



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Unidad de Biotecnología y Prototipos

Laboratorio de Biogeoquímica

Estudio sobre la adsorción de micotoxinas de *Amanita muscaria* L. en
zeolita

P R E S E N T A

Guadalupe Jazmín Coca Díaz

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. César Mateo Flores Ortíz



Los Reyes Iztacala, Tlalnepanitla de Baz, Estado de México (FES Iztacala) 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi madre

Que, gracias a todo su trabajo, esfuerzo, apoyo y amor, pude terminar mi carrera con éxito, gracias por ser el ejemplo de esa persona fuerte y por demostrarme que con esfuerzo todo se puede lograr. Te lo agradezco con todo mi corazón, momi.

A mi mamá Chuy

Por todos los cuidados que me ha dado a lo largo de mi vida, por su apoyo y dedicación, por estar ahí para lo que necesitara y por todo ese amor que nunca me faltó. Gracias.

A mi papá Luis

Por su apoyo durante mis años de estudio y por ser el sustento de la familia en tiempos difíciles. Fuiste y serás siempre una parte muy importante en mi vida.

Los amo muchísimo y estoy profundamente agradecida con ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A mis hermanos

Por acompañarme en el camino y ser siempre un apoyo para lo que necesitara y por muchas veces ser mis acompañantes para obtener muestras que necesite a lo largo de la carrera. Los amo.

A mi familia

Mi tía, tíos y primo. Por confiar siempre en que lograría llegar a este punto de mis estudios, y por demostrar su apoyo cada uno a su manera.

A Jaz

Mi linda hermanita de otra madre, muchas gracias por ser la persona que le da ese toque de ternura e inocencia a mi vida, por siempre tener tiempo de escucharme y de dar un sabio consejo. Te amo mucho. Nunca me voy a arrepentir de haberte hablado aquel día que no tuvimos clase.

A Charlitos

Mi incondicional, amigo, hermano y compañero. Gracias por estar siempre en las buenas, pero sobre todo en las malas, por escucharme y ser quien le mete alegría y locura a mi vida. Te amo. Gracias por cuidarme siempre y gracias por regañarme ese día en la mañana por llegar a una clase que no teníamos.

A Mizthly

La preciosa niña que llegó a mi vida para convertirse en mi otra hermanita, la inteligente y responsable, pero, sobre todo, la que llegó a meterle locura y descontrol a todo el grupito. Te amo y amo que seas tan sincera. Gracias por seguir a Charlitos y llegar a completar nuestro grupo.

A Jorge

Por su apoyo, compañía y paciencia. Por ser uno de los pilares en mis últimos años de carrera. Por ser la persona que me sacaba de mis días cotidianos para darme un respiro y por hacerla de guía en los recorridos al bosque para obtener muestras y fotografías de, básicamente, todo.

A Lesly

Por ser una increíble persona y amiga que ayudó en la colecta de los honguitos que se necesitaban.

A mi Director de tesis y Comité

Muchas gracias por brindarme de su tiempo, conocimiento y asesoría para lograr concluir con éxito mi proyecto. Sobre todo, al Dr. César Flores y al Mtro. Luis Barbo, por su guía constante y confianza.

Gracias también a Daniel Cabrera Santos por su apoyo en los programas estadísticos y gráficos, y a Fer por hacer más ameno el tiempo en laboratorio y por su contribución con ideas, dudas y conocimiento en la información del trabajo.

A la UNAM y la FESI

Por último, agradezco a mi bella casa de estudios por el conocimiento y valores inculcados a lo largo de mi trayectoria académica. Por las personas importantes que dejó en mi vida. Gracias por la oportunidad de formar parte.

Índice

Índice	4
Resumen	6
1. Introducción	7
1.1. Usos comestibles.....	7
1.2. Compuestos tóxicos.....	8
1.3. Toxicidad en Humanos.....	9
1.4. Etnomicología.....	9
2. Antecedentes	11
3. Justificación	12
4. Hipótesis	13
5. Objetivos	13
5.1. Objetivo General.....	13
5.2. Objetivos Particulares.....	13
6. Materiales y métodos	14
6.1. Obtención de material biológico.....	14
6.2. Identificación taxonómica.....	15
6.3. Material de Zeolita.....	15
6.4. Descripción de la extracción de metabolitos.....	15
6.5. Análisis Instrumental mediante Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas.....	16
6.6. Bioensayo de toxicidad con <i>Artemia salina</i>	16
6.7. Ensayo de adsorción de micotoxinas de <i>A. muscaria</i> en zeolita.....	17
6.7.1. <i>In vitro</i>	17
6.7.2. <i>In vivo</i>	18
6.8. Análisis Estadístico.....	19
7. Resultados	20

7.1. Colecta	20
7.2. Identificación taxonómica	21
7.3. Caracterización del Material de Zeolita	21
7.3.1. Composición elemental	21
7.4. Identificación de Micotoxinas presentes en <i>A. muscaria</i>.....	22
7.4.1. Ácido iboténico	22
7.4.2. Muscimol	25
7.5. Bioensayo de toxicidad	27
7.6. Ensayos de adsorción de micotoxinas de <i>A. muscaria</i> mediante zeolita	
29	
7.6.1. <i>In vitro</i>	29
7.6.2. <i>In vivo</i>	31
8. Discusión	33
9. Conclusiones	36
10. Referencias bibliográficas.....	37

Resumen

El uso de los hongos ha ocurrido desde hace cientos de años, de maneras muy diversas, por lo que el conocimiento de estos en las comunidades que están en contacto con ellos es muy amplio, sin embargo, en las últimas décadas este conocimiento ha decaído debido a la falta de interés de los jóvenes. La falta de conocimiento y su consumo accidental o intencional en ceremonias, ha provocado intoxicaciones por diversas especies de hongos, una de las más comunes, *Amanita muscaria*. Considerando lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar la capacidad adsorbente de la zeolita para disminuir los efectos tóxicos de metabolitos de *A. muscaria*. Las muestras biológicas de *A. muscaria* fueron obtenidas de la región de Tlalmanalco, Estado de México, de las cuales se obtuvo el extracto orgánico y se analizaron los metabolitos presentes mediante el uso de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se identificaron las micotoxinas de ácido iboténico (IBO) y el muscimol (MUS) como compuestos mayoritarios presentes en el extracto de *A. muscaria*. Se realizó un bioensayo de toxicidad sobre *Artemia salina*, ya que es un modelo experimental excelente para determinar toxicidad de diversos extractos, este permitió calcular una CL₅₀ de 404 µg/mL y un efecto tóxico significativo de $\alpha=0.008-.035$ entre el grupo control y la concentración de 1000 ppm. El ensayo de adsorción *in vitro* con zeolita mostró efectos positivos en la disminución del efecto tóxico del extracto, los datos se compraron con pruebas de ANOVA, obteniendo diferencias significativas ($\alpha= .005 - .023$) a partir de la quinta hora de exposición. Sin embargo, en el ensayo de adsorción *in vivo*, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de sobrevivencia de *A. salina*. Los resultados del presente trabajo permiten concluir que, la zeolita natural es efectiva en la disminución de la toxicidad del extracto de *A. muscaria* sobre *A. salina*, esto con incubación previa, ya que el efecto de intoxicación es más rápido que la adsorción de la zeolita sobre el alcaloide tóxico presente en el hongo.

1. Introducción

México es un país megadiverso por los diferentes ecosistemas con los que cuenta y con ellos la gran diversidad de vegetación, tanto en altitud como latitud. Los hongos se han adaptado y diversificado en una gran cantidad de hábitats (Sierra *et. al.*, 2014), desde suelos áridos, pastizales calcáreos, bosques desde frondosas caducifolios hasta bosque de abetos boreales, variando su pH de alcalino a ácido (Rydin, 1997), y debido a su nutrición, los podemos encontrar en el suelo de un bosque, la madera de un árbol, creciendo en cualquier animal para descomponerlo o incluso sobre otros hongos, pueden ser saprobios, parásitos o simbioses (Herrera y Ulloa, 1998).

Los hongos son parte fundamental en la funcionalidad de los ecosistemas, al igual que otros organismos, son descomponedores de materia orgánica y ayudan a reintegrar nutrientes al suelo, debido a esto, son un factor muy importante en la composición de la biodiversidad de diversos ecosistemas (Cepero *et. al.*, 2012), ya que participane en la degradación de materia orgánica de plantas y animales, tanto vertebrados como invertebrados (Ruíz, 2001), algunos hongos, incluso asimilan sustancias tóxicas, metales pesados y contaminantes, logrando la biorremediación de suelos (Coello y Burgos, 2012).

El grupo de los macromicetos, se caracterizan por producir un cuerpo fructífero, comúnmente llamado “hongo”, que es el más estudiado debido a la importancia de su uso, en comunidades cercanas a bosques o selvas, son muy populares como alimento, pueden ser medicinales o de uso recreativo, sin embargo, también son bien conocidos por las intoxicaciones y envenenamientos que pueden provocar, llegando incluso a causar la muerte (Aroche *et. al.*, 1984, Kuhar *et. al.*, 2013).

1.1. Usos comestibles

Al ser un recurso comestible que no requiere de mayor esfuerzo que la colecta, es ampliamente usado como alimento y producto comercial en las comunidades cercanas a los ecosistemas en donde crecen. La comercialización en México se puede dividir en cuatro categorías: autoconsumo, comercialización directa con los recolectores nativos, comercialización a través de intermediarios y exportación a mercados internacionales (Pérez-Moreno *et. al.*, 2010).

Esta práctica se realiza de manera ancestral por personas de las mismas comunidades, generalmente adultos mayores o jóvenes que comienzan a ayudar en las colectas. En la mayoría de los casos los organismos recolectados por jóvenes son examinados a detalle por personas de mayor edad, ya que se presume, tienen el mayor conocimiento dentro de las familias (Domínguez *et. al.*, 2015).

En cambio, hay especies tóxicas que son confundidas con las comestibles por las personas menos experimentadas y de esta manera, se producen intoxicaciones no intencionadas que, pueden llegar a la muerte incluso con tratamiento, especialmente con especies de los géneros *Amanita*, *Galerina* y *Lepiota* (Giannini *et. al.*, 2007), que contienen amatoxinas en forma de ciclopéptidos que provocan necrosis hepática (Karlson-Stiber y Persson, 2003).

1.2. Compuestos tóxicos

Se le da el nombre de micetismo, a la intoxicación o envenenamiento causado por la ingestión de macromicetos que contienen sustancias que no pueden ser descompuestas por los procesos digestivos y metabólicos y que, al ser absorbidas, provocan reacciones tóxicas causando desde una intoxicación hasta un envenenamiento (Sánchez *et. al.*, 1999). Existen varios tipos, aunque las reacciones son diferentes de persona a persona. Generalmente, se reconocen cuatro formas en las que se presenta la intoxicación: alergias, trastornos gastrointestinales, alteración del sistema nervioso central y la muerte (Pérez-Moreno *et. al.*, 2010).

El grado de intoxicación va de acuerdo con la edad, sexo, cantidad ingerida y especie del hongo. Los micetismos están clasificados de acuerdo con las toxinas que tienen los hongos, y se conocen como de corta y larga duración (Serrano, 1998).

Los de corta duración son aquellos que presentan síntomas en un periodo menor a seis horas, por lo general, se trata de intoxicaciones no mortales que evolucionan favorablemente después de 12 a 48 horas. Este tipo de intoxicaciones se presentan en los géneros *Boletus*, *Hypholoma*, *Agaricus*, *Omphalotus*, *Lactarius*, *Russula*, *Entoloma*, *Chlorophyllum* y *Leucoprinus*, por mencionar algunos. Se identifican por la aparición de síntomas como náuseas, malestar, cólicos y vómito, acompañados, en ocasiones, de dolores abdominales y diarrea (Pomilio *et. al.*, 2019b).

En el caso de las intoxicaciones de larga duración, son las que presentan síntomas después de seis horas, por lo general son casos de gravedad. Estas intoxicaciones son causadas por especies de los géneros *Amanita*, *Galerina*, *Lepiota*, *Conocybe*, *Clitocybe* e *Inocybe*, entre otros. En un principio los síntomas pueden ser náuseas, vómito, letargo, anorexia, sed intensa, boca y labios secos, sensación de ardor en la lengua, pérdida de apetito, poliuria, diarrea, y estreñimiento, seguidos por dolor de cabeza, escalofríos y gran cansancio general (Pomilio *et. al.*, 2019a). Después de cierta mejoría se puede dar, dependiendo de la especie, necrosis celular a través de la inhibición de la síntesis de ácido ribonucleico (RNAm), además de causar daños hepáticos y renales (Piqueiras, 1989).

1.3. Toxicidad en Humanos

En México se cuenta con una gran cantidad de estudios para conocer más acerca de los hongos tóxicos. Podemos citar el trabajo de Pérez, Herrera y Guzmán (1970), en el que realizó un listado de 54 especies de hongos tóxicos o sospechosos de toxicidad, esto con el fin de diferenciarlos de los comestibles, y en el que además, se señalan 4 casos de intoxicación mortal, uno con *Amanita bisporigera* y los tres restantes con *A. verna*.

Siguiendo con los casos de micetismos, tenemos el trabajo de Aroche *et. al.*, 1984 en el que revelan las propiedades tóxicas de *A. flavoconia*, *Stropharia coronilla* y *A. cokeri*, después de tres intoxicaciones mortales en el Estado de México.

Algunos estudios como el de Alcántar *et. al.*, 2020 se enfoca en dar a conocer las especies tóxicas en la Sierra de Quila. Se reportan la ocurrencia de *A. muscaria*, *Chlorophyllum molybdites*, *Panaeolus antillarum* y *Scleroderma texense*. Al igual que Pérez *et. al.*, 2008, donde reportó a *A. bisporigera*, *A. verna*, *A. virosa*, *A. muscaria*, *A. pantherina*, *A. gemmata*, *Inocybe erubescens*, *Coprinopsis atramentaria*, *Agaricus xanthoderma*, *C. molybdites*, *Omphalotus olearius*, *Cortinarius cinnabarinus* y *Cortinarius semisanguineus* como especies tóxicas que provocan diversos tipos de micetismo.

1.4. Etnomicología

La falta de conocimiento en comunidades rurales, específicamente en las últimas generaciones, ha provocado el incremento en los casos de intoxicaciones y

envenenamientos por hongos, esto debido a la falta de interés de los jóvenes por mantener el conocimiento tradicional de identificación de hongos (Carrillo, 1989).

La mayoría de las intoxicaciones, especialmente en comunidades con conocimiento acerca de los hongos, no importando la especie que la provocó, aplican los mismos remedios naturales, conocidos principalmente por personas mayores dentro de la comunidad. Por ejemplo, en la comunidad de Los Pilares, Tlaxcala, se recomienda beber aguamiel y tés con hierbas hervidas y manteca para provocar el vómito, en Ixtenco se busca el mismo efecto, pero con el agua en la que se hirvió una mazorca de elote tierno. En contraste, en el municipio de Javier Mina, se utilizan ajos, aceite o manteca para actuar como purgantes (Montoya, 1992).

En San Juan Atzingo, Estado de México, beben el agua de venida (agua que corre por el suelo durante o después de la lluvia), leche, agua con sal, té de monte, una copa de vino con el tabaco de un cigarrillo, comer ajos crudos o masticar hueso de capulín (Palomino, 1990).

No obstante de la variedad de los remedios tradicionales disponibles, ninguno de éstos tiene fundamento científico que compruebe su efectividad. El tratamiento clínico que se le da a este tipo de intoxicaciones depende de la especie de hongo que se ingirió, su cantidad, etapa de maduración, época del año y cuánto tiempo ha transcurrido entre la ingestión y el inicio de los síntomas, información que en la mayoría de los casos es difícil de obtener (Gallego *et. al.*, 2020).

2. Antecedentes

El tratamiento médico general está orientado a tratar de eliminar las toxinas del tracto digestivo con un lavado gástrico, control de líquidos y electrolitos, la administración de carbón activado 1 g/kg de peso corporal, evitar el uso de antiespasmódicos y el mantenimiento de la diuresis (Talamoni *et. al.*, 2006; Castillo, Durán y Matamoros, 2019).

En caso de identificar la especie, el tratamiento específico va desde la administración de penicilina, silibinina, silimarina, realizar una hemoperfusión con carbón y de ser necesario en casos extremos un trasplante hepático (Talamoni *et. al.*, 2006).

Dado lo anterior, en micromicetos se utilizan adsorbentes, materiales inertes que tienen la capacidad de fijar a su superficie la micotoxina y salir del organismo con las heces, logrando disminuir la absorción intestinal de la misma y por lo tanto reducir la toxicidad en el sistema (Espíndola, 2006).

Los adsorbentes son polímeros inorgánicos, silicatos como zeolitas, aluminosilicato de sodio y el hidrato de calcio, bentonita, carbón activado y tierra de diatomeas. Las zeolitas son cristales de aluminosilicato de estructura porosa que absorben compuestos polares con alta selectividad (De Oliveira, 2015).

Las bentonitas son silicatos probados en la adsorción de micotoxinas como aflatoxina B1, ocratoxina A, deoxinivalenol, fumonisina B1 y zearalenona, probando ser más eficiente que otros silicatos (Vila, Marín, Sanchís y Ramos, 2017).

El carbón activado es un compuesto formado por pirólisis, su estructura es muy porosa, es utilizado para disminuir toxinas como fumonisina B1, deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina y nivalenol (Martínez *et. al.*, s.f.).

El uso de aluminosilicatos ha tenido una amplia aplicación como adsorbente de micotoxinas. En el 2004, Martínez *et. al.*, emplearon zeolita natural en un estudio para controlar diarreas en cerdos recién destetados, estos fueron sometidos a tres tratamientos, 1 mL por tres días vía intramuscular: 1) gentamicina, 2) eritromicina, y 3) zeolita natural (100 g al día por 3 días). Los resultados fueron eficientes para los tratamientos 2 y 3 comprobando la efectividad antibiótica de la zeolita natural.

Nesic *et. al.*, 2010 utilizaron zeolita modificada para prevenir daños por zearalenona en terneros destetados. Se realizaron cinco tratamientos: 1) sin zearalenona ni zeolita, 2) sin zearalenona con 2 g kg⁻¹ de zeolita, 3) con zearalenona (3.36 mg kg⁻¹) y sin zeolita, 4) con zearalenona (2.86 mg kg⁻¹) y 2 g kg⁻¹ zeolita, y 5) con zearalenona (3.34 mg kg⁻¹) y 5 g kg⁻¹ zeolita. Los resultados mostraron que no hubo efectos significativos al agregar 0.2 y 0.5% de zeolita en concentrados con o sin presencia de zearalenona (5.29-6.22 mg). Sin embargo, se encontraron, efectos positivos en el pH ruminal confirmando ganancia diaria de peso.

Poco después, Bočarov-Stančić *et. al.*, 2011 utilizaron un modelo *in vitro* para evaluar la capacidad de adsorción de micotoxinas de tres adsorbentes minerales naturales: bentonitas, diatomitas y zeolitas. Se evaluaron con seis micotoxinas: aflatoxina B1 (AFL), ocratoxina A (OTA), deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZON), diacetoxisiscirpenol (DAS) y toxina T-2, a pH 3 y 6.9. Los resultados indicaron que los tres adsorbentes funcionaron sobre AFL, DON (únicamente en pH 3), ZON y T-2 con porcentajes de adsorción de 95-96.9%, 25-50, 12.2-37 y 16.7-33.3, respectivamente.

Años más tarde, Marković *et. al.*, 2017 utilizaron dos zeolitas naturales (clinoptilolita y phillipsita) tratadas con cloruro de cetilpiridinio (PC) para investiga la adsorción de zearalenona (ZEN) a pH 3 y 7. Obtuvieron que a mayor cantidad de PC en la superficie zeolítica aumenta la adsorción de ZEN. La cantidad máxima adsorbida de ZEN fue de 5.73 mg/g para organoclinoptilolita y 6.86 mg/g para organofillipsita a pH 3, y de 6.98 mg/g para organoclinoptilolita y 7.54 mg/g para organofilpsita a pH 7.

3. Justificación

En consideración de que los hongos macromicetos son recursos alimenticios tradicionales y que pueden provocar intoxicaciones en humanos, se reconoce la importancia de identificar los compuestos que provocan los efectos nocivos y determinar si el uso de adsorbentes es eficaz para disminuir los niveles de intoxicación, y pueda ser considerado como tratamiento clínico auxiliar.

4. Hipótesis

Ya que los aluminosilicatos han sido de gran utilidad en la adsorción de micotoxinas como aflatoxina B1, deoxinivalenol, zearalenona y toxina T-2 de hongos filamentosos, se cree que pueden ser una opción viable para la adsorción de micotoxinas de macromicetos.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Determinar la capacidad de adsorbentes a base de aluminosilicatos para disminuir el efecto tóxico de metabolitos secundarios de *Amanita muscaria*.

5.2. Objetivos Particulares

- ξ Colectar especímenes del género *Amanita muscaria* para la obtención de micotoxinas.
- ξ Identificar taxonómicamente las muestras de *A. muscaria* colectadas.
- ξ Caracterizar e identificar las micotoxinas presentes en el extracto de *A. muscaria*.
- ξ Evaluar la capacidad de adsorción de metabolitos de *A. muscaria* mediante zeolita natural.
- ξ Determinar el efecto preventivo de la toxicidad por metabolitos de *A. muscaria* mediante aluminosilicatos en un ensayo de toxicidad en *Artemia salina*.

6. Materiales y métodos

6.1. Obtención de material biológico

Las muestras de macromicetos se obtuvieron en el municipio de Tlalmanalco, ubicado al sureste del Estado de México, limita al este con el estado de Puebla y tiene una extensión total de 161.57 km². Se encuentra rodeado en un 65% por bosque de coníferas y encinos, en el que predominan los suelos formados por cenizas volcánicas y pómez (tefras). El clima es templado subhúmedo con lluvias en verano, la temperatura media anual es de 13.2°C, con precipitaciones anuales de 1092 mm, siendo julio el mes más lluvioso con 228.8 mm (INAFED, s.f.). La localidad de San Rafael se ubica en el polígono dos (Falda de la Iztaccíhuatl) de la subzona de Uso Público del Parque Nacional Izta-Popo a una altitud media de 2552 msnm (DOF, 2013)(Figura 1).

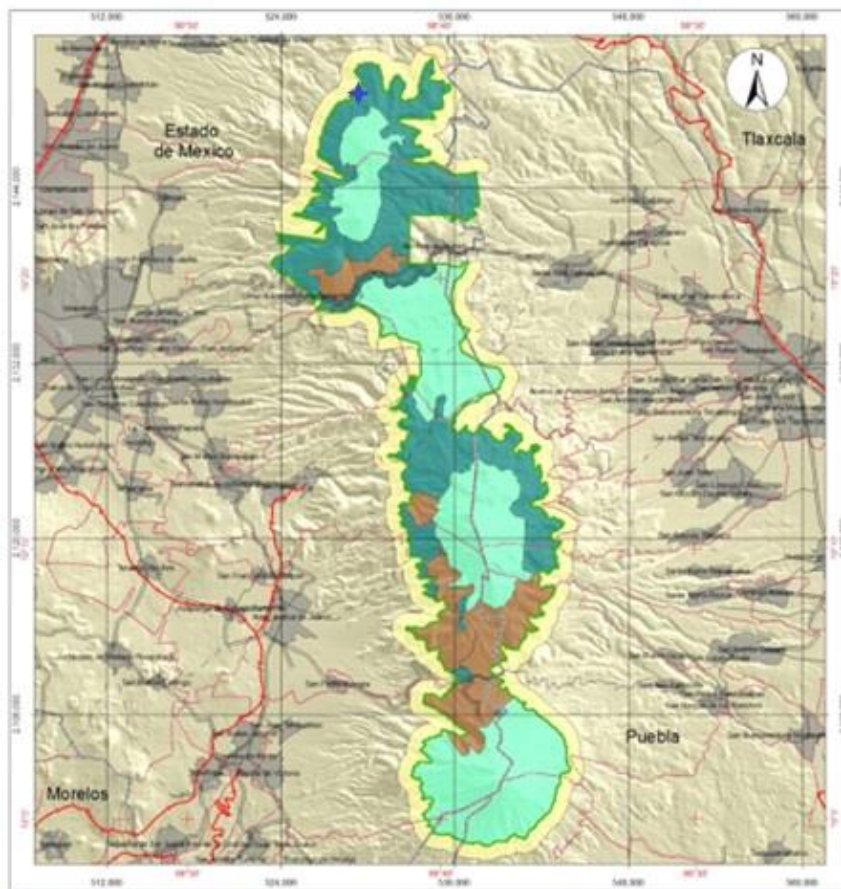


Figura 1. Parque Nacional Izta-Popo. Localidad de San Rafael, EDOMEX (DOF, 2013).

6.2. Identificación taxonómica

Los organismos colectados fueron identificados en laboratorio de acuerdo con sus características macroscópicas y a las fotografías tomadas en su hábitat, siguiendo las claves de determinación; Identificación de los hongos comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de la madera (Guzmán, 1977). Se tomó en cuenta su tamaño, color, forma del carpóforo, pie y sombrero con láminas o con poros en la cara inferior.

La identificación y confirmación de la especie se realizó con el apoyo de la especialista del grupo biológico, M. en C. Irene Frutis, en el Herbario de la FESI, UNAM.

6.3. Material de Zeolita

La muestra de zeolita se obtuvo de yacimientos del altiplano mexicano. El material fue reducido a polvo malla 200 empleando un mortero de ágata. Los análisis, la micromorfología y composición elemental de la superficie, se realizaron mediante imágenes tomadas por microscopía electrónica de barrido JEOLJSM-6380 modelo 7582 con accesorio de Rayos X EDS InCA x-sight Oxford Instruments. Con barrido de 3 campos distintos de muestra con los siguientes parámetros: voltaje mínimo 15 kV, aumentos de 1000 a 25000 X y distancia de trabajo 10 mm (Franco, D, 2012).

6.4. Descripción de la extracción de metabolitos

Para la extracción de ácido iboténico y muscimol se utilizó un método reportado previamente (Tsunoda *et. al.*, 1993) con modificaciones menores de la siguiente manera.

En breve, se separó la cutícula del resto del sombrero de los hongos secos. Una vez separada se molió hasta obtener un polvo fino con ayuda de un mortero. Se utilizó 1 g del polvo, se hizo una extracción con 8 mL de etanol acuoso al 70%, agitación de 1 min seguido de ultrasonificación durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó el extracto a 6000 rpm durante 10 min y se recuperó el sobrenadante.

Posteriormente se realizó una derivatización de la muestra obtenida anteriormente, de la cual se tomó una alícuota de 200 µL y se evaporó a sequedad bajo una corriente

de nitrógeno, se agregó una mezcla de 50 μL de BSTFA con un 10% de TMCS y 50 μL de acetato de etilo, se incubó a 80°C durante 30 min. Se usó una alícuota de 2 μL para la espectrometría de masas por cromatografía de gases.

6.5. Análisis Instrumental mediante Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas

Para el análisis e identificación química de los compuestos mayoritarios se utilizó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, empleando un cromatógrafo Agilent modelo 6850 y un espectrómetro de masas Agilent modelo 5975C VL MSD, (CG-EM). La fracción alcaloidea obtenida de la derivatización se inyectó en el cromatógrafo de gases, utilizando una columna HP-5MS con una longitud de 30 metros, diámetro de 0.25 mm y una película de 0.25 μm , a una temperatura inicial del horno de 110°C; se realizó una primer rampa de calentamiento de 20°C/min hasta 250°C y se mantuvo durante 10 minutos; una segunda rampa 30°C/min hasta 290°C y se mantuvo durante 10 minutos; la temperatura del inyector de 250°C; el gas acarreador fue Helio a una velocidad constante de 46 cm/seg; el modo de inyección Splitless, con split cerrado a 0.0 min. y split abierto a 0.3 min, el volumen de inyección fue de 2 μL . Las condiciones del espectrómetro de masas fueron: temperatura de la fuente de ionización a 230°C; temperatura de cuadrupolo a 150°C, temperatura de la línea de transferencia a 290°C, tipo de ionización barrido completo con Impacto Electrónico (IE) con una energía de ionización de 70 eV y un rango de 35 a 400 de relación de masa carga (m/z); polaridad de los iones positivos. Los espectros de fragmentación de masas obtenidos de los alcaloides separados se compararon con los espectros de la biblioteca NIST ver. 8.0 (Agurell, 1969).

6.6. Bioensayo de toxicidad con *Artemia salina*

La prueba de toxicidad general se realizó con la prueba de letalidad *in vivo* utilizando larvas recién eclosionadas (nauplio) de *A. salina* (Leach), de acuerdo con la metodología descrita por McLaughlin (1991). El extracto se analizó a 1, 10, 100 y 1000 ($\mu\text{g/ml}$), más un grupo control. Cada tratamiento y el control tuvieron un total de seis

repeticiones. Los sobrevivientes se contaron cada hora durante 9 horas para observar a que tiempo el número de individuos se redujo a la mitad.

La actividad de toxicidad general se expresó en porcentaje y se consideró: 0-10% no tóxico, 11-50% moderadamente tóxico, 51-90% altamente tóxico y 100% extremadamente tóxico (Borroto *et. al.*, 2011). En el caso de obtener larvas muertas en el control se corrigió del siguiente modo:

% Mortalidad corregido = % Sobrevivientes en el control - % Sobrevivientes en el tratamiento (Carballo *et. al.*, 2002)

Los porcentajes de mortalidad se expresaron en un gráfico en función de la concentración utilizada y se obtuvo la línea de tendencia. Con la ecuación de la gráfica se calculó la concentración letal para el 50% de la población (CL50) (Padmaja *et. al.*, 2002).

6.7. Ensayo de adsorción de micotoxinas de *A. muscaria* en zeolita

6.7.1. *In vitro*

La evaluación de adsorción *in vitro* de toxinas por aluminosilicatos se realizó haciendo modificaciones menores a los métodos previamente reportados (Phillips *et. al.*, 1988; Dweyer *et. al.*, 1997; Ledoux *et. al.*, 1999). En términos generales el método consistió en poner en contacto el material adsorbente (zeolita) y el extracto de *A. muscaria*.

En este ensayo de adsorción se utilizó únicamente la concentración de 100 ppm para observar mejor el efecto de la zeolita y no tener una disminución muy acelerada de los organismos con la concentración más alta.

Se preparó una solución con un volumen final de 2.5 mL con zeolita al 0.5% y el extracto de *A. muscaria* obtenido del hongo a una concentración de 100 ppm. La solución de adsorción se incubó durante 60 min a 30°C con agitación orbital de 150 rpm. Posteriormente, se centrifugó a 6,000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y se colocaron los grupos de *A. salina*. Los tratamientos *in vitro* se realizaron con 10 repeticiones cada uno, empleando solución de *A. salina* con 10

individuos cada uno. Los sobrevivientes se contaron cada hora durante 11 horas (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos *in vitro* de adsorción de metabolitos utilizando zeolita.

GRUPO	TRATAMIENTO
C	Solución de Artemia
AZ	Artemia + 0.5% zeolita
AE	Solución de Artemia + 100 ppm extracto
AS	Solución de Artemia + 100 ppm Sobrenadante

Solución de Artemia con 10 individuos

6.7.2. *In vivo*

La evaluación de adsorción *in vivo* se realizó siguiendo a Phillips *et. al.*, (1988); Dweyer *et. al.*, (1997) y Ledoux *et. al.*, (1999) con modificaciones menores.

Se preparó una solución con un volumen final de 2.5 mL que contiene zeolita al 0.5%, el extracto obtenido del hongo a una concentración de 100 ppm. A esta solución se le colocaron los grupos de artemias con 10 individuos cada uno. Los sobrevivientes se contaron cada hora durante 9 horas. Para cada tratamiento *in vivo* se realizaron 10 repeticiones (Tabla 2).

Tabla 2. Tratamientos *in vivo* de adsorción de metabolitos utilizando zeolita.

GRUPO	TRATAMIENTO
C	Solución de Artemia
AZ	Artemia + 0.5% zeolita
AE	Solución de Artemia + 100 ppm extracto
AZE	Solución de Artemia + 0.5% zeolita + 100 ppm Sobrenadante

Solución de Artemia con 10 individuos

6.8. Análisis Estadístico

Para determinar la significancia de los resultados obtenidos se aplicó un análisis estadístico de dos vías, en el cual el primer paso fue confirmar el comportamiento normal de los datos y así poder aplicar métodos paramétricos de pruebas de hipótesis. Para comparar las medias de los diferentes tratamientos se realizó con una ANOVA de 2 vías para datos pareados, seguido de la prueba *post-hoc* de Tukey para las comparaciones múltiples entre todos los tratamientos; en tanto que para las comparaciones múltiples entre el grupo control y los tratamientos se utilizó la prueba *post-hoc* de Dunnett. En ambos casos se consideró el valor $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism®, versión 9.5.1 para macOS, GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com.

7. Resultados

7.1. Colecta

La colecta se realizó en el mes de octubre durante la temporada de lluvias del año 2022. Se colectaron diez ejemplares adultos con las características correspondientes a la especie *A. muscaria*, en el Parque Dos Aguas ubicado en la localidad de San Rafael, Tlamanalco. Los ejemplares fueron encontrados a una altitud de 3000 msnm, se mantuvieron frescos y completos en una canasta para su posterior identificación (Figura 2).



Figura 2. Ejemplares de *A. muscaria* en Parque Dos Aguas, San Rafael, EDOMEX.

7.2. Identificación taxonómica

Se identificó la especie *A. muscaria* de acuerdo con sus características macroscópicas. Sombrero rojo anaranjado, de 10 a 20 cm de diámetro, estriado en el margen, con escamas pequeñas, blanquecinas o amarillas. Láminas y pie blancos. El anillo es membranoso, colgante con el borde polvoriento y amarillo. Las escamas del bulbo del pie son amarillas sin distribución bien regular. Crecen en bosques de pinos, solitarios o en pequeños grupos. En la fase de botón, el hongo está totalmente cubierto por escamas, blanquecinas o amarillentas del bulbo de pie (Guzmán, 1977).

Phylum Basidiomycota

Clase Agaricomycetes

Orden Agaricales

Familia Amanitaceae

Amanita muscaria (L.) Lam.

7.3. Caracterización del Material de Zeolita

La zeolita muestra una microestructura superficial característica de los aluminosilicatos, en donde destacan partículas cristalinas de tamaños inferiores a 1 μm (B). Adicionalmente, los contrastes de luz retrodispersa en las imágenes indicaron la presencia de fracciones metálicas (A) como se espera en el arreglo tridimensional de la zeolita (Figura 3).

7.3.1. Composición elemental

Los resultados se mostraron el perfil característico de un aluminosilicato con 18.35% de silicio y 4.79% de aluminio. Adicionalmente, el perfil de composición del material se puede asociar con el tipo de zeolita Heulandita, debido al elevado nivel de sodio, que alcanza un porcentaje de 0.86%, por lo cual se espera una capacidad de intercambio catiónico elevado. Finalmente, la presencia de calcio en un porcentaje de 0.34% se puede asociar a la detección de carbono con 12.97%, los cuales forman una impureza de carbonato de calcio muy común en aluminosilicatos de origen natural (Tabla 3).

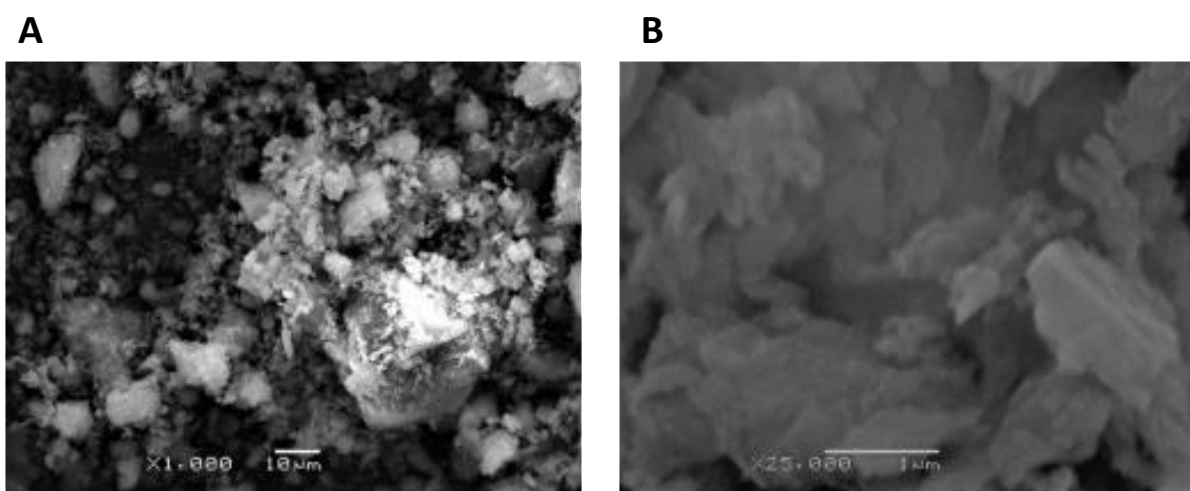


Figura 3. Microfotografías del material zeolita.

Tabla 3. Composición elemental del material de zeolita.

ELEMENTO	PORCENTAJE (%)
C	12.97
Na	0.86
Mg	0.88
Al	4.79
Si	18.35
Ca	0.34
Fe	0.83

7.4. Identificación de Micotoxinas presentes en *A. muscaria*

7.4.1. Ácido iboténico

Se utilizó un cromatograma del extracto de *A. muscaria* para la detección de la presencia de Ácido Iboténico (IBO), para lo cual, se filtró la señal de 257 m/z mediante la Técnica de Monitoreo de Ion Selectivo (SIM). La señal de 257 fue elegida dado que el ion molecular del producto derivatizado IBO-tri-TMS con 374 m/z es indetectable debido a que descompone espontáneamente. El IBO fue detectado con un tiempo de retención de 5.83 min (Figura 4).

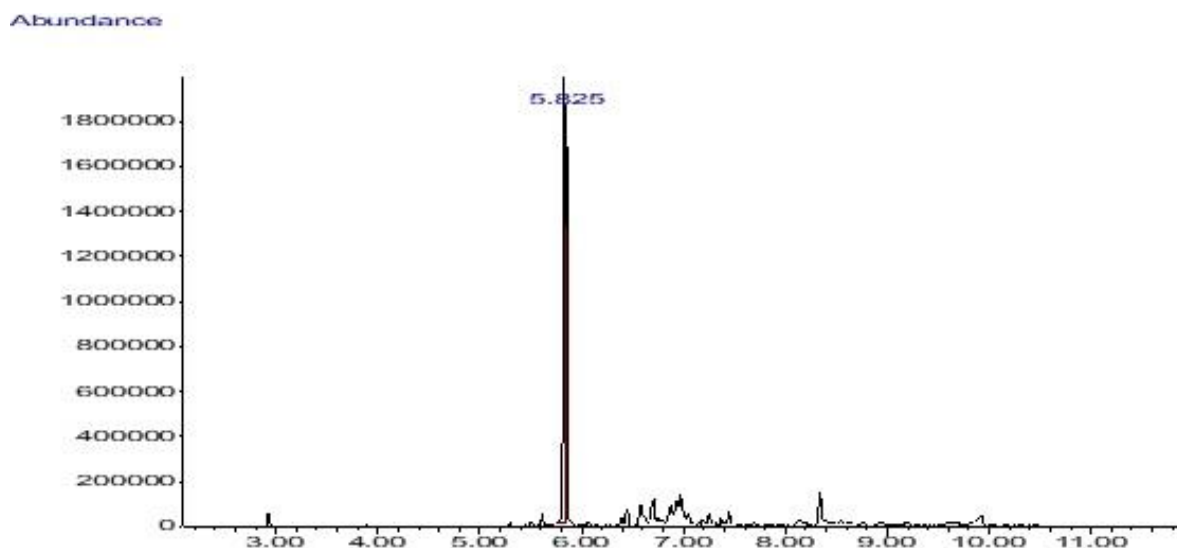


Figura 4. Cromatograma de IBO. Monitoreo de Ion Electrónico 257 e/z.

La identificación química de IBO fue establecida mediante el patrón de fragmentación del producto derivatizado IBO-tri-TMS (Figura 5). La confirmación inequívoca del IBO se determinó mediante la hipótesis de fragmentación, en la cual, se parte de las condiciones de derivatización en presencia de Anhídrido Trifluoroacético (TFA) y Trimetil Silicio (TMS), las cuales producen tres sustituciones con TMS en el α -amino, el ácido carboxílico y el alcohol del anillo heterocíclico del isoxazol, con lo cual se genera el producto volátil de IBO-tri-TMS con 374 m/z (M^+). La inestabilidad del ion molecular obtenido debido a la triple sustitución de TMS genera espontáneamente el ion 359 m/z (M^+-15), el cual corresponde a la pérdida de un metilo sustituido en la amina para producir el ion amonio de la amina del IBO-tri-TMS. Adicionalmente, se observa el fragmento 257 m/z, el cual corresponde a la ruptura del grupo funcional del ácido carboxílico sustituido, lo cual es inducido por el efecto alfa del carbonilo. Así mismo, se observan los fragmentos 145 m/z y 117 m/z que indican los iones complementarios de la ruptura de la cadena lateral del isoxazol. Finalmente, se reconoce el fragmento M^+ 73 m/z como pico base, el cual corresponde a la masa esperada del derivatizante TMS (Figura 6).

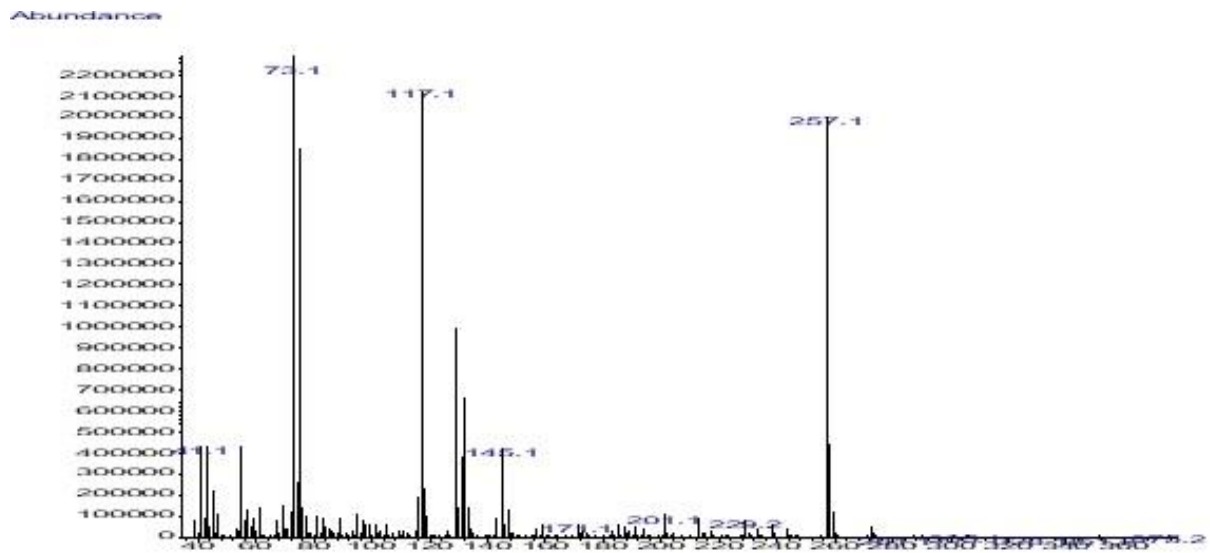


Figura 5. Patrón de Fragmentación de IBO-tri-TMS (374 M⁺).

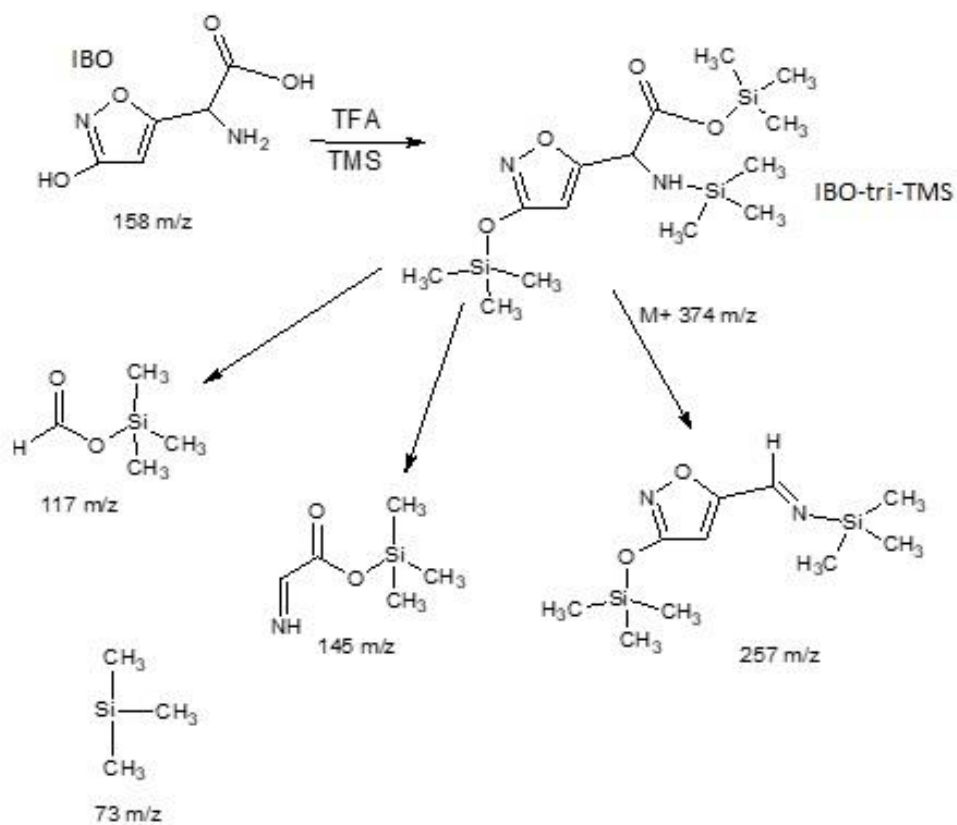


Figura 6. Hipótesis de Fragmentación de IBO-tri-TMS.

7.4.2. Muscimol

Se utilizó un cromatograma del extracto de *A. muscaria* para la detección de Muscimol (MUS), para lo cual, se filtró la señal de 243 m/z mediante la Técnica de Monitoreo de Ion Selectivo (SIM). La señal de 243 fue elegida dado que el ion molecular del producto derivatizado MUS-di-TMS con 258 e/m es indetectable debido a que descompone espontáneamente en las condiciones de análisis de masas. El MUS fue detectado con un tiempo de retención de 5.24 min (Figura 7).

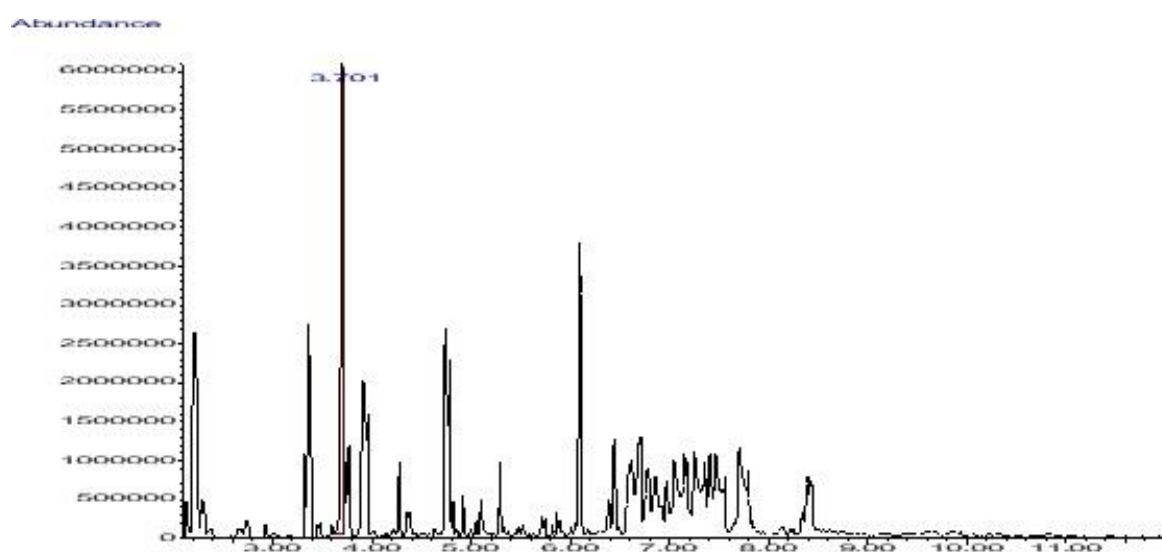


Figura 7. Cromatograma de Muscimol. Monitoreo de Ion Electrónico 243 m/z.

La identificación química de MUS fue establecida mediante el patrón de fragmentación del producto derivatizado MUS-di-TMS (Figura 8). La confirmación inequívoca del MUS se propone mediante la hipótesis de fragmentación, en la cual, se parte de las condiciones de derivatización en presencia de Anhídrido Trifluoroacético (TFA) y Trimetil Silicio (TMS), ambos producen dos sustituciones con TMS en el amino y el alcohol del anillo heterocíclico del isoxazol, esto genera el producto volátil de MUS-di-TMS con 258 m/z (M^+). La inestabilidad del ion molecular obtenido debido a la doble sustitución de TMS genera espontáneamente el ion 243 m/z (M^+-15), el cual corresponde a la pérdida de un metilo sustituido en la amina para producir el ion amonio de la amina del MUS-di-TMS. Adicionalmente, se observan los fragmentos 147 y 117 m/z, correspondientes a dos fragmentaciones de retrodiels-alder del anillo

isoxazol. Finalmente, se reconoce el fragmento M^+ 73 m/z como pico base, que corresponde a la masa esperada del derivantizante TMS (Figura 9).

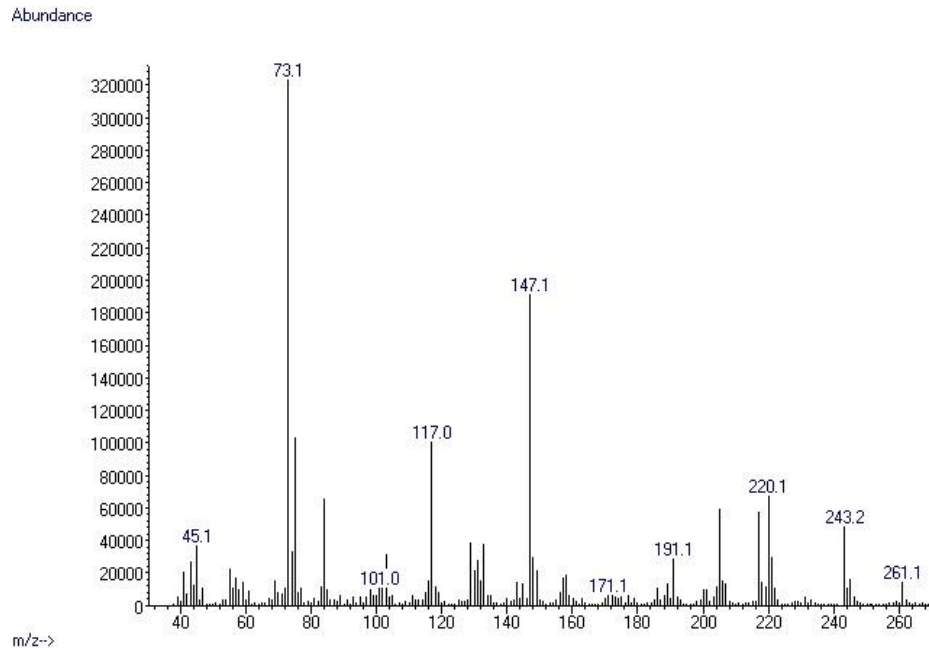


Figura 8. Patrón de Fragmentación de MUS-di-TMS ($258 M^+$).

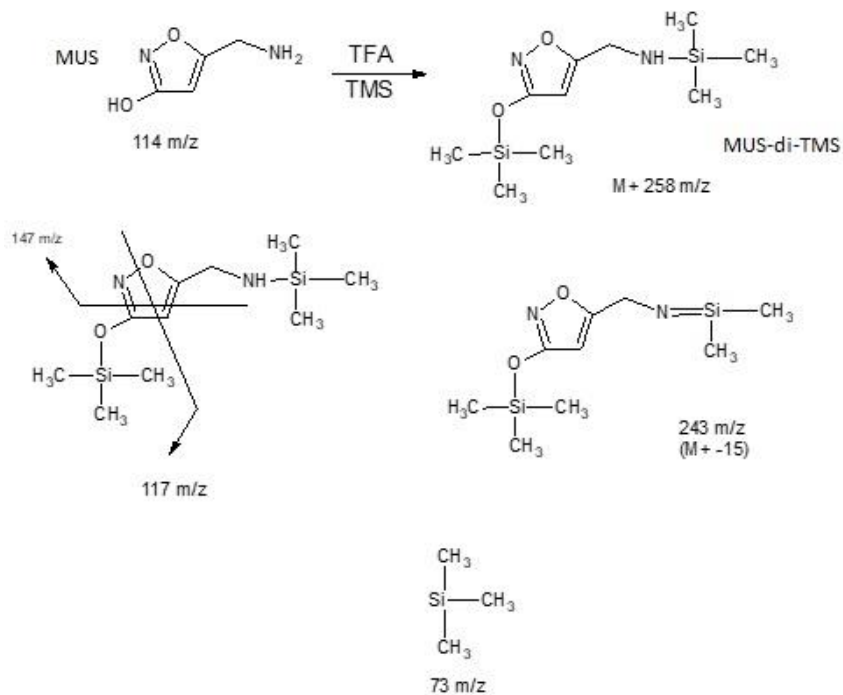


Figura 9. Hipótesis de Fragmentación de MUS-di-TMS.

7.5. Bioensayo de toxicidad

Los resultados obtenidos en el bioensayo con *A. salina* demostraron que la toxicidad del extracto de *A. muscaria* dependen tanto de la concentración como del tiempo transcurrido en exposición, es decir, de acuerdo con los parámetros considerados, a las 9 horas la concentración de 1 ppm no es tóxica, sin embargo, se presenta una toxicidad moderada en concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm (Figura 10). La CL50 calculada con una R^2 de 0.995 fue de 404 $\mu\text{g/mL}$.

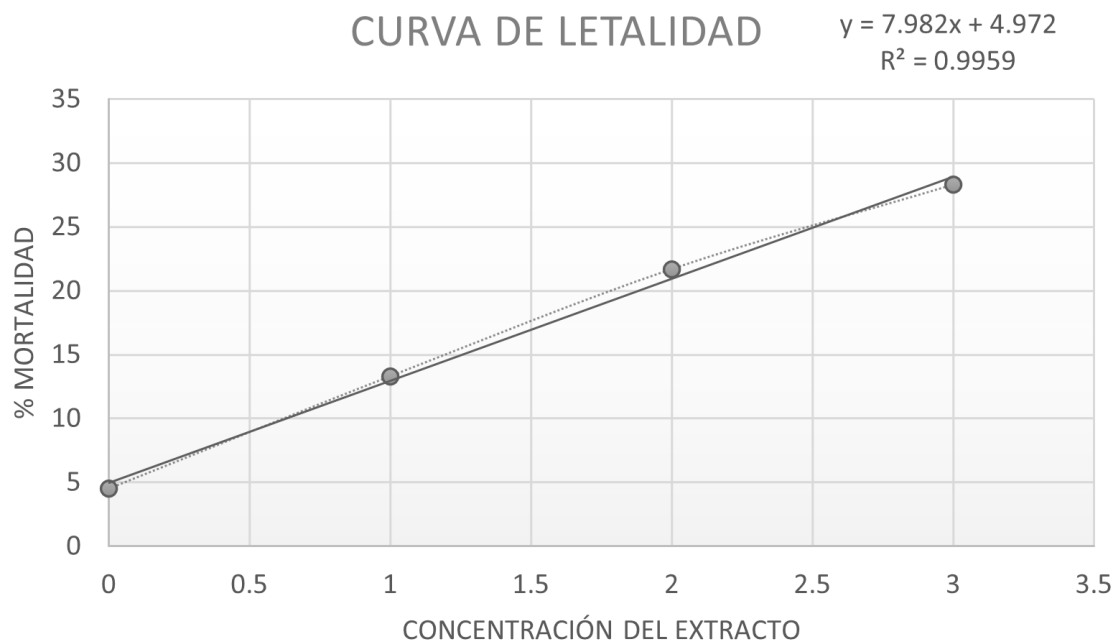


Figura 10. Curva de letalidad de *A. salina* expuesta a diferentes concentraciones (1, 10, 100 y 1000 ppm expresado en logaritmo) del extracto de *A. muscaria*.

Los porcentajes de mortalidad a las 9 horas de exposición indicaron que con el 4.49% la concentración de 1 ppm no es tóxica y las concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm son moderadamente tóxicas. La viabilidad de las larvas en el grupo control fue de 53.89% y no se observaron cambios en su motilidad (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de mortalidad corregido y supervivencia de *A. salina*.

	(μ G/ML)	TOTAL	% VIVAS	% MUERTAS	% SUPER- VIVENCIA	% MORTALIDAD
CONTROL	0	30	16.17	13.83	53.89	0
EXTRACTO	1	30	14.83	15.17	49.4	4.49
	10	30	12.17	17.83	40.56	13.3
	100	30	9.67	20.3	32.2	21.69
	1000	30	7.67	22.3	25.56	28.3

La mortalidad de *A. salina* aumentó con mayor rapidez entre mayor fue la concentración del extracto a la que fueron expuestos. El tratamiento con la concentración más baja (1 ppm) se comportó de manera muy similar al grupo control. El resto de los tratamientos se desviaron de este comportamiento, con una reducción de más del 50% de la población en 9 horas (Figura 11).

Las pruebas de normalidad de los datos aplicadas con $\alpha=0.05$, indicaron que los resultados tuvieron un comportamiento normal característico, lo cual permitió aplicar las pruebas paramétricas de ANOVA para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos.

Los resultados de toxicidad mostraron diferencias significativas en la prueba de Tukey a la hora 6 y 8, entre el grupo control y el tratamiento de 1000 ppm con valor de probabilidad de $\alpha=0.035$ y 0.008, respectivamente. Con los resultados significativos obtenidos se comprobó el efecto tóxico del alcaloide sobre *A. salina*, ya que en la hora 9 se observó una diferencia significativa ($\alpha=.009$) entre el tratamiento de 10 ppm y 1000 ppm, lo que indicó un efecto tóxico más acelerado dependiente de la concentración.

Adicionalmente, se observó que al comparar el grupo control contra los tratamientos en la prueba de Dunnett, se obtuvieron diferencias significativas, desde la hora 6-9, contra el tratamiento de 1000 ppm ($\alpha=.004$ - .044). Reafirmando lo obtenido en la prueba de Tukey, el extracto resultó tóxico con mayor rapidez a la concentración de 1000 ppm (Tabla 5).

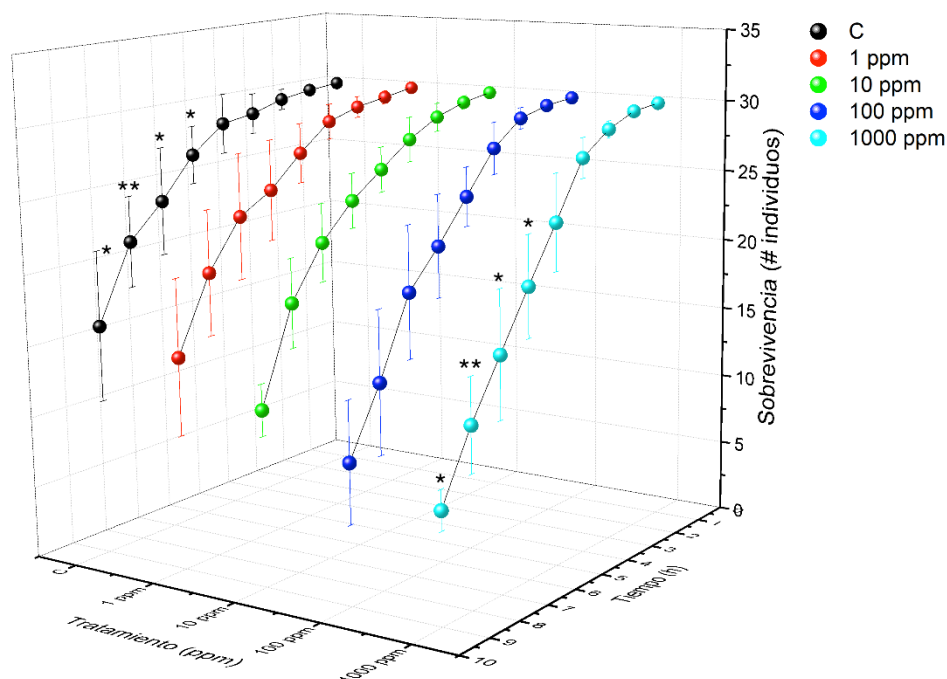


Figura 11. Sobrevivencia de *A. salina*. en presencia de concentraciones crecientes del extracto de *A. muscaria*. C: Control.

Tabla 5. Valores de significancia en ensayo de toxicidad, prueba de Dunnett.

HORA	6	7	8	9
C;1000 PPM	.018	.044	.004	.041

7.6. Ensayos de adsorción de micotoxinas de *A. muscaria* mediante zeolita

7.6.1. *In vitro*

Para el ensayo *in vitro* la prueba de Tukey mostró diferencias significativas en tres comparaciones desde la tercera hora de exposición. La comparación del grupo control contra AE con valores de probabilidad de $\alpha < .001 - .016$, demostrando el efecto toxico del extracto para *A. salina* desde las primeras horas de exposición.

El tratamiento con zeolita no tuvo efecto negativo sobre *A. salina*, dado que no se registraron diferencias significativas con respecto al grupo control. En contraste, la

comparación de AZ y AE si presento diferencias significativas desde la tercera hora, con valores de probabilidad en el rango de $\alpha < .001 - .021$.

El rango de valores de probabilidad obtenidos de la comparación de AE y AS fue de $\alpha = .005 - .023$ a partir de la quinta hora de exposición. El tratamiento AS tuvo un comportamiento similar al grupo control, de esta manera se demostró la eficiencia de la zeolita para disminuir los efectos tóxicos del extracto de *A. muscaria* sobre *A. salina* (Figura 12).

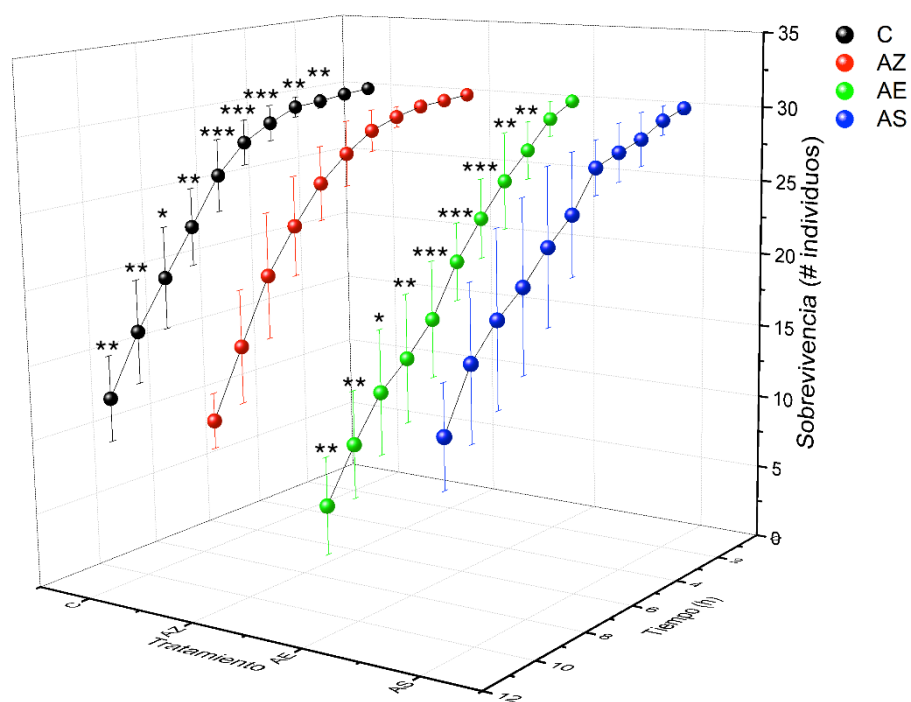


Figura 12. Tratamientos aplicados *in vitro*. C: Control, AZ: *A. salina* con zeolita al 0.5%, AE: *A. salina* con extracto a 100 ppm y AS: *A. salina* con el sobrenadante recuperado.

De acuerdo con la prueba de Dunnett, solo se obtuvo una diferencia significativa al comparar el grupo control contra el tratamiento AE con valores en el rango de $\alpha < .001 - .010$, confirmando el efecto tóxico del extracto sobre *A. salina*. Al no obtener diferencias entre el grupo control, AZ y AS, se asume que los comportamientos son

similares, se confirma que la zeolita no tiene efecto negativo y que al actuar con el extracto disminuye el porcentaje de intoxicación (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de significancia en ensayo de adsorción, prueba de Dunnett.

HORA	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C;AE	.009	.009	<.001	<.001	<.001	.001	.010	.009	.009

7.6.2. *In vivo*

Se observaron las diferencias obtenidas en la prueba de Tukey. Al comparar el grupo control contra AZE se obtuvieron valores de probabilidad de $\alpha=.018 - .023$ desde la sexta hora de exposición. La zeolita sin previa incubación con el extracto no disminuyó los porcentajes de intoxicación. Así mismo, el tratamiento AZ al tener comportamiento similar al grupo control también presentó diferencias contra AZE con valores de $\alpha=.003 - .032$ (Figura 13).

El comportamiento de las comparaciones entre el grupo control y AE ($\alpha=.004 - .017$) y AZ contra AE ($\alpha=<.001 - .009$) resultó ser el mismo que en el ensayo *in vitro*, los valores de probabilidad se obtuvieron a partir de la sexta hora.

El estadístico de Dunnett en el ensayo *in vivo* permitió determinar diferencias significativas en la comparación de dos tratamientos contra el grupo control. Al comparar contra AE se observa un rango de $\alpha=.002 - .009$, mostrando el efecto tóxico del extracto. Así mismo, el tratamiento AZE se registró diferencias significativas con respecto al control ($\alpha=.010 - .033$), reafirmando que la zeolita requiere de incubación previa con el extracto para disminuir los niveles de intoxicación en *A. salina* (Tabla 7).

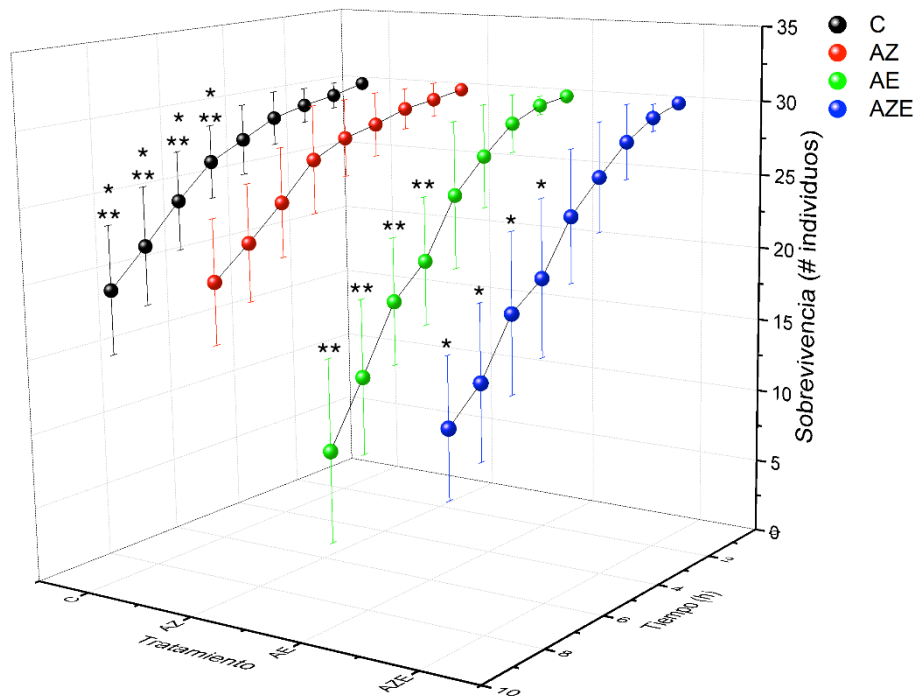


Figura 13. Tratamientos aplicados *in vivo*. C: Control, AZ: *A. salina* con zeolita al 0.5%, AE: *A. salina* con extracto a 100 ppm y AZE: *A. salina* con zeolita al 0.5% y extracto a 100 ppm.

Tabla 7. Valores de significancia en ensayo de adsorción, prueba de Dunnett.

HORA	6	7	8	9
C;AE	.005	.009	.004	.002
C;AZE	.011	.033	.010	.013

8. Discusión

Se considera de gran importancia el estudio de los hongos debido a que su popular uso alimenticio expone a una parte considerable de la población a posibles intoxicaciones a causa de malas identificaciones en las especies (Voynova *et. al.*, 2020). *A. muscaria* en su etapa madura, es comúnmente confundida con *A. caesarea*, esta especie es comestible y muy reconocida por su sabor. La ingesta accidental surge ya que *A. muscaria* pierde con gran facilidad las escamas blanquecinas o amarillas que se encuentran en la cutícula, que la distinguen de *A. caesarea*, además de que el sombreado adquiere un tono más anaranjado (Geml *et. al.*, 2008; Tulloss, 2005).

La intoxicación, en muchos casos, también puede ocurrir por consumo intencional (Voynova *et. al.*, 2020). El consumo se lleva a cabo desde hace muchos años en rituales o ceremonias, en donde los participantes buscan llegar a un estado particular de autoconocimiento, “delirio” o “alucinación” (Levi-Strauss, 1970), obtenido a través de la hipersensibilidad de los sentidos. Los componentes psicoactivos comienzan a hacer efecto a partir de los 20-30 minutos después de la ingestión, terminan de 2-8 horas después y hay una total recuperación pasadas 24 horas (Satora *et. al.*, 2005). Sin embargo, se han reportado casos de intoxicación por *A. muscaria* provocando el síndrome glutaminérgico o intoxicación por isoxazólicos, síndrome muscarínico y el síndrome delirante, micoatropínico (Benítez-Macías *et. al.*, 2009; Yáñez y Radigales, 2008), la mayoría de las personas se recuperan después de varios días de hospitalización con observación constante, los casos letales por esta especie son raros (Satora *et. al.*, 2005).

Se trabajó con base en la identificación del ácido iboténico y muscimol, ya que son los compuestos más abundantes en *A. muscaria*, ambos son derivados del isoxazol (Michelot y Meléndez-Howell, 2003; Satora *et. al.*, 2005), por lo que se les atribuiría a estos compuestos un efecto tóxico, sin embargo, al trabajar con el extracto crudo se encuentran presentes más compuestos como: muscazona, -R-4-hidroxi-pyrrolidona-, ácido tricolómico, ácido estizolóbico, ácido estilozobino, muscarina y ácido propanoico, además de pigmentos como: muscarufin, muscaflavina y muscaurinas I-VII (Michelot y Meléndez-Howell, 2003). Se ha comprobado la presencia de vanadio en un compuesto organometálico llamado amavadina (Berry *et. al.*, 1999; Braeuer *et. al.*, 2021).

En el presente trabajo, se identificaron los compuestos de IBO y MUS con base en la inspección de los espectros de masas de los productos derivatizados mediante la mezcla de reacción de TFA y TMS. Los resultados de fragmentación de masas concuerdan con los reportados con Tsujikawa et al (2006), quienes reconocieron la presencia de ácido iboténico y muscimol en extractos de obtenidos de *A. muscaria* y *A. pantherina*. Las hipótesis de fragmentación propuestas para el patrón registrado para cada alcaloide corresponden completamente con las pérdidas esperadas de grupos derivatizantes y funcionales esperados en las micotoxinas. Interpretaciones similares de patrones de fragmentación en derivatizados con TMS se han reportado previamente para metabolitos de hongos potencialmente psicoactivos (Repke, 1978).

Adicionalmente, se han propuesto derivatizaciones alternativas para IBO y MUS con reactantes de metilación exhaustiva, aplicados para la identificación de estas micotoxinas en muestras de orina (Střibrný et. al., 2011), sin embargo, se requieren etapas previas de prepurificación empleando columnas de intercambio catiónico, lo cual reduce el rendimiento de derivatizados e incrementa el tiempo de proceso de las muestras.

Por otro lado, el método para la evaluación de letalidad es un instrumento útil para la evaluación preliminar de toxicidad. Por la practicidad y veracidad del procedimiento, se utiliza para el monitoreo de toxicidad en extractos de diversos organismos (Carballo et. al., 2002). El valor de concentración letal media (404 ppm) obtenido mediante el bioensayo con *A. salina* del extracto etanólico del hongo *A. muscaria*, nos indica que es considerado moderadamente toxico debido a que se encuentra en el rango de 100-500 ppm según la clasificación de CYTED (Sánchez y Neira, 2006), aunque son necesarios más experimentos de toxicidad para comprobarlo.

La CL50 obtenida en este trabajo fue de 404 ppm, con modelo experimental de *A. salina*, en tanto que una concentración de 1000 ppm, acabo con la mayor cantidad de individuos. El estudio de Ott, 1976, reporta una CL50 de muscimol con rango de 4.5 mg/kg vía intravenosa a 45 mg/kg vía oral en ratas. De acuerdo con Stebelska, 2013, para obtener efectos psicodélicos en adultos se necesitan aproximadamente 6 mg de muscimol o de 30 a 60 mg de ácido iboténico (un ejemplar de *A. muscaria* de 50–70 g, contine más de 70 mg de ácido iboténico).

Con respecto a los resultados de prevención de la toxicidad, en el presente trabajo se registraron diferencias significativas de $\alpha=0.005$ y 0.023 entre los tratamientos AE y AS, en el ensayo *in vitro*, lo cual, permite confirmar una disminución significativa del efecto tóxico del extracto de *A. muscaria* sobre *A. salina*. El efecto de la zeolita fue eficaz en prevenir la toxicidad con una hora de incubación con el extracto y la mezcla de las toxinas, en este sentido, diferentes estudios utilizan el mismo tratamiento cuando evalúan a la zeolita, ya que, al tener una superficie porosa, tiene la capacidad de para adsorber a las toxinas. Los resultados obtenidos en este trabajo son comparables con Thimm *et. al.*, 2001, quienes reportan un procedimiento similar, incubación por una hora a 37° C, seguido de una centrifugación. Así mismo, Bočarov-Stančić *et. al.*, 2018 mantienen las muestras en incubación por una hora con agitación de 185 rpm a temperatura de $22-25^{\circ}$ C, con lo cual reducen en porcentajes elevados la presencia de las toxinas en el medio.

A diferencia de los estudios anteriores en los cuales se reporta la eficacia de adsorbentes aluminosilicatos, el ensayo *in vivo* realizado en el presente trabajo no mostró diferencias significativas, se presume que sin previa incubación no disminuye la toxicidad sobre *A. salina*. Se puede observar que el efecto tóxico producido por el extracto es más rápido sobre el modelo experimental que, la adsorción de las toxinas por la zeolita en el extracto. Los efectos del extracto comienzan pasados los 20 minutos de la ingestión (Satora *et. al.*, 2005) y la incubación de zeolita requiere de por lo menos una hora para lograr algún efecto (Bočarov-Stančić *et. al.*, 2018).

El presente trabajo se realizó con un modelo experimental de adsorción/toxicidad, el cual, aporta evidencias preliminares de uso potencial de zeolitas en la prevención de los síndromes de intoxicación con IBO y MUS. Los resultados obtenidos permiten apreciar la viabilidad de esta alternativa para la caracterización en detalle cómo se ha realizado en micotoxinas producidas por hongos filamentosos, y contaminaciones granos y materias primas empleadas en la producción pecuaria (Li *et. al.*, 2018). En este sentido, se han establecido los mecanismos fisicoquímicos de remoción, tales como la interacción polar de los grupos funcionales de aflatoxinas en zeolitas y arcillas (Flores *et. al.*, 1999). Así mismo, se han aportado evidencias microestructurales y espectroscópicas de los procesos de dilatación de capas interlamelares de aluminosilicatos y el intercambio catiónico en organoarcillas para la adsorción de fusariotoxinas, tales como Toxina T2 y Toxina HT2 (García-García *et. al.*, 2023).

Adicionalmente, se ha reconocido el potencial de enzimas para la degradación de micotoxinas como Ocratoxina A en forma selectiva y específica (Orozco-Cortés *et. al.*, 2023).

Con base en estudios de riesgo de micotoxinas, se ha reconocido que el manejo de los eventos de contaminación e intoxicación se deben aplicar múltiples estrategias para coadyuvar entre las formas de adsorción y hacer sinergia entre los ingredientes de manejo terapéutico (Singh y Kumari, 2022). Considerando lo anterior, el presente trabajo contribuye con una alternativa adicional en el tratamiento preventivo y correctivo de la exposición fortuita o intencional con micotoxinas de *A. muscaria*.

9. Conclusiones

- ξ El análisis por espectrometría de masas permitió identificar los compuestos de ácido iboténico y muscimol en el extracto de *A. muscaria*.
- ξ Se determinó una CL50 de 404 µg/mL, en el bioensayo con *A. salina*, por lo que se considera un extracto moderadamente tóxico, debido a que se encuentra en el rango de 100-500 ppm según la clasificación de CYTED
- ξ La zeolita natural no tiene efectos negativos sobre *A. salina* a la concentración de 0.5%.
- ξ La zeolita al 0.5%, resulta efectiva en el ensayo *in vitro* para disminuir los efectos tóxicos del extracto de *A. muscaria* en concentración de 100 ppm.
- ξ El ensayo *in vivo* demostró que se requiere de incubación previa de la zeolita con el extracto para lograr un efecto positivo en la disminución del efecto tóxico.

10. Referencias bibliográficas

Agurell, Stig. 1969. Identification of Alkaloid Intermediates by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. I. Potential Mescaline Precursors in *Trichocereus Species*. *Lloydia* 32(1): 40-45.

Alcántar, O. R., López, L. H., Dueñas, J. J. R. y García, D. F. 2020. Los hongos en Sierra de Quila, Jalisco, registros nuevos. *e-CUCBA*, (13), 4-4.

Aroche, R. M., Cifuentes, J., Lorea, F., Fuentes, P., Benavides, J., Galicia, H., Eduardo, M., Ofelia, A. y Valenzuela, V. 1984. Macromicetos tóxicos y comestibles de una región comunal del Valle de México, I. *Scientia Fungorum*, 2(19), 291-318.

Benítez-Macías, J. F., García-Gil, D., Brun-Romero, F. M. y Nogué-Xarau, S. 2009. Intoxicaciones agudas por setas. *Revista clinica espanola*, 209(11), 542-549.

Berry, R. E., Armstrong, E. M., Beddoes, R. L., Collison, D., Ertok, S. N., Helliwell, M. y Garner, C. D. 1999. *The Structural Characterization of Amavadin*. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(6), 795–797.

Bočarov-Stančić, A., Adamović, M., Salma, N., Bodroža-Solarov, M., Vučković, J. y Pantić, V. 2011. In vitro efficacy of mycotoxins adsorption by natural mineral adsorbents. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 27(3), 1241-1251.

Bočarov-Stančić, A., Lopičić, Z. R., Bodroža-Solarov, M. I., Stanković, S., Janković, S., Milojković, J. V. y Krulj, J. A. 2018. In vitro removing of mycotoxins by using different inorganic adsorbents and organic waste materials from Serbia. *Food and Feed research*, 45(7), 87-96.

Borroto, J., Trujillo, R., de la Torre, Y. C., Waksman, N., Hernández, M. y Salazar, R. 2011. Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* L. *Revista cubana de plantas medicinales*, 16(1), 34-42.

Braeuer, S., Walenta, M., Steiner, L. y Goessler, W. 2021. Determination of the naturally occurring vanadium-complex amavadin in *Amanita muscaria* with HPLC-ICPMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 36(5), 954-967.

Carballo, J. L., Hernández-Inda, Z. L., Pérez, P. y García-Grávalos, M. D. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC biotechnology*, 2(1), 1-5.

Carrillo, T. A. 1989. Contribución a la etnomicología de San Pablo Ixayoc, Texcoco Estado de México. Tesis de licenciatura. 143.

Castillo Godoy ND, Durán López CA, Matamoros M. 2019. Micetismo: Reporte de dos casos fatales y revisión bibliográfica. *Rev. cienc. forenses Honduras*. 5(2): 25-34.

Cepero, M. C., Restrepo, S. y Franco, A. E. 2012. Biología de hongos. ProQuest Ebook Central.

Coello, J. M. y Burgos, F. 2012. Aplicación del hongo *Pleurotus ostreatus* como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados.

De Oliveira, D. A. S. 2015. Utilización de secuestrantes de micotoxinas. Jornada Nacional de Forrajes Conservados. 6. 2015 04, 22-23, 22 y 23 de abril de 2015. EEA Manfredi, Córdoba. AR.

DOF. 2013. Tercera sección. Secretaria de medio ambiente y recursos naturales.

Domínguez, R. D., Arzaluz, R., Josefa, I., Romero, P., Narda, P. y Valdés, V. C. 2015. Uso y manejo de hongos silvestres en cinco comunidades del Municipio de Ocoyoacac, Estado de México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 18(2), 133-143.

Dweyer, M., Kubena, L., Harvey, R., Mayura, K., Sarr, A., Buckley, S., Bailey, R. y Phillips, T. 1997. Effects of inorganic adsorbents and cyclopiazonic acid in broiler chickens. *Poultry Sci.* 76: 1141-1149.

Espíndola, F. S. 2006. Micotoxinas y micotoxicosis en el ganado bovino lechero. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, V(1), 89-94.

Gallego, Ú. M., Heredia, B. M., Campos, F. de S. M. A. y Ruiz D. A. 2020. Patología otoñal: micetismos, intoxicación por *Amanita virosa*. *Revista de la OFIL*, 30(2), 157-159.

Flores, C. M.; Domínguez, J. M.; Díaz de León, J. 1999. Modelling and Experimental Comparison of the Differential Adsorption of B1 and G1 Aflatoxins on Mineral Aluminosilicates Surfaces. *J. Environ. Pathol. Toxicol & Oncol.* 18(3): 213-220

Franco, D. 2012. Modificación química de la estructura de aluminosilicatos para incrementar la capacidad de adsorción de Toxina T2. Tesis de Biología, FESI, UNAM.

Geml, J., Tulloss, R., Laursen, G., Sazanova, N. y Taylor, D. 2008. Evidence for strong inter- and intracontinental phylogeographic structure in *Amanita muscaria*, a wind-dispersed ectomycorrhizal basidiomycete. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48(2): 694–701.

García-García, F.A., Cristiani-Urbina, E., Morales-Barrera, L., Rodríguez-Peña, O.N., Hernández-Portilla, L.B., Flores-Ortíz, C.M. 2023. Spectroscopic and Microstructural Evidence for T-2 Toxin Adsorption Mechanism by Natural Bentonite Modified with Organic Cations. *Toxins* 2023, 15, 470. doi.org/10.3390/toxins15070470

Giannini, L., Vannacci, A., Missanelli, A., Mastroianni, R., Mannaioni, P. F., Moroni F. y Masini E. 2007. Amatoxin poisoning: a 15-year retrospective 129 analysis and follow-up evaluation of 105 patients. *Clinical Toxicology* 45: 539-542.

Guzmán G. 1977. Identificación de los hongos comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de madera. México, D. F.: Limusa.

Herrera, T. y Ulloa, M. 1998. El reino de los hongos: micología básica y aplicada (No. 589.2 H565r). México, MX: Universidad Nacional Autónoma de México.

INAFED. s.f. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Tlalmanalco.

Karlson-Stiber C. y Persson, H. 2003. Cytotoxic fungian overview. *Toxicon* 42: 339-349.

Kuhar, J. F., Castiglia, V. C. y Papinutti, V. L. 2013. Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos.

Ledoux, D., Rottinghaus, E., Bermudez, A. y Alonso-Debolt. 1999. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broiler chicks. *Poultry Sci.* 78: 204-210.

Levi-Strauss, C. 1970. Les champignons dans la culture. *L'homme* 10: 5–16.

Li, Y., Tian, G., Dong, G., Bai, S., Han, X., Liang, J., Meng, J., Zhang, H. 2018. Research progress on the raw and modified montmorillonites as adsorbents for mycotoxins: A review. *Applied Clay Science*. 163. 10.1016/j.clay.2018.07.032.

Marković, M., Daković, A., Rottinghaus, G. E., Kragović, M., Petković, A., Krajišnik, D., Krajišnik, D., Milic, J., Mercurio, M. y de Gennaro, B. 2017. Adsorption of the mycotoxin zearalenone by clinoptilolite and phillipsite zeolites treated with cetylpyridinium surfactant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 151, 324-332.

Martínez, N. D., Rodríguez, A. M., Gómez, D. A., Gutiérrez, A. R. y Gómez, E. B. s.f. Descontaminación de pasa de uva contaminada con ocratoxina A mediante el uso de ácido cítrico y carbón activado. Instituto de ingeniería química, Argentina.

Martínez, M., Castro, M., Hidalgo, K., Ayala, L., Pérez, R., Hernández, L. y Báez, L. 2004. La utilización efectiva de la zeolita natural para el control de las diarreas. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38(4), 395-398.

Michelot, D., y Melendez-Howell, L. M. 2003. *Amanita muscaria: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. Mycological Research*, 107(2), 131–146.

McLaughlin J.L. 1991. Crown gall tumors on potato disc and brine shrimp lethality: two simple assays for higher plant screening and fractionation. In: Dey PM, Harborne JB, Hostettman K (eds) *Methods in Plant Biochemistry Assays for Bioactivity*, 6. San Diego, Academic Press, pp. 1-32.

Montoya, E. A. 1992. Análisis comparativo de la etnomicología de tres comunidades ubicadas en las faldas del volcán La Malintzi, Estado de Tlaxcala. Tesis de licenciatura. 171.

Nesic S., Grubic G., Adamovic M., Đorđević N., Stojanovic B. y Boickovic A. 2010. Uso de la zeolita como absorbente de la zearalenona en la nutrición de terneros. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 44(3), 227-232.

Orozco-Cortés, P., Flores-Ortiz, C.M., Portilla, L., Medrano, J., Rodríguez-Peña, O. 2023. Molecular Docking and In Vitro Studies of Ochratoxin A (OTA) Biodetoxification Testing Three Endopeptidases. *Molecules*. 28. 2019. 10.3390/molecules28052019.

Ott J 1976 Psycho-mycological studies of Amanita-from ancient sacrament to modern phobia. *Journal of Psychedelic Drugs* 8(1): 27–350.

Padmaja R., Arun P. C., Prashanth D., Deepak M., Amit A. y Anjana M. 2002. Brine shrimp lethality bioassay of selected Indian medicinal plants. *Fitoterapia*, 73(6): 508-510.

Palomino, N. A. 1990. Etnomicología Tlahuica de San Juan Atzingo, Estado de México. Tesis de licenciatura. 127.

Pérez-Moreno, J., Lorenzana-Fernández, A., Carrasco-Hernández, V. y Yescas-Pérez, A. 2010. Los hongos comestibles silvestres del parque nacional Izta-Popo, Zoquiapan y anexos. Montecillo, Texcoco, Estado de México: Colegio de Postgraduados, SEMARNAT, CONACyT.

Pérez, S. E., Herrera, T. y Guzmán, G. 1970. Introducción al estudio de los macromicetos tóxicos de México. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 4.

Pérez, S. E., Esqueda, M. y Herrera, T. 2008. Macromicetos tóxicos de Sonora, México. *Revista mexicana de micología*, 28(spe), 81-88.

Pérez, S. E, Herrera, T. y Ocampo, L. A. 2011. Nuevos registros de macromicetos para el municipio de Temascaltepec, Estado de México. *Revista mexicana de micología*, 34, 23-30.

Phillips, T., Kubena, L., Harvey, R., Taylor, D. y Heidelbaugh, N. 1988. Hydrated Sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxins. *Poultry Sci.* 67: 243-247.

Piqueiras J. 1989. Hepatotoxic mushroom poisoning: Diagnosis and management. *Mycopathologia* 105: 99-110.

Pomilio, A. B., Battista, S. M. y Alonso, Á. 2019. Micetismos. Parte 2: Síndromes con sintomatología demorada y latencia muy larga. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 53(1), 79-107.a

Pomilio, A. B., Battista, S. M. y Alonso, Á. 2019. Micetismos. Parte 3: Síndromes tempranos gastrointestinales. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 53(2), 217-244.b

Repke D, Leslie D., Kish N., 1978. GLC--mass spectral analysis of fungal metabolites. *J Pharm Sci.* 1978 Apr;67(4):485-7. doi: 10.1002/jps.2600670412. PMID: 565401.

- Ruíz, J. 2001. El asombroso mundo de los hongos. Departamento de Ingeniería Genética de la Unidad Irapuato del Cinvestav. Irapuato, México. *Avance y perspectiva*, 20: 275-281.
- Rydin, H., Diekmann, M., y Hallingback, T. 1997. Biological Characteristics, Habitat Associations, and Distribution of Macrofungi in Sweden. Características Biológicas, Asociaciones de Hábitat y Distribución de Macrohongos en Suecia. *Conservation Biology*, 11(3), 628–640.
- Sánchez, D. R., Zavala, J. T., Vega, J. T. S. y García, H. M. 1999. Los micetismos y su relevancia en medicina. *Rev Iberoam Micol*, 16, 121-125.
- Sánchez, L. y Neira, A. 2006. Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava* L. y *Psidium guineense*. *SW. Cultura científica (Fundación Universitaria Juan de Castellanos)*, 40-45.
- Satora, L., Pach, D., Butryn, B., Hydzik, P. y Balicka-Ślusarczyk, B. 2005. Fly agaric (*Amanita muscaria*) poisoning, case report and review. *Toxicon* 45(7): 941–943.
- Serrano, E., García, A. y Murguía, P. 1998. “Intoxicación por hongos macroscópicos”. *Epidemiología*, 15(1), pp. 1-4.
- Singh, K., Kumari, A. 2022. Management Strategies. In: *Mycotoxins and Mycotoxicoses*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-2370-8_9.
- Sierra, C. L. J., Ramírez, J. S., Cortés-Calva, P., Cámara, A. B. S., Dávalos, L. I. Í. y Ortega-Rubio, A. 2014. México país megadiverso y la relevancia de las áreas naturales protegidas. *Investigación y ciencia*, 22(60), 16-22.
- Stebelska, K. 2013 Fungal hallucinogens psilocin, ibotenic acid, and muscimol. *Therapeutic Drug Monitoring* 35(4): 420–442.
- Stříbrný, J., Sokol, Mi., Merová, B., Ondra, P. 2011. GC/MS determination of ibotenic acid and muscimol in the urine of patients intoxicated with *Amanita pantherina*. *International journal of legal medicine*. 126. 519-24. [10.1007/s00414-011-0599-9](https://doi.org/10.1007/s00414-011-0599-9).
- Talamoni, M., Cabrerizo, S., Cari, C., Diaz, M., Ortiz de Rozas, M. y Sager, I. 2006. Intoxicación por *Amanita phalloides*, diagnóstico y tratamiento. *Archivos argentinos de pediatría*, 104(4), 372-374.

Thimm, N., Schwaighofer, B., Ottner, F., Fröschl, H., Greifenender, S. y Binder, E. 2001. *Adsorption of mycotoxins. Mycotoxin Research*, 17(S2), 219–223.

Tsunoda, K., Inoue, N., Aoyagi, Y. y Sugahara, T. 1993. Simultaneous analysis of ibotenic acid and muscimol in toxic mushroom, *Amanita muscaria*, and analytical survey on edible mushrooms, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 34, 12–17.

Tulloss, R. 2005 *Amanita* distribution in the Americas with comparison to eastern and southern Asia and notes on spore character variation with latitude and ecology. *Mycotaxon* 93: 189–231.

Tsujikawa, K., Mohri, H., Kuwayama, K., Miyaguchi, H., Iwata, Y., Gohda, A., Fukushima, S., Inoue, H., Kishi, T. 2006. Analysis of hallucinogenic constituents in *Amanita* mushrooms circulated in Japan. *Forensic science international*. 164. 172-8. 10.1016/j.forsciint.2006.01.004.

Vega-Villasante F., Ruiz-González L. E., Guerrero-Galván S. R., Guzmán-Dávalos L. 2013. Evaluación de la toxicidad de *Psilocybe cubensis* (Agaricales, Basidiomycota) sobre *Artemia franciscana* (Crustacea, Anostraca). *Rev Iberoam Micol.*; 30:54–6.

Vila, D. P., Marín, S. S., Sanchís, A. V. y Ramos, G. A. J. 2017. Evaluación de nuevos adsorbentes multimicotoxínicos basados en bentonitas para alimentación animal. *Revista de Toxicología*, vol. 34, núm. 1, p. 21.

Voynova, M., Shkondrov, A., Kondeva-Burdina, M. y Krasteva, I. 2020. Toxicological and pharmacological profile of *Amanita muscaria* (L.) Lam. a new rising opportunity for biomedicine. *Pharmacia* 67(4): 317–323.

Yáñez, J. H. y Radigales, J. R. 2008. Intoxicación por setas.