



## Actividad antioxidante, antimicrobiana y citotoxicidad de dos especies mexicanas de *Suillus spp.*

PATRICIA GONZÁLEZ BARRANCO\*, LOURDES GARZA OCAÑAS\*, MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA\*\*, LUCIO VERA CABRERA\*\*\*, FORTUNATO GARZA OCAÑAS\*\*\*\*, XÓCHITL RAMÍREZ GÓMEZ\*, ÓSCAR TORRES ALANÍS(+)\*

Los basidiomicetos, también conocidos como macromicetos, son los más evolucionados del reino Fungi.<sup>1</sup> Entre la gran diversidad de organismos vivos, los basidiomicetos se consideran la mayor fuente de productos naturales biológicamente activos, ya sean compuestos, constitutivos del macromiceto o metabolitos secundarios producidos por los mismos.<sup>2,3</sup>

Estos hongos se han utilizado ampliamente en la medicina tradicional oriental desde hace miles de años, y a la fecha se han aislado diversas sustancias a partir del cuerpo fructífero o micelio de especies de basidiomicetos que crecen en Oriente. Entre los principales compuestos activos aislados se encuentran los proteoglucanos y polisacáridos, para los cuales se ha demostrado actividad antitumoral, inmunomoduladora, hipoglucemiante, antimicrobiana y antioxidante, entre otras.<sup>4,8</sup>

Actualmente, el uso de los macromicetos se ha extendido alrededor del mundo; países como Corea, China y Japón, en Oriente; asimismo, Rusia, Estados Unidos y Canadá han incorporado estos hongos en el tratamiento de diversas enfermedades.<sup>9</sup>

En México, donde crece una gran diversidad de macromicetos, la evaluación de la actividad biológica de los mismos constituye un campo

prácticamente inexplorado.<sup>10,11</sup> Por lo anterior, el Departamento de Farmacología y Toxicología inició una línea de investigación encaminada a la evaluación de la actividad biológica de especies de macromicetos que crecen en nuestro país, para establecer su potencial como fuente de productos de interés farmacológico. A la fecha, se ha demostrado la actividad inmunomoduladora de extractos de micelio de cepas mexicanas de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Armillaria tabescens* en ratones BALB/c,<sup>12</sup> así como la actividad hipoglucemiante de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* en ratas Wistar con diabetes experimental inducida con aloxana.<sup>13</sup> Para estas especies, además, se ha demostrado actividad antioxidante *in vitro*.<sup>12</sup>

Con relación a la actividad antimicrobiana, además de los estudios realizados con basidiomicetos de Oriente en modelos *in vivo*, en los cuales el principal mecanismo de acción es debido —al igual que la actividad antitumoral— a la estimulación del sistema inmune del huésped, se ha reportado actividad de fracciones o compuestos aislados a partir de micelio contra diversos microorganismos en ensayos realizados *in vitro*.<sup>14-17</sup>

\* Departamento de Farmacología y Toxicología, FM-UANL.  
\*\* Lab. Interdisciplinario de Inv. Dermatológica, HU-UANL.  
\*\*\* Departamento de Inmunología, FM-UANL.  
\*\*\*\* Departamento de Silvicultura, FCF-UANL.

La evaluación de la actividad biológica de los macromicetos puede realizarse utilizando su cuerpo fructífero recolectado en el campo, o cultivando el macromiceto *in vitro*, y empleando ya sea el micelio o el cuerpo fructífero. El cultivo *in vitro* permite controlar condiciones de humedad, temperatura, pH, y evitar la presencia de contaminantes. A la fecha, los estudios de actividad biológica realizados en nuestro laboratorio se han efectuado con el micelio de los macromicetos cultivados *in vitro*.

Sin embargo, se sabe que los macromicetos cultivados *in vitro* producen metabolitos secundarios, los cuales se acumulan tanto en el micelio del hongo como en el medio de cultivo al cual son secretados. Para un mismo metabolito, la distribución entre el medio de cultivo y el micelio se encuentra correlacionado con la solubilidad que tenga en agua, y con la facilidad de cada metabolito de atravesar las membranas celulares.<sup>17,18</sup>

En este contexto, la actividad antimicrobiana de basidiomicetos que crecen en Oriente ha sido demostrada, tanto para muestras de micelio de especies *Pleurotus spp* o *Suillus luteus* que son activas contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* MB964, respectivamente, como para muestras de medio de cultivo donde crecieron cepas de *Coprinus similis* y *Lentinus degener*, las cuales mostraron que poseían actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.<sup>19</sup>

En el presente trabajo se investigó la producción de metabolitos secundarios activos de dos especies de *sillus*: *Suillus luteus* y *Suillus lakei* recolectados en Nuevo León. Para lo anterior se evaluaron las actividades antifúngica, antibacteriana, antioxidante y la citotoxicidad de muestras de medio, donde se cultivaron las dos especies, obtenidas a diferentes tiempos. Además se realizó un fraccionamiento del medio de cultivo de la especie que resultó más activa, y se evaluó la actividad biológica de las fracciones obtenidas.

## Materiales y métodos

### Cultivo *in vitro* de macromicetos

El cultivo de los macromicetos se realizó en condiciones de esterilidad, dentro de una campana de flujo laminar. A partir de cepas puras de *Suillus luteus* y *Suillus lakei*, obtenidas del Departamento de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la UANL, campus Linares, se tomaron muestras de micelio con un bisturí estéril y se colocaron en cajas Petri que contenían medio de Melin-Norkrans solidificado con agar bacteriológico. Las cajas Petri sembradas se incubaron durante dos semanas, a una temperatura de 25°C y con ciclos de luz-oscuridad de 12 h.

Los cultivos en medio líquido se realizaron tomando inóculos de los cultivos en medio sólido, los cuales se sembraron en matraces Erlenmeyer que contenían 150 mL de medio modificado de Melin-Norkrans, a pH 6.5. Los matraces se dejaron incubar a 25°C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h, durante dos meses. Se obtuvieron muestras de medio de cultivo, mediante filtración para eliminar el micelio, a las dos semanas, un mes y dos meses de crecimiento de los macromicetos. Las muestras del medio de cultivo se liofilizaron y se almacenaron a -4°C hasta su evaluación.

### Evaluación de la actividad biológica de las muestras

#### a) Evaluación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se evaluó en los siguientes microorganismos: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Candida albicans* ATCC 90028 y LIID Z-83, *Mycobacterium smegmatis* LR-222 y *Sporothrix schenckii* LIID-713 y LIID-1458. Los microorganismos fueron cultivados en agar Sabraud, y se efectuó el método de dilución en caldo para efectuar la evaluación de la actividad antimicrobiana.<sup>20</sup>

El inóculo para cada microorganismo empleado se ajustó de acuerdo con el estándar número 1 del nefelómetro de MacFarland.<sup>21</sup> Para preparar las suspensiones celulares se emplearon las colonias sembradas de los microorganismos y una solución estéril de NaCl al 0.9%.

Las muestras liofilizadas de medio de cultivo, sin basidiomiceto, obtenidas a diferentes tiempos, se pesaron y a partir de éstas se prepararon soluciones en medio de cultivo a una concentración de 8 mg/ml, las cuales se esterilizaron a través de filtros Millipore de 0.22 µm de tamaño de poro.

Después de la preparación del inóculo, y de las soluciones de las muestras a evaluar, se realizaron diluciones seriadas a partir de la muestra (un total de nueve diluciones). Posteriormente se colocaron, en placas de 96 pozos, el inóculo y cada una de las diluciones que se evaluaron en una disposición que permitiera probar todas las diluciones con cada uno de los inóculos. Como control positivo de crecimiento microbiano se emplearon pozos a los que se les agregó medio de cultivo y el inóculo correspondiente, y como control negativo de crecimiento microbiano se utilizaron pozos que contenían solamente medio de cultivo; la ausencia de turbidez en las celdillas, apreciable a simple vista, se comparó con los controles, y se consideró como positivo para la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana.

#### b) Evaluación de la actividad antioxidante

Para la evaluación de la actividad antioxidante se manejaron células de hígado de Chang, las cuales se mantuvieron en frascos de cultivo utilizando como nutriente medio esencial mínimo (MEM), suplementado a 10% con suero fetal bovino (SFB), a una temperatura de 37°C y una atmósfera de 95% aire/5% CO<sub>2</sub>, hasta la formación de monocapa. Las células en monocapa se expusieron a 1 mL de tripsina a 0.25%, durante diez minutos, para desprender la monocapa celular, y se ajustó la densidad celular a 1x10<sup>4</sup> células/mL. Posteriormente se colocaron 0.1 mL de la suspen-

sión celular a cada celdilla de la placa de 96 pozos, la placa se incubó a 37°C en una atmósfera 95% aire/5% CO<sub>2</sub>, durante 24-48 h, hasta la formación de una monocapa celular.

La evaluación de la actividad antioxidante de las muestras de medio se efectuó mediante el método de Bass *et al.*<sup>22</sup> En esta técnica se emplea el diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA) como indicador intracelular de la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Se preparó una solución de 10 mg/mL (disueltas en MEM) de cada una de las muestras de medio de cultivo liofilizado, obtenidas a los diferentes tiempos, y se esterilizaron por filtración.

La placa con las células en monocapa se expuso a las muestras (rango 10 mg/mL a 0.312 mg/mL) en presencia y ausencia de DCFDA. La placa expuesta se incubó a 37°C, y se midió la fluorescencia emitida cada hora, durante seis horas, a una longitud de onda de 485 nm de excitación y 530 nm de emisión. Como control positivo de actividad oxidativa se utilizó la xantina oxidasa, y como control positivo de actividad antioxidante a la vitamina C; como control negativo se colocaron celdillas con el solvente (MEM). La evaluación se realizó en tres ocasiones diferentes en experimentos separados.

#### c) Evaluación de citotoxicidad

Para la evaluación de la citotoxicidad se utilizaron células de hígado de Chang cultivadas en las condiciones antes descritas. Para la realización del experimento se retiró el medio de cultivo a la placa donde se encontraban las células en monocapa, y se colocaron en cada pozo 0.2 ml de las muestras a evaluar. Se evaluaron seis concentraciones (rango 10 mg/mL a 0.312 mg/mL) para las muestras de cada uno de los tiempos (una semana, un mes y dos meses). Posteriormente, la placa se incubó a 37°C a una atmósfera de 95% aire/5% CO<sub>2</sub>, durante 48 horas. Se utilizaron tres celdillas para cada una de las concentraciones, y en todas las placas se utilizaron celdillas control que contenían sólo

el solvente. Cada experimento se repitió, mínimo, en tres ocasiones por separado.

Una vez transcurrido el periodo de exposición celular a las muestras, se efectuó una revisión morfológica del aspecto celular, en un invertoscopio y, posteriormente, se realizó la prueba de reducción del metiltiazoltetrazolio (MTT), de acuerdo al método de Mossmann.<sup>23</sup>

### Análisis estadístico

Los datos se estudiaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), estableciéndose el valor de  $p \leq 0.05$  para indicar una diferencia significativa.

## Resultados

### Cultivo *in vitro* de macromicetos

Bajo las condiciones de incubación utilizadas, se observó un buen crecimiento para ambas cepas de *Suillus*, y cada una de éstas conservó sus características de desarrollo (figura 1).

### Actividad antimicrobiana

De las dos cepas evaluadas, sólo las muestras de *Suillus lakei*, obtenidas a los dos meses de cultivo, mostraron actividad antimicrobiana contra *Sporothrix schenkii* LIID1458, a una concentración de 4 mg/mL.

### Evaluación de la actividad antioxidante

Las muestras de medio de cultivo obtenidas al mes y a los dos meses de crecimiento de *Suillus lakei* y *Suillus luteus* mostraron que tenían actividad antioxidante al producir una disminución significativa de la actividad oxidativa de la xantina oxidasa. La actividad antioxidante se detectó a los 30 minutos de exposición celular, y se mantuvo durante las seis horas de evaluación. Las muestras *Suillus lakei* y *Suillus luteus* obtenidas al mes de cultivo produjeron una reducción de la actividad

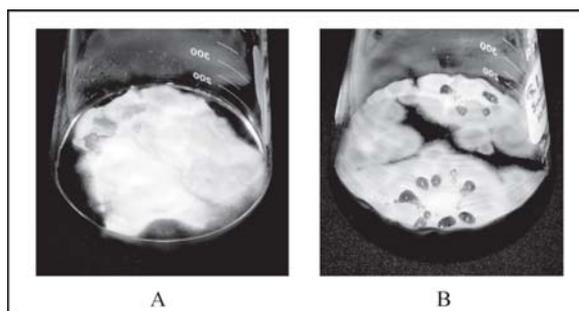


Fig 1. Aspecto del cultivo *in vitro* de: A) *Suillus luteus*, B) *Suillus lakei* a los dos meses de crecimiento.

oxidativa de la xantina oxidasa de 75% y 20%, respectivamente. La mayor actividad antioxidante, en el caso de ambos basidiomicetos, se obtuvo de las muestras de dos meses de cultivo, con las que se observó una reducción de la actividad oxidativa de la xantina oxidasa de 75%, en el caso de *Suillus lakei*, y de 38% para *Suillus luteus*. Las muestras obtenidas después de una semana de crecimiento no produjeron actividad antioxidante. Al comparar la actividad antioxidante de las muestras de dos meses de cultivo de ambos basidiomicetos con la de la vitamina C, se observó que *Suillus lakei* produjo una actividad antioxidante mayor que la de la vitamina C, al ser evaluados con la misma concentración (figura 2).

### Evaluación de citotoxicidad

Las muestras de *Suillus luteus* y *Suillus lakei*, obtenidas a la semana, al mes y a los dos meses de cultivo, y evaluadas en un rango de concentración de 10 a 0.312 mg/mL, no fueron citotóxicas.

### Fraccionamiento biodirigido

Para el fraccionamiento biodirigido se seleccionó a *Suillus lakei*, porque produjo la mayor actividad antioxidante y mostró actividad antimicrobiana contra *S. schenkii* LIID1458.

El fraccionamiento se efectuó mediante de solventes de distinta polaridad. Se inició con una precipitación con etanol durante 24 h, al cabo de este tiempo se separó el precipitado del

sobrenadante; el precipitado se dejó secar y la fracción obtenida se denominó fracción F1.<sup>24</sup> Al sobrenadante se le realizaron extracciones sucesivas con distintos solventes: se inició con hexano, se continuó con acetato de etilo y, finalmente, se utilizó butanol. Las extracciones con cada solvente se realizaron tres veces, y cada fase orgánica se hizo pasar a través de sulfato de sodio anhidro. Las tres fracciones obtenidas, denominadas FII, FIII y FIV, se llevaron a sequedad en rotavapor, se recuperaron y se colocaron en tubos Eppendorf. Las muestras de las fracciones se almacenaron a -4°C hasta su evaluación. Para la evaluación de la actividad biológica de las fracciones se utilizaron los mismos parámetros antes descritos.

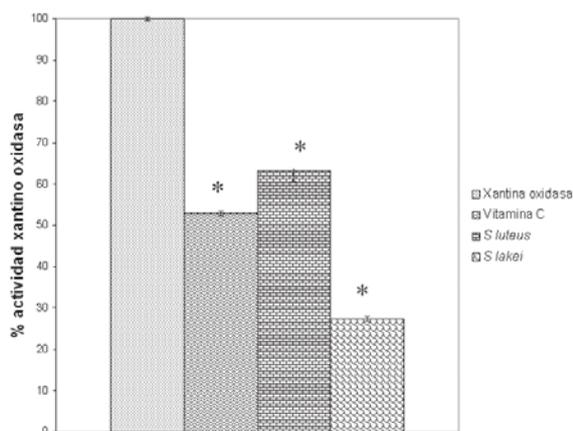


Fig. 2. Comparación de actividad antioxidante de muestras de medio de cultivo (10 mg/mL) de *Suillus lakei* y *Suillus luteus*, obtenidas a los dos meses de crecimiento y vitamina C (10 mg/mL). \*  $pd \leq 0.05$ .

## Evaluación de la actividad biológica de las fracciones FI, FII, FIII y FIV

### A. Actividad antimicrobiana

Las fracciones FI, FIII y FIV de *Suillus lakei* mostraron tener actividad antimicrobiana a la dosis 500 mg/mL. En el caso de la fracción F1, ésta fue activa contra todos los microorganismos evaluados (tabla I).

Tabla I. Actividad antimicrobiana de las fracciones FI, FII, FIII y FIV de *Suillus lakei*. Las cruces representan actividad antimicrobiana a la dosis 500 mg/mL (+).

<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	-	+	+
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	-	+	+
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	+	-	-	+
<i>C. albicans</i> LIID-Z-83	+	-	+	+
<i>M. smegmatis</i> LR-222	+	-	+	-
<i>S. schenkii</i> LIID-713	+	-	+	-
<i>S. schenkii</i> LIID-1458	+	-	+	+

### B. Actividad antioxidante

Las fracciones FIII y FIV (obtenidas con acetato de etilo y butanol, respectivamente) mostraron actividad antioxidante al reducir la oxidativa de la xantina oxidasa en 60% y 45%, respectivamente, a la concentración de 1 mg/mL (figura 3).

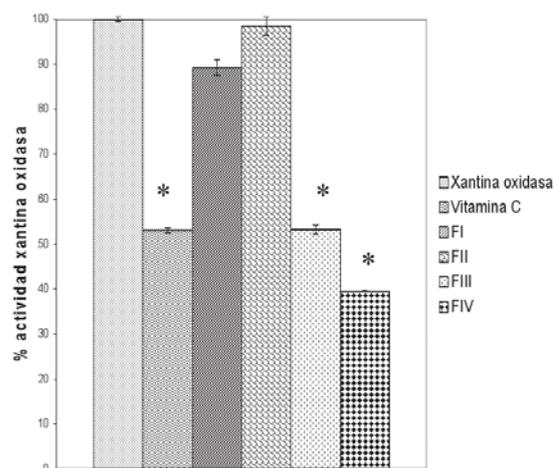


Fig. 3. Actividad antioxidante de las fracciones FI, FII, FIII y FIV (1 mg/mL) de *Suillus lakei*. \*  $pd \leq 0.05$ .

### C. Citotoxicidad

Ninguna de las fracciones de *Suillus lakei* fue citotóxica.

## Discusión

En este estudio se investigó la producción de metabolitos secundarios activos de dos especies de basidiomicetos originarios del noreste del país: *Suillus luteus* y *Suillus lakei*. La actividad biológica evaluada incluyó su efecto antioxidante, la actividad antimicrobiana y la citotoxicidad.

Las muestras se obtuvieron a la semana, al mes y a los dos meses de cultivo, con el propósito de evaluar la posible producción de metabolitos activos, considerando diferentes etapas del crecimiento de los basidiomicetos *in vitro*. En la evaluación de la actividad antioxidante se observó que las muestras obtenidas después de una semana no fueron activas, mientras las muestras de un mes y de dos meses de crecimiento produjeron actividad antioxidante, y ésta fue significativamente mayor en las muestras de dos meses. En el caso de la actividad antimicrobiana, se observó que sólo las muestras obtenidas a los dos meses de crecimiento fueron activas. Estos resultados indican que la producción de metabolitos activos es mayor a los dos meses de crecimiento. Lo anterior pudiera deberse a que el metabolismo del hongo durante la fase inicial se concentra en su propio crecimiento, y sólo hasta que se agotan los nutrientes se activan las enzimas que forman parte de las rutas metabólicas secundarias del organismo.<sup>17</sup>

Las especies reactivas de oxígeno (anión superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno, entre otros), producidas por los rayos del sol, radiación ionizante, o procesos metabólicos, se han relacionado fuertemente con una gran variedad de estados patológicos, entre los que se encuentran enfermedades autoinmunes (como la artritis reumatoide), aterosclerosis y cáncer; se ha propuesto que las substancias con actividad antioxidante pudieran ser útiles en la terapéutica de este tipo de padecimientos.<sup>25</sup>

En este estudio se demostró que las dos cepas de basidiomicetos evaluados tuvieron una importante actividad antioxidante y no fueron

citotóxicos, lo cual concuerda con lo reportado para diversas especies de basidiomicetos que crecen en oriente como: *Coriolus versicolor*, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* y *Tricholoma lobayense*.<sup>26</sup> *Suillus lakei* fue la especie más activa y de particular interés debido a que la actividad antioxidante de las muestras de dos meses de cultivo de esta especie fue incluso mayor que la producida por la vitamina C, considerando que la muestra se evaluó como extracto y no como compuesto puro. Al fraccionar las muestras de *Suillus lakei*, se observó que la actividad antioxidante fue mayor y que los compuestos activos se encuentran en las fracciones III y IV.

En el caso de la actividad antimicrobiana, en este estudio se demostró que la cepa de *Suillus lakei* produce metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana.

Al fraccionar las muestras de dos meses de crecimiento de *Suillus lakei* y evaluar la actividad biológica de las cuatro fracciones obtenidas, se observó que el espectro de actividad antimicrobiana fue mayor que el observado para la muestra cruda, particularmente en el caso de las fracciones FIV y FI, siendo esta última activa contra los siete microorganismos evaluados. De particular interés fue la actividad mostrada por ambas fracciones contra *S. schenkii*, lo cual es relevante, ya que uno de los pocos tratamientos disponibles en la terapéutica de una infección por este microorganismo es una solución de yoduro de potasio.<sup>27</sup>

En cuanto a propiedades antioxidantes de las fracciones, se observó que los principios activos predominan en las fracciones FIII y FIV.

Los resultados obtenidos acerca de la actividad antioxidante y antimicrobiana, de muestras de medio de cultivo de basidiomicetos cultivados *in vitro*, constituyen el primer reporte de actividad farmacológica de metabolitos secundarios secretados al medio de cultivo por basidiomicetos originarios del noreste del país.

Se demuestra además que, al igual que los basidiomicetos que crecen en oriente, los basidiomicetos que crecen en nuestro país pue-

den ser fuente de productos con potencial farmacológico, como en el caso de las especies evaluadas en este estudio.

## Conclusiones

*Suillus lakei* y *Suillus luteus* mostraron que tenían actividad antioxidante, siendo *Suillus lakei* el más activo. *Suillus lakei* mostró actividad antimicrobiana, y el fraccionamiento inicial de muestras de esta especie reveló que la fracción etanólica (FI) tuvo actividad antimicrobiana contra todos los microorganismos evaluados, y la fracción butanólica (FIV) tuvo la mayor actividad antioxidante. Se propone que las especies de basidiomicetos evaluadas en este estudio son fuente de metabolitos secundarios con potencial farmacológico, por lo que se realizarán estudios para el aislamiento de los compuestos activos presentes en las fracciones.

## Resumen

En este estudio se evaluó la actividad antioxidante, antimicrobiana y citotoxicidad de dos cepas de basidiomicetos originarios del noreste de México. La actividad antioxidante se evaluó mediante la prueba de fluorescencia de DCFDA, la actividad antimicrobiana se evaluó mediante la técnica de dilución en caldo, y la citotoxicidad se determinó utilizando células de hígado de Chang, mediante la técnica del MTT. Ninguna de las cepas resultó citotóxica, ambas tuvieron actividad antioxidante, siendo *Suillus lakei* la más activa. *Suillus lakei* mostró actividad antimicrobiana contra *S. schenkii*. Se realizó un fraccionamiento biodirigido de *Suillus lakei*, y las fracciones I y IV fueron las de mayor actividad antimicrobiana y antioxidante, respectivamente.

**Palabras clave:** Basidiomicetos, Actividad antioxidante, Actividad antimicrobiana.

## Abstract

In this study the cytotoxicity, antioxidant, and antimicrobial activity of culture broth of Mexican strains of *Suillus lakei* and *Suillus luteus* were evaluated. The antioxidant activity was measured with the DCFDA assay, the antimicrobial activity was evaluated with the microdilution broth technique, and the cytotoxicity was evaluated in Chang liver cells with the MTT assay. The strains were not cytotoxic and both strains showed an important antioxidant effect, being *Suillus lakei* the most active. *Suillus lakei* showed antimicrobial activity against *S. schenkii*. *Suillus lakei* was fractionated, having the fraction I and IV with the greatest antimicrobial and antioxidant activity respectively.

**Keywords:** Basidiomycetes, Antioxidant activity, Antimicrobial activity.

## Referencias

1. Statements, P. 1983. The mushroom cultivator: A Practical Guide to Growing Mushrooms at home. Agarikon Press. EUA.
2. Brizuela, M., García, L., Pérez, L., Mansur, M. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Rev. Iberoam. Micol. 15: 69-74.
3. Mizuno, T. Sakai, T; Chihara, G. 1995. Health foods and medicinal usage of mushrooms. Food Review International. 11:69-81.
4. Santos Neves, JC; Pereira, M. I.; Carbonero, E.R.; Grachel, A. H.; Gorin, P.A.; Sasaki, G.L.; Iacomini, M. 2008. A gel forming beta-glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida*. Carbohydr Res. 343.(9): 1456-1462.
5. Yeon, Sil Lee; Young-Hee, Kang; Ju-Young, Jung; Il-Jun, Kang; Sang-No, Han; Jong-Sang, Chung; Hyun-Kyung, Shin; Soon Sung, Lim.

2008. Inhibitory constituents of aldose reductase in the fruiting body of *Phellinus linteus*. *Biol Pharm Bull.* 31:765-768.
6. Tadaaky, S; Katsutoshi, K; Wei, L. Kazuo, K. et al. 2008. The toxin produced by *Pleurotus ostreatus* reduces the head size of nematodes. *Biol Pharm Bull.* 31: 574-576.
  7. Jiménez Medina, E; Berruguilla, E; Romero, I; Algarra, I; Collado, A; Garrido, F; García Lora, A. 2008. The immunomodulator PSK induces in vitro cytotoxic activity in tumor cell lines via arrest of cell cycle and induction of apoptosis. *BMC Cancer.* 8:78-88.
  8. Carvalho Montenegro, R; Feio Farias, R A; Pinho Pereira, M R; Negreiros Nunes Alves, A P; Silva Bezerra, F; Andrade-Neto, M; Pessoa, C; de Moraes, M O; Veras Costa-Lotufo, L. 2008. Antitumor activity of pisosterolin mice bearing with S180 tumor. *Biol Pharm Bull.* 31: 454-457.
  9. Sadler, M J; Saltmarsh, M; Functional foods: the consumer, the products and the evidence. Royal Society of Chemistry. Inglaterra.
  10. Guzmán, G; Allen, J W; Gartz, J. 1998. Inventorying the fungi of Mexico. *Biod and Conser.* 7:369-384.
  11. García Jiménez, J., Garza Ocañas, F. 2001. Conocimiento de los hongos de la familia Boletaceae de México. *CiENCiA, UANL.* IV, 3: 336-343.
  12. Garza Ocañas, L; Ramírez Gómez, X.; Garza Ocañas F.; Salinas Carmona M C; Waksman de Torres, N.; Alcaraz Contreras, Y.; Torres Alanís O. 2006. Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos de macromicetos del noreste de México. *Ciencia UANL.* 9(2): 166-170.
  13. Tamez de la O, E. 2007. Evaluación de la actividad hipoglucemiante e hipocolesterolemia de cepas del noreste de México. Tesis doctoral, UANL.
  14. Ofodile, L.N; Uma, N.U.; Kokubun, T.; Grayer, R.J.; Ogundipe, O.T; Simmonds, M.S.J. 2005. Antimicrobial activity of some *Ganoderma* species from Nigeria. *Phytoter Res.* 19 (4): 310-313.
  15. Rofuli, N. B.; Cruz, A. G. V; Medalla, A. P; Buenavista, M. T. S. 2005. Antimicrobial and antagonistic properties of *Ganoderma lucidum*. *Int J of Med Mushrooms.* 7(3): 150.
  16. Suay, I.; Arenal, F.; Asensio, F.J.; Basilio, A.; Cabello, MA; Díez, MT; García, J.B.; Val, AG; Gorrochategui, J.; Hernández, P.; Peláez, F.; Vicente, M. F. 2000. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Anton van Leeuwenh.* 78: 129-139.
  17. Turner, W.B. 1971. Fungal metabolites. Academic Press. England.
  18. Smith, J. E.; Rowan, N.; Sullivan, R. 2002. Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. University of Strathclyde. Reino Unido.
  19. Anchel, M; Herve, A.; Kavanagh, F.; Polatnick, J.; Robbins, W. 1948. Antibiotic substances from basidiomycetes III: *Coprinus similis* and *Lentinus degener*. *Botany.* 34: 498-502
  20. Nacional Comité for Clinical Laboratory Standard. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved estándar M7-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa
  21. Bollela, VR; Sato, DN; Fonseca, B A L. 1999. McFarland nephelometer as a simple method to estimate the sensitivity of the polymerase chain reaction using *Mycobacterium tuberculosis* as a research tool. *Brazilian J. of Medical and Biolog Research.* 32: 1073-1076.
  22. Bass, D. A.; Parce, J. W.; Dechatelet, L. R.; Szejda, P.; Seeds, M. C.; Thomas, M. 1983. Cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrana stimulation. *J. Immunol.* 130: 1910-1918.
  23. Mossman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application

- to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55.
24. Maziero, R; Cavazzoni, V; Ramos, V L. 1999. Screening of basidiomycetes for the production of exopolisaccharide and biomasa in submerged culture. *Revista de microbiologia.* 30: 77-84.
25. Halliwell, B; Gutteridge, J M. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 219: 1-4.
26. Mau, J L; Lin, H C; Chen, C C. 2001. Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. *J Agric Food Chem.* 49: 5461-5467.
27. Saxena, M; Rest, E; Lowe, L. 1999. An ulcerating nodule on the arm. *Archives of Family Medicine.* 8(2): 97.

*Recibido: 2 de julio de 2008*  
*Aceptado: 11 de agosto de 2008*