chang H., Peng W., Sheu M., Huang G., Tseng M., Lai M., Ho Y. y Chang Y.S. (2007). Hepatoprotective and antioxidant effects of ethanol extract from *Phellinus*

- merrillii* on carbon tetrachloride-induced liver damage. American Journal of Chinese Medicine 35(5): 793. Chang H.Y., Ho Y.L., Sheu M.J., Lin Y.H., Tseng M.C., Wu S.H., Huang G.J. y Chang Y.S. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of *Phellinus merrillii* extracts. Botanical Studies 48(4): 407-417.
- Chang H.Y., Sheu M.J., Yang C.H., Lu T.C., Chang Y.S., Peng W.H., Huang S.S. y Huang G.J. (2010). Analgesic effects and the mechanisms of anti-inflammation of hispolon in mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2011.
- Cushnie T.P.T. y Lamb A.J. (2006). Antimicrobial activity of flavonoids (vol 26, pg 343, 2005). International journal of antimicrobial agents 27(2): 181-181.
- Cushnie T.P.T. y Lamb A.J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. International journal of antimicrobial agents 38(2): 99-107.
- Daglia M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. Current Opinion in Biotechnology 23(2): 174-181.
- De Silva D.D., Rapior S., Fons F., Bahkali A.H. y Hyde K.D. (2012). Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action. Fungal Diversity 55(1): 1-35.
- Dulger B., Suerdem T.B., Yesilyurt D., Hacıoglu N. y Camdeviren A. (2005). Evaluation of antimicrobial activity of the macrofungus *Phellinus torulosus*. Journal of Biological Sciences 5(4): 436-439.
- Edziri H., Smach M., Ammar S., Mahjoub M., Mighri Z., Aouni M. y Mastouri M. (2011). Antioxidant, antibacterial, and antiviral effects of *Lactuca sativa* extracts. Industrial Crops and Products 34(1): 1182-1185.
- Estevinho L., Pereira A.P., Moreira L., Dias L.G. y Pereira E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. Food and Chemical Toxicology 46(12): 3774-3779.
- Felix-Valenzuela L., Resendiz-Sandoval M., Burgara-Estrella A., Hernandez J. y Mata-Haro V. (2012). Quantitative detection of hepatitis A, rotavirus and genogroup I norovirus by RT-qPCR in fresh produce from packinhouse facilities. Journal of Food Safety 32(4): 467-473.

- Friedman M. (2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular nutrition & food research* 51(1): 116-134.
- Ge H., Wang Y.-F., Xu J., Gu Q., Liu H.-B., Xiao P.-G., Zhou J., Liu Y., Yang Z. y Su H. (2010). Anti-influenza agents from traditional Chinese medicine. *Natural product reports* 27(12): 1758-1780.
- George B., Kaur C., Khurdiya D.S. y Kapoor H.C. (2004). Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype. *Food Chemistry* 84(1): 45-51.
- Gescher K., Hensel A., Hafezi W., Derksen A. y Kühn J. (2011). Oligomeric proanthocyanidins from *Rumex acetosa* L. inhibit the attachment of herpes simplex virus type-1. *Antiviral research* 89(1): 9-18.
- Gilbertson R.L. y Ryvarden L. (1987). *North American Polypores*. Oslo Noruega, Gronlands grafiske.
- Gowdaman V., Rajeswari S. y Mani K. (2007). Antibacterial metabolites from wood rot fungus *Phellinus hohnelli*. *Plant Archives* 7(2): 763-765.
- Hammond G., Bates P., Vaisberg A., Liu L. y Xu B. (2010). Synthesis of stable organogold compounds and methods of use thereof, WO Patent 2,010,062,846.
- Hancock R.E.W. (2005). Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *The Lancet Infectious Diseases* 5(4): 209-218.
- Huang G.J., Hsieh W.T., Chang H.Y., Huang S.S., Lin Y.C. y Kuo Y.H. (2011). α -Glucosidase and aldose reductase inhibitory activities from the fruiting body of *Phellinus merrillii*. *Journal of agricultural and food chemistry*.
- Interest C.f.S.i.t.P. (2007). "Food safety outbreak alert." Retrieved 07/01/2013, 2013.
- Jaiswal A.K., Gupta S., Abu-Ghannam N. y Cox S. (2011). Application of Baranyi function to model the antibacterial properties of solvent extract from Irish York cabbage against food spoilage and pathogenic bacteria. *Food Science and Technology International* 17(5): 495-502.
- Jung J.Y., Lee I.K., Seok S.J., Lee H.J., Kim Y.H. y Yun B.S. (2008). Antioxidant polyphenols from the mycelial culture of the medicinal fungi *Inonotus xeranticus* and *Phellinus linteus*. *Journal of applied microbiology* 104(6): 1824-1832.

- Juven B.J., Barefoot S.F., Pierson M.D., McCaskill L.H. y Smith B. (1998). Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged ground beef inoculated with *Lactobacillus alimentarius* FloraCarn L-2. *Journal of Food Protection* 61(5): 551-556.
- Kanazawa K. (2011). Bioavailability of non-nutrients for preventing lifestyle-related diseases. *Trends in Food Science & Technology* 22(12): 655-659.
- Kim S.U., Hwang E.I., Kim J.R., Jeong T.S., Lee S., Lee S.H., Moon J.S. y Rho M.-C. (2010). Pharmaceutical composition and health food comprising extract of phellinus sp. PL3 or phellinsin A isolated from the same as an effective component for prevention and treatment of cardiovascular disease, Google Patents.
- Kim Y., Narayanan S. y Chang K.-O. (2010). Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. *Antiviral research* 88(2): 227-235.
- Kojima K., Ogihara Y., Sakai Y., Mizukami H. y Nagatsu A. (2008). HPLC profiling of *Phellinus linteus*. *Journal of Natural Medicines* 62(4): 441-446.
- Koppmann M. (2012). "Los vegetales y las enfermedades transmitidas por alimentos en el año 2011." Retrieved 30 de mayo del 2012, 2012.
- Kratz J.M., Andrighetti-Fröhner C.R., Leal P.C., Nunes R.J., Yunes R.A., Trybala E., Bergström T., Barardi C.R.M. y Simões C.M.O. (2008). Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31(5): 903-907.
- Kristiansen B. (2006). Immune modulating compounds from fungi, WO Patent 2,006,007,848.
- Li D., Baert L. y Uyttendaele M. (2013). Inactivation of food-borne viruses using natural biochemical substances. *Food Microbiology* 35(1): 1-9.
- Liang C.H., Tsai S.Y., Huang S.J., Liang Z.C. y Mau J.L. (2010). Taste quality and antioxidant properties of medicinal mushrooms *Phellinus linteus* and *Sparassis crispa* mycelia. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 12(2): 141-150.
- Luley C.J. (2006). Identifying wood decay and wood decay fungi in urban trees. *Arborist News* 7(2): 8-15.

- Mainil J. (2012). *Escherichia coli* virulence factors. Veterinary immunology and immunopathology 152(1): 2-12.
- Maloney J. y Barger K. (2010). Acne tretment powder foundation, WO Patent 2,010,077,971.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. y Jimenez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition 79(5): 727-747.
- Mukhtar M., Arshad M., Ahmad M., Pomerantz R.J., Wigdahl B. y Parveen Z. (2008). Antiviral potentials of medicinal plants. Virus research 131(2): 111-120.
- Muszyńska B. y Sułkowska-Ziaja K. (2012). Analysis of indole compounds in edible Basidiomycota species after thermal processing. Food Chemistry 132(1): 455-459.
- Nambudiri A., Vance C. y Towers G. (1973). Effect of light on enzymes of phenylpropanoid metabolism and hispidin biosynthesis in *Polyporus hispidus*. Biochemical Journal 134(4): 891-897.
- Oboh G. y Rocha J.B.T. (2007). Distribution and antioxidant activity of polyphenols in ripe and Unripe tree pepper (*Capsicum pubescens*). Journal of Food Biochemistry 31(4): 456-473.
- Özçelik B., Kartal M. y Orhan I. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. Pharmaceutical biology 49(4): 396-402.
- Palacios I., Lozano M., Moro C., D'Arrigo M., Rostagno M.A., Martínez J.A., García-Lafuente A., Guillamón E. y Villares A. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. Food Chemistry 128(3): 674-678.
- Patel J.R., Tripathi P., Sharma V., Chauhan N.S. y Dixit V.K. (2011). *Phyllanthus amarus*: Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: A review. Journal of Ethnopharmacology 138(2): 286-313.
- Pokorný J. (1991). Natural antioxidants for food use. Trends in Food Science & Technology 2(1): 223-227.

- Qiu L. y Chen K. (2012). Anti-HBV agents derived from botanical origin. *Fitoterapia* 84(1): 140-157.
- Rauter A.P., Dias C., Martins A., Branco I., Neng N.R., Nogueira J.M., Goulart M., Silva F.V.M., Justino J., Trevitt C. y Waltho J.P. (2012). Non-toxic *Salvia sclareoides* Brot. extracts as a source of functional food ingredients: Phenolic profile, antioxidant activity and prion binding properties. *Food Chemistry* 132(4): 1930-1935.
- Raybaudi-Massilia R.M., Mosqueda-Melgar J., Soliva-Fortuny R. y Martín-Belloso O. (2009). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit Juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 8(3): 157-180.
- Reis F.S., Pereira E., Barros L., Sousa M.J., Martins A. y Ferreira I.C. (2011). Biomolecule profiles in inedible wild mushrooms with antioxidant value. *Molecules* 16(6): 4328-4338.
- Rodrigo A., Tomás Cobos L., Mellado E. y Tomás D. (2007). Virus entéricos en alimentos: Incidencia y métodos de control. *Profesión veterinaria* 16(66): 82-86.
- Rodríguez Vaquero M.J., Alberto M.R. y Manca de Nadra M.C. (2007). Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18(5): 587-593.
- Roupas P., Keogh J., Noakes M., Margetts C. y Taylor P. (2012). The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. *Journal of Functional Foods* 4(4): 687-709.
- Savi L.A., Caon T., de Oliveira A.P., Sobottka A.M., Werner W., Reginatto F.H., Schenkel E.P., Barardi C.R.M. y Simões C.M.O. (2010). Evaluation of antirotavirus activity of flavonoids. *Fitoterapia* 81(8): 1142-1146.
- Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M.-A., Roy S.L., Jones J.L. y Griffin P.M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging infectious diseases* 17(1): 7-15.
- Sheena N., Ajith T., Mathew A. y Janardhanan K. (2003). Antibacterial activity of three macrofungi, *Ganoderma lucidum*, *Navesporus floccosa* and *Phellinus rimosus* occurring in South India. *Pharmaceutical biology* 41(8): 564-567.

- Singleton V. y Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* 16(3): 144-158.
- Sittiwet C. y Puangpronpitag D. (2008). Antibacterial activity of *Phellinus gilvus* aqueous extract. *International Journal of Pharmacology* 4(6): 500-502.
- Sokmen M., Angelova M., Krumova E., Pashova S., Ivancheva S., Sokmen A. y Serkedjieva J. (2005). In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum*. *Life sciences* 76(25): 2981-2993.
- Stapleton P.D., Shah S., Ehlert K., Hara Y. y Taylor P.W. (2007). The beta-lactam-resistance modifier (-)-epicatechin gallate alters the architecture of the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology-Sgm* 153(7): 2093-2103.
- Steenackers H., Hermans K., Vanderleyden J. y De Keersmaecker S.C.J. (2012). *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International* 45(2): 502-531.
- Su X., Howell A.B. y D'Souza D.H. (2010). Antiviral effects of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on foodborne viral surrogates—A time dependence study in vitro. *Food Microbiology* 27(8): 985-991.
- Suárez B., Álvarez Á.L., García Y.D., Barrio G.d., Lobo A.P. y Parra F. (2010). Phenolic profiles, antioxidant activity and *in vitro* antiviral properties of apple pomace. *Food Chemistry* 120(1): 339-342.
- Tapas A., Sakarkar D. y Kakde R. (2008). Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7(3): 1089-1099.
- Taskila S., Tuomola M. y Ojamo H. (2012). Enrichment cultivation in detection of food-borne *Salmonella*. *Food Control* 26(2): 369-377.
- Thetsrimuang C., Khammuang S., Chiablaem K., Srisomsap C. y Sarnthima R. (2011). Antioxidant properties and cytotoxicity of crude polysaccharides from *Lentinus polychrous* Lév. *Food Chemistry* 128(3): 634-639.
- Vaz J.A., Barros L., Martins A., Morais J.S., Vasconcelos M.H. y Ferreira I.C.F.R. (2011). Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. *LWT-Food Science and Technology* 44(1): 343-346.

- Wang G.-F., Shi L.-P., Ren Y.-D., Liu Q.-F., Liu H.-F., Zhang R.-J., Li Z., Zhu F.-H., He P.-L. y Tang W. (2009). Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid *in vivo* and *in vitro*. *Antiviral research* 83(2): 186-190.
- Wang G.F., Shi L.P., Ren Y.D., Liu Q.F., Liu H.F., Zhang R.J., Li Z., Zhu F.H., He P.L. y Tang W. (2009). Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid *in vivo* and *in vitro*. *Antiviral research* 83(2): 186-190.
- Wong J.Y. y Chye F.Y. (2009). Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis* 22(4): 269-277.
- Wu C.-S., Lin Z.-M., Wang L.-N., Guo D.-X., Wang S.-Q., Liu Y.-Q., Yuan H.-Q. y Lou H.-X. (2011). Phenolic compounds with NF- κ B inhibitory effects from the fungus *Phellinus baumii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21(11): 3261-3267.
- Yarmolinsky L., Huleihel M., Zaccai M. y Ben-Shabat S. (2012). Potent antiviral flavone glycosides from *Ficus benjamina* leaves. *Fitoterapia* 83(2): 362-367.
- Zhishen J., Mengcheng T. y Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64(4): 555-559.