



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Área Académica de Biología
Licenciatura en Biología

Evaluación de la toxicidad de extractos del hongo *Russula olivacea* en *Artemia salina*

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Licenciado en Biología

P r e s e n t a:

Hemir Valenzuela Bautista

Directora: M. en C. Leticia Romero Bautista
Mineral de la Reforma, Hidalgo. 2009.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Diversidad de hongos.....	2
2.2. Especie de estudio	2
2.3. Clasificación taxonómica de <i>R. olivacea</i>	3
2.4. Metabolitos secundarios en hongos	3
2.5. Bioensayos	4
2.6. Generalidades de <i>Artemia salina</i>	4
2.7. Clasificación taxonómica de <i>Artemia salina</i>	5
2.8. Área de estudio	6
2.9. Ubicación.....	7
2.10. Vegetación	8
2.11. Clima	9
2.12. Edafología	10
2.13. Caracterización poblacional y cultural	10
3. Antecedentes	11
3.1. Estudios de <i>Russula olivacea</i> a nivel nacional.	11
3.2. Estudios de <i>Russula olivacea</i> a nivel estatal.....	12
3.3. Propiedades tóxicas de los basidiomicetos	12
3.4. Toxicidad de <i>R. olivacea</i>	13
3.5. Estudios químicos de <i>R. olivacea</i>	13
3.6. Bioensayos en <i>R. olivacea</i>	14

4. Justificación	15
5. Objetivos	16
5.1. Objetivo general	16
5.2. Objetivos específicos	16
6. Materiales y Métodos	17
6.1. Recolecta	17
6.2. Determinación de la especie	17
6.3. Obtención de los extractos en Soxhlet	18
6.4. Obtención de los extractos en maceración	19
6.5. Separación de los compuestos por cromatografía en columna	19
6.6. Cromatografía en placa preparativa	20
6.7. Cromatografía en capa fina	21
6.8. Análisis de los compuestos	21
6.9. Evaluación de la toxicidad en <i>A.salina</i>	22
6.10. Pruebas estadísticas	24
7. Resultados	26
7.1. Identificación taxonómica de <i>R. olivacea</i>	26
7.2. Caracteres morfológicos	26
7.3 Caracteres microscópicos	27
7.4. Caracteres organolépticos	27
7.5. Reacciones macroquímicas	28
7.6. Obtención de los extractos en Soxhlet	31
7.7. Toxicidad de los extractos en Soxhlet	31
7.8. Separación de los compuestos del extracto en Soxhlet por cromatografía en columna	32
7.9. Cromatografía en capa fina	33
7.10. Identificación del compuesto predominante	34
7.11. Obtención de los extractos por maceración en fresco	36

7.12. Toxicidad de los extractos obtenidos por maceración	36
7.13. Toxicidad de las fracciones obtenidas del píleo	37
8. Discusión	39
9. Conclusiones.....	43
10. Literatura citada.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Artemia salina</i>	5
Figura 2. Localización del municipio de Mineral del Chico; Hidalgo, México.....	6
Figura 3. Ortofotos digitales	7
Figura 4. Ubicación del Parque Nacional “El Chico”	8
Figura 5. Tipos de vegetación en el área del Parque Nacional “El Chico”	9
Figura 6. Distribución de <i>R. olivacea</i> en la República Mexicana	11
Figura 7. Localización de cada una de las partes del extractor Soxhlet	18
Figura 8. Cromatografía en columna.....	20
Figura 9. Cromatografía en placa preparativa	21
Figura 10. Cromatografía en placa fina	22
Figura 11. Condiciones de quistes de <i>A.salina</i> para que eclosionaran	23
Figura 12. Ensayo de toxicidad en <i>A.salina</i> con las cinco concentraciones.....	25
Figura 13. <i>Russula olivacea</i>	27
Figura 14. Caracteres macroscópicos de <i>R. olivacea</i>	30
Figura 15. Caracteres microscópicos de <i>R. olivacea</i>	31
Figura 16. Cristales del compuesto mayoritario	34
Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C del manitol.....	35
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H del manitol.....	36
Figura 19. Formula estructural del manitol	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Rendimiento en porcentaje de de los extractos en Soxhlet.....	32
Tabla II. $CL_{50} \pm$ Error Estándar de los extractos de <i>R. olivacea</i> en <i>A.salina</i>	33
Tabla III. Fracciones obtenidas en cromatografía en columna.....	33
Tabla IV. Rendimiento en porcentaje de los extractos obtenidos por maceración	37
Tabla V. $CL_{50} \pm$ Error Estándar de los extractos de <i>R. olivacea</i> en <i>A.salina</i>	38
Tabla VI. $CL_{50} \pm$ Error Estándar de las fracciones de <i>R. olivacea</i> en <i>A.salina</i>	38

Abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
°C	Grado Celsius
CHCl ₃	Cloroformo
D ₂ O	Agua deuterada
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
Hex.	Hexano
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitros
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NaCl	Cloruro de sodio
µm	Micrómetros (1/1000 mm)
pH	Potencial Higrógeno
ppm	Partes por millón
R _f	Factor de referencia de desplazamiento
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
UV	Ultravioleta visible

1. RESUMEN

Russula olivacea, es un hongo macromiceto que presenta carpóforos relativamente abundantes, de considerable tamaño. Ha sido reportada como una especie tóxica en distintas regiones del mundo e incluso también, para algunos estados de la República Mexicana. Esto mismo lo confirman las personas residentes en “Los Copados”, Mineral del Chico, Hidalgo, quienes lo consideran como un hongo capaz de causar el micetismo llamado “síndrome gastrointestinal”. Existen pocos estudios encargados de evaluar la toxicidad a través de modelos biológicos. En este trabajo se evaluó la toxicidad de *R. olivacea* en *Artemia salina*, y se identificaron algunos compuestos químicos presentes. Se realizaron dos tipos de extracciones, continua por Soxhlet y discontinua por maceración, con el fin de validar si la toxicidad de los compuestos químicos dependía de la polaridad o temperatura en cada uno de los extractos y fracciones obtenidas. La separación de los compuestos presentes en los extractos se llevó a cabo por cromatografía en columna y cromatografía en placa preparativa. Posteriormente, la toxicidad se calculó por medio de la concentración letal-50 (CL₅₀) y la identificación química de los compuestos por espectrometría de RMN de ¹H y de ¹³C. Los cuatro extractos distintos obtenidos por Soxhlet no mostraron toxicidad en *A. salina*, mientras que la fracción I del extracto metanólico macerado de la parte del píleo, fue la que resultó presentar la mayor toxicidad en *A. salina*, con una CL₅₀ <100 µg/mL. Así mismo se determinó que el manitol es el compuesto orgánico predominante de *R. olivacea*, el cual no resultó ser tóxico. Es así que la propuesta del compuesto tóxico por RMN de ¹³C de la fracción I, no fue determinante para concluir que dicho compuesto fuera responsable de otorgarle la toxicidad a *R. olivacea*, por lo que se recomienda hacer una investigación a futuro más minuciosa.

1. INTRODUCCIÓN

2.1. Diversidad de hongos

En la actualidad existen numerosas especies de los diferentes grupos de hongos que constituyen un recurso biológico importante y valioso para los ecosistemas. Estos últimos alcanzan un alto índice de biodiversidad y han sido estimados por Hawksworth (1991), quien señala la existencia de más de 1.5 millones de especies en la naturaleza de las cuales solamente se conoce el 4.6 % en el mundo. El 95.4 % de las especies que falta por conocer, están confinados principalmente en los ecosistemas tropicales, que son precisamente los más afectados por la explotación intensiva (Guzmán, 1994).

Por otra parte Guzmán (1994 y 1995) estima que deben de existir alrededor de 140,000 especies de hongos en nuestro país, esto con base a los hongos asociados a las plantas vasculares que prosperan y de los cuales, para el caso de los macromicetos, sólo se ha estudiado una quinta parte, con alrededor de 3,000 especies conocidas (Cifuentes *et al.*, 1993), por lo que el estado de conocimiento actual sobre la micobiota nacional es de apenas el 4.5 % al 6 %.

2.2. Especie de estudio

Russula olivacea (Schaeff.) Pers., incluye a los hongos agaricales más cosmopolitas que se conocen y es considerada como una de las más representativas, numerosas y diversas de la familia Russulaceae, la que a su vez incluye 1,074 especies descritas en diferentes partes del mundo, abarcando especies tanto comestibles como tóxicas (Kirk *et al.*, 2001).

Esta especie, crece en asociación ectomicorrízica con *Abies religiosa*, durante los meses de junio a septiembre. A su alrededor es muy común la presencia de musgos y arbustos como *Baccharis conferta*, conocida como “escoba” por los lugareños. Así mismo, se observaron en las mismas fechas de vista al lugar, otras especies del género *Russula* y otros géneros como *Lycoperdon*, *Amanita*, *Clitocybe* entre otras.

2.3. Clasificación taxonómica de *R. olivacea*

A continuación se presenta la clasificación taxonómica de la especie con ligeras modificaciones realizadas por Kong (2003) basado en Romagnesi (1967), Singer (1986) y Bon (1988).

Reino: Fungi

División: Basidiomycota

Clase: Agaricomycete

Orden: Russulales

Familia: Russulaceae

Género: *Russula*

Subgénero: Polychromidia

Sección: Alutaceae

Subsección: Olivaceinae

Especie: *olivacea*

2.4. Metabolitos secundarios en hongos

Los metabolitos secundarios, son el resultado final de reacciones químicas complejas, biosintetizados a partir de sustancias primarias, con distribución restringida y muchas veces característicos de un género o de una especie, por lo que no se consideran universales. A este grupo pertenecen los esteroides, alcaloides, terpenoides, entre otros (Brizuela *et al.*, 1998).

Actualmente, la línea investigación de los productos naturales, aplicada al área de los metabolitos secundarios en hongos macromicetos, representa un campo recientemente investigado. El descubrimiento de nuevas sustancias químicas obtenidas a partir de éstos, muestran un camino prometedor para la investigación científica de nuestro país, como lo han sido hasta ahora los metabolitos secundarios encontrados en los vegetales.

Es así como del potencial de los componentes bioactivos de numerosas especies fúngicas, se han descubierto una gama de metabolitos secundarios derivados de los ácidos grasos, como las lactonas sesquiterpénicas y esteroides,

cuyas propiedades fisiológicas descubiertas hasta el momento son: la actividad antibiótica, citotóxica, antitumoral e insecticida (Brizuela *et al.*, 1998).

2.5. Bioensayos

Los bioensayos constituyen una de las primeras herramientas utilizadas para la búsqueda de sustancias químicas con actividad biológica. A través de ellos se pueden determinar las consecuencias de exposición de una sustancia química, manifestar los estados iniciales e intermedios de los individuos sensibles con la mismas ventajas de estandarización y calidad de control.

En el caso particular de poder determinar la toxicidad de compuestos químicos, se pueden utilizar algunos de estos modelos biológicos: larvas de insectos de *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera littoralis*, ratas *Rattus norvegicus*, pez *Danio rerio* o el crustáceo *Artemia salina*.

Esta última especie, es de gran utilidad por la facilidad de su cultivo en el laboratorio, ser económico, tener una alta calidad de control, un ciclo biológico corto, estado de diapausa alta y manejo práctico de las larvas nauplio una vez colocados en condiciones favorables de salinidad, temperatura, oxigenación, pH e iluminación (McLaughlin *et al.*, 1998).

Además las larvas nauplio recién eclosionadas tienen un amplio rango de sensibilidad a las sustancias químicas que pueden manifestar toxicidad a través de la mortalidad *in vivo*. De tal manera que el uso experimental de este simple organismo puede ser usado para la búsqueda y fraccionación de productos naturales bioactivos (Anderson, 1998).

2.6. Generalidades de *Artemia salina*

Este animal vive en aguas salobres, en estado adulto llega a medir 18 mm, poseen una vida media de un año y presenta el cuerpo dividido en tres partes: cabeza, tórax y abdomen (Castro, 1985; Ruppert y Barnes, 1993). La cabeza está formada por cinco segmentos fusionados; en ella se encuentran los ojos compuesto, el ocelo en el centro, las anténulas y en el centro las primeras antenas.

El tórax está formado por once segmentos bien delimitados, dotado cada uno de un par de apéndices foliáceos llamados filópodos, que sirven como órganos natatorios, respiratorios y filtradores.

El abdomen está formado por ocho segmentos ápodo: los dos más próximos al tórax son los segmentos genitales y al final se localiza el telson, provisto de la fuerza caudal (figura 1).



Figura 1. *Artemia salina* (<http://www.drpez.com/drali1.htm>).

2.7. Clasificación taxonómica de *Artemia salina* basada en Ruppert y Barnes, (1993).

Reino: Animalia

Phylum: Artrópoda

Subphylum: Crustácea

Clase: Brachiopoda

Subclase: Sarsostraca

Orden: Anostraca

Familia: Artemiidae

Género: *Artemia*

Especie: *salina*

2.8. Área de estudio

El área de estudio se localiza en la comunidad de Carboneras, específicamente en el sitio llamado los Copados dentro del municipio de Mineral del Chico, el cual se encuentra situado en el extremo occidental de la Sierra de Pachuca, perteneciente a la estructura orográfica integrante del Eje Neovolcánico Transversal y Sierra Madre Oriental (figura 2). Se accede hacia al norte de la Ciudad de Pachuca, capital del estado, por la carretera Federal 105 Pachuca-Tampico, con desviación a la carretera estatal Pachuca-Mineral del Chico, aproximadamente a 24 km (SEDUE, 1985).

Esta zona es considerada como con un importante patrimonio biológico principalmente por el tipo de coníferas por las que se encuentra dominado ya que se encuentra muy cerca del Parque Nacional el Chico (SEDUE, 1988).

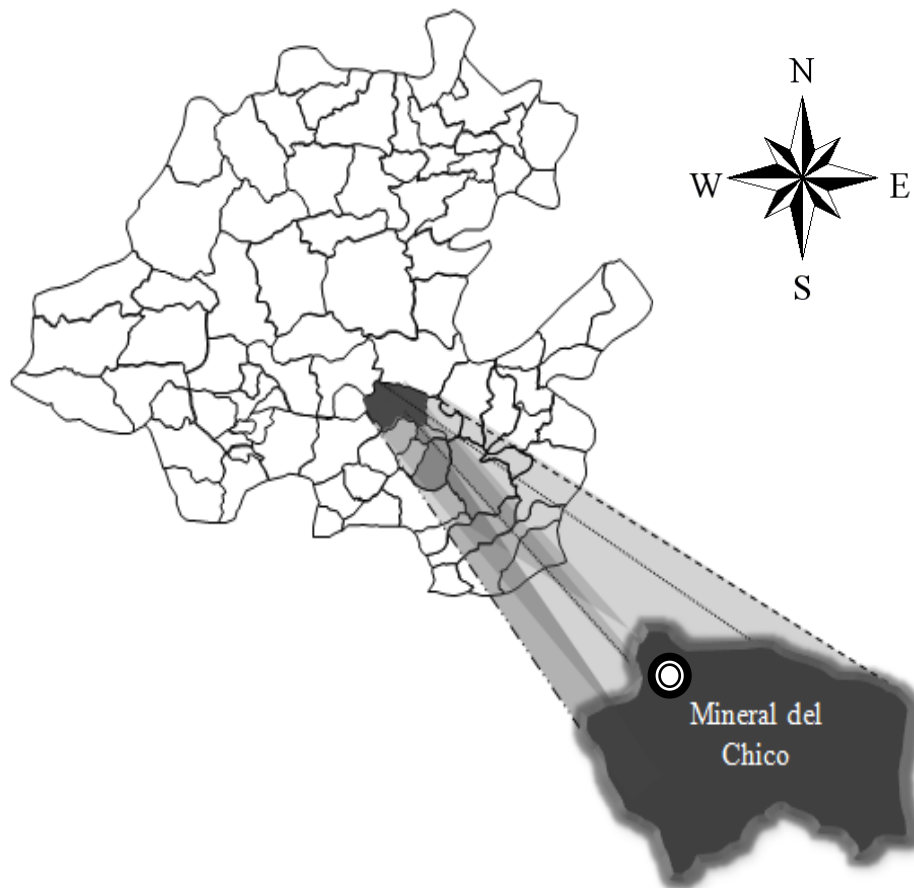


Figura 2. Localización del municipio de Mineral del Chico; Hidalgo, México.

2.9. Ubicación

Geográficamente el área de recolecta de los ejemplares de *R. olivacea* se ubicó en un valle con bosque de oyamel y abarcó aproximadamente 1000 m². Se localizó a 3 km al oriente de la Cabecera Municipal de Mineral del Chico, a 2,624 msnm, entre las coordenadas 20°12'41.6" latitud norte y 98°41'57.5" longitud oeste (figura 3).

Es un lugar perturbado por el hombre, por poseer senderos rurales que comunican a diversas zonas de huertos y cultivos familiares, localizada en los límites del Parque Nacional El Chico (figura 4). Además, colinda con la comunidad de Velasco y con el Municipio de Omitlán de Juárez (INEGI, 2005).

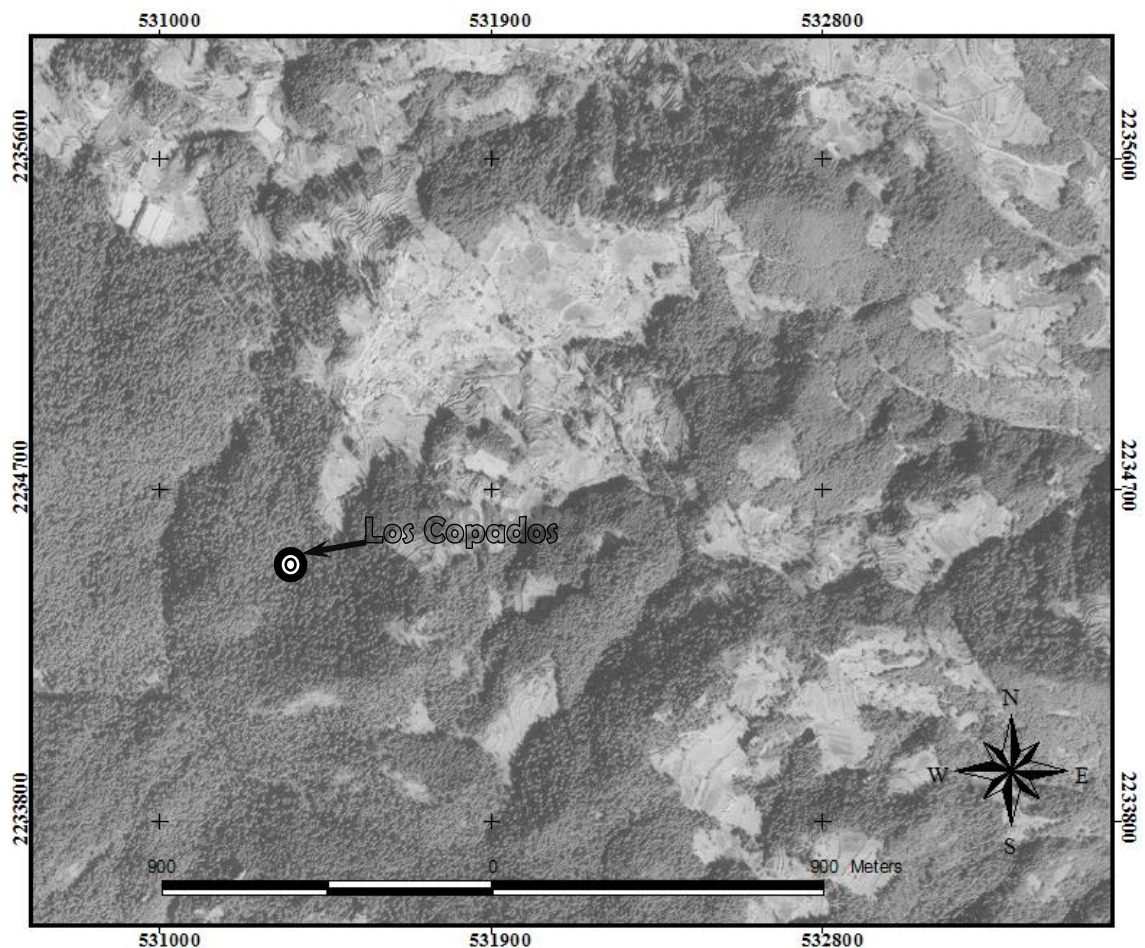


Figura 3. Ortofotos digitales INEGI (1995) Escala 1:20000 donde se ubica espacialmente el área de estudio rodeada de bosque de *Abies religiosa*.



Figura 4. Ubicación del Parque Nacional “El Chico” y el área de estudio
<http://www.parqueelchico.gob.mx>.

2.10. Vegetación

Las características topográficas, geográficas y climáticas de la región donde se localiza el parque, le confieren una vegetación con gran riqueza de especies. Este lugar destaca por la presencia de seis géneros de coníferas de los nueve representados en México (Zavala, 1995). Así como también por contener numerosas comunidades vegetales de especies arbustivas y herbáceas, proporciona diversos ambientes con fisonomías distintas (Fig. 5). Entre su composición florística, destaca por la extensión que está dominada el parque: bosques de oyamel (1,856.0 Ha), seguida del bosque de pino-encino (403.0 Ha), bosque de oyamel-encino (95.0 Ha), bosque de tláxcal o táscate (63.0 Ha), pastizal (46.0 Ha), bosque de cedro (27.0 Ha) y bosque de encino (25.0 Ha), (Rzedowski, 1978).

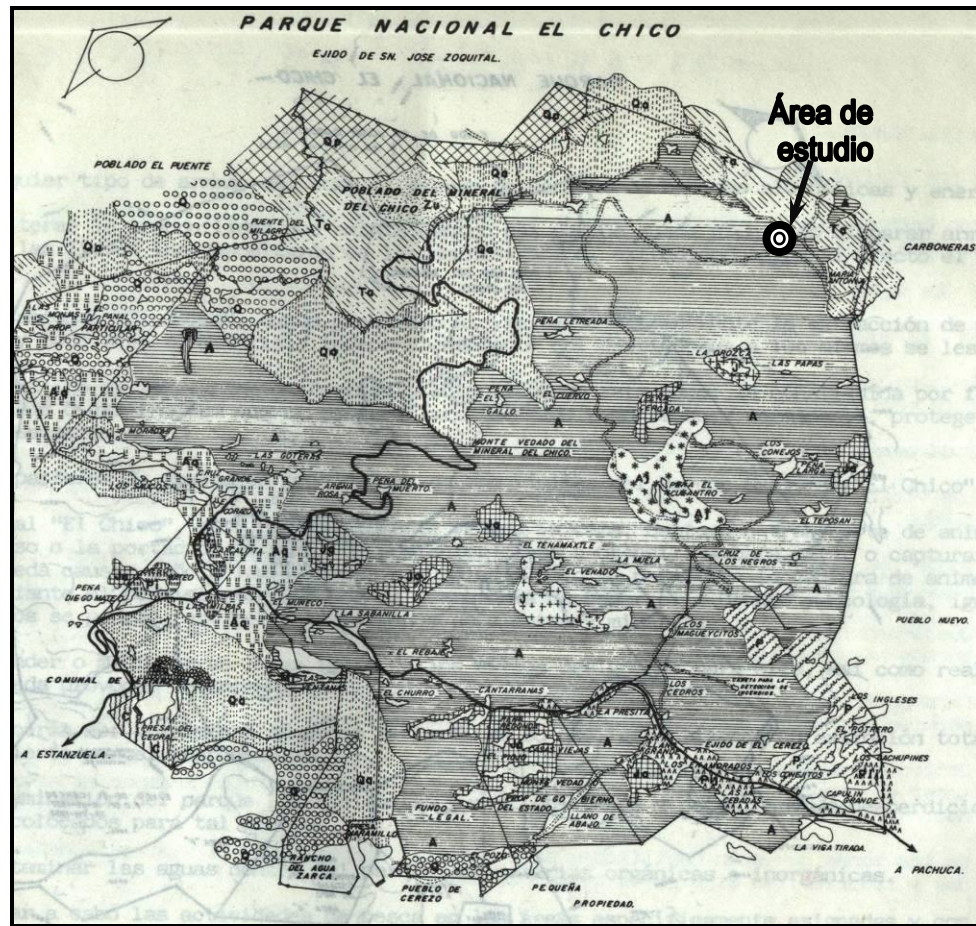


Figura 5. Tipos de vegetación en el área del Parque Nacional El Chico (SEDUE, 1988).

2.11. Clima

La altitud y topografía de área de estudio le confieren un clima templado-húmedo. Las temperaturas medias anuales varían entre 10° y 14°C (Madrigal, 1967). La precipitación total varía de 600 a 1500 mm (Medina y Rzedowski, 1981). Los periodos de lluvia y sequía se presentan bien marcados. Las primeras lluvias se presentan durante las tardes y noches principalmente del mes de mayo y cesan en octubre (Manzanilla, 1974). Mientras el periodo de sequía abarca los meses de noviembre a mayo.

2.12. Edafología

El área del parque presenta suelos poco profundos, porosos y bien drenados (Madrigal, 1967). Los bosques de oyamel prosperan sobre suelos jóvenes formados por andesitas, basalto y riolita. Son suelos limoso-arenosos, arcillo-arenosos o arenosos. Su pH varía desde medios ácidos hasta neutros. La capa superior tiene un alto contenido de humus alcanzando hasta en algunos lugares hasta un 70%. Presentan una capa de hojarasca no descompuesta de espesor variable de 1.5 a 5 cm, constituida por hojas de oyamel, restos de musgos, hojas y tallos de arbustos y herbáceas y algunas semillas, inflorescencias, escamas de conos y fragmentos de corteza de oyamel (Madrigal, 1967).

2.13. Caracterización poblacional y cultural

De acuerdo con el censo poblacional realizado por INEGI (2005), el municipio de Mineral del Chico contaba con total de 6, 714 habitantes, para el cual 3,217 eran hombres y 3,497 eran mujeres. Mientras que para la comunidad de Carboneras existe una población aproximada de 535 habitantes, de los cuales 240 son hombres y 295 mujeres, misma que cuenta con un total de 124 viviendas habitadas distribuidas en barrios y rancherías. La actividad económica predominante es la agricultura. En su mayoría las calles están empedradas o son de terracería. Cuenta con equipamiento para el bienestar social: salud, educación y energía eléctrica.

De acuerdo a INEGI (2005), en el municipio de Mineral del Chico el 0.5 % de su población habla lengua indígena, entre las más practicadas se encuentran otomí y nahua, aunque esto no se percibió en la comunidad de recolecta anteriormente mencionada, ya que la mayor parte son mestizos y hablan español.

3. ANTECEDENTES

3.1. Estudios de *R. olivacea* a nivel nacional

La mayoría de los estudios que se encontraron fueron de tipo ecológico donde se estima la diversidad de cuerpos fructíferos ectomicorrizógenos entre las estaciones de verano a otoño, donde predomina esta especie registrando un alto número de abundancia relativa (Richard, 2004; Welden y Guzmán, 1978; Zarco, 1986; Padilla *et al.*, 2004).

Kong (1998), realizó una aportación importante al estimar 61 especies y 4 variedades para el género *Russula* en México y reporta a *R. olivacea* como una especie típica de los bosques de *Abies religiosa*.

Valenzuela (1981), refirió a este taxón como una de las especies de macromicetos muy poco conocidas para México, además de hacer una descripción taxonómica de este mismo hongo tomando en cuenta caracteres muy precisos y reporta su distribución para los estados de: Nuevo León, Hidalgo, México, Jalisco, Michoacán, Morelos, Tlaxcala, Veracruz y el Distrito Federal (figura 6).



Figura. 6. Distribución de *R. olivacea* en la República Mexicana.

3.2. Estudios de *R. olivacea* a nivel estatal

El estado de Hidalgo se caracteriza por tener una amplia tradición micófaga (consumidora de hongos); ocupa el tercer lugar a nivel nacional en cuanto a número de especies que se consumen con aproximadamente 126 de ellas (Romero, 1996).

Frutis y Guzmán (1983), realizaron una contribución al conocimiento de los hongos de tipo florístico y ecológico en el que mencionan a *R. olivacea* creciendo sobre un hábitat micorrízico, asociado al bosque de *Abies* y colectado en el sitio conocido como “Las Ventanas” en el interior del Parque Nacional el Chico, Hgo.

Mendoza *et al.*, (2006), reportaron a *R. olivacea* al crecer en los límites del Parque Nacional el Chico y estar asociada al bosque de encino *Quercus obtusata* (BQO) en la porción noroeste de la Sierra de Pachuca, Hgo.

Hernández (2007), realizó un estudio sobre los macromicetes con un enfoque etnomicológico para la región de Mineral del Chico y la comunidad de Carboneras, Hidalgo, menciona a *R. olivacea* como un hongo “loco”, por ser el causante de provocar trastornos de tipo gastrointestinal, al ser consumido por los habitantes de esta misma región. Sin embargo, este autor la identifica como *R. xerampelina*.

3.3. Propiedades tóxicas de los basidiomicetos

Actualmente el conocimiento de las sustancias químicas que pueden producir intoxicación o envenenamiento causado por las toxinas de los macromicetos es muy limitado. Sin embargo, se ha demostrado que por su nutrición heterótrofa los conduce a degradar metales pesados por medio de exoenzimas para ser incorporados al metabolismo fúngico como es el caso del As, Hg y Cd, considerados como metales pesados altamente tóxicos (Cocchi, 2005).

Otra característica de los basidiomicetes es que hasta el momento no se ha determinado la función precisa de producción de metabolitos secundarios. Sólo se presume que sintetizan estas sustancias naturales poco comunes con el fin de comunicarse entre sí, actuar como defensas, atrayentes, inhibir el crecimiento, como repelentes químicos o simplemente ser tóxicos para poder sobrevivir en el nicho ecológico.

3.4. Toxicidad de *R. olivacea*

En algunos de los estados de la República Mexicana e incluso para el estado de Hidalgo *R. olivacea* es considerada como una de las especies de macromicetos capaz de causar intoxicaciones de tipo gastrointestinal (Hernández, 2007). Sin embargo, para la mayoría de los países Europeos y concretamente para Italia diversos autores afirman que este mismo cuerpo fructífero no es tóxico e inclusive, establecen que puede ser consumido por el ser humano sin causar malestar alguno después de tener una cocción prolongada pero que cuando se consume en estado crudo o mal cocido ha causado el mismo tipo de trastorno gastrointestinal solo que con distinto grado de intensidad (Kuhner y Romagnesi, 1974; Foiera *et al.*, 1993; Cetto, 1994; Galli, 1996; Lonati, 1996; Papetti y Simonini, 1999; Gennari, 2000; Mazza, 2000). Así mismo existen casos en los que no se tiene ningún registro sobre el uso o toxicidad de esta especie, pero tampoco descartan la posibilidad de ser un hongo potencialmente utilizable para el consumo alimenticio humano (Kong, 1998).

3.5. Estudios químicos de *R. olivacea*

El ergosterol es el compuesto que se encuentra en mayor cantidad presente en los hongos macroscópicos, cuyo contenido es aproximadamente de un 80 %. Además de esto, la familia Russulaceae contiene de veinte a veintidós esteroides, donde cinco de ellos han sido aislados en forma cristalina correspondientes a: ergostadieno, cerevisterol, lanosterol, colesterol y 5-7 dihidrocolesterol, este último aislado de la especie *R. decolorans* y *R. aeruginosa* (Cancela, 1995).

A nivel de género Phillips (1991), señala a *R. flavida*, *R. subnigricans*, *R. brevipes* y *R. japonica* y *R. foetes*, *R. nigricans* entre las Russulas más comúnmente estudiadas. Igualmente menciona que su metabolismo secundario es rico en terpenoides, especialmente sesquiterpenoides de los cuales se ha aislado el ergosta-5, 7 dien-3 β -ol y ergosta-7-en-3 β -ol.

Esto mismo lo corroboraron recientemente Trigos *et al.*, (1998), quienes hallaron la estructura de cuatro esteroides en *R. olivacea*, pertenecientes a peróxido de ergosterol; ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α -diol; ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α ,6 α -triol; y

ergosta-22-en-3 β ,5 α ,6 α -triol por técnicas espectroscópicas donde utilizan extractos con Acetato de etilo.

Adicionalmente, a estos estudios enfocados en la búsqueda de los metabolitos secundarios responsables de conferir las propiedades tóxicas a los hongos, también se basaron en la técnica de pirólisis acoplado a cromatografía de gases-líquidos. Este es un valioso método, propuesto para identificar los compuestos tóxicos presentes en los hongos comparados con una la base de datos o pirograma (Benoit-Guyed *et al.*, 1980).

Por otra parte, es importante señalar la existencia de sustancias predominantes en los hongos, como es el caso del carbohidrato llamado manitol. Este es el compuesto más soluble encontrado en la mayoría de los hongos macromicetes en forma de cristales y considerado como una sustancia importante en la comparación de espectros hallados en otra clase de hongos.

3.6. Bioensayos en *R. olivacea*

Hasta el momento el único reporte que se tiene acerca de la toxicidad de *R. olivacea*, ha sido el de la evaluar sus propiedades insecticidas, tomando como modelos biológicos larvas de *Drosophila melanogaster* (mosca de fruta) y *Spodoptera littoralis* (rosquilla negra), donde sobresale esta especie por poseer poca una nula toxicidad (Mier *et al.*, 1995).

4. JUSTIFICACIÓN

El área de estudio se encuentra situado en un bosque de *A. religiosa*, albergando una considerable diversidad de macromicetos los cuales juegan un papel importante para el funcionamiento de los ecosistemas naturales y en particular en la formación de micorrizas, ya que confiere a las plantas beneficios como incremento en biomasa, supervivencia, resistencia a la sequía, entre otros.

En la literatura, la identificación precisa de *R. olivacea* es poco confiable debido a que se basa principalmente en la micobiota de otros países, por lo que muchas veces los datos no son suficientes para poder afirmar que se trate de la misma especie.

No existen estudios precisos para esta especie que ayuden a descubrir la presencia de los compuestos químicos responsables de otorgarle la toxicidad, como es el caso de los compuestos químicos presentes en otros géneros de hongos macroscópicos bien conocidos.

Dentro del campo de la química orgánica la mayoría de los productos naturales que han sido aislados, proceden de plantas, no siendo así el caso para los macromicetos, que son un grupo de los menos estudiados, pero que sin embargo, ofrecen un amplio número de productos potenciales para la obtención de nuevos compuestos.

Hasta el momento no existe un solo trabajo enfocado a evaluar la toxicidad de *R. olivacea* empleando larvas acuáticas vivas de *A. salina*. Siendo necesario definirla en este modelo altamente sensible a perturbaciones.

Se pretende llegar a la identificación química de los productos naturales que constituyen a este cuerpo fructífero y pudieran estar provocando algún efecto tóxico.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la toxicidad e identificar los distintos extractos orgánicos de *R. olivacea* en larvas vivas de *A. salina*.

5.2. Objetivos específicos

- Determinar taxonómicamente el macromiceto, con la ayuda de un especialista en el género.
- Evaluar la toxicidad de los extractos orgánicos de *R. olivacea* obtenidos mediante dos métodos de extracción, en larvas acuáticas vivas de *A. salina* a distintas concentraciones.
- Separar los compuestos de los extractos que presenten toxicidad mediante métodos cromatográficos.
- Identificar por métodos espectroscópicos los compuestos químicos de los de *R. olivacea*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Recolecta

Durante las nueve salidas al campo se recolectaron un total de cinco carpóforos en el sitio conocido como Los Copados en temporada de lluvias, durante los meses de julio a septiembre de 2007. Las salidas se realizaron quincenalmente con el fin de obtener el mayor número de carpóforos siguiendo los métodos descritos previamente (Larget *et al.*, 1977; Cifuentes *et al.*, 1986). Los cuerpos fructíferos frescos fueron llevados al laboratorio de micología de la UAEH, pesados en una balanza analítica y divididos en dos partes. La cantidad media de cuerpos fructíferos frescos fueron inmediatamente deshidratados a una temperatura de 60°C en una cámara de secado por 24 horas. Al finalizar este proceso la muestra se pulverizó en un molino eléctrico con la finalidad de facilitar la extracción de los compuestos orgánicos al aplicar calor por medio de un equipo Soxhlet. Mientras que la otra mitad restante de hongos frescos, se fragmentó en trozos pequeños de menos de 1 cm de diámetro con el propósito de haber una mejor penetración del diluyente en estos y extraer directamente los compuestos orgánicos sin aplicar temperatura por el método de maceración.

6.2. Determinación de la especie

Para efectuar la identificación y determinación del material obtenido en campo, se consultaron diversos trabajos especializados, monografías y obras micológicas como las de Romagnesi (1967), Bon (1988), Schaeffer (1979) y Sarnari (1991). Sin embargo, por la dificultad para definir adecuadamente el taxa y los numerosos caracteres a tomar en cuenta en este grupo en particular, se recurrió al especialista en Russulas de México, el M. en C. Alejandro Kong Luz del Centro de Investigaciones de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

6.3. Obtención de los extractos en Soxhlet

Este método es útil para solubilizar una muestra seca en uno o varios disolventes, hasta lograr la difusión celular completa de los principios activos al aplicar calor de por medio (Kuklinski, 2000) y para ello, se realizaron los siguientes pasos:

Se introdujo la cantidad de 14.2 g de muestra pulverizada en un dedal poroso y se depositó dentro del cuerpo del extractor (A). Se vació en un matraz de bola con capacidad de 250 mL la cantidad de 200 mL de Hex, CHCl_3 , AcOEt y MeOH (cada uno por separado, en orden creciente de polaridad y temperatura según el punto de ebullición) para ser calentados durante ocho horas continuas en una canastilla (B) a una temperatura aproximada de 50 a 60°C. Una vez que se llevó a cabo la ebullición, los vapores del disolvente ascendieron por el tubo lateral (C), hasta tener contacto con el refrigerante (D), de esa manera se condensó el disolvente y se depositó directamente sobre la muestra del dedal situado en el cuerpo del extractor. El cuerpo del extractor se lleno de disolvente que se evacuó por el sifón lateral interno (E) hasta caer en el matraz de bola (F). Finalmente después de ocho horas continuas se retiró el extracto (figura 7).

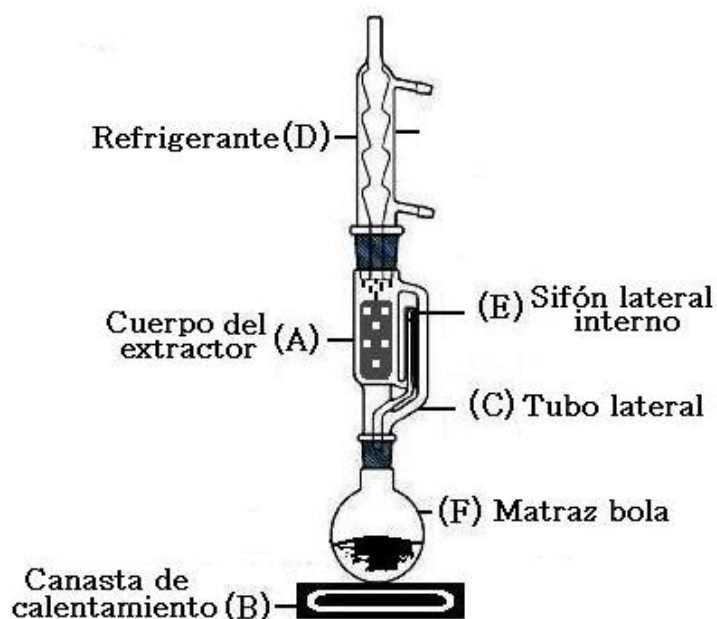


Figura. 7. Localización de cada una de las partes del extractor Soxhlet.

A continuación se filtró cada uno de los cuatro extractos obtenidos por separado en un embudo mediante un papel Whatman No. 42 y se evaporó la mayor parte del disolvente en un rotavapor Büchi R-124 a una temperatura aproximada entre 40 a 50°C, con movimientos rotatorios lentos, a una presión reducida de 1 bar y con un vacío moderado. El evaporado se transfirió a viales limpios de impurezas y calentados a una temperatura de 30°C para eliminar el resto del disolvente. Finalmente la cantidad de extracto obtenido se calculó por diferencia de peso del vial y se almacenó en congelación a 0 °C hasta su posterior uso (Harborne, 1980).

6.4. Obtención de los extractos en maceración

Este método consiste en extraer los principios activos de origen natural al tener siempre en contacto el material en fresco (basidiocarpo) con el disolvente a utilizar (metanol) y en una agitación constante durante un tiempo determinado (Kuklinski, 2000). Esta técnica normalmente se utiliza cuando la estructura del material es muy permeable al disolvente, los principios activos son muy solubles, pero principalmente para la extracción de principios activos termolábiles por trabajar a una temperatura ambiente. Para ello, se realizaron los siguientes pasos:

Se trituró por separado el píleo y estípites, ambos con un peso fresco de 72.43 g y 31.35 g respectivamente; posteriormente se colocaron en el interior de recipientes herméticos de vidrio, con de 15 mL de metanol y puestos a temperatura ambiente en un cuarto oscuro durante seis días hasta lograr la difusión celular de los compuestos químicos.

6.5. Separación de los compuestos por cromatografía en columna

La cromatografía en columna es una técnica útil para separar y cuantificar selectivamente las moléculas de una mezcla compleja. La técnica consiste en aislar los compuestos químicos través de una fase estacionaria (sólido poroso) con base a la velocidad de desplazamiento diferencial de los solutos al ser transportados por una fase móvil (eluyente líquido) (Kuklinski, 2000).

Para esta operación se utilizó el extracto homogeneizado con gel de sílice de 60 micras, marca Merck (70-230 mesh ASTM) dentro de una columna de vidrio de 50 cm de longitud y 2 cm de diámetro. Como disolvente en la fase estacionaria se utilizó hexano (Hex). Posteriormente se efectuó la elución con la mezcla de Hex, Hex-CHCl₃, CHCl₃, CHCl₃-AcOEt, AcOEt, AcOEt-MeOH, MeOH (en orden creciente de polaridad) hasta concluir la cromatografía (figura 8).



Figura 8. Cromatografía en columna
6.6. Cromatografía en placa preparativa

La cromatografía en placa preparativa es una técnica útil para separar y visualizar los compuestos de una mezcla compleja por distribución de dos fases. La técnica consiste en aislar los compuestos químicos través de una fase móvil la cual fluye en sentido ascendente arrastrando los diferentes componentes de la mezcla a velocidades diferentes, con lo que se consigue la separación.

Para esta operación se utilizó una cromatografía en placa preparativa de 20 x 20 cm, marca Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ de gel sílice de 2 mm de espesor, posteriormente la placa se colocó verticalmente en una cámara de cromatografía

con el disolvente (metanol) previamente depositado en el fondo del recipiente. Finalmente se determinó el factor de referencia de desplazamiento (R_f) de las fracciones aisladas en una cámara ultravioleta modelo C-65 para tener mayor detalle el R_f de cada una de las fracciones (figura 9).

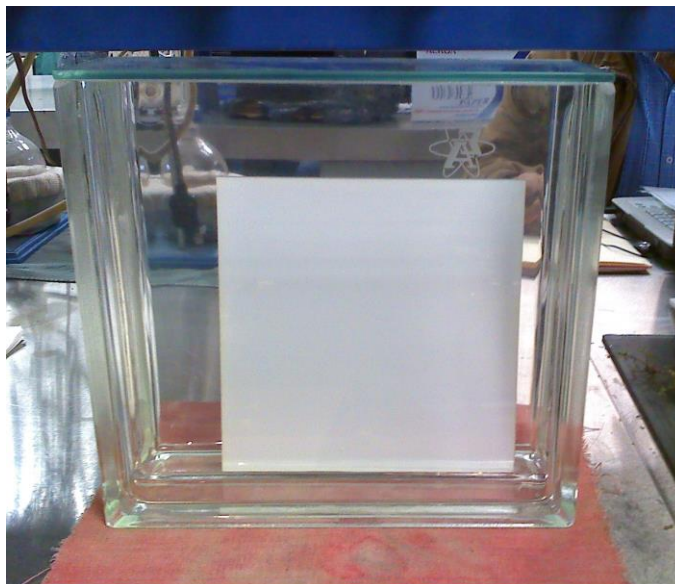


Figura 9. Cromatografía en placa preparativa

6.7. Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina, se basa en la misma técnica anterior, únicamente que se utiliza una cantidad muy pequeña de muestra. Para ello se depositó una muestra de cada una de las fracciones sobre una placa comercial de aluminio marca Kieselgel, recubiertas con gel de sílice para cromatografía, con un espesor de 0.25 mm y de 5 X 2.5 cm. Finalmente se determinó el número de compuestos visualizados en la cámara ultravioleta (figura 10).

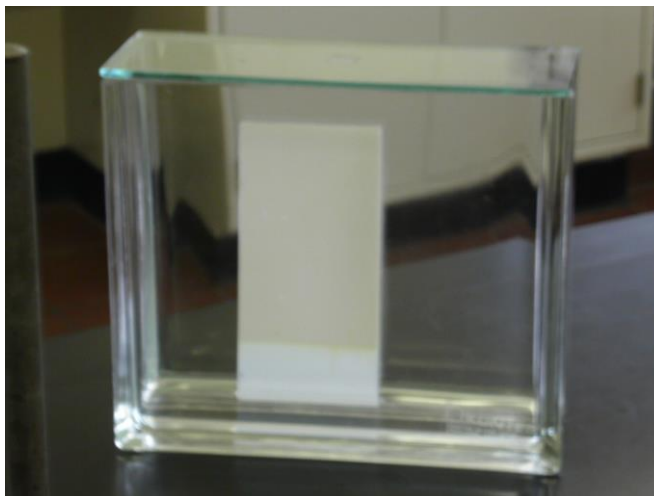


Figura 10. Cromatografía en capa fina

6.8. Identificación de los compuestos

Posterior a la separación de las sustancias químicas, se eligió la técnica de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , utilizando un equipo Jeol Eclipse a 400 y 100 MHz.

Este método es útil para elucidar las estructuras moleculares de los compuestos orgánicos, el cual se basa en someter los núcleos atómicos activos a un campo magnético externo. Esta condición la cumple el ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P y ^{15}N por presentar números atómicos impares. Para que se pueda emplear la técnica los núcleos deben tener espines con carga positiva y un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como pequeños imanes provocando una diferencia energética como respuesta de la radiación a la que están sometidos. Esto provoca que el espectrómetro de RMN detecte estas señales y las registre como una gráfica de frecuencias de diferente intensidad.

6.9. Evaluación de la toxicidad en *Artemia salina*

Para la prueba de toxicidad en el laboratorio se utilizó nauplios de *A. salina* siguiendo el método de Meyer *et al.*, (1982) y McLaughlin *et al.*, (1998). Para ello se llevó a cabo la eclosión de quistes de *A. salina* de la siguiente manera:

En un embudo de plástico con capacidad de 500 mL se colocó la cantidad de 2 g de quistes deshidratados de *A. salina*, con solución salina (NaCl) al 5%, pH

de 7.5, oxigenación constante a través de una bomba de acuario, temperatura promedio de 25°C e iluminación con una lámpara de luz blanca de 75 Watts (figura 11).

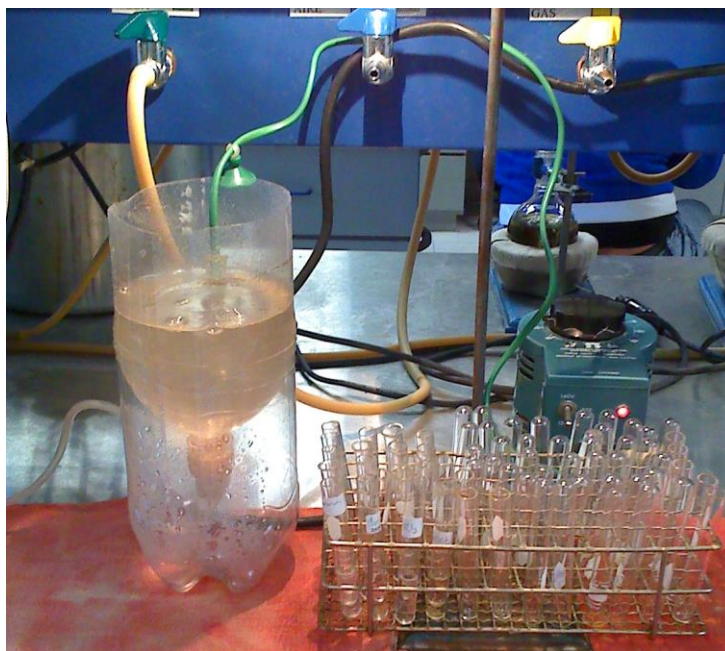


Figura. 11. Condiciones de quistes de *A. salina* para que eclosionaran.

Posterior a la eclosión después de 24 horas de incubación los nauplios recién emergidos se utilizaron de la siguiente manera:

En 30 tubos de ensaye de 13 x 100 mm, se colocaron 3 mL de las soluciones de los extractos evaporados a utilizar, preparados previamente con solución salina. Después, con una pipeta Pasteur se contabilizó y colocaron 10 nauplios de *A. salina* por tubo, cada tubo se consideró una réplica, preparándose cinco réplicas por concentración de extracto, las cuales fueron 1, 10, 100, 1000 y 2000 µg/mL. Finalmente los tubos destapados se colocaron en una gradilla la cual se ubicó cerca de la lámpara encendida durante 24 horas, para contabilizar a simple vista el número de larvas muertas de cada uno de los tubos de las cinco concentraciones. Los resultados expresados en porcentaje de mortalidad, fueron calculados mediante la fórmula $100 - (100B/A)$, en donde A fue el número promedio de larvas vivas en el testigo y B el número promedio de larvas muertas en el experimental de cada uno de los cuatro extractos en Soxhlet. Los dos testigos

negativos (T-), se prepararon únicamente con agua salina al 5 %, mientras que el otro contiene dimetil sulfóxido (DMSO) al 0.5 % para lograr una mejor disolución de los extractos en agua (figura 12).

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa SPSS 14.0 mediante una regresión lineal Probit para poder establecer la concentración letal 50 (CL₅₀), la cual se conoce como la cantidad de sustancia que conduce a la pérdida del 50% de los organismo tratados, por lo que se consideró que los compuestos químicos produjeran toxicidad en *A. salina* cuando presentaron un valor promedio de CL₅₀ ≤ 100 µg/ml (Zani *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2000).



Figura. 12. Ensayo de toxicidad en *A. salina* con las cinco concentraciones de cada réplica, testigo negativo y testigo con DMS.

6.10. Pruebas estadísticas

Para este análisis, se realizó la prueba de análisis de la varianza (ANOVA). La cual sirve para determinar si las diferencias que existen entre las medias de tres o más grupos son estadísticamente significativas. Se basa en la partición de la varianza para establecer si la varianza explicada por los grupos formados es suficientemente mayor que la varianza residual o no explicada (Varó, 1998). Es decir si los extractos o fracciones utilizadas en el ensayo son tóxicos o no, por lo que se requiere contar con una hipótesis nula (H₀) y una hipótesis alternativa (H_A);

las cuales son excluyentes una de otra; y que permiten determinar la toxicidad inducida por el extracto evaluado (Frei y Würger, 1998).

La hipótesis nula (H_0), se asume que no hay diferencia entre los resultados obtenidos de los testigos negativos y el tratamiento, y esta se acepta estadísticamente cuando no hay un incremento significativo.

La hipótesis alternativa (H_A), se asume que si hay diferencia entre los resultados obtenidos de los testigos negativos y el tratamiento; esto se presenta cuando los resultados obtenidos del ensayo tienen un incremento significativo. Si se rechaza indica que el tratamiento no produce incremento requerido para considerar que el compuesto es tóxico, mientras que si se acepta significa que el compuesto a evaluar es capaz de causar toxicidad en distintas concentraciones (Frei y Würger, 1998).

La interpretación de los datos estadísticos se hace bajo la siguiente premisa: si se acepta la (H_0) y se rechaza la (H_A), el resultado indica que la toxicidad es negativa, pero si se acepta la (H_A) y se rechaza la (H_0), la toxicidad es positiva; pero en cambio si se rechazan las dos hipótesis se dice que el resultado del tratamiento es débil positivo o débil tóxico; por otro lado si se aceptan las dos hipótesis el resultado es considerado interminado o inconcluyente (Frei y Würger, 1998).

7. RESULTADOS

7.1. Identificación taxonómica de *R. olivacea*

R. olivacea se distingue de otras especies por presentar un basidioma grande cuya consistencia es frágil y quebradiza. El píleo es de color púrpura, con rugosidades concéntricas sobre el margen, una superficie opaca, láminas de color amarillo y color púrpura-rojizo en el estípite (figura 13).



Figura 13. *Russula olivacea* (Valenzuela-Bautista).

7.2. Caracteres morfológicos

Presenta píleo de 78-135 mm de diámetro, forma convexo a plano-convexo, con el centro deprimido, tonos púrpura (14 E7; 14 C3; 15 E4; 15 D4; 15 D7), de acuerdo con la guía de color de Kornerup y Wanscher (1961), margen entero, con rugosidades concéntricas y en partes ondulado, consistencia carnosa, presenta desprendimiento de la cutícula, lustre opaco, textura seca-sedosa y con ornamentación glabro. Contexto de consistencia carnosa, no fibrosa y quebradiza, tonalidades blancas (4 A2), sabor a queso y grosor de 16 mm. Láminas con uniones subadheridas, uncinadas, juntas, no presenta lamélulas, su forma es ancha de 18-12 mm, consistencia quebradiza, lisa en la forma de borde, color amarillento (3 A3) y con el borde más oscuro (3 B5). Estípite de 53 mm a 106 mm de tamaño, el ancho medio es de 25 mm a 30 mm, base del estípite de 38-46 mm

y forma clavada. Ornamentación fibrosa con tonos rojizos (12 D5), blancos (12 A1) y amarillos (5 A3) y el interior esponjoso-cavernoso (figura 14).

7.3. Caracteres microscópicos

Basidiosporas de 9-12 x 8-10 μm , anchamente elípticas ($Q=1.18$) con ornamentación amiloide con el reactivo de Melzer, constituida por espinas y verrugas aisladas. Esporada de color amarillo (4-A.5). Pileipellis poco diferenciado de la trama, ausencia de macrocistidios, presenta tinción en todas las células de la cutícula de color rosa-transparente, así como también como la ausencia de hifas primordiales en todas las células de la cutícula en H_2SO_4 al 50% y con cristales de sulfovainillina. Hifas segmentadas de la cutícula del píleo son más grandes unas que otras y/o ancladas en KOH al 10%. Hifas primordiales de la cutícula del píleo largas y septadas con tinción rojo-púrpura quedando retenido el colorante de fuccina de Ziehl y el HCl al 10%. Hifas terminales de la cutícula del píleo septadas y largas en KOH al 10% y H_2SO_4 al 50% con cristales de sulfovainillina. Basidios de 36-51 x 9.4-14.3 μm , claviformes, con cuatro esterigmas y pared delgada, hialinos en KOH. Pleuromacrocistidios de 73-123 x 7.9-12.3 μm , subcilíndricos a subfusiformes, con el ápice obtuso, mucronado o subrostrado, de pared delgada, contenido granular poco abundante y disperso. Queilomacrocistidios de 47-92 x 6.3-10.7 μm , llegan a presentar septos. Macrocistidios en láminas muy abundantes. Células marginales de 30-50 x 4.1-9.8 μm , cilíndricas, fusiformes o subuladas y de pared delgada, hialina en KOH; subhimenio pseudoparenquimatoso (figura 15).

7.4. Caracteres organolépticos

Olor a queso y cuando se deshidrata el basidioma, a pan horneado. Sabor de la trama a queso. Sabor en las láminas ligeramente amargo.

7.5. Reacciones macroquímicas

NH₄OH negativo en la trama, píceo y en láminas. Anilina negativo en láminas y de color amarillo. Fenol al 2% es positivo en el contexto del píceo y en la trama. Formol al 40% negativo en la trama. FeSO₄ al 10% negativo con color rosa en la trama.

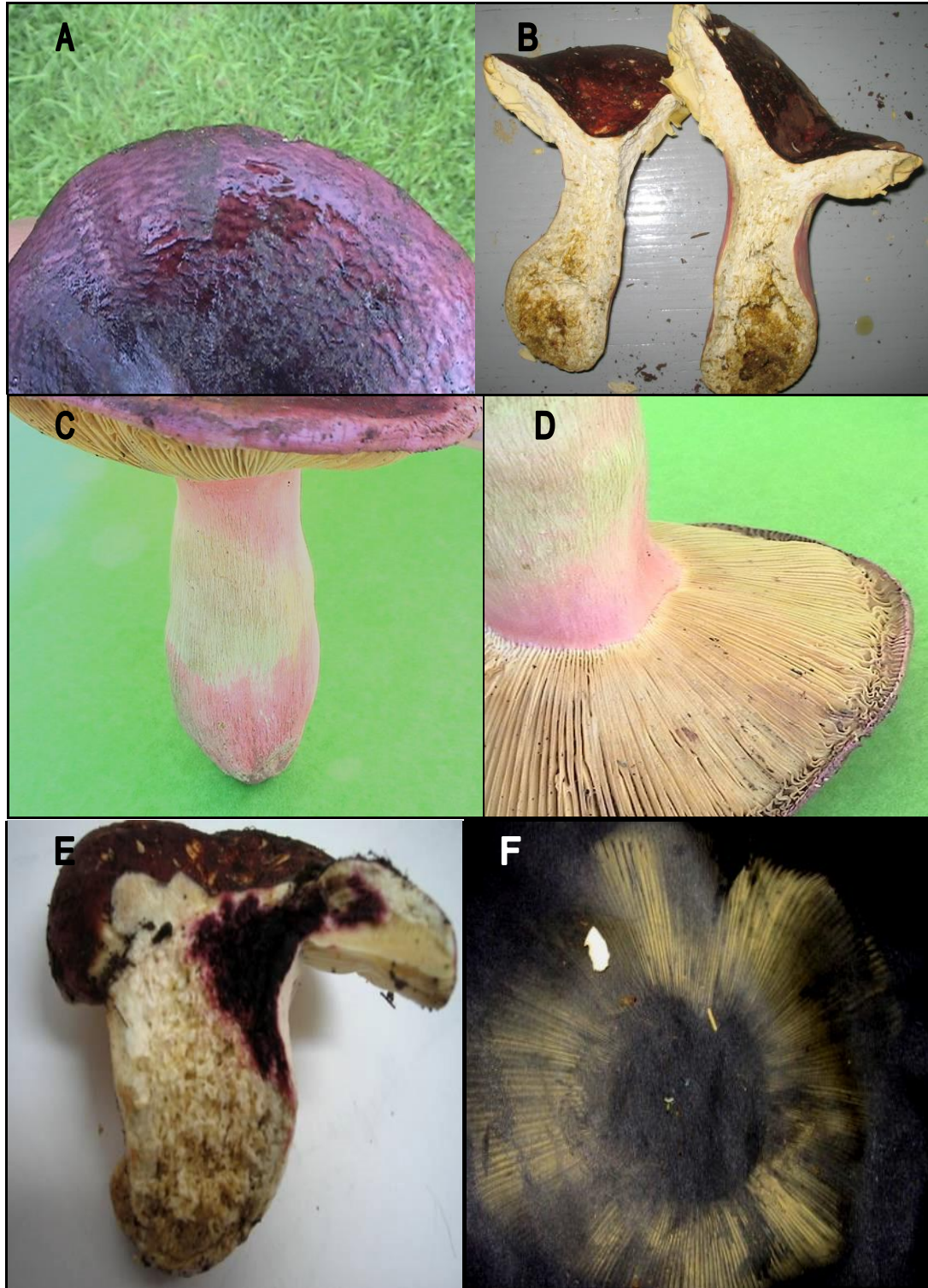


Figura 14. Caracteres macroscópicos de *R. olivacea*.

A. Rugosidades concéntricas del píleo; B. Trama; C. Estípite; D. Láminas; E. Reacción con fenol; F. Esporada (Valenzuela-Bautista).

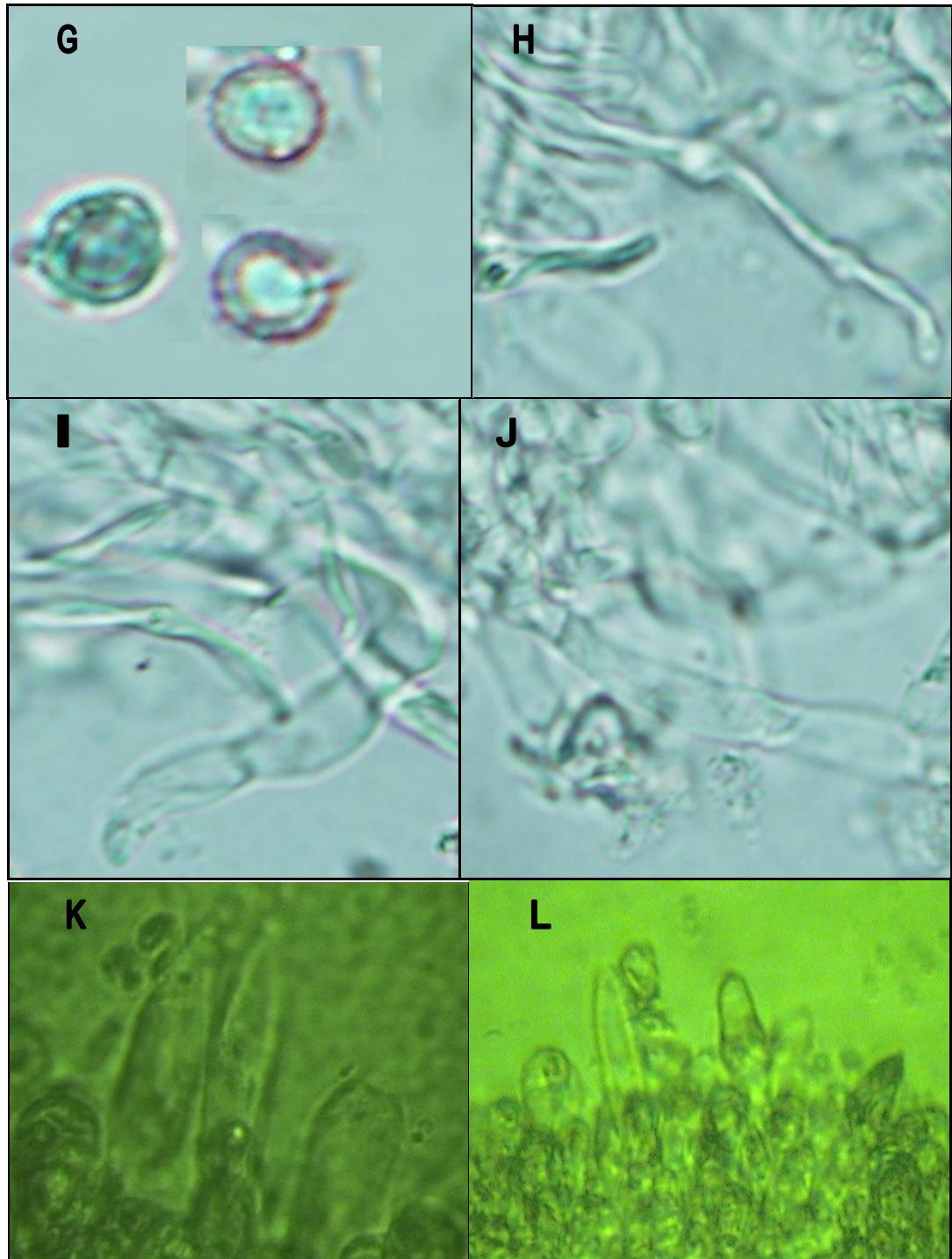


Figura 15. Caracteres microscópicos de *R. olivacea* a 100X.

G. Esporas en Melzer; H. Células no diferenciadas de la cutícula en KOH al (5%); I. Hifa terminal en KOH al (5%); J. Basidio en KOH al 5%; K. Pleurocistidios; L. Queilocistidios. (Valenzuela-Bautista).

7.6. Obtención de los extractos en Soxhlet

La biomasa neta registrada en el cuerpo fructífero seleccionado, fue de 54.25 g, mientras que una vez deshidratado, pesó 10.6 g, obteniendo así una pérdida de humedad del 80.49%.

Se utilizaron 14.2 g del mismo material orgánico para los cuatro disolventes en el equipo Soxhlet mediante el cual se extrajeron los compuestos químicos. En la tabla I se presentan los resultados de la cantidad y rendimiento de los extractos preparados con los cuatro disolventes de manera separada y en orden creciente de polaridad: hexano, cloroformo, acetato de etilo, hasta finalizar con metanol. Se puede observar que el disolvente más polar utilizado, fue el metanol y el que a su vez, presentó el mayor rendimiento expresado en porcentaje, comparado con el resto de los disolventes menos polares.

Tabla I. Rendimiento en porcentaje de cada uno de los extractos en Soxhlet.

Disolvente	Muestra (g)	Extracto (g)	Rendimiento (%)
Hexano	14.2	3.51	24.71
Cloroformo	14.2	2.13	15.00
Acetato de etilo	14.2	2.48	17.46
Metanol	14.2	6.16	43.38

7.7. Toxicidad de los extractos en Soxhlet

En la tabla II se presentan los resultados de acuerdo a la mortalidad determinada al evaluar los extractos de hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol en larvas nauplio de *A. salina*, se obtuvieron valores de $CL_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$, por lo que produjo un efecto negativo de toxicidad, de acuerdo con el criterio previamente establecido ($CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$). Los dos testigos negativos utilizados en los ensayos mostraron el 100% de supervivencia.

Tabla II. $CL_{50} \pm$ Error Estándar de los extractos de *R. olivacea* en *A. salina*.

Extractos	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Hexano	432.273 \pm 76.725 *b
Cloroformo	623.260 \pm 54.393 *b
Acetato de Etilo	984.4200 \pm 83.205 *c
Metanol	119.187 \pm 50.778 *a

Los valores con una letra en común no son significativamente diferentes, de acuerdo con la prueba de Tukey.

En la prueba estadística de Análisis de Varianza (ANOVA) se observó que sí existen diferencias significativas ($F=28.684$; $p=0.000$; $gl=3$) de la mortalidad causada en *A. salina* para los cuatro extractos evaluados. Mientras que la prueba de Tukey indicó tres grupos distintos: a, b y c. De los cuales (a y c) presentaron una mortalidad diferente entre sí, mientras que para las letras iguales (b) presentaron la misma mortalidad.

7.8. Separación de los compuestos del extracto en Soxhlet por cromatografía en columna

Para este proceso se eligió el extracto metanólico por ser el que presentó el mayor rendimiento expresado en porcentaje, comparado con el resto de los disolventes menos polares. Por lo que se obtuvo un total de 72 fracciones. De cada una de ellas, se recuperó el volumen aproximado de 8.57 mL, previamente eluidas con la mezcla de disolventes como se presentan en la tabla III.

Tabla III. Fracciones obtenidas en cromatografía en columna.

Fracciones	Fracciones reunidas	% de Polaridad	Mezcla
1-7	I	100	Hex
8-14	II	50 : 50	Hex- CHCl ₃
15-21	III	100	CHCl ₃
22-28	IV	50 : 50	CHCl ₃ -AcOEt
29-34	V	100	AcOEt
35-46	VI	50 : 50	AcOEt –MeOH
50-72	VII	100	MeOH

7.9. Cromatografía en capa fina

En cada una de las 72 fracciones obtenidas, se rastreó y visualizó el factor de referencia de desplazamiento (R_f) usando para esto una cámara de ultravioleta Modelo C-65, vapores de yodo como revelador y sólo en casos específicos ácido clorhídrico (HCl al 10%).

De esta manera se seleccionó y determinó la fracción VII recuperada y disuelta con metanol (100%) por estar constituida de la sustancia orgánica predominante, la cual resultó ser una sustancia cristalina de color amarillo-crema, sabor dulce, soluble en agua y poco solubles en alcohol, cuyo punto de fusión fue de 159-164 °C (figura 16).



Figura. 16. Cristales del compuesto mayoritario color amarillo-crema.

7.10. Identificación del compuesto predominante

La identificación del compuesto orgánico predominante localizado en la fracción VII se analizó y corroboró con la base de datos de Aldrich y referencias análogas reportadas, por lo que resultó tratarse de un azúcar poliol llamado manitol. El espectrómetro de RMN ^{13}C , indicó de manera sobresaliente tres señales en la región de 60-70 ppm, correspondiente a los tres tipos de carbono presentes en el manitol. Mientras que el espectrómetro de RMN de ^1H indicó señales múltiples entre 3 y 4 ppm corroborando la presencia de este mismo compuesto (figura 17 y 18).

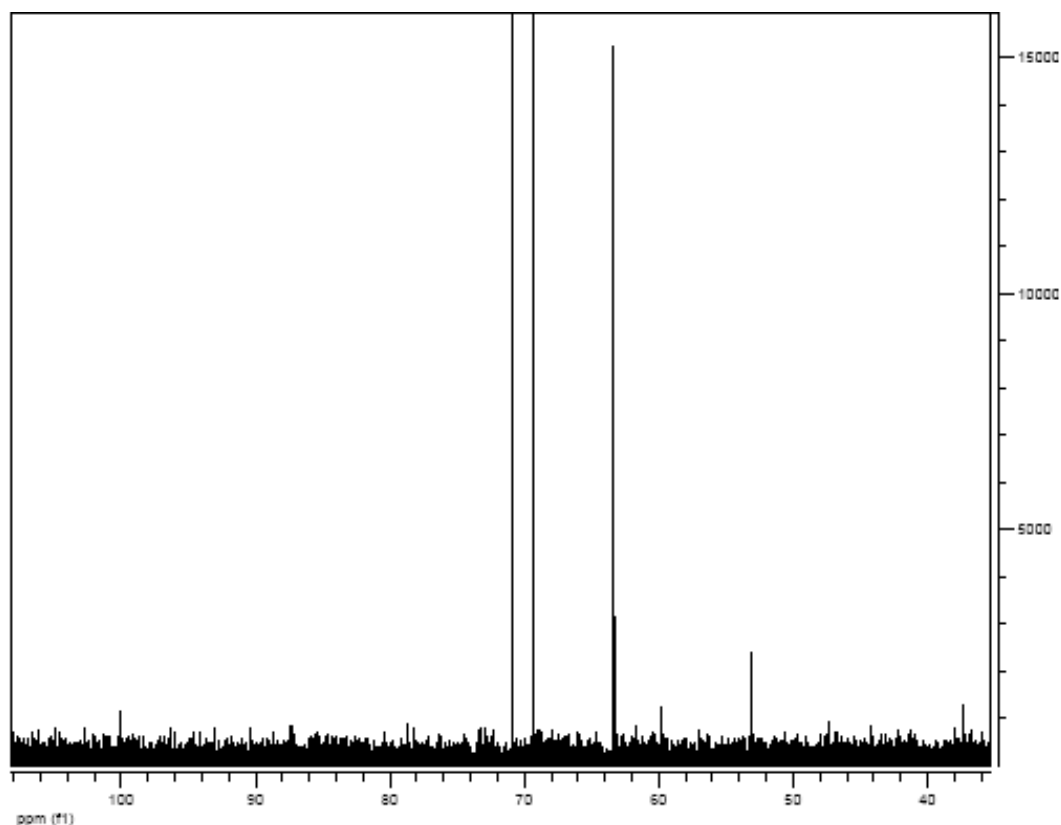


Figura. 17. Espectro de RMN de ^{13}C del manitol, en D_2O .

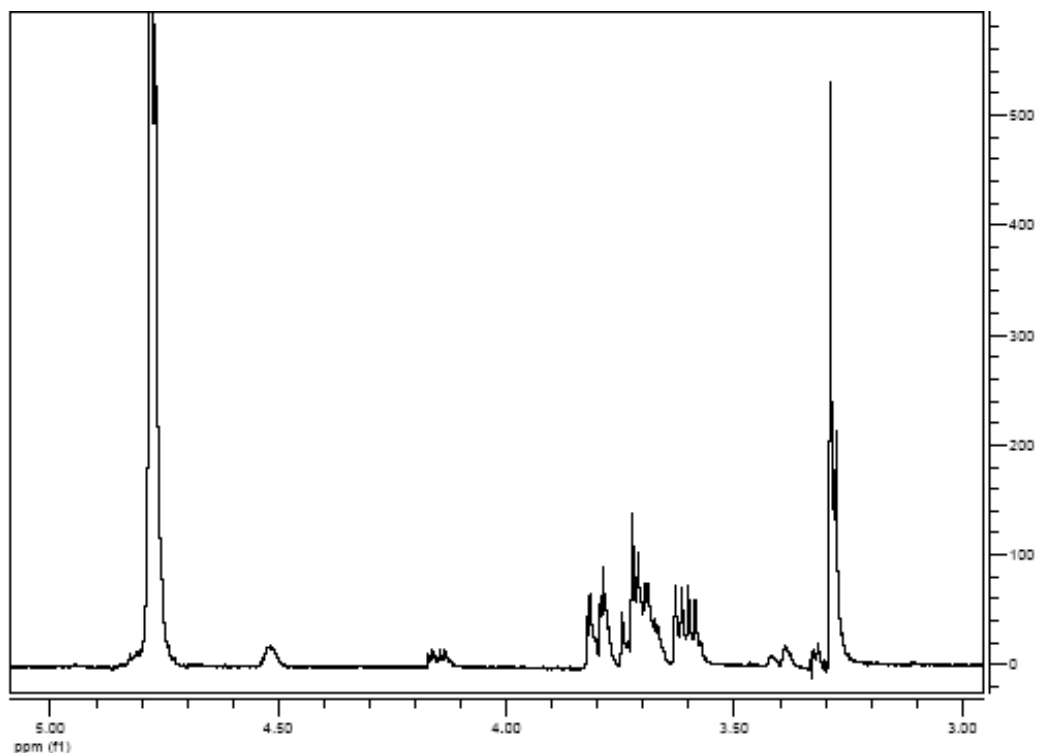


Figura. 18. Espectro de RMN de ^1H del manitol, en D_2O .

El compuesto mayoritario identificado con el nombre de manitol corresponde al monosacárido llamado polihidroxi-alcohol derivado de las aldosas, este tipo de compuesto se encuentra ampliamente distribuido en los hongos macroscópicos aproximadamente en un 50-60% (Illana, 2008). La fórmula estructural de este compuesto posee 6 Carbonos y dos grupos carboxilos (figura 19).

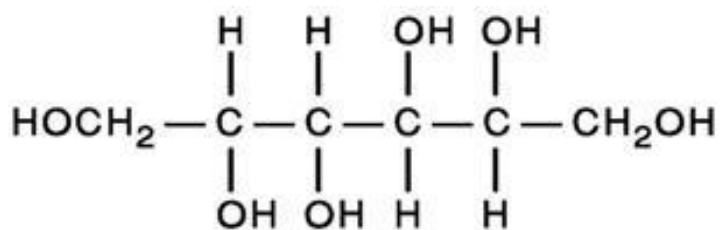


Figura 19. Fórmula estructural del manitol.

7.11. Obtención de los extractos por maceración en fresco

La masa neta registrada en el cuerpo fructífero seleccionado para realizar la extracción por maceración en fresco, fue de 103.78 g, mientras que una vez deshidratado pesó 7.52 g, obteniendo así una pérdida de humedad del 92.74 %.

En la tabla IV se presentan los resultados de la cantidad y rendimiento del píleo y estípite obtenidos por separado, utilizando únicamente metanol como disolvente. Se puede observar que el extracto del píleo presentó el mayor rendimiento expresado en porcentaje, comparado con el extracto del estípite.

Tabla IV. Rendimiento en porcentaje de los extractos obtenidos por maceración.

Parte	Disolvente	Muestra (g)	Extracto (g)	Rendimiento %
Píleo	MeOH	103.78	5.25	5.05
Estípite	MeOH	103.78	2.27	2.18

7.12. Toxicidad de los extractos obtenidos por maceración

La mortalidad obtenida al evaluar el extracto de la parte del estípite en larvas nauplio de *A. salina*, presentó un valor de $CL_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$, por lo que mostró un efecto negativo de toxicidad, de acuerdo con el criterio previamente establecido. Sin embargo, al evaluar de manera conjunta estos dos extractos (píleo/estípite) se obtuvieron valores de $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$, por lo que produjo un efecto positivo de toxicidad de acuerdo con este criterio.

Esto mismo ocurrió con el extracto obtenido de la parte del píleo, al producir la mayor mortalidad en larvas de *A. salina*, al presentar valores de $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ y producir un efecto positivo de toxicidad como se muestra en la tabla V. Los dos testigos negativos utilizados en los ensayos mostraron el 100% de supervivencia.

Tabla V. CL₅₀ ± Error Estándar de los extractos de *R. olivacea* en *A.salina*.

Extractos	CL ₅₀ (µg/mL)
Píleo/Estípite	90.4466±33.5633 *a
Píleo	58.8738±49.2611 *a
Estípite	178.6460±6.7782 *a

Los valores con una letra en común no son significativamente diferentes, de acuerdo con la prueba de Tukey.

En la prueba estadística de Análisis de Varianza (ANOVA) se observó que no existen diferencias significativas ($F=3.212$; $p=0.076$; $gl=2$) de la mortalidad causada en *A. salina* para los tres extractos evaluados. Mientras que la prueba de Tukey no indicó grupos distintos, los cuales resultaron tener un índice mortalidad diferente entre sí.

7.13. Toxicidad de las fracciones obtenidas del píleo

Con base a los resultados de toxicidad obtenidos del extracto del píleo, donde se separaron los constituyentes químicos y se corrieron por cromatografía en placa preparativa, tres fracciones distintas, con el propósito de profundizar en la búsqueda de aquellos compuestos orgánicos tóxicos.

En la tabla VI se presenta el valor de CL₅₀ de la fracción I, ensayada en *A. salina*, la cual presentó valores <100 µg/mL, por lo que se consideró tóxica.

Sin embargo, la fracción II y III presentaron valores de CL₅₀ que son >100 µg/mL por lo que no fueron consideradas tóxicas. Los dos testigos negativos utilizados en los ensayos mostraron el 100% de supervivencia.

Tabla VI. CL₅₀ ± Error Estándar de las fracciones de *R. olivacea* en *A.salina*.

Fracciones	CL ₅₀ (µg/mL)
Fracción I	40.9990±50.2274 *a
Fracción II	154.5624±49.8030 *a
Fracción III	156.4218±36.5092*a

Los valores con una letra en común no son significativamente diferentes, de acuerdo con la prueba de Tukey.

En la prueba estadística de Análisis de Varianza (ANOVA) se observó que no existen diferencias significativas ($F=2.069$; $p=0.169$; $gl=2$) de la mortalidad causada en *A. salina* para los tres extractos evaluados. Mientras que la prueba de Tukey no indicó grupos distintos, los cuales resultaron tener un índice mortalidad diferente entre sí.

8. DISCUSIÓN

El reconocimiento y determinación taxonómica de las especies del género *Russula* en México es complicada debido a la carencia de estudios taxonómicos que ayuden a elucidar la diversidad real de estos organismos (Kong, 1998) ya que en su mayoría, estos estudios están basados en la micobiota de países europeos. A esto se incorporan algunas otras diferencias importantes como las variedades, que presentan numerosos caracteres morfoanatómicos para este género.

En *R. olivacea*, la coloración tiende a ser muy variable, y en algunas poblaciones de México y E.U.A. presenta colores púrpura-violáceo mientras que en distintas partes del mundo presenta tonos verde-olivo que es de donde parte el nombre de la especie (Kibby, 1993).

La coloración también está relacionada con la estación del año en que se presenta la fructificación, el tipo de sustrato, los factores climáticos y/o el hospedero con el que se asocia para formar micorrizas, ya que se ha observado que no siempre crece asociado a *A. religiosa*, sino que también a algunas especies de *Pinus* y *Quercus* (Richard, 2004).

Por otra parte *R. olivacea* es una especie en la que ha prevalecido la incertidumbre acerca de su toxicidad, misma que ha estado asociada al estado crudo o mal cocido, consumido por los habitantes de las distintas poblaciones de nuestro país y del mundo (Lonati, 1996, Mazza, 2000 y Ternano, 2002).

Particularmente para México, Guzmán (1984) la reconoce como comestible para el Distrito Federal, de la misma forma que Montoya *et al.*, (2002) para el estado de Tlaxcala y Chanona (2007) para el estado de Chiapas. Sin embargo, para Kong (2003) es de comestibilidad dudosa en el Parque Nacional la Malinche en el estado de Tlaxcala.

Hernández (2007) es quien reporta por primera vez la posibilidad de tratarse de un hongo tóxico, el reporte lo realizó en el mismo lugar donde se recolectó el material trabajado en el presente estudio. Es considerado un “hongo loco” que produce malestares estomacales; este micetismo es referido como “síndrome gastrointestinal” por Gennari (2000).

Partiendo de dichos estudios, se buscó obtener dos tipos de extractos; por Soxhlet y por maceración, utilizando distintos disolventes, con la finalidad de conocer, si la toxicidad de los compuestos evaluados en *A. salina* dependía del grado de polaridad o temperatura a la que fueron sometidos los compuestos orgánicos de acuerdo con el método propuesto por Foiera *et al.*, (1993) mismo que se ajustó a *R. olivacea* sin presentar ningún problema.

Los resultados de estos análisis indican que el extracto obtenido por maceración manifestó un efecto tóxico dependiente de la concentración del extracto principalmente registrado en la parte del píleo; posiblemente debido a que en esta parte del carpóforo es en donde se aloja la mayor cantidad de metabolitos secundarios producidos, de la misma forma que es referido por Shultes (2000) quien trabajó con especies catalogadas como tóxicas dentro de los géneros de *Amanita*, *Boletus*, *Hebeloma*, entre otros.

Mientras que para el caso del extracto en Soxhlet no hubo efecto tóxico, muy posiblemente debido a que en el equipo Soxhlet, al utilizar calor, descompone algunas de las sustancias químicas que puedan ser termolábiles. Esta característica es reconocida por autores tales como (Foiera *et al.*, 1993 y Ternano, 2002), por lo que se requiere realizar a futuro más estudios con esta misma clase de extractos y con otros bioensayos que permitan descartar su “no toxicidad” lo cual permitirá ampliar el conocimiento de éstos y sus efectos.

Por otro lado, se identificó que el compuesto predominante por espectroscopía de RNM de ^{13}C es un monosacárido correspondiente al manitol, este compuesto se encuentra ampliamente distribuido en los hongos macroscópicos y su función es la de actuar a nivel fisiológico en el ser humano ya que no puede ser absorbido por el intestino delgado y consecuentemente incrementa la excreción de agua y Na^+ , lo que disminuye el volumen de fluido extracelular (Fraser y Arief, 1985). Por lo anterior, se puede asumir, que si bien este compuesto no es tóxico, muy posiblemente explique la razón de que en casos esporádicos el consumo en grandes cantidades de ingesta, de este hongo pueda desencadenar el micetismo llamado “síndrome gastrointestinal”, ya que a altas

concentraciones se ha comprobado que el manitol por vía oral, actúa como diarréico osmótico (Trigos, *et al.*, 1999 y Hernández, 2007).

La identificación de los compuestos tóxicos resultantes en la fracción I, no se determinaron debido a la poca cantidad de muestra analizada, sin embargo, en el espectro de RNM de ^{13}C mostró señales entre las 7 y 8 ppm, caracterizados como compuestos aromáticos. En principio se pensó que podía tratarse de un flavonoide, pero con base a la revisión bibliográfica se descartó la posibilidad de ser el compuesto orgánico responsable de otorgarle la toxicidad a *R. olivacea*, por lo que se recomienda hacer una investigación a futuro más minuciosa sobre la búsqueda de los compuestos químicos, a fin de concluir con la identificación de dichos compuestos.

Independientemente a los resultados obtenidos, podemos asumir que son escasos los estudios y por ende la información que se tiene acerca de los metabolitos secundarios del género *Russula* (Shultes, 2000), sin embargo, los terpenoides, específicamente a los sesquiterpenos y esteroides como el ergosterol son los compuestos orgánicos más comúnmente hallados en este grupo de hongos (Cancela, 1995 y Fraga, 1998), justificando la razón de que hasta el momento no se ha demostrado que estos mismos puedan causar toxicidad (Martínez, 2002).

No obstante, no podemos dejar de lado las otras razones por las que se pueden presentar casos de toxicidad por la ingesta de hongos; debido a que no solamente el hongo como tal puede producir un daño, sino que existen diversas situaciones tales como son; la edad y susceptibilidad del individuo que lo consume, así como también las cantidades abundantes y el consumo repetitivo de este; sin olvidar la característica propia de nutrición que tienen los basidiomicetos para absorber metales pesados altamente tóxicos como son el (As, Hg, Cd, entre otros) (Cocchi, 2005).

Cabe resaltar que para el género *Russula*, no existen especies particularmente mortales como ocurre en otros géneros fúngicos bien conocidos a pesar de que están incluidas en un gran número de especies donde su naturaleza es incierta, es decir se desconoce tanto su comestibilidad como su toxicidad, pero

también existen algunas especies de este género que son ampliamente utilizadas para consumo alimenticio en la mayor parte de la República Mexicana como son: *R. brevipes*, *R. delica*, *R. cessans*, *R. cyanoxantha*, *R. flavida*, *R. pulcra*, *R. virescens* y *R. vesca* (Kong, 2003, Hernández, 2008 y Jiménez, 2008).

Finalmente es importante mencionar, que este tipo de estudios contribuyen a validar la toxicidad de especies consideradas como “sospechosas” o incluso de aquellas que son totalmente desconocidas en cuanto a su comestibilidad, así como identificar aquellos compuestos responsables de dicha actividad.

La mayoría de los compuestos químicos que se conocen actualmente, han sido aislados a partir de plantas, no siendo así el caso para los macromicetos, que son uno de los grupos menos estudiados desde este punto de vista y que, sin embargo, ofrecen un amplio potencial para la obtención de nuevos compuestos con actividades biológicas (Brizuela *et al.*, 1998).

9. CONCLUSIONES

La identificación precisa de *R. olivacea* se logró tomando caracteres precisos, tanto macroscópicos como microscópicos en colaboración con un especialista en este género.

La prueba estadística de ANOVA realizada en los cuatro extractos (Soxhlet) evaluados, expresa que sí existen diferencias significativas entre la mortalidad causada en *A. salina* y los testigos negativos. De acuerdo a los valores obtenidos de $CL_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$, sugieren que muy posiblemente *R. olivacea* posee sustancias termolábiles que se alteran al ser expuestas a altas temperaturas.

La prueba estadística de ANOVA realizada en el extracto por maceración, expresa que no existen diferencias significativas entre la mortalidad causada en *A. salina* y los testigos negativos. Los valores obtenidos de $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ confirman parte de la información contenida en la literatura, donde se plantea que *R. olivacea* en estado crudo es tóxica, lo que permite evidenciar que está relacionado con el tipo de sustancias químicas que se lograron arrastrar por medio de esta extracción.

La prueba estadística de ANOVA realizada en las tres fracciones, expresa que no existen diferencias significativas entre la mortalidad causada en *A. salina* y los testigos negativos.

Las señales registradas por el espectrómetro de RMN, no fueron determinantes para concluir que se tratara de un compuesto puro, por lo que se recomienda hacer una investigación minuciosa a futuro, a fin de concluir con la identificación de este tipo de compuestos químicos.

La sustancia orgánica predominante que fue identificada en *R. olivacea* se trata del manitol, este compuesto orgánico no es tóxico, no obstante, las grandes cantidades de ingestión por vía oral de dicho compuesto, si está comprobado de actuar como diarreico osmótico en el ser humano.

Esta investigación, no es concluyente por lo que no se puede recomendar el consumo de *R. olivacea* en la región donde se obtuvieron los cuerpos fructíferos.

Este tipo de estudios sustentan las bases para conocer los efectos tóxicos de los macromicetos y profundizar en la búsqueda de los metabolitos responsables de otorgarles dicho efecto, considerando el amplio número de especies donde existe incertidumbre sobre su consumo alimenticio.

10. LITERATURA CITADA

- Alves, M. A., Fonseca, S., Brandão, T., Mesquita, G., Smânia, J. y Leomar, C. 2000. Biological screening of Brazilian medical plants. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 95: 367-373.
- Amat, F. 1985. *Utilización de Artemia en Acuicultura*. Información Técnica. Instituto de Investigación Pesquera. Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal. Ribera de Cabanes. España. 57.
- Benoit, J. L., Benkheder, K., Seigle, F y Lu, C. 1980. Differential identification of toxic mushrooms by pyrolysis-GLC Coupling. *Journal. Agriculture. Food Chemistry*. 28:1317-1319.
- Brizuela, M. A., Garcia, L., Pérez, L y Mansur, M. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología*. 15: 69-74.
- Bon, M. 1988. Clé mongraphique des russules d'Europe. *Document of Mycology*. 18: 1-120.
- Cancela, G. 1995. Estudio químico del hongo *Russula olivacea*. (Tesis de licenciatura). México. Facultad de Química Farmacéutica Biológica, UV. 16-49.
- Castro, T y Gallardo, C. 1985. *Artemia* sp. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. CBS. México D.F. 9-35.
- Cetto. B. 1994. *I funghi dal vero*. Saturnia, Trento. Italia. 1:1.
- Chanona, F., Andrade, R., Castellano y Sánchez, J. 2007. Macromicetos del Parque Educativo Laguna Bélgica, municipio de Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 78: 369- 381.
- Cifuentes, B. J., M. Villegas. R. y Pérez, L. 1986. Hongos. En: Lot, A. y F. Chiang. *Manual de Herbario. Administración y Manejo de Colecciones, Técnicas*

de Recolección y Preparación de Ejemplares Botánicos. Consejo Nacional de la Flora de México. A.C., México D.F. 55-64.

Cocchi, L., Vescovi, L., Petrini, L. A y Petrini, O. Heavy metals in edible mushrooms in Italy. *Food Chemistry*. 98: 277-284.

Conrado, T. 1980. *Artemia* sp. En: Investigación y docencia. México D.F. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. SBS. 43.

ESRI. 2002. ARC View Gis 3.2. Red Lands, California.

Fraga, B. 1998. *Natural sesquiterpenoids*. Instituto de Productos Naturales y Agrobiología. 15-20.

Frutis, I. y G, Guzmán. 1983. Contribución al conocimiento de los hongos del estado de Hidalgo. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*. 18: 219-265.

Galli, R. 1996. *Le Russule*. Edinatura, Milano. 34-67.

Galindo, C. 1988. Plan de Manejo Parque Nacional el Chico. Secretaria de Desarrollo Urbano y Ecología. Delegación Hidalgo. 56-74.

Dictionary of the Fungi, ninth edition, by P.M. Kirk, P.F. Cannon, J.C. David, y J.A. Stalpers, 2001, CAB International.

García, J. Pedrasa, D. Silva, C. Andrade, R. y Castillo, J. 1998. *Hongos del Estado de Querétaro*. Querétaro, Red Regional en Recursos Bióticos FOMES 96. UAQ. 87.

Guzmán, G. 1977. *Identificación de los hongos comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de la madera*. Limusa, México D.F. 34-54.

Guzmán, G. 1978. *Hongos*. Limusa, México D.F. 45-64.

Guzmán, G. 1984. *Identificación de los hongos comestibles*. México D.F. Limusa. 56-68.

Guzmán, G. 1994. Las colecciones de hongos en México y su problemática en la biodiversidad del país. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 55: 35-37.

Guzmán, G. 1995. La diversidad de hongos en México. Facultad de Ciencias. UNAM. *Ciencias* 39: 52-57.

Hawksworth, D. L. 1991. The fungaldimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research*. 95: 641-655.

Harbone, J. B. 1980. *Phytochemical methods*. Chapman and Hall. New York. 278.

Hernández, H. 2007. Macromicetos de una región de Mineral del Chico, Hgo: una aproximación a la Etnomicología. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 35-75.

Hernández, G. N. 2008. Inventario de las familias Agaricaceae, Plutaceae, Tricolomataceae y Russulaceae de un encinar en Omitlán, Hidalgo. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 17-20.

INEGI. 2005. Censo poblacional por localidades. México.

Illana, C. 2008. El hongo maitake (*Grifola frondosa*) y su potencial terapéutico. *Revista Iberoamericana de Micología*. 25: 141-144.

Jiménez, G. 2008. Uso de macromicetos de Molango de Escamilla, Hidalgo, México. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 89-91.

Kibby, G. 1993. *An illustrated guide to mushrooms and other fungi of North America*. Longmeadow Press, Drago'n World Ltd, Limpsfield. 36-48.

Kirk, P. M., P.F. Cannon, J.C. David, and J.A. Stalpers, 2001. *Dictionary of the Fungi*, ninth edition, CAB International.

Kong, A. 1998. Ectomycorrhizal Agaricales of Tlaxcala, México. *Mcllvainea*. 13: 13-24.

Kong, A. 2003. El género *Russula* (Fungí, Russulales) en el Parque Nacional la Malinche. (Maestro en Ciencias). México D.F. UNAM. 1-123.

Kornerup, A y Wanscher, J. H. 1978. *Methuen Handbook of Colour*. Third Edition. Great Britain, London. Eyre Methuen. 252-256.

Koskinen, A. 1993. *Asymetric Synthesis of Natural Products*. Wiley. England. 1-17.

Kuklinski, C. 2000. *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona. Omega. 26-87.

Largent, D., Johnson, D y Wathing, R. 1977. *How to identify Mushrooms to genus III: Microscopic Features*. Masson, Paris. 23-56.

Madrigal, S. X. 1967. Contribución al conocimiento de la ecología de los bosques de oyamel (*Abies religiosa*) en el Valle de México. Boletín Técnico 18. México, D.F. 94.

Manzanilla, H. 1974. Investigaciones epidomésticas y silvícolas en bosques mexicanos de *Abies religiosa*. Dirección General de Información. México. 165.

Martin, F., Canet, D y Marchal, J. 1984. ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Study of Mannitol Cycle and Trealose Synthesis during Glucose Utilization by the Ectomycorrhizal Ascomycete *Cenococcum graniforme*. *Plant Physiol.* 77: 499-502.

Martínez, A. 2002. *Esteroles*. Universidad de Antioquia. Medellin. Colombia. 21-23.

McLaughlin, J. L., Rogers, L. L y Anderson. 1998. The use of biologicals assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal.* 32: 513-524.

Medina, J. M. y J. Rzedowski. 1981. Guía botánico-forestal de la parte alta de la Sierra de Pachuca. En: Guías Botánicas de Excusiones en México IV Sociedad Botanica de México. 1-19.

Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putman, J. E., Jacosen, L. B., Nichols, D. E. y McLaughlin, J. L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 45: 31-34.

Mendoza, M. Zavala, F y Estrada, E. 2006. Hongos asociados con encinos en la porción noroeste de la Sierra de Pachuca, Hidalgo. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 12: 13-18.

Mier, N., Canete, S., Klæbe, A., Chavant, L y Fournier, D. 1995. Insecticidal Properties of Mushroom and Toadstool Carpophores. *Phytochemistry*. 41: 1293-1299.

Montoya, A., Estrada-Torres., A y Caballero, J. 2002. Comparative ethnomycological survey of three localities from La Malinche Volcano, México. *Journal of Ethnobiology*. 22: 103-131.

Phillips, R. 1991. *Mushrooms of North America*. Little, Brown and Company, Toronto 34-56.

Padilla, L. M., Acosta, I y Moctezuma, M. G. 2004. Estudio e identificación de hongos macromicetos en la estación "Las Palomas" de la ciudad de Guanajuato. Centro de investigación y de estudios de posgrado. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 1:1.

Richard, F., Moreau, P. A., Selosse, M. A y Gardes, M. 2004. Diversity and fruiting patterns of ectomycorrhizal and saprobic fungi in an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex* L. *Canadian Journal of Botany*. 82: 1711–1729.

Romagnesi, H. 1967. *Les Russules d'Europe et d'Afrique du Nord*. Bordas, Paris. 998.

Ruppert, E. E y Barnes, R. D. 1993. *Zoología de los invertebrados*. McGraw Hill Interamericana. México D.F. 761-793.

Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Editorial Limusa. México 432.

Sarnari, M. 1982. Intossicazione da *Russula olivacea*. *Quadrimestrale Dell'Unione Micologica Italiana. Trento*. 25: 3-7.

Sarnari, M. 1991. *Russula* nuove o interessanti dell'Italiacentrale e mediterranea-15 contributo. *Mediterranean Vegetables*. 19:111-132.

Schaeffer, J. 1979. *Russula-Monographie*. Cramer. 152-154.

SEDUE.1988. *Plan de Manejo Parque Nacional El Chico*. Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología, Delegación Hidalgo. Pachuca, Hidalgo. 55.

SEDUE. 1985. *Estudio del Parque Nacional El Chico*. Delegación Hidalgo. Pachuca, Hidalgo. 22-45.

Singer, R. 1986. *The Agaricales in modern taxonomy*. Koeltz Scientific Books, Koenigstein. 34-65.

Schultes, R., Hofmann, A y Rätsch, C. 2000. *Plantas de los dioses*. Fondo de Cultura Económica. México. 83-90.

Trigos, A. 1998. Química de los hongos. En: Augusto Rivera. Producción de Vitaminas D₂ a partir de hongos macromicetos: aspectos científicos, técnicos y económicos. CYTED-COLCIENCIAS, Santa Fé de Bogotá, Colombia. 34-54.

Trigos, A., Cancela, G y Ramos, J.M. 1999. Sterols from the wild fungus *Russula olivacea*. *Micología Neotropical Aplicada*. 12: 59-65.

Turner, W. B. y Aldrige, D. C. 1983. *Fungal metabolites II*. Academic Press, New York. 34-65.

Valenzuela, R., Guzmán, G y Castillo, J. 1981. Descripciones de las especies de macromicetos poco conocidas en México, con discusiones sobre su ecología y distribución. *Boletín Sociedad Mexicana de Micología*. 15: 83-95.

Villareal, L. y Pérez-Moreno, J. 1989. Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral. *Micología Neotropical Aplicada*. 2:77-114.

Welden, A. L. y G. Guzmán. 1978. Lista preliminar de los hongos, líquenes y mixomicetos de las regiones de Uxpanapa, Coatzacoalcos, Los Tuxtlas, Papaloapan y Xalapa (parte de los estados de Veracruz y Oaxaca). *Boletín Sociedad Mexicana de Micología*. 12: 59-102.

Woo, B. 1989. *Trial field key to the species of RUSSULA in the Pacific Northwest*. Puget Sound Mycological Society. 56-78.

Zarco, J. 1986. Estudio de la distribución ecológica de los hongos (principalmente macromicetos) en el Valle de México, basado en los especímenes depositados en el Herbario ENCB. *Revista Mexicana de Micología*. 2: 41-72.

Zani, C.L., Chávez, P.P.G., Queiroz, R., de Oliveira, A.B., Cardoso, J., Anjos, A.M.G. y Grandi, T.S.M. 1995. Brine shrimp lethality as a prescreening system for anti-trypanosoma cruzi activity. *Phytomedicine*. 2: 47-50.

Zavala, C.F. 1995. *Encinos Hidalguenses*. Dirección de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. México 67-87.

LITERATURA EN INTERNET

El Chico. (Lunes 29 de septiembre de 2008). Parque Nacional El Chico. <http://www.parqueelchico.gob.mx/>

Hawksworth, D. L. Index Fungorum Partnership. (2004). Search the database. <http://www.indexfungorum.org/>

Kong, A. (2007). Russulas de México. México D.F. <http://www.russulamx.com/>