



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

***Lactarius indigo* (Schwein.) Fr. (RUSSULACEAE): ETNOMICOLOGÍA, QUÍMICA Y  
FARMACOLOGÍA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**KARLA PAOLA GARCÍA CRUZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RICARDO REYES CHILPA**  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. ADRIANA MONTOYA ESQUIVEL**  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

**DR. SIGFRIDO SIERRA GALVÁN**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., NOVIEMBRE, 2021**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

***Lactarius indigo* (Schwein.) Fr. (RUSSULACEAE): ETNOMICOLOGÍA, QUÍMICA Y  
FARMACOLOGÍA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**KARLA PAOLA GARCÍA CRUZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RICARDO REYES CHILPA**  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. ADRIANA MONTOYA ESQUIVEL**  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

**DR. SIGFRIDO SIERRA GALVÁN**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2021**

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

OFICIO CPCB/975/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión virtual del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **23 de agosto de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **BIOLOGÍA EXPERIMENTAL** de la estudiante **GARCIA CRUZ KARLA PAOLA** con número de cuenta **310015860** con la tesis titulada "**Lactarius indigo (Schwein.) Fr. (RUSSULACEAE): ETNOMICOLOGÍA, QUÍMICA Y FARMACOLOGÍA**", realizada bajo la dirección del **DR. RICARDO REYES CHILPA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO  
Vocal: DR. SOL CRISTIANS NIIZAWA  
Vocal: DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ  
Vocal: DRA. SILVIA LAURA GUZMÁN GUTIÉRREZ  
Secretario: DR. SIGFRIDO SIERRA GALVÁN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de octubre de 2021

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria  
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pbiol.posgrado.unam.mx/>

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM**, por la oportunidad de ingresar a su programa de posgrado, por proporcionarme los medios necesarios para cursar la Maestría y concluir este proyecto de manera satisfactoria.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo otorgado a través del Programa de Becas Nacionales, CVU # 925070, el cual fue indispensable para realizar mis estudios. También por la beca otorgada como "Ayudante de Investigador Nacional Nivel 3" por parte del Dr. Ricardo Reyes Chilpa que me permitió concluir con esta tesis.

A los **proyectos "Química, farmacología y botánica de las plantas del Códice De la Cruz Badiano de 1552" y "Filogenómica, química, farmacología y propagación del laurel mexicano (*Litsea spp.*, Lauraceae): un estudio interdisciplinario para su aprovechamiento sustentable"**. DGAPA-PAPIIT-UNAM IG200418 e IG-200321, por el apoyo en reactivos y materiales para realizar este proyecto.

Al Tutor Principal: **Dr. Ricardo Reyes Chilpa**

A los miembros del comité tutor:

**Dra. Adriana Montoya Esquivel**

**Dr. Sigfrido Sierra Galván**

## AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al **Dr. Ricardo Reyes Chilpa**, por abrirme las puertas de su laboratorio 2-4 de Productos Naturales, en el Instituto de Química. Por aceptar dirigir esta tesis, por su valiosa asesoría, confianza y apoyo en la realización de esta tesis. Sobre todo, por hacer más amplios mis conocimientos en biología y química.

A la **Dra. Adriana Montoya Esquivel**, del Laboratorio de Biodiversidad, Centro de investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Por su confianza, disposición, apoyo y asesoría en temas de etnomicología que fueron de gran importancia en la realización de esta tesis.

**Dr. Sigfrido Sierra Galván**, del Laboratorio de Taxonomía de Hongos Tremeloides de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Por su confianza, apoyo y asesoría taxonómica y biológica que ayudaron en la realización de esta tesis.

Al **Dr. Francisco Javier Pérez Flores**, del Laboratorio de Espectrometría de Masas en el Instituto de Química, UNAM. Por su apoyo técnico y disposición en la realización del método de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

A la **M. en C. Mayra León Santiago**, del Laboratorio Nacional para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC). Por su apoyo técnico en la realización del método de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

A la **Dra. Daniela Araiza Olivera Toro**, del Laboratorio de Química de Biomacromoléculas 3 del Instituto de Química de la UNAM. Por su gran apoyo, amable atención y asesoría en las determinaciones de actividad citotóxica frente a las líneas celulares tumorales.

Al **M. en C. Antonio Nieto**, del Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM. Por su gran apoyo y asesoría en la evaluación de la actividad antiinflamatoria mediante el modelo de edema inducido con TPA.

A la **Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez**, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Por su gran ayuda, sugerencias, consejos y asesoría en la realización de esta tesis.

Al laboratorio 2-4 del Instituto de Química UNAM: Dr. Alfredo López Caamal, Biol. Jessica Karina Díaz Canton, M. en C. Dulce Yehimi Lopez Miranda, Dr. Felix Krengel, Dr. Jorge Iván Castillo Arellano y Dra. Karla Daniela Rodríguez Hernández, por su grata compañía, amabilidad y apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del comité sinodal:

**Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero**

**Dr. Sol Cristians Niizawa**

**Dra. Rosa Ventura Martínez**

**Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez**

**Dr. Sigfrido Sierra Galván**

## DEDICATORIA

*A mi familia, por su amor y apoyo.*

*A mis padres Julieta Cruz y Álvaro García.*

*A mi esposo Gustavo Sánchez.*

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
1.1. ABSTRACT .....	3
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>3. ANTECEDENTES.....</b>	<b>7</b>
3.1. GÉNERO <i>LACTARIUS</i> .....	7
3.1.1. <i>Química del Género Lactarius</i> .....	7
3.1.2. <i>Farmacología del género Lactarius</i> .....	9
3.2. <i>LACTARIUS INDIGO</i> (SCHWEIN.) FR. ....	9
3.2.1. <i>Química</i> .....	11
3.2.2. <i>Farmacología</i> .....	12
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>12</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
5.1. OBJETIVO GENERAL .....	13
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	13
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
6.1. RECOLECTAS DE BASIDIOMAS.....	14
6.2. DETERMINACIÓN TAXONÓMICA .....	15
6.3. ANÁLISIS QUÍMICO .....	15
6.3.1. <i>Obtención de extractos orgánicos</i> .....	15
6.3.2. <i>Análisis por cromatografía de capa fina (CCF)</i> .....	15
6.3.3. <i>Cromatografía líquida al vacío (CLV)</i> .....	16
6.3.4. <i>Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)</i> .....	16
6.3.5. <i>Cromatografía en columna (CC)</i> .....	17
6.3.6. <i>Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP)</i> .....	18
6.3.7. <i>Caracterización por resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono (RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C) de los compuestos obtenidos.</i> .....	18
6.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA .....	20
6.4.1. <i>Ensayo citotóxico basado en el MTT</i> .....	20
6.4.2. <i>Actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA</i> .....	26
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
7.1. ETNOMICOLOGÍA DE <i>L. INDIGO</i> .....	27
7.2. DETERMINACIÓN TAXONÓMICA .....	29
<i>Lactarius indigo</i> (Schwein.) Fr. : .....	29
7.3. ANÁLISIS QUÍMICO .....	31
7.3.1. <i>Extracción</i> .....	31
7.3.2. <i>Cromatografía en Capa Fina (CCF)</i> .....	32
7.4. ESTUDIO BIODIRIGIDO: ACTIVIDAD CITOTÓXICA .....	34
7.4.1. <i>Cromatografía en Columna Flash</i> .....	35
7.4.2. <i>Análisis por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM)</i> .....	38
7.4.3. <i>Resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono (RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C)</i> .....	43
7.4.4. <i>Actividad anti-inflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA</i> .....	45
7.5. ESTUDIO BIODIRIGIDO: ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA.....	46
7.5.1. <i>Análisis por Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas (CG-EM)</i> .....	46
7.5.2. <i>Cromatografía en Columna</i> .....	50
7.5.3. <i>Actividad anti-inflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA</i> .....	51
7.5.4. <i>Análisis por Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas (CG-EM)</i> .....	52

7.5.5.	<i>Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP)</i> .....	54
7.5.6.	<i>Resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono (RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C)</i> .....	55
8.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>58</b>
9.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>64</b>
10.	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>65</b>
11.	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>66</b>
12.	<b>ANEXOS</b> .....	<b>72</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>µL</b>	Microlitro
<b>A2</b>	Fracción 2 del extracto de acetato de etilo
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>AS1</b>	Subfracción 1 del extracto de acetato de etilo
<b>AS2</b>	Subfracción 2 del extracto de acetato de etilo
<b>CC</b>	Cromatografía en columna
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina
<b>CCFP</b>	Cromatografía en capa fina preparativa
<b>CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub></b>	Acetona deuterada
<b>CDCL<sub>3</sub></b>	Cloroformo deuterado
<b>CG-EM</b>	Cromatografía de gases- acoplado a espectrometría de masas
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Diclorometano
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo
<b>CLV</b>	Cromatografía líquida al vacío
<b>COS</b>	Línea celular no tumoral de riñón de mono verde africano
<b>d</b>	Doble
<b>dd</b>	Doble de doble
<b>DE<sub>50</sub></b>	Dosis efectiva 50
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetra-acético
<b>EM</b>	Espectrometría de masas
<b>FCME</b>	Colección de Macromicetos del Herbario de la Facultad de Ciencias
<b>g</b>	Gramo
<b>HCT</b>	Cáncer de colon
<b>HeLa</b>	Cáncer cervicouterino
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria media
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<b>KCl</b>	Cloruro de Potasio
<b>kg</b>	kilogramo
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato monopotásico
<b>KOH</b>	Hidróxido de potasio
<b>L</b>	Litro
<b>m</b>	Múltiple
<b>m/z</b>	Relación masa/carga
<b>M+</b>	Masa del ion molecular
<b>MBC</b>	Actividad bacteriana mínima
<b>MCF7</b>	Cáncer de mama
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligramo
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>MIC</b>	Concentración mínima de inhibición

<b>mL</b>	Mililitro
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O</b>	Fosfato de sodio dibásico heptahidratado
<b>NaCl</b>	Cloruro de Sodio
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos
<b>Posc.</b>	Posición
<b>q</b>	Cuadruple
<b>REMA</b>	Métodos Alternativos a la experimentación animal
<b>RMN <sup>1</sup> H</b>	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
<b>RMN <sup>13</sup> C</b>	Resonancia magnética nuclear de carbono
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>RSF</b>	Fibroblastos de suero de conejo
<b>s</b>	Simple
<b>SFB</b>	Suero bovino fetal
<b>SKLU-1</b>	Cáncer de pulmón
<b>TPA</b>	13-acetato de 12-tetradecanoilforbol
<b>TR</b>	Tiempo de retención
<b>UV</b>	Ultra Violeta
<b>Vero</b>	Células epiteliales de riñón de mono verde africano

# 1. RESUMEN

Se estudió etnomicológica, química y farmacológicamente a la especie fúngica *Lactarius indigo* (Russulaceae), a la cual se le conoce popularmente como "hongo azul", esto debido a la presencia de sustancias coloridas llamadas azulenos (sesquiterpenos de tipo guayano) que le dan ese color tan característico a sus basidiomas y especialmente a su látex. *Lactarius indigo* forma micorrizas con pinos y encinos y sus basidiomas se pueden encontrar durante el otoño, con las primeras lluvias del mes de junio y hasta septiembre.

Se realizó una revisión bibliográfica de los estudios etnomicológicos para esta especie, se abarcaron nueve grupos étnicos y se identificaron 44 nombres locales que hacen referencia a ciertas características del basidioma, como lo es la forma y el color principalmente. Se observó que esta especie es empleada como alimento y con fines medicinales en el Estado de México, Chiapas, Tlaxcala e Hidalgo, para el tratamiento de diversas afecciones, principalmente del sistema digestivo y urinario.

Ejemplares de esta especie se recolectaron en una localidad del estado de Tlaxcala y en tres localidades del Edo. de México para obtener los extractos hexánicos, de diclorometano-metanol (1:1), metanólicos y de acetato de etilo y evaluar su actividad citotóxica sobre tres líneas tumorales humanas: cáncer cervicouterino (HeLa), cáncer de colon (HCT) y cáncer de pulmón (SKLU-1) y su actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA (13-acetato de 12-tetradecanoilforbol). Los extractos con actividad citotóxica y antiinflamatoria se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y los compuestos presentes se separaron mediante cromatografía en columna (CC) y cromatografía en capa fina preparativa (CCFP), la identificación de los compuestos activos presentes se realizó mediante resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN  $^1\text{H}$ ) y espectrometría de masas (EM). El extracto de acetato de etilo fue el único que presentó un efecto citotóxico a las concentraciones evaluadas (1.56-50 ng/mL), de este extracto se obtuvo una subfracción AS1, la cual presentó una actividad citotóxica relevante en la línea tumoral humana HeLa, con una concentración inhibitoria media ( $\text{IC}_{50}$ ) de 40.46 ng/mL  $\pm$  3.17. La

actividad citotóxica de la subfracción AS1 se podría deber a un sinergismo o potenciación de los compuestos que la conforman: ácido esteárico y un compuesto desconocido con  $m/z = 396/60$  (relación masa/carga:  $M^+$ /pico base). En cuanto a la actividad antiinflamatoria, la fracción 40 del extracto hexánico mostro la mayor actividad antiinflamatoria, con un 74% de inhibición, la cual se podría deber al azuleno presente identificado como lactaroviolin. Tanto el ácido esteárico como el lactaroviolin, han sido previamente reportados en *L. deliciosus*.

Los resultados obtenidos indican que algunos compuestos existentes en los basidiomas de *L. indigo*, presentan actividad citotóxica contra la línea tumoral humana de cáncer cervicouterino (HeLa) y actividad antiinflamatoria. Por lo que sería necesario continuar con las investigaciones enfocadas al aislamiento, identificación y evaluación de la actividad citotóxica y antiinflamatoria particular de los compuestos ya mencionados, además de elucidar su mecanismo de acción y su selectividad a ciertas células tumorales.

## 1.1. ABSTRACT

The fungal species *Lactarius indigo* (*Russulaceae*), which is popularly known as "blue mushroom", was studied ethnomycologically, chemically and pharmacologically, due to the presence of colored substances called azulenes (guayan-type sesquiterpenes) responsible of the characteristic color of its basidiomata and especially its latex. *Lactarius indigo* forms mycorrhizae with pines and oaks and its basidiomata can be found during the autumn, after the first rains of June and until September.

A bibliographic review of ethnomycological studies for this species was carried out. Nine ethnic groups were included, and 44 local names were identified that refer to certain characteristics of the basidioma, mainly shape and color. This species is used as food and for medicinal purposes in the State of Mexico, Chiapas, Tlaxcala, and Hidalgo, for the treatment of several diseases, mainly of the digestive and urinary systems.

Specimens of this species were collected in a locality in the State of Tlaxcala and in three localities in the State of Mexico. Their hexane, dichloromethane-methanol (1:1), methanol and ethyl acetate extracts were prepared and evaluated for their cytotoxic activity on three human tumor lines: cervical cancer (HeLa), colon cancer (HCT) and lung cancer (SKLU-1). Its anti-inflammatory activity was also examined in the model of edema induced with TPA (12-tetradecanoylphorbol 13-acetate). The extracts with cytotoxic and anti-inflammatory activity were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Several compounds were separated by column chromatography (CC) and preparative thin-layer chromatography (CCFP). The identification of the pharmacological active compounds was performed using Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H}$  NMR) and Mass Spectrometry (MS). Only the ethyl acetate extract showed cytotoxic effect at the evaluated concentrations (1.56-50 ng/mL). From this extract the AS1 subfraction was obtained, and presented relevant cytotoxic activity in the human tumor line HeLa, with a mean inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of 40.46 ng/mL  $\pm$  3.17. The cytotoxic activity of the AS1 subfraction could be due to a synergism or enhancement of the compounds that comprise it: stearic acid and an unknown compound with  $m/z = 396/60$  (mass/charge ratio:  $\text{M}^+$ /base peak). Regarding the anti-inflammatory

activity, fraction 40 of the hexane extract showed the highest anti-inflammatory activity, with 74% inhibition, which could be due to an azulene identified as lactaroviolin. Both stearic acid and lactaroviolin have been previously reported in *L. deliciosus*.

The obtained results indicate that some compounds of *L. indigo* basidiomas have cytotoxic activity against the human tumor line of cervical cancer (HeLa) and anti-inflammatory activity. Therefore, it would be necessary to continue the research focused on the isolation, identification and evaluation of the particular cytotoxic and anti-inflammatory activity of the aforementioned compounds, in addition to elucidating their mechanisms of action and their selectivity to certain tumor cells.

## 2. INTRODUCCIÓN

Para diversos grupos étnicos los hongos juegan un papel muy importante, ya que han sido utilizados con fines medicinales, comestibles, lúdicos y mágico-religiosos. Sin embargo, el amplio conocimiento que presentan estos grupos étnicos sobre los diversos usos de muchas especies de hongos ha sido insuficientemente documentado, esto aunado a diversos factores, como lo son: la prohibición de la comercialización de hongos comestibles debido a la ingesta de hongos tóxicos, la destrucción de bosques y la pérdida del conocimiento tradicional que se hereda de generación en generación.

En lo que respecta a los hongos medicinales, existen pocos estudios etnomicológicos sobre los hongos en la medicina tradicional mexicana. En el trabajo de Guzmán (2008) se calculaba que existían más de 70 especies de hongos, incluyendo líquenes utilizados en la medicina tradicional mexicana, tan solo para los 10 grupos étnicos estudiados. Bautista-González y Moreno-Fuentes (2014), aumentan la cifra de hongos medicinales presentando un listado de 200 especies fúngicas con 138 usos específicos en la medicina tradicional. La forma de administración de los hongos es tópica, nasal, oftalmológica y oral, siendo esta última la más común y se refiere al consumo de hongos comestibles preparados en caldo.

Los hongos comestibles silvestres son un recurso forestal, alimenticio y económico muy importante (Garibay-Orijel *et al.* 2009) además son considerados genuinos nutraceuticos o alimentos funcionales, por su contenido nutricional: alto en proteínas y fibra, aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y bajo en grasas. Todo ello reduce el riesgo de contraer enfermedades y mejora la salud (Piqueras, 2004). Garibay-Orijel y Ruan-Soto (2014) reportaron 371 taxones de macromicetos silvestres comestibles de 1980 y hasta 2014, colocando así a México como el segundo país con el mayor número de hongos silvestres usados como alimento, solo después de China. De las 371 especies, 229 son ectomicorrízicas y llegan a alcanzar altos precios en el mercado (Bandala *et al.*, 1996; Méndez *et al.*, 2001; Montoya-Esquivel *et al.*, 2001), dentro de las especies que han sido citadas en mayor número de ocasiones, *Lactarius indigo* se encuentra en el tercer sitio.

Además de la falta de información sobre el uso tradicional de hongos medicinales en México, la validación científica de este conocimiento ancestral ha sido poco desarrollada en el país, esto en cuanto a estudios químicos y farmacológicos que sustenten el uso medicinal de dichas especies. Sin embargo, en la última década este tipo de estudios ha emergido en el mundo, ya que datos científicos han documentado que los hongos representan una fuente ilimitada de moléculas bioactivas con potencial para el descubrimiento y desarrollo de fármacos. Esto se ve reflejado en la revisión de De Silva *et al.* (2013), en la cual compilan información sobre los metabolitos bioactivos de macromicetos, a partir de estudios etnofarmacológicos, de composición química y actividad biológica.

Entre los macromicetos destacan los hongos basidiomicetos (Phylum Basidiomycota, subdivisión Agaricomycotina), como productores de diversas moléculas bioactivas, tales como: flavonoides, alcaloides, polisacáridos, esteroides, acetilenos, glicolípidos, policetonas, nucleósidos, terpenos (sesquiterpenos, diterpenos y terpenoides), las cuales presentan efectos antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, antioxidantes, antitumorales, inmunoestimulantes, citotóxicos, antiinflamatorios, antihipertensivos, antiolesterolémicos y cardiotónicos (Brizuela *et al.*, 1998; Wasser y Weis, 1999; Barranco *et al.*, 2010). De entre los efectos terapéuticos más investigados en los hongos Basidiomycota, se encuentran aquellos que presentan actividad antitumoral (Daba y Ezeronye, 2003), siendo este un eje de investigación prometedor para los hongos medicinales.

De acuerdo con la OMS, el cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se refiere a «tumores malignos» o «neoplasias malignas». Una característica definitoria del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden propagarse a otros órganos (metástasis). Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer. Sin embargo, un porcentaje importante de cánceres pueden tratarse mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia, especialmente si se detectan en una fase temprana (OMS, 2020). El cáncer es un problema de salud pública mundial y se estima que el número de casos aumentará aproximadamente en un 62%, alcanzando los 29 millones por año para 2040. El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, esto plantea una amenaza de rápido crecimiento para los sistemas de salud y la economía a nivel mundial. De esta manera existe una demanda creciente de terapias anticancerígenas que sean más eficientes.

Diversos tipos de cáncer surgen de sitios de infección, irritación crónica e inflamación, por lo que un factor etiológico importante para su desarrollo es la inflamación crónica (Coussens y Werb, 2002; Balkwill *et al.*, 2005; Baniyash, 2006; Lin y Karin, 2007), ya que puede inducir una infección persistente dentro del huésped, donde los leucocitos y otras células fagocíticas generan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno para combatir la infección, sin embargo, estas especies reactivas forman peroxinitrito, un agente mutagénico que induce daños en el DNA de células en proliferación, por lo que se generan alteraciones genómicas permanentes. Al inicio del proceso neoplásico, las células inflamatorias son potentes promotores tumorales, inducen la proliferación celular, facilitan la inestabilidad genómica y promueven la angiogénesis. Por lo que, en el microambiente tumoral, las células inflamatorias son indispensables en el proceso neoplásico, ya que fomentan la proliferación, la supervivencia y la migración. Un ejemplo claro se encuentra en la carcinogénesis de colon, la cual surge en individuos con enfermedades inflamatorias del intestino, por ejemplo, colitis ulcerosa crónica y enfermedad de Crohn. Otros tipos de cáncer asociados a inflamación son: el cáncer de pulmón y el cáncer cervicouterino (Coussens y Werb, 2002).

### 3. ANTECEDENTES

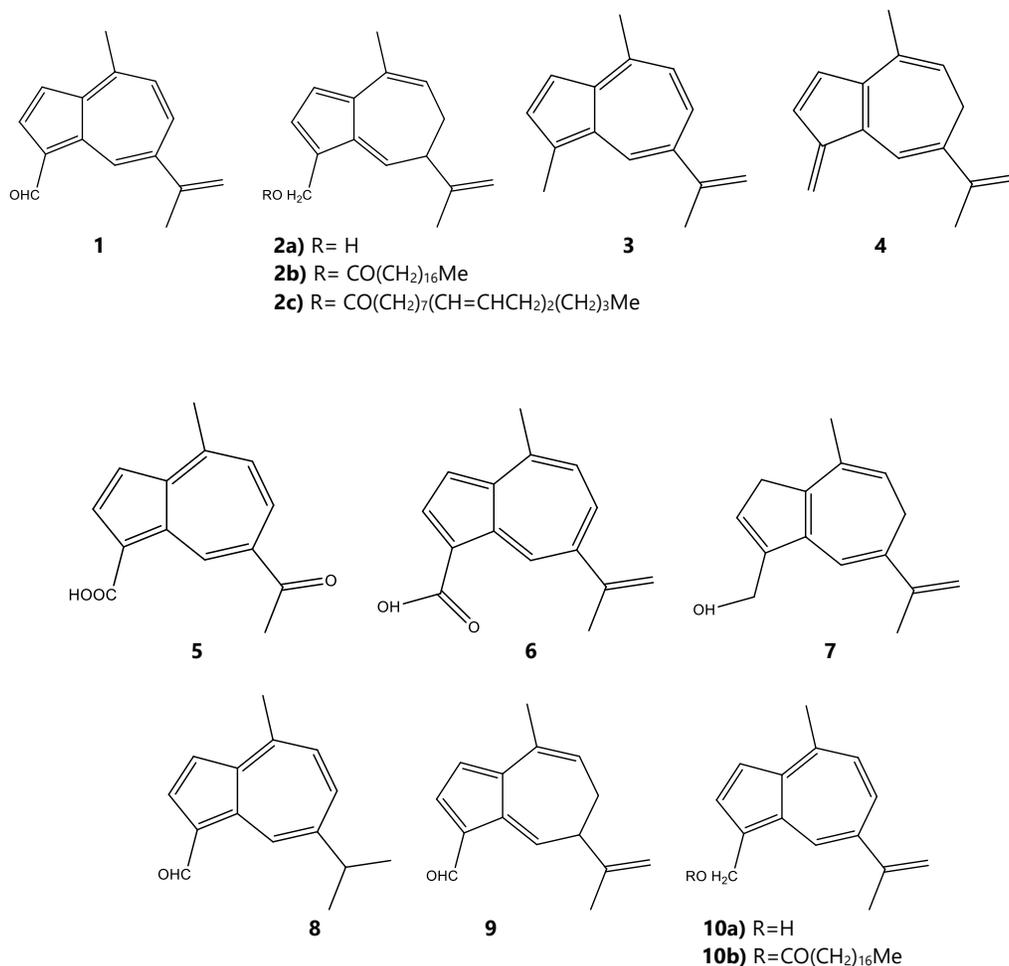
#### 3.1. Género *Lactarius*

El género *Lactarius* de la familia Russulaceae, pertenece al phylum Basidiomycota. Una característica general y de gran importancia taxonómica para el género, es la presencia de un látex que se puede observar al trozar los basidiomas. El color y sabor de este látex varía de acuerdo con la especie. Dentro del género *Lactarius* existen especies comestibles y medicinales. Boa (2004) reporta 38 especies comestibles y 7 medicinales en 39 países, de los cuales en 17 de ellos está comprobado su consumo como alimento, por lo que varias especies se venden con frecuencia en los mercados locales. *L. deliciosus*, es una especie es muy apreciada como alimento. El nombre *chinananacatl* (náhuatl, "champiñón con chile") o enchilado se utiliza para múltiples especies de *Lactarius*, incluyendo principalmente al complejo *L. deliciosus* (Pérez-Moreno *et al.*, 2008).

##### 3.1.1. Química del Género *Lactarius*

Se ha demostrado previamente que el color del látex de los cuerpos fructíferos de distintas especies del género *Lactarius* se debe a sesquiterpenos (terpenos de quince átomos de carbono) de tipo guayano, conocidos como azulenos. Para *L. deliciosus*, se ha aislado lactaroviolin (**1**) (Heilbronner y Schmid, 1954), el alcohol dihidroazuleno libre (**2a**), así como su éster de ácido esteárico (**2b**) (Vokáč *et al.*, 1970), el lactarazuleno (**3**) (Šorm *et al.*, 1954), el lactarofulveno (**4**) (Bertelli y Crabtree, 1968), el ácido 7-acetil-4-metilazuleno-1-carboxílico (**5**) (Yang, *et al.*, 2006), el ácido 7-isopropenil-4-metil-azuleno-1-carboxílico (**6**) y el 15-hidroxi-3,6-dihidrolactarazuleno (**7**) (Tala *et al.*, 2017). Por otro lado, para *L. deterrimus* se ha identificado el 1-formil-4-metil-7-isopropil azuleno (11,12-dihidro-lactaroviolin) (**8**) (Koul *et al.*, 1985) (**Figura 1**).

No obstante, tanto para *L. deliciosus* como para *L. deterrimus*, el látex es de color naranja y eventualmente se vuelve verde. Este fenómeno fue estudiado por Bergendorff y Sterner (1988), quienes reportaron la presencia de un único sesquiterpeno con dos ésteres de ácidos grasos, mediante la extracción en hexano de especímenes completos y jóvenes, donde el componente principal en ambas especies fue el éster de ácido esteárico (**2b**) y se sugiere como componente menor el éster de ácido linoleico (**2c**). Por otro lado, al obtener extractos hexánicos de los basidiomas molidos, obtuvieron diferentes productos, algunos de los cuales ya habían sido reportados (**1**, **2a** y **3**) y dos más llamados "Delicial" (1-formil-6,7-dihidro-4-metil-7-isopropenil azuleno) (**9**), y "Deterrol" (1-hidroximetil-4-metil-7-isopropenil azuleno) (**10a**) (**Figura 1**).



**Figura 1:** Sesquiterpenos de tipo guayano (azulenos) obtenidos de especies del género *Lactarius*.

Sin embargo, la mayoría de las especies de *Lactarius* que se han investigado carecen de sesquiterpenos de guayano, ya que muchos tienen un látex incoloro con un intenso sabor picante, debido a la presencia de sesquiterpenos de dialdehído insaturado con esqueletos marasmano, lactarano y secolactarano. Los dialdehídos insaturados picantes se forman enzimáticamente a partir de un sesquiterpenoide precursor (un éster de ácido graso de un sesquiterpeno marasmano) como respuesta a la lesión de los basidiomas (Sternner *et al.*, 1985).

Se ha sugerido que la formación y transformación de sesquiterpenos protege a los basidiomas contra parásitos y mamíferos, por lo que podrían ser parte de un "sistema de defensa químico" (Camazine *et al.*, 1983).

Además de sesquiterpenos, en las especies del género *Lactarius* también se han detectado ácidos grasos, como lo es el ácido esteárico, el ácido oleico, el ácido linoleico y el ácido palmítico (Koul *et al.*, 1985; Altuntaş *et al.*, 2016). Así como fenoles, flavonoides (Barros *et al.*, 2007) y ácidos fenólicos (Dundar *et al.*, 2016).

### 3.1.2. Farmacología del género *Lactarius*

En cuanto a la actividad biológica, los extractos metanólicos de los basidiomas del género *Lactarius* tienen actividad antimicrobiana (Dulger *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2007), antioxidante (Dundar *et al.*, 2016), citotóxica (Kosanić *et al.*, 2016) y antígeno tóxica (Mlinarić *et al.*, 2004). Por otro lado, los extractos clorofórmico y etanólico de los basidiomas de *L. vellereus*, presentan actividad antifúngica, contra *Fusarium inflexum* y *Fusarium heterosporium* (Guler *et al.*, 2009). También, algunos compuestos aislados de los basidiomas, como los alcoholes sesquiterpénicos, han presentado actividades inmunomoduladoras, citotóxicas y antivirales (Krawczyk *et al.*, 2003, 2005, 2006); mientras que, los dialdehídos insaturados, que se forman enzimáticamente como respuesta a la lesión de los basidiomas, poseen potentes actividades antibióticas y antialimentarias (Sterner *et al.*, 1985).

### 3.2. *Lactarius indigo* (Schwein.) Fr.

*Lactarius indigo* fue descrito por Fries en 1838, con la siguiente clasificación:

Reino: Fungi  
Phylum: Basidiomycota  
Clase: Agaricomycetes  
Orden: Russulales  
Familia: Russulaceae  
Género: *Lactarius*  
Especie: *L. indigo* (Schwein.) Fr.

De acuerdo con Kong (1995), *L. indigo* es un hongo micorrízico con basidioma solitario a subgregario. Píleo de 6 a 12.5 cm de diámetro, convexo, deprimido en el centro, margen glabro, no estriado, incurvado ondulado; superficie cerosa, viscosa o seca, radialmente rugulosa, de color blanco azulado, gris azulado, azul pálido, azul grisáceo claro o azul, con zonaciones de color azul oscuro, desarrollando tonos de color verde grisáceo o verde opaco al madurar. Se mancha de color azul al corte debido al látex y después de color verde, olor suave, fúngico, ligeramente lactarioide o afrutado; sabor suave, ligeramente amargo-astringente. Látex de color azul oscuro al ser exudado.

Laminas adheridas a decurrentes, muy juntas, con numerosas lamélulas. Color azul pálido, azul o azul grisáceo, con tonos de color más pálido o crema hacia el borde; borde entero. Esporada de color crema. Estípites de 2-6 x 1.3-3.1 cm, cilíndrico, central; superficie seca, lisa-pruinosa o rugulosa, pruinosa en el ápice; de color azul pálido o azul, con las escrobículas de color más oscuro y el ápice de color blanquecino azulado, sólido a hueco. Basidiosporas de 6.5-8.7 x 4.9-6.6 µm, elípticas a ovoides, con ornamentación amiloide. Basidios de 37-68 x 7.1-

10.3  $\mu\text{m}$ , subcilíndricos a claviformes, con cuatro esterigmas. Cistidios: pleurocistidios de 35-70 x 5-9  $\mu\text{m}$ , fusiformes, ápice mucronado, contenidos de color pardo a pardo amarillento. Pseudocistidios de 3.6-15.8  $\mu\text{m}$  de ancho, claviformes a cilíndricos, ápice obtuso o mucronado, contenidos de color pardo o pardo amarillento (**Figura 2**).



**Figura 2:** Ejemplares de los basidiomas de *L. indigo* recolectados en San Juan Atzingo, Municipio de Ocuilan Edo. de México (en la parte superior), en San Francisco Temezontla, Municipio de Panotla, Tlaxcala (en la parte central) y en Valle de Bravo, Edo. de México (en la parte inferior). A) Hábito de crecimiento. B) Detalle de un corte en las láminas: se observa el látex de color azul intenso. C) Detalle de las láminas D) Detalle del estípote. E) Detalle de la unión del píleo con el estípote y F) Corte longitudinal del basidioma que muestra el contexto y el color azul intenso del látex. Fotos: Karla Paola García (2017 y 2018).

*Lactarius indigo* crece en bosques caducifolios y de coníferas, ya que forma micorrizas (ectomicorriza) con pinos y encinos. Se ha reportado en bosque de *Quercus* (bosques mixtos de *Quercus magnoliifolia*, *Q. castanea*, *Q. urbanii*, *Q. rugosa*, *Q. laurina* y *Q. acutifolia*), bosque *Pinus-Quercus* (Santiago *et al.*, 2016) y bosques de encino (*Quercus spp.*) (Montoya *et al.*, 2003). Se distribuye en el este de Norteamérica, el este de Asia (China y Japón) y en Centroamérica (Wu y Mueller, 1997; Hesler y Smith, 1979; Hutchinson, 1991; Montoya y Bandala, 1996). En México, crece en los estados de Hidalgo, Chihuahua, Puebla, Michoacán,

Morelos, Baja California Sur, Ciudad de México, Durango, Oaxaca y Tlaxcala (UNAM, 2018. Portal de datos abiertos).

Los cuerpos fructíferos (basidiomas) se encuentran durante el otoño. Un estudio sobre la aparición estacional de cuerpos fructíferos en los bosques subtropicales de Xalapa, México, confirmó que la producción máxima coincidió con la temporada de lluvias entre junio y septiembre (Chacón y Guzmán 1995).

*Lactarius indigo* es un hongo comestible y tiene un gran valor culinario (Robles *et al.*, 2018, Pérez-Silva *et al.*, 2006), ya que es vendido en mercados locales de Tlaxcala de junio a agosto (Montoya-Esquivel *et al.*, 2001) y en las ciudades de Puebla y de México (Carrera *et al.*, 2005). En pueblos y ciudades pequeñas de la zona centro del país, forma parte de las recolectas a pedido para consumo familiar, ya que son muy apreciados (Pérez-Moreno *et al.*, 2008).

Cabe destacar que en estudios taxonómicos más recientes han surgido evidencias que apoyan la hipótesis de que *L. indigo* es en realidad un complejo de especies (Montoya, datos no pub.), si bien aún no se identifican a detalle las características que delimitan a las especies pertenecientes a este complejo, ni el total de especies de las distintas regiones y países, esta distinción de la variación en la morfología de los basidiomas de *L. indigo* ya ha sido observada (Kong, Ramírez-Terrazo, com. pers. ).

### 3.2.1. Química

Un estudio de los basidiomas de *L. indigo*, realizado en Querétaro mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), reporta la presencia de ésteres metílicos de ácidos grasos libres con los siguientes tiempos de retención y concentraciones en mg/g: ácido mirístico 9-metilo (20.17/.134), ácido palmítico (23.47/3.491), ácido linoleico (28.81/13.276), ácido oleico (29.00/10.757), ácido esteárico (29.83/32.057) y ácido araquidónico (35.74/.213). De los cuales el ácido esteárico con 32.06 mg /g, corresponde al 53.5% del total de grasas libres (León-Guzmán *et al.*, 1997).

Del mismo modo, se ha reportado el contenido fenólico total ( $1.91 \pm 0.23$  mg QE/g), de flavonoides ( $0.25 \pm 0.00$  mg QE/g), ácido ascórbico ( $3.65 \pm 0.00$  mg/g),  $\beta$  glucanos ( $88.34 \pm 3.62$  mg/g) y ácidos clorogénicos ( $222.42 \pm 1.55$   $\mu$ g/g) en un extracto metanólico de los basidiomas de *L. indigo* (López-Vázquez *et al.*, 2017).

*Lactarius indigo* es conocido como "hongo azul", por el característico color azul de sus esporomas. Harmon *et al.*, (1980) demostraron que el color azul profundo del látex de los ejemplares jóvenes se debe a azulenos preexistentes. El pigmento azul soluble en hexano: 1-estearoil oximetilen-4-metil-7-isopropil azuleno (**Figura 1,10b**), fue obtenido a partir de

cromatografía en columna (gel de sílice 60, hexano / acetona 6: 1) de un extracto de acetona del basidioma.

### 3.2.2. Farmacología

Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos y uno acuoso de los basidiomas congelados y liofilizados de *L. indigo*, mediante el método de difusión en agar, con cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae* y *Salmonella enterica* a 10, 20 y 30 mg/disco. El extracto de acetato de etilo inhibió todas las cepas a las tres concentraciones evaluadas, con una mayor actividad contra una cepa de *Escherichia coli*, enterotoxigénica (EIEC) (19.0 mm) y *P. aeruginosa* (21.0 mm) a 30 mg. Igualmente el extracto metanólico inhibió todo el crecimiento bacteriano a las tres concentraciones evaluadas, excepto *E. cloacae*. También se evaluó la actividad citotóxica de los extractos de este hongo, mediante el método de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). El extracto acuoso mostró actividad antiproliferativa contra células MCF7 (cáncer de mama) a concentraciones de 1 a 100 µg/ml y el metanólico y de acetato de etilo inhibieron la proliferación de células HeLa (cáncer cérvico uterino) de 50 a 1000 ng/ml. El extracto metanólico no inhibió las células normales de fibroblastos de suero de conejo (RSF), mientras que el extracto hexánico y de acetato de etilo si, con 50 y 100 ng/ml, respectivamente, menos que en proliferación de células HeLa (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2011).

Finalmente, también se ha evaluado la actividad antioxidante de un extracto de metanol-agua (80:20), con el cual se obtuvo un  $31.3 \pm 2.4$  % de inhibición de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y un  $18.6 \pm 0.6$  % en poder reductor (López-Vázquez *et al.*, 2017).

Esto demuestra que los basidiomas de *L. indigo* contienen sustancias con actividades antibacterianas, citotóxicas y antioxidantes. Sin embargo, es necesario aislar y caracterizar las moléculas responsables de dichas actividades.

## 4. HIPÓTESIS

Dado que el efecto citotóxico de los extractos orgánicos de *Lactarius indigo* ha sido comprobado, se podrán aislar e identificar a los compuestos responsables de este efecto farmacológico a través de un estudio biodirigido en un modelo *in vitro* utilizando diferentes técnicas de cromatografía.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

- Determinar la composición química y la actividad citotóxica y antiinflamatoria de los extractos orgánicos de los basidiomas de *Lactarius indigo*.

### 5.2. Objetivos particulares

- Compilar información bibliográfica sobre la importancia cultural de *L. indigo*, en cuanto a sus usos en la medicina tradicional.
- Obtener los extractos orgánicos de los basidiomas de *L. indigo*.
- Determinar la actividad citotóxica de los extractos orgánicos, fracciones y/o compuestos aislados en líneas celulares de cáncer cervicouterino (HeLa), cáncer de pulmón (SKLU), cáncer de colon (HCT) y en una línea celular no tumoral de riñón de mono verde africano (COS).
- Determinar la actividad antiinflamatoria de los extractos orgánicos, fracciones y/o compuestos en un el modelo de edema inducido con TPA.
- Aislar e identificar los compuestos y/o mezclas mayoritarias de los extractos orgánicos activos, por métodos cromatográficos, espectroscópicos y espectrométricos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Recolectas de basidiomas

Se realizaron cinco recolectas de basidiomas de *L. indigo*, una en el estado de Tlaxcala y cuatro en el Estado de México. Las dos primeras se realizaron en octubre de 2017 y las tres posteriores se compraron en septiembre de 2018 en Valle de Bravo Edo. de México. A continuación, se muestran los datos de los sitios de recolecta:

1. 5 de octubre de 2017  
Tlaxcala: bosque de *Quercus*, 1Km al este de San Francisco Temezontla, Municipio de Panotla, Tlaxcala. Altitud: 2600 m. Coordenadas: 19° 20' 45" N, 98° 16' 25" O.
2. 11 de octubre de 2017  
Ocuilan: bosque de *Quercus*, Localidad de San Juan Atzingo, Municipio de Ocuilan, Estado de México. Altitud: 2597 m. Coordenadas: 18° 59' 08" N, 99° 19' 56" O.
3. 22 de septiembre de 2018  
Se compraron dos "medidas" de basidiomas de *L. indigo* en un puesto local del centro de Avándaro, Edo. de México, en \$120 cada "medida" con aproximadamente siete basidiomas cada una.
4. 23 de septiembre de 2018  
Se realizaron dos compras en el Mercado municipal de Valle de Bravo, en la primera se compraron 2kg de basidiomas de *L. indigo* en \$200 cada kg.
5. En la segunda se compraron dos "medidas" con aproximadamente cinco basidiomas cada una, en \$40 cada "medida". Solamente de la última compra se pudo determinar el sitio de procedencia de los basidiomas, los cuales habían sido recolectados por la Sra. Eugenia en San Lucas del Pulque, Municipio de Temascaltepec. Edo. de México.

Los basidiomas se limpiaron de cualquier residuo de sustrato u hojas que pudieran estar adheridos y posteriormente para preservarlos, fueron secados (sitio 1 y 2) y congelados utilizando nitrógeno líquido (sitio 3, 4 y 5) (Bergendorff y Sterner (1988)). Solamente tres ejemplares de cada sitio se conservaron mediante secado para su posterior análisis microscópico y para su depósito en una colección.

## **6.2. Determinación taxonómica**

Para determinar taxonómicamente a la especie, se describieron las características macroscópicas de los basidiomas en fresco y las microscópicas en seco. La descripción macroscópica se realizó con base en las sugerencias de Delgado *et. al.*, (2005) y una guía de color (Kornerup y Wanscher, 1978). La descripción microscópica se realizó con ayuda de las claves taxonómicas de Hesler & Smith (1960) y Kong (1995). Se realizaron preparaciones con cortes del himenio laminar de los basidiocarpos hidratados con KOH al 5% y teñidos con floxina e hidratados con agua más el reactivo de Melzer (reacción amiloide), en un microscopio de la marca NIKON ECLIPSE E100. De esta manera se determinó el tamaño y tipo de basidiosporas, basidios, pleurocistidios y pseudocistidios. El tamaño de todas las estructuras se obtuvo de al menos una  $n=10$ , de los cuales se reporta el valor mínimo y el valor máximo de todas las mediciones, para tres muestras de cada localidad.

Un ejemplar de cada sitio de recolecta fue depositado para su resguardo en la Colección de Macromicetos del Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME) de la UNAM, con los siguientes registros: García-Cruz 01 (número de Herbario: 27833), García-Cruz 02 (número de Herbario: 27834), García-Cruz 03 (número de Herbario: 27835) y García-Cruz 04 (número de Herbario: 27836) y García-Cruz 05 (número de Herbario: 27837).

## **6.3. Análisis químico**

### **6.3.1. Obtención de extractos orgánicos**

Los basidiomas congelados se fragmentaron en trozos pequeños, se maceraron durante tres días a temperatura ambiente con hexano, posteriormente con una mezcla 1:1 de diclorometano/metanol ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 1:1), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH). Los extractos se concentraron a presión reducida en un rotavapor y se colocaron en una cámara de vacío, para eliminar completamente el disolvente. Este proceso se repitió siete veces para cada disolvente empleado. Todos los frascos con extractos se cubrieron con aluminio o se almacenaron en viales ámbar para protegerlos de la luz y evitar su degradación.

### **6.3.2. Análisis por cromatografía de capa fina (CCF)**

Para los extractos se realizó cromatografía en capa fina, empleando cromatofolios de sílica gel 60 (MACHEREY-NAGEL) con indicador de fluorescencia UV<sub>254</sub> y 0.20 mm de espesor. De cada extracto se pesaron 3 mg y se disolvieron en 1 ml de disolvente (de acuerdo con su solubilidad). Se aplicaron 10  $\mu\text{l}$  de la muestra en cada placa con ayuda de un capilar graduado. Se evaluaron diferentes sistemas de elución de acuerdo con la polaridad de cada muestra para observar los diferentes patrones de resolución de las placas sin embargo, la fase móvil

más utilizada fue la mezcla de Hexano/AcOEt 95:5, para las fracciones del extracto de AcOEt, fue la mezcla de Hexano/AcOEt 75:25. Como revelador se empleó luz UV onda corta de 254 nm y onda larga de 365 nm y el reactivo de vainillina para la detección específica de sesquiterpenos, el cual consta a su vez de dos soluciones:

Solución 1: Vainillina etanólica al 1% -100 ml de etanol y 1 g de vainillina.

Solución 2: Ácido sulfúrico etanólico al 10% - 10 ml de ácido sulfúrico y 90 ml de etanol.

Las placas para revelar se rociaron con 10 ml de la solución 1, seguida por 10 ml de la solución 2 y después se calentaron a 110°C durante 5 minutos (Wagner y Blatt, 1996).

### **6.3.3. Cromatografía líquida al vacío (CLV)**

El extracto de AcOEt, que fue el único que presentó un efecto citotóxico, se fraccionó mediante cromatografía líquida al vacío. En una primera ocasión con 1 g de extracto y con 2 g de extracto.

El extracto de AcOEt se disolvió con acetato de etilo y se mezcló con celita (en proporción 1:2). Se colocó en un embudo Buchner de porcelana empaquetado con 20 g de sílica gel (75-230 µm). La elución al vacío se inició con 500 mL de hexano al 100%, las eluciones posteriores fueron con una mezcla de Hexano-AcOEt incrementando progresivamente en un 25% la cantidad de AcOEt, hasta llegar a 100% y posteriormente con una mezcla de AcOEt-MeOH incrementando progresivamente en un 25% la cantidad de MeOH hasta llegar a 100%. Se obtuvieron nueve fracciones de 500 mL cada una. Las fracciones se concentraron en rotavapor y se analizaron por CCF.

La fracción 2 se lavó para separar los compuestos. Una porción de esta fracción 2 (703.2 mg) se filtró con hexano, obteniendo así la subfracción AS2, soluble en hexano y la subfracción AS1, soluble en acetato de etilo.

### **6.3.4. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)**

Se realizó un análisis mediante CG-EM de los extractos hexánicos y de las fracciones del extracto de AcOEt, para conocer su perfil cromatográfico. Para el análisis, se pesó 1 mg de extracto hexánico de los basidiomas procedentes de Avándaro, Valle de Bravo y San Lucas del Pulque y, 1 mg de la fracción AS1 y AS2 del extracto de AcOEt.

El análisis de los extractos hexánicos se realizó en el instituto de Química de la UNAM en el Laboratorio Nacional para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC),

con ayuda de la M. en C. Mayra León Santiago en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama Agilent Tech (*Agilent GC, modelo 7890B*) y un equipo de espectrometría de masas PI de alta resolución (CG-EM-SQ) Agilent Tech. Por otro lado, las fracciones del extracto de AcOEt se analizaron en el Laboratorio de Espectrometría de Masas a cargo del Dr. Francisco Javier Pérez Flores, en un cromatógrafo de gases (*Agilent GC, modelo 7890A*) acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico (*JEOL GCMate II mass*) en modalidad de energía de ionización a 70 Ev.

Para ambos análisis el método fue el siguiente: los cromatógrafos cuentan con una columna de sílica gel *HP-5* (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m). La temperatura inicial del horno se mantuvo durante un minuto a 40 °C, la velocidad de calentamiento fue de 8 °C/min. Para los extractos hexánicos la temperatura se mantuvo a 280 °C por cinco minutos y a 325°C por un minuto. La temperatura de inyección fue de 280 °C. Mientras que, para las fracciones del extracto de AcOEt, la temperatura de inyección fue de 310 °C. La velocidad de flujo del gas acarreador (Helio) fue de 1 mL/min y la relación del Split fue de 1:20. De cada muestra se obtuvo un cromatograma, en el cual para cada pico se registró su tiempo de retención (TR), además cada pico fue identificado con base en su espectro de masas (comparándolos con la literatura). Aquellos que no se identificaron se nombraron con base en los picos principales de su espectro de masas (relación masa/carga, *m/z*).

### **6.3.5. Cromatografía en columna (CC)**

Se realizó una cromatografía en columna del extracto hexánico. Para esto se utilizó 1 g del extracto hexánico de los basidiomas provenientes de Avándaro, el cual se disolvió con hexano y se mezcló con celita (en proporción 1:5). Posteriormente se colocó en una columna de vidrio de 2 cm de diámetro empaquetada con 50g de sílica gel (230-400  $\mu$ m). La elución inicial se realizó con 200 mL de hexano 100%; mientras que, las eluciones posteriores se realizaron con una mezcla de hexano-AcOEt incrementando progresivamente la cantidad de AcOEt (aumentando de 1 a 5%), hasta llegar a 100%. Las primeras diez fracciones se obtuvieron de 25 mL, las siguientes de 50 mL y las últimas, a partir de la 347 (con reacción negativa para terpenos) de 100 mL. Las fracciones se concentraron en rotavapor y se analizaron mediante CCF usando la fase móvil hexano-AcOEt (95:5).

### **6.3.6. Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP)**

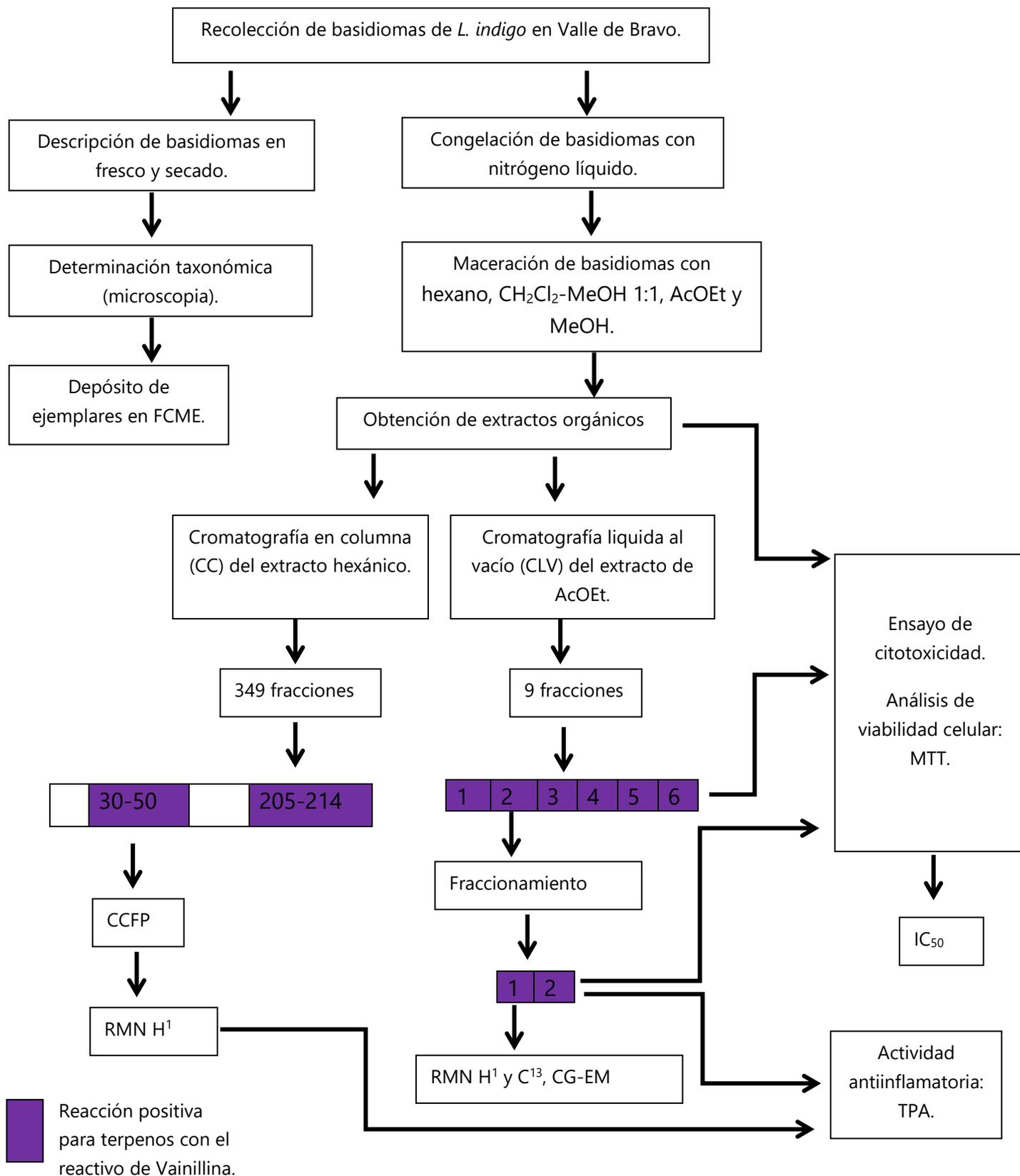
Para la separación por CCFP de los compuestos de la fracción 33 a la 50 del extracto hexánico (60 mg), se usó un cromatofolio con soporte de vidrio, sílica gel C<sub>18</sub> de 20 cm x 20 cm, con indicador UV<sub>254</sub> y 1mm de grosor de la marca MACHEREY-NAGEL. Como fase móvil se empleó hexano/acetona (6:1) eluyendo dos veces.

Las bandas obtenidas se rasparon con una espátula. El adsorbente se colocó en viales de vidrio y se les agregó 20 mL de la fase móvil empleada, se agitaron y se filtraron. Este proceso se repitió cuatro veces con la fase móvil y dos veces más con cada uno de los disolventes empleados en cada fase móvil, por cada banda. Los filtrados se concentraron en rotavapor y se reunieron en viales tarados, los cuales se secaron en una cámara de vacío.

### **6.3.7. Caracterización por resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono (RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C) de los compuestos obtenidos.**

Las fracciones y subfracciones activas obtenidas del extracto hexánico y del extracto de acetato de etilo se analizaron por resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono (RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C) a 400 MHz, en un equipo Bruker, Avance III 400 MHz, usando como disolvente acetona deuterada (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) para las fracciones hexánicas y cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>) para las de acetato de etilo, con el objetivo de elucidar la estructura química de los compuestos aislados o de las posibles mezclas de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna (**Figura 3**).

**Figura 3:** Diagrama de flujo que muestra un resumen de los métodos empleados.

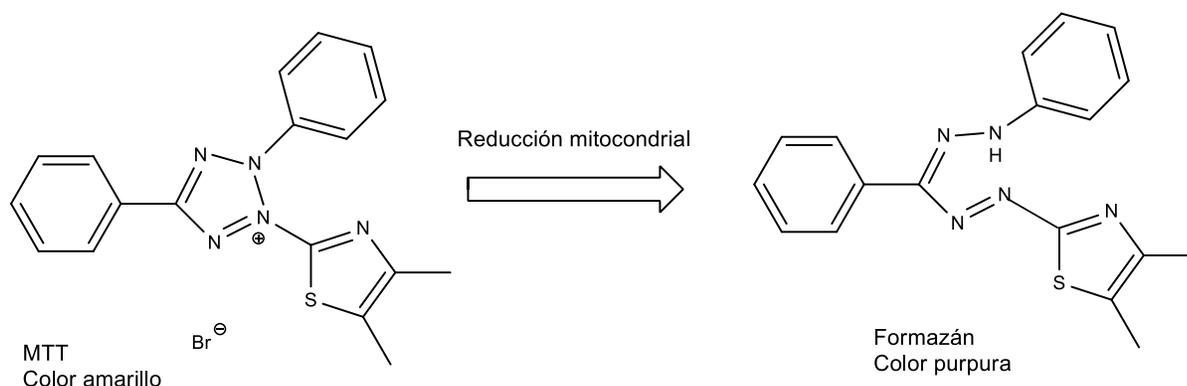


## 6.4. Actividad biológica

### 6.4.1. Ensayo citotóxico basado en el MTT

La actividad citotóxica *in vitro* de los extractos y fracciones obtenidas de los basidiomas de *L. indigo*, se determinó mediante un método colorimétrico (MTT), en el Laboratorio de Química de Biomacromoléculas 3 del Instituto de Química de la UNAM, a cargo de la Dra. Daniela Araiza Olivera Toro.

Mediante este método, la viabilidad celular se puede medir por la reducción del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- bromo difeniltetrazolio) (MTT). Estas sales de tetrazolio amarillas y solubles en agua son reducidas únicamente por las células vivas gracias a la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. De esta reducción se forma un producto denominado formazan, el cual forma cristales purpura en medio acuoso (**Figura 4**) (Carmichael *et al.*, 1988).



**Figura 4:** Reducción del MTT.

Para este ensayo se emplearon cuatro líneas celulares, una no tumoral, de riñón de mono verde africano (COS) y tres tumorales humanas de cáncer de pulmón (SKLU-1), cáncer cervicouterino (HeLa) y cáncer de colon (HCT), debido a que son tipos de cáncer con alta incidencia, además de tener en común en su desarrollo un proceso inflamatorio.

### **6.4.1.1. Soluciones requeridas para el cultivo celular**

#### Medio de cultivo

Para la preparación de un litro de medio, se utilizaron los siguientes reactivos: un sobre con 10 g de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) o medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute), antibiótico-antimicótico (10 mL) y agua desionizada estéril. Se disolvieron los componentes, se agitó y se llevó a un volumen final de 900 mL con agua desionizada. El medio de cultivo se esterilizó por filtración pasándolo a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ , posteriormente se complementó con 10 % de suero bovino fetal (SFB) inactivado (este procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar).

#### Medio para conservar células en congelación

Se utilizó medio de cultivo DMEM o RPMI complementado con 15 % de suero bovino fetal (93 %) y DMSO dimetilsulfóxido (7 %).

#### Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Para la preparación de un litro de solución se utilizaron los siguientes reactivos: NaCl (8.0 g), KCl (0.20 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.20 g),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2.16 g), los cuales se disolvieron con agua desionizada estéril en un matraz aforado de 1 L. El pH se ajustó a 7.4. La solución se esterilizó por filtración.

#### Solución tripsina-verseno

Para preparar 50 mL de solución, se mezclaron las siguientes soluciones: 25 mL de verseno (EDTA, ácido etilendiamino tetra-acético) al 0.05 % y 25 mL de tripsina al 0.05 %. La solución se esterilizó por filtración.

#### Solución de azul de tripano

Para preparar 10 mL del colorante, se disolvieron 0.02 g de azul de tripano en 10 mL de PBS, se filtró con papel Whatman No. 50 y se envaso protegido de la luz.

#### Solución de MTT

Se pesó MTT (125 mg) en un tubo eppendorf estéril y se disolvió con 50 mL de PBS. La solución se envaso protegida de la luz.

Los medios de cultivo, la solución de azul de tripano y la solución de MTT, se almacenaron en refrigeración.

#### **6.4.1.2. Congelación y descongelación de células**

Se obtuvo una suspensión celular tripsinizando las monocapas de aquellas cajas Petri que presentaran una confluencia del 100 %. La suspensión celular se colectó en un tubo eppendorf y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió con medio de congelamiento (ajustando la suspensión a  $10^7$  células/mL) y colocando la suspensión a 4 °C durante 30 minutos. Finalmente se distribuyó 1 mL de la suspensión en criotubos rotulados, los cuales se congelaron a -70 °C.

Para descongelar las células: se frotó con las manos el criotubo, agitando suavemente hasta que el contenido se descongeló. Se transfirió la suspensión celular a una caja Petri con 4 mL de medio DMEM o RPMI, la caja Petri se agitó durante 30 segundos y se incubó a 37 °C. Pasadas tres horas de incubación se cambió el medio de cultivo y se dejó en incubación hasta que se alcanzó el 100 % de confluencia.

#### **6.4.1.3. Mantenimiento y propagación del cultivo celular**

En la manipulación del cultivo celular, se utilizó material estéril y los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar. Las células se sembraron en cajas Petri de plástico, con medio de cultivo DMEM (para las células HeLa) o RPMI (para las células COS, HCT y SKLU-1). El medio se cambió cada tercer día, retirando el medio con ayuda de una micropipeta y lavando las células adheridas con 1 mL de PBS, finalmente se agregó medio de cultivo fresco y se incubaron en un ambiente con 5 % de CO<sub>2</sub> y con una humedad relativa del 98 % a 37 °C.

Cuando la confluencia fue del 100 %, se realizó un pase, es decir, una transferencia de células de un cultivo a otro, esto para evitar la saturación y obtener un número mayor de células. Para ello, se retiró el medio de cultivo, las células adheridas se lavaron con 1 mL de PBS, el cual también se retiró. Las células se incubaron con 500 µL de solución tripsina-verseno durante 5 min. hasta que las células se desprendían, esto debido al daño proteolítico en la membrana celular por a la actividad de la tripsina. Para detener la actividad proteolítica de la tripsina, se agregó 1 mL de medio de cultivo y con ayuda de una micropipeta se despegaron completamente las células. Por último, una parte de la suspensión celular resultante se sembró nuevamente en otra caja Petri con medio de cultivo, la cual se homogeneizó con movimientos circulares para ser incubada nuevamente.

#### 6.4.1.4. Conteo celular

Para el conteo celular se utilizó una cámara de Neubauer. Para cada tipo celular ensayado, se agregó tripsina a la monocapa de células (con confluencia del 80 al 90 %). La suspensión celular obtenida se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió con 1 mL de medio de cultivo. Se tomaron 10  $\mu$ L de la suspensión celular y se mezcló con 10  $\mu$ L de solución de azul de tripano. El colorante tiñe de azul las células muertas, por lo que nos permite descartarlas del conteo. Se colocó en la cámara de Neubauer 10  $\mu$ L de la suspensión celular teñida con azul de tripano y con ayuda de un microscopio se realizó el conteo del número de células en cada uno de los cuatro cuadrantes que se encontraban en las esquinas de la cámara. Se calculó el promedio de células por cuadrante y se multiplicó por  $10^4$  y por el factor de dilución (que en este caso fue de 2).

Para determinar el número de células por mililitro se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Células/mL} = (\text{promedio de células}) \times [1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}] \times 2$$

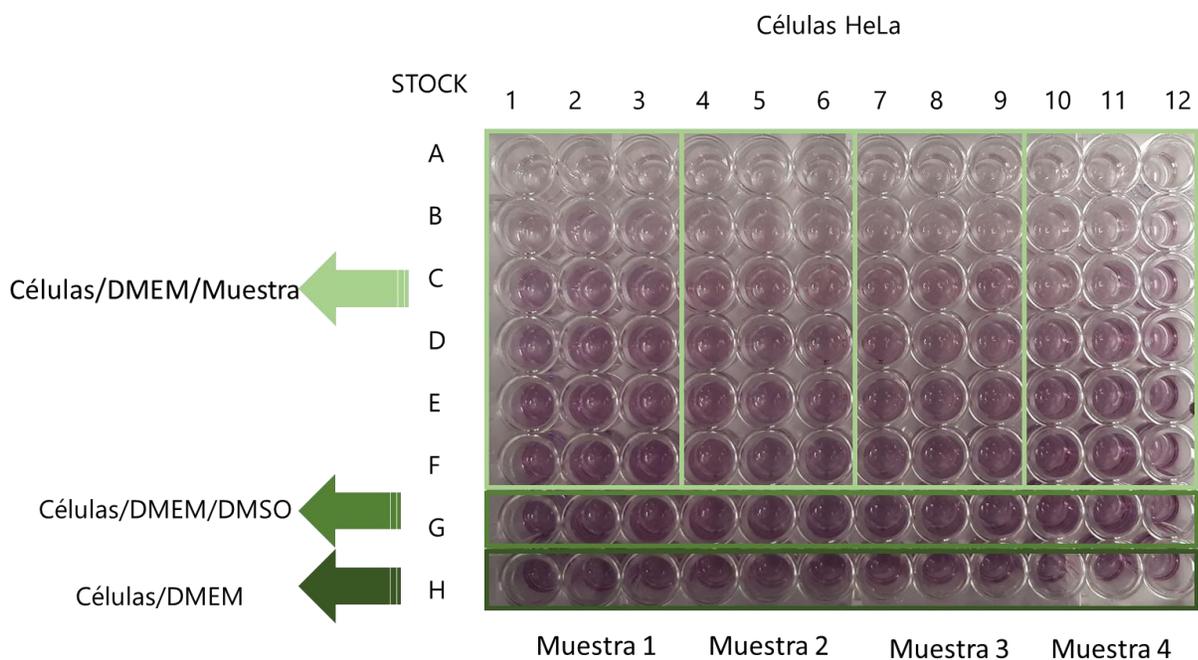
Se calculó el volumen de suspensión celular necesario para sembrar 7000 células por pozo en una placa de 96 pozos y a un volumen final de 100  $\mu$ L por pozo.

#### 6.4.1.5. Evaluación de la actividad citotóxica por MTT

Para determinar la actividad citotóxica de los extractos orgánicos y las fracciones del extracto de AcOEt, se cultivó la línea celular no tumoral de riñón de mono verde africano (COS) y las tres líneas celulares tumorales humanas de cáncer de pulmón (SKLU-1), cáncer cervicouterino (HeLa) y cáncer de colon (HCT) como se describió anteriormente. Se pesó 1 mg de los extractos orgánicos y las fracciones a evaluar y se disolvieron en 200  $\mu$ L de DMSO. De esa dilución se tomó 1  $\mu$ L y se diluyó con 200  $\mu$ L de PBS, para llegar a una concentración final de 25 ng/mL. A partir de ese stock se prepararon las diluciones necesarias para el tratamiento en la placa de 96 pozos (**Tabla 1**), en la cual se colocaron 100  $\mu$ L de la dilución en cada pozo, con las diferentes concentraciones de la muestra en las seis primeras filas (A-F), en la fila G DMSO (vehículo) y en la fila H solo medio de cultivo (**Figura 5**). Las células tratadas se incubaron durante 24 h. y después de ese tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo y se colocaron 50  $\mu$ L a cada pozo de una mezcla 45:5 de medio de cultivo y solución MTT respectivamente. La placa Petri se cubrió con papel aluminio y se incubó nuevamente durante 4 h. Transcurrido ese tiempo se retiró el sobrenadante y los cristales de formazan que se precipitaron se disolvieron con 50  $\mu$ L de DMSO por pozo. Finalmente se leyó la absorbancia a 570 nm en un equipo Cytation™ 5. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra.

**Tabla 1.** Preparación de las diluciones a partir del stock con concentración de 25 ng/mL, para los tratamientos con extractos orgánicos y fracciones. Las diluciones se repartieron en 6 pozos (100  $\mu$ L c/u).

Dilución	Volumen de muestra ( $\mu$ L)	Volumen de medio ( $\mu$ L)	Concentración (ng/mL) en cada pozo
A	8	392	50
B	4	396	25
C	2	398	12.5
D	1	399	6.25
E	.5	399.5	3.13
F	.25	399.75	1.56
G (DMSO)	8	392	
H (Medio)	-	400	



**Figura 5:** Distribución de los tratamientos en la placa de 96 pozos. Por cada placa se evaluaron cuatro muestras distintas. Cada muestra se probó a seis concentraciones sucesivas, iniciando con 50 ng/mL y finalizando con 1.56 ng/mL. Se hicieron tres repeticiones de cada muestra (1-3, 4-6, 7-9 y 10-12). Se agregó DMSO como control (fila G) y células con medio de cultivo (fila H).

#### 6.4.1.6. Cálculo de la IC<sub>50</sub>

El porcentaje de viabilidad se calculó con la fórmula:

$$100 (AF/AC)$$

Donde:

AF=absorbancia de las células tratadas

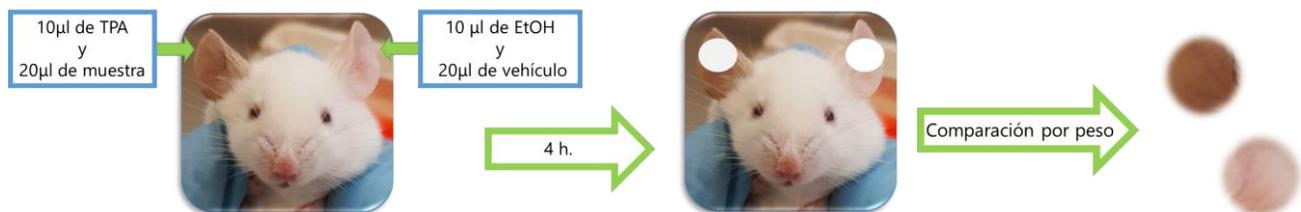
AC= absorbancia de las células sin tratamiento.

Una vez que se obtuvo el porcentaje de viabilidad, se realizaron gráficas de la relación entre porcentaje de viabilidad contra la concentración del extracto o fracción. En los casos en los que la viabilidad celular fue del 50 % o menor, se determinó la IC<sub>50</sub> (concentración inhibitoria media), la cual representa la concentración que produce una disminución de la viabilidad celular del 50 % con respecto al vehículo. Esto se calculó usando un análisis de regresión lineal con los datos de viabilidad celular con respecto a cada concentración del tratamiento correspondiente. El análisis se realizó con el programa Graph Pad Prism versión 5.0. Los experimentos se realizaron por triplicado y se obtuvo el promedio para obtener el valor final de la IC<sub>50</sub>.

### 6.4.2. Actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA

Se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto de AcOEt y su subfracción AS1, así como del extracto hexánico y su fracción 40. Esto mediante el modelo de edema inducido con TPA (13-acetato de 12-tetradecanoilforbol), en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM, a cargo del M. en C. Antonio Nieto. El experimento contó con el permiso del comité de bioética CICUAL-IQ-004-17.

Para evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos y las fracciones, se utilizaron tres grupos con tres ratones cada uno. Un grupo fue el control negativo y los otros dos de tratamiento. Los ratones se anestesiaron con una solución de pentobarbital sódico (6.3 mg/ml) por vía intraperitoneal (63 mg/kg). Posteriormente se aplicó tópicamente en la oreja derecha 10  $\mu$ l de TPA (13-acetato de 12-tetradecanoilforbol a una concentración de 2.5 mg/ml) y 20  $\mu$ l de una dilución de las muestras a analizar (1 mg de extracto o fracción en 20  $\mu$ l de una mezcla de Cloroformo: Acetona 1:1). Se aplicó en la oreja izquierda, 10  $\mu$ l de etanol (vehículo del TPA) y 20  $\mu$ l de una mezcla de cloroformo: acetona 1:1 (vehículo de las muestras). Para el control negativo se aplicó en la oreja derecha 10  $\mu$ l de TPA y 20  $\mu$ l del vehículo y en la oreja izquierda 10  $\mu$ l de etanol y 20  $\mu$ l del vehículo. Después de 4 horas, el TPA alcanza la máxima inflamación, así que transcurrido ese tiempo se sacrificaron los ratones por dislocación, se cortaron ambos lóbulos de las orejas con un sacabocados y se colocaron en tubos eppendorf para pesarlos y sacar la diferencia entre el lóbulo inflamado y el no inflamado (Merlos *et al.*, 1991) (**Figura 6**).



**Figura 6:** Modelo de edema inducido con TPA.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Etnomicología de *L. indigo*

Los estudios etnomicológicos que incluyen a *L. indigo*, muestran que es conocido y utilizado por los pobladores de ocho grupos étnicos. Esta especie es empleada como alimento y con fines medicinales en el Estado de México, Chiapas, Tlaxcala e Hidalgo, para el tratamiento de diversas afecciones principalmente del sistema digestivo y urinario (**Cuadro 1**). Se reconoce con diversos nombres locales, los cuales hacen referencia a ciertas características del esporoma de *L. indigo*, como lo es la forma y el color principalmente (**Cuadro 2**). Se encontraron en total 44 nombres locales para *L. indigo*, 14 en español, 14 en náhuatl, 6 en otomí, 1 en zapoteco, 1 en mixteco, 3 en tzeltal, 2 en matlatzinca, 1 en mame, 1 en tsotsil y 1 en tlahuica.

**Cuadro 1:** Información etnomicológica de *L. indigo* en México, su importancia como alimento y en la medicina tradicional.

Estado y/o localidad	Grupo étnico	Uso C/M	Enfermedad o afección	Forma de preparación	Cita
Acambay, Estado de México Localidades de Detiña y La palma.	Otomí	C/T*/M	Purgante  Aparato digestivo, gastritis y otros desordenes gastrointestinales, dolor y/o ardor del estómago.	Se macera crudo y se toman con agua o con leche.  Lo consumen asado en el Comal o las brasas.  Un hongo de tamaño regular se corta en cuatro partes una de ellas se pone a cocer con dos o tres litros de agua y un puñito de árnica, al vaso en el que se va a ingerir se le agrega azúcar, sal o agua miel, se debe tomar medio vaso.	(Estrada-Torres y Aroche, 1987)  (Bautista, 2013)
La Cañada, Edo. De México.	Otomí	C/M			(Bautista, 2013)
Chimalpa, Acaxochitlán Hidalgo.	Nahua	C/M	Aparato urinario, problemas de los riñones.	Se prepara en un caldo con epazote, puede contener varias especies de hongos y ofrecer mejores resultados.	(Bautista, 2013)
San Isidro Buensuceso, Tlaxcala.	Nahua	C/M	Aparato digestivo, infecciones gastrointestinales, inflamación estomacal intoxicaciones y gastritis. Granos en la piel.	Se limpia, se corta el "rabitto" (la base del estípote), se muele y se guisa en quesadillas con epazote o en caldo sin picante.	(Bautista, 2013)

Estado y/o localidad	Grupo étnico	Uso C/M	Enfermedad o afección	Forma de preparación	Cita
Amatenango del Valle, Chiapas	Tseltal	C/M			(Bautista, 2013)
Tenejapa, Chiapas.	Tseltal	C/M	Alimento funcional		(Bautista, 2013)

C= comestible, M= medicinal y T= tóxico. \* Para otra parte de la población es considerado tóxico, esto debido a su color azul.

**Cuadro 2:** Nombres locales para *L. indigo* en México.

Nombres locales	Estado y/o localidad	Grupo étnico	Cita
"Pajaritos" "keschque" "totolitas".	Veracruz.		(Villarreal y Perez, 1989)
Indigo, zuin, zuine y quexque.	Veracruz y Zaragoza, Puebla.	Nahua	(Montoya y Bandala, 1996) (Contreras <i>et al.</i> , 2018)
Añil, ateconza, aticonzol, hongo azul, tecax azul, tecosán morado y tlapaltecax.	Apizaco, Tlaxcala.	Nahua	(Montoya <i>et al.</i> , 2001)
<i>Cacaxnanácatl</i> (cacaxtli = se refiere a un tipo de pájaro y su color azul) y <i>cuatecax azul</i> .	San Isidro Buensuceso, Tlaxcala.	Nahua	(Montoya <i>et al.</i> , 2003)
<i>Moradonanácatl</i> u Hongo morado, <i>nacatl</i> = carne.	Chimalpa, Acaxochitlán Hidalgo.	Nahua	(Bautista, 2013)
<i>Xilnanácatl</i> morado, <i>cacash</i> o <i>cuatecach</i> azul.	San Isidro Buensuceso, Tlaxcala.	Nahua	(Bautista, 2013)
! Bella tzila bella – hongo, tzi – contracción de nitzi – leche, la – ¿? Hongo de leche azul. Nombre que se da a <i>Lactarius indigo</i> por el color azul del látex que secreta al romperse.	Nuevo Zoquiapan y Aloapan, Oaxaca.	Zapoteco	(Aguilar-Fernández, 1998) (Garibay-Origel, 2009)
<i>Lactarius indigo</i> ( <i>xi'i kuilu</i> ) está asociado con el color del plumaje del pájaro "chara" ( <i>Aphelocoma woodhouseii</i> ) ( <i>t + daa kuilu</i> ), que produce un canto alarmante que los pueblos mixtecos consideran que significa que se acerca un ataque o que algo malo sucederá.	Ciudad de Oaxaca.	Mixteco	(Santiago <i>et al.</i> , 2016)
Guilloi (ñäi) y en español: Zorrillo, zorrillo azul, hongo pantalón, trompas azules, hongo azul, hongo de zorrillo.	Amealco de Bonfil, Querétaro.	Otomí	(Robles-García <i>et al.</i> , 2018)
Azulejos, enchilados azules, hongo azul, orejas azules, tomatillo azul.	Amanalco Edo. De México.	Predominio de lengua Otomí	(Burrola-Aguilar <i>et al.</i> , 2012)
oreja azul, hongo azul, oreja de puerco azul, por su significado en Otomí: K' angui kjo gushti (K' angui= azul; gu: oreja; ts' udi= puerco).	Acambay, Edo. De México. Localidades de Detiña y La palma.	Otomí	(Estrada-Torres y Aroche, 1987) (Bautista, 2013)
<i>Kjogusti</i> u oreja azul.			

Nombres locales	Estado y/o localidad	Grupo étnico	Cita
<i>Kjojtidi</i> azul, <i>Kjojtidi</i> morado u hongo de oreja azulito.	La Cañada, Edo. De México.	Otomí	(Bautista, 2013)
<i>Yaxk ' anchay</i> o <i>K' analchay</i> morado.	Amatenango del Valle, Chiapas.	Tseltal	(Bautista, 2013)
<i>Yaxal chejchew.</i>	Tenejapa, Chiapas.	Tseltal	(Bautista, 2013)
Chotinta o Choazul	San Francisco Oxtotilpan, Municipio de Temascaltepec, Edo. de México.	Matlatzinca	(Molina-Castillo <i>et al.</i> , 2019).
X' ew	El Soconusco, Chiapas.	Mame	(Gallegos y Sánchez, 2020).
Yaxal manayok	Chamula, Chiapas.	Tsotsil	(Ruan-Soto, 2018)
"Añil" "cho-nguzúl"	Edo. de México. San Juan Atzingo.	Tlahuica	(Palomino, 1990)

## 7.2. Determinación taxonómica

Las características macroscópicas y microscópicas de los basidiomas de las distintas localidades fueron descritas para la correcta identificación de los ejemplares. Para las características macroscópicas, se presenta una descripción general que concuerda para todas las localidades, y en el **Cuadro 3** se muestran las dimensiones correspondientes al píleo y el estípite de los basidiocarpos de cada localidad. En cuanto a las características microscópicas, en la **Figura 7** se muestran las siguientes estructuras con importancia taxonómica: basidiosporas con reacción amiloide, basidios, pleurocistidios y pseudocistidios, cuyas dimensiones se muestran en el **Cuadro 4**.

### ***Lactarius indigo* (Schwein.) Fr.:**

Hábito de crecimiento disperso y terrícola.

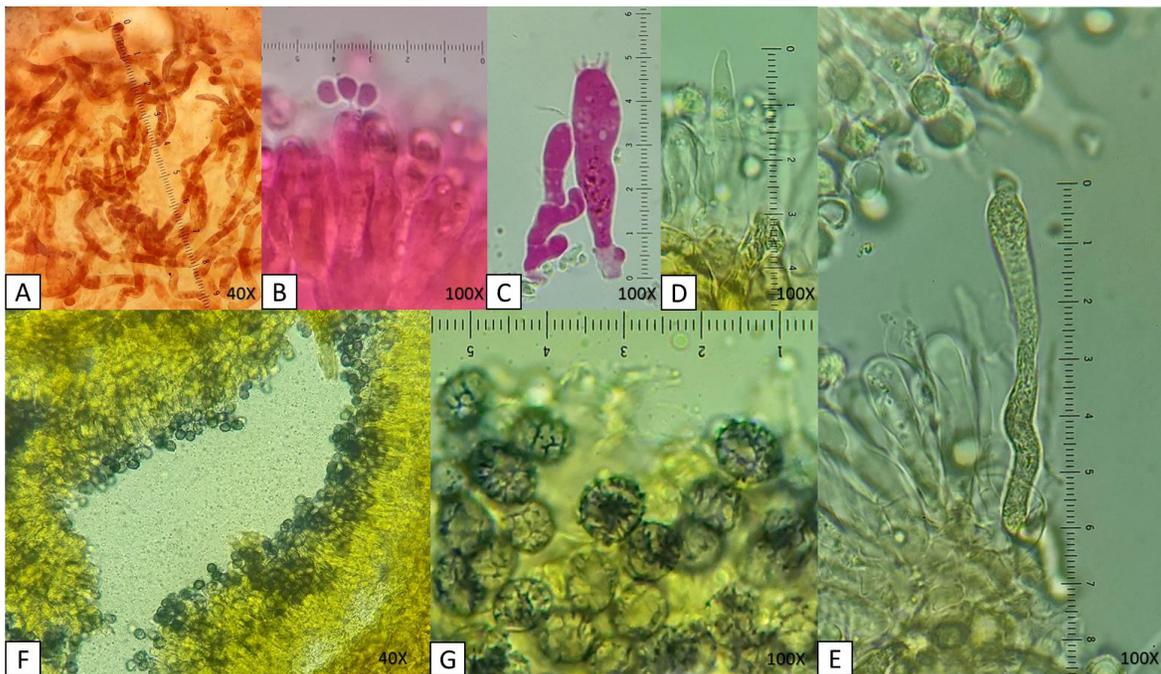
Píleo: convexo o turbinado, con centro deprimido o en forma de embudo (infundibuliforme), margen arqueado o decurvado, borde entero o crenulado, superficie aceitosa o seca, brillo zonado, azul añil (21C4-21D4-21D5), con círculos concéntricos de color gris blanquecino (20B1-20C1) alternados con los azules. Con un exudado que se libera al trozar el basidiocarpo, es un látex de color azul intenso (20C6-20C7-20C8). Láminas: muy juntas, adheridas, arqueado-decurrentes o subdecurrentes, anchas, con borde liso y lamélulas redondeadas, de color azul (21C3-21C4-21C5-21C6), con esporada de color crema.

Estípite: Unión central con el píleo, tomento basal, forma cilíndrica, carnosoporuso, quebradizo, contexto hueco.

Cuadro 3: Dimensiones macroscópicas de los basidiomas obtenidos de las cinco localidades.

Localidad	Píleo Diámetro (cm)	Promedio	Estípite Alto/Ancho (cm)	Promedio
Tlaxcala	5.8-6	9.2-10.9	2-1.4	2.3-2
	10.8-11.8		2.5-1.8	
	11-15		2.5-2.8	
Ocuilan	12-11.3	8.5-7.9	5-3.2	3.2-2.2
	8-7.7		2.5-2.5	
	5.5-4.8		2.2-1	
Avándaro	5.7-6	5.8-5.9	2-1.4	2.3-1.4
	6.2-6.5		2.3-1.4	
	5.4-5.4		2.5-1.4	
Valle de Bravo	4.5-4.7	6.1-6.7	2-1.2	2-1.4
	7.4-8		2-1.5	
	7-7.3		2-1.6	
San Lucas del pulque	4.1-4.2	6.3-6.6	1.5-1	2.6-1.4
	6.3-6.8		3.7-1.4	
	8.5-8.9		2.6-1.7	

\*n=3



**Figura 7:** Estructuras microscópicas de los basidiomas de *L. indigo*. Vistas a 40 y 100 X en un microscopio NIKON ECLIPSE E100. Tejido hidratado con KOH y teñido con floxina e hidratado con agua mas reactivo de Melzer (esporas azuladas, reaccion amiloide). A. Hifas laticíferas. B. Basidio con basidiosporas. C. Célula marginal y basidio. D. Pleurocistidio. E. Pseudocistidio. F. Esporas con reacción amiloide. G. Esporas ovaladas con ornamentación. Barra en 40x=2.5 µm y en 100x=1 µm.

**Cuadro 4:** Microscopia de las estructuras presentes en los basidiomas de *L. Indigo* recolectados en las distintas localidades y su comparacion con los ejemplares de referencia.

<b>Localidad</b>	<b>Basidiosporas (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Basidios (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>Kong, 1995</b>	6.5-8.7 x 4.9-6.6	37-68 x 7.1-10.3
<b>Ocuilan</b>	7-10 x 5.5-7	40-50 x 7-9
<b>Tlaxcala</b>	7-9 x 5-7.5	39-55 x 7.5-10
<b>Avándaro</b>	6.5-10 x 6.5-7	37-50 x 8-10
<b>Valle de bravo</b>	7-9 x 6-7.5	37-43 x 8-10
<b>San Lucas del Pulque</b>	6.5-10 x 5.5-8	35-50 x 8-10

\* n=10. Se representa el valor mínimo y el valor máximo encontrado en todas las mediciones, para tres muestras.

### 7.3. Análisis químico

#### 7.3.1. Extracción

Se obtuvieron extractos orgánicos de los basidiomas recolectados en 2017 y 2018. En ambos casos, el proceso de preservación de las muestras fue distinto, por lo que los rendimientos se muestran por separado. Se obtuvieron 70 g en peso seco de las muestras procedentes de la Localidad de San Juan Atzingo, Edo. de México y 24 g de la localidad de San Francisco Temezontla, Tlaxcala. En el **Cuadro 5**, se muestran los rendimientos con respecto al peso seco de las muestras obtenidas en 2017. En el **Cuadro 6**, se muestran los rendimientos con respecto al peso fresco de las muestras obtenidas en 2018. Se observa que el rendimiento es mayor en el caso de las muestras de 2017, ya que se comparan con respecto al peso seco. Sin embargo, con lo que respecta especialmente al extracto hexánico, el proceso de secado previo del material daba como resultado una degradación de los compuestos presentes en los basidiomas (azulenos), por lo que, en adelante para el análisis químico y las pruebas biológicas se trabajó únicamente con los extractos obtenidos de los basidiomas recolectados en 2018.

**Cuadro 5.** Rendimientos de los extractos orgánicos obtenidos de los basidiomas de *L. indigo* en octubre de 2017. En negritas se muestran los valores más altos de cada sección. Se presentan también valores en % con respecto al peso seco.

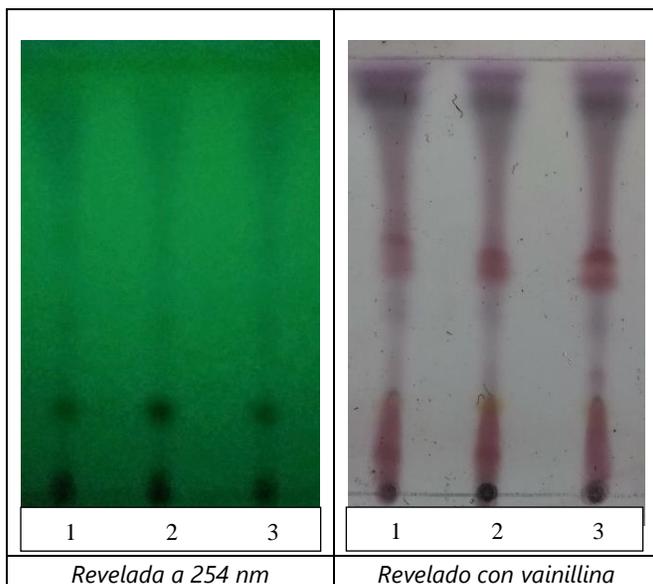
Localidad	Peso seco (mg)	Extractos	
		Hexánico mg (%)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH 1:1 mg (%)
<b>San Francisco Temezontla, Tlaxcala.</b>	500	6 (1.2)	<b>166.3 (33.26)</b>
<b>San Juan Atzingo, Estado de México.</b>	500	<b>12.8 (2.56)</b>	165.1 (33.02)

**Cuadro 6.** Rendimientos de los extractos orgánicos obtenidos de los basidiomas de *L. indigo* en septiembre de 2018. En negritas se muestran los valores más altos de cada sección. Se presentan también valores en % con respecto al peso fresco.

Localidad	Peso fresco (g)	Extractos			
		Hexánico g (%)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH 1:1 g (%)	AcOEt g (%)	MeOH g (%)
<b>Avándaro</b>	730	1.05 (.14)	<b>13.12 (1.79)</b>		
<b>Valle de bravo</b>	1000	1.67 (.17)	7.85 (.79)		
<b>San Lucas del Pulque</b>	400	<b>0.81 (.20)</b>	2.67 (.67)		
	500			<b>4.58 (.92)</b>	<b>6.63 (1.33)</b>

### 7.3.2. Cromatografía en Capa Fina (CCF)

La detección de los compuestos presentes en los extractos orgánicos de los basidiomas se realizó mediante CCF, el mejor sistema de elución se obtuvo empleando una fase móvil de Hexano/AcOEt 95:5. Se observa que la composición química de todas las muestras procedentes de las distintas localidades, es similar entre sí, para los diferentes extractos (**Placa 1 y 2**).



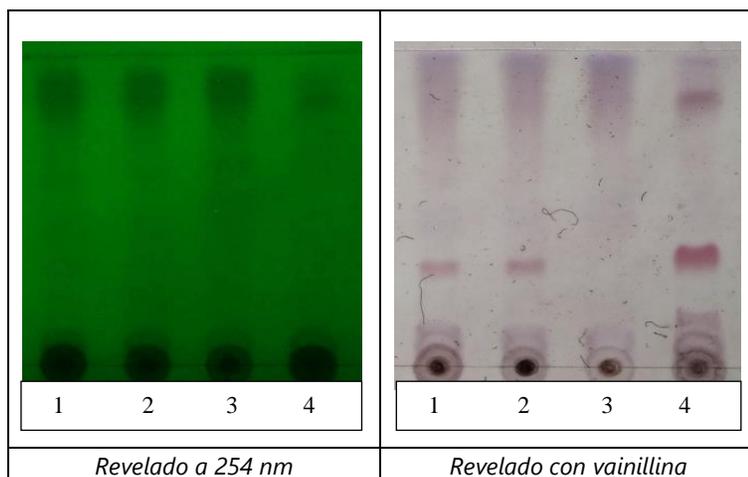
Extracto:  
Hexano

Fase móvil: Hexano/AcOEt 95:5

- 1) Avándaro
- 2) Valle de Bravo
- 3) San Lucas del Pulque

3 mg/mL    10  $\mu$ L

**Placa 1:** Cromatografía en capa fina de los extractos hexánicos de *L. indigo*. Se observa que el perfil cromatográfico de los cuatro extractos es similar y que los compuestos presentes revelan en luz UV a 254 nm y con vainillina dando una coloración purpura, rosa y amarilla.



Extractos:

- 1)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 1:1- Avándaro
- 2)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 1:1- Valle de Bravo
- 3)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 1:1- San Lucas del Pulque
- 4) AcOEt- San Lucas del Pulque

Fase móvil: Hexano/AcOEt 95:5

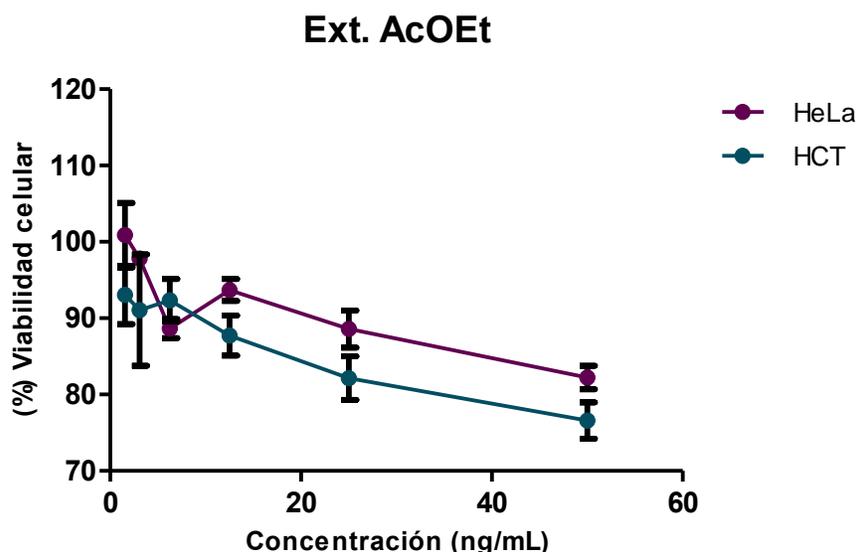
3 mg/mL    10  $\mu$ L

**Placa 2:** Cromatografía en capa fina de los extractos de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 1:1 y de AcOEt. Se observa que el perfil cromatográfico de los seis extractos es similar y que los compuestos presentes revelan en luz UV a 254 nm y con vainillina dando una coloración purpura y rosa.

#### 7.4. Estudio biodirigido: actividad citotóxica

Para identificar los compuestos activos presentes en los extractos orgánicos, se evaluó la actividad citotóxica de tres extractos orgánicos: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 1:1, AcOEt y MeOH. No fue posible evaluar el extracto hexánico, debido a su baja solubilidad en el vehículo empleado (DMSO).

En la línea celular no tumoral (COS), las concentraciones de los extractos orgánicos de 62.50 a 1000 ng/ml redujeron la viabilidad celular de hasta un 80 % con la mayor concentración, por lo que se evaluaron a concentraciones menores. Con concentraciones de 1.56 a 50 ng/ml no se presentó una disminución de la viabilidad celular, por lo que se utilizaron esas concentraciones para la evaluación en células tumorales. De los tres extractos orgánicos evaluados, el extracto de AcOEt fue el único que, a las concentraciones evaluadas (1.56 a 50 ng/ml), presentó actividad citotóxica en dos líneas celulares HCT y HeLa, sin embargo, no se alcanzó el 50% de la disminución de la viabilidad celular (**Figura 8**), por esta razón se decidió fraccionar el extracto para llegar al o los compuestos activos que pudieran alcanzar una mayor disminución de la viabilidad celular a concentraciones menores.



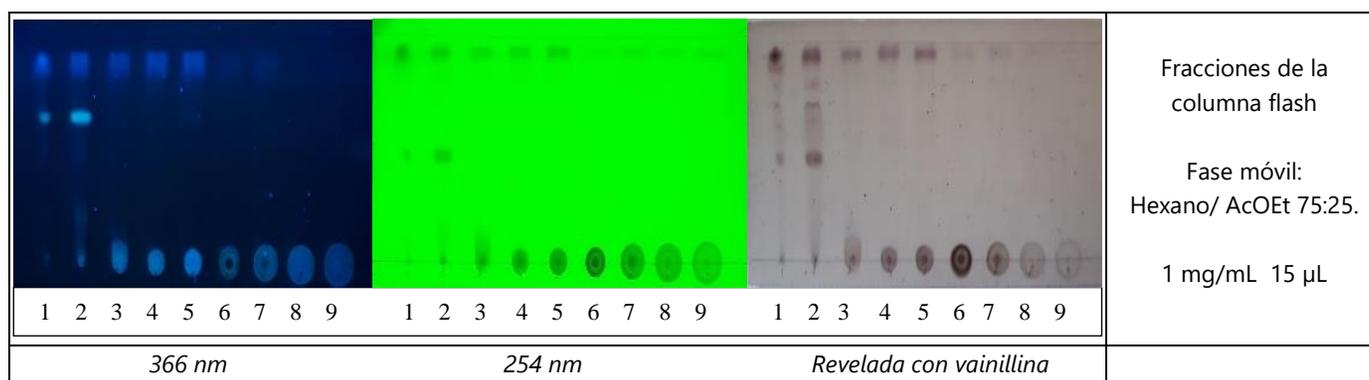
**Figura 8:** Efecto del extracto de AcOEt sobre la viabilidad de las células HeLa y HCT. Los valores son promedios  $\pm$  error estándar, n=3.

### 7.4.1. Cromatografía en Columna Flash

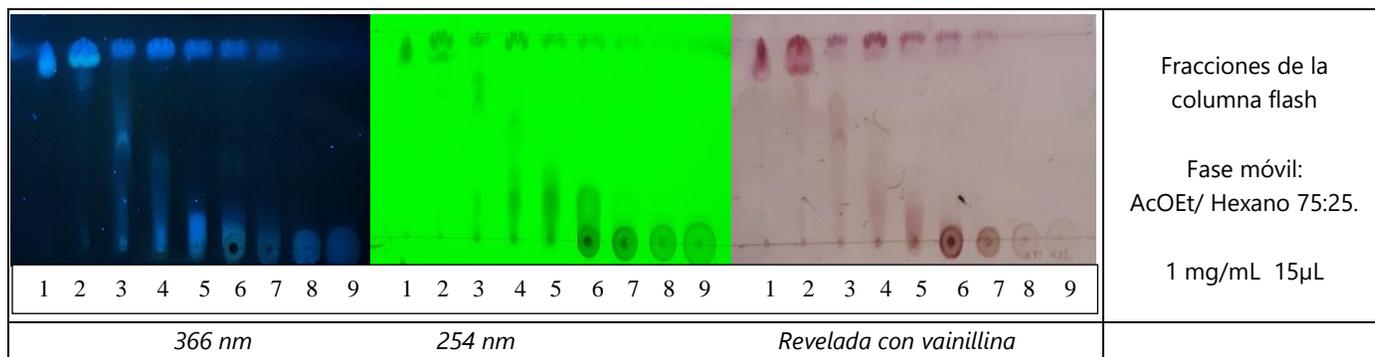
Para fraccionar el extracto de AcOEt se realizó cromatografía en columna, en una primera ocasión con 1g de extracto y debido a que se obtuvo un bajo rendimiento en las fracciones (**Cuadro 7**), se realizó nuevamente otra cromatografía con 2g de extracto. En las placas 3 y 4 se muestra la CCF de todas las fracciones obtenidas de la columna flash.

**Cuadro 7:** Rendimiento de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna flash, a partir de 1 g de extracto de AcOEt.

Fracciones del extracto de AcOEt		
Fracción	Fase móvil	Rendimiento (mg)
1	Hexano 100%	140.3
2	Hexano-AcOEt 75 %-25%	411.6
3	Hexano-AcOEt 50 %-50%	151.6
4	Hexano-AcOEt 25 %-75%	52.4
5	AcOEt 100%	20.2
6	AcOEt-MeOH 75 %-25%	86.1
7	AcOEt-MeOH 50 %-50%	15.8
8	AcOEt-MeOH 25 %-75%	11.5
9	MeOH 100%	8

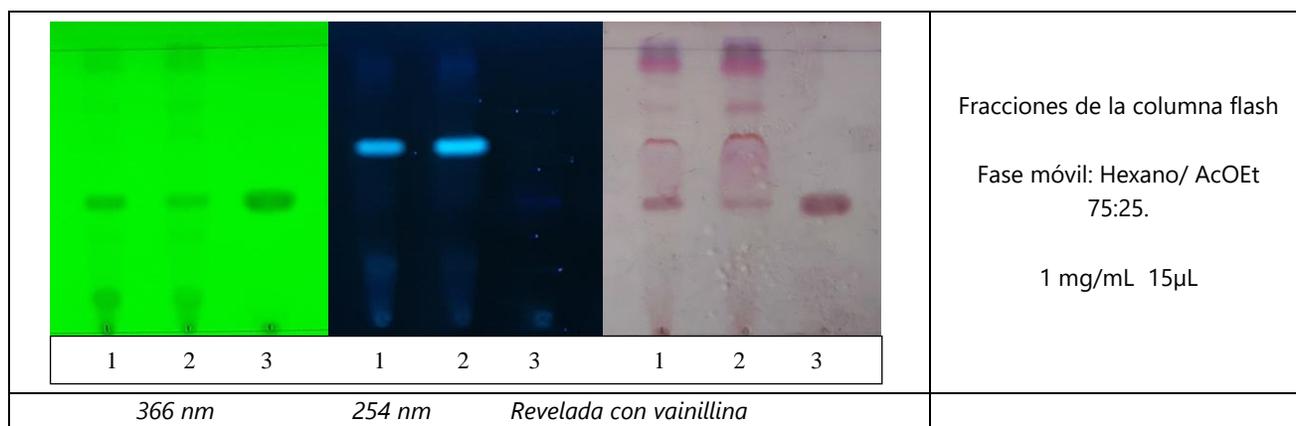


**Placa 3:** Cromatografía en capa fina de las nueve fracciones obtenidas del extracto de AcOEt mediante columna flash: 1) Hexano 100%, 2) Hexano-AcOEt 75%-25%, 3) Hexano-AcOEt 50%-50%, 4) Hexano-AcOEt 25%-75%, 5) AcOEt 100%, 6) AcOEt-MeOH 75%-25%, 7) AcOEt-MeOH 50%-50%, 8) AcOEt-MeOH 25%-75% y 9) MeOH 100%.

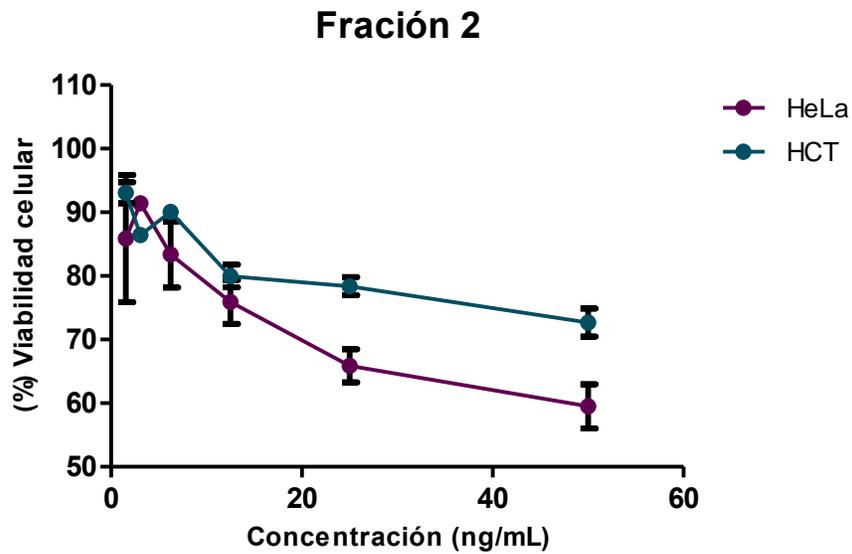


**Placa 4:** Cromatografía en capa fina de las nueve fracciones obtenidas del extracto de AcOEt mediante columna flash: 1) Hexano 100%, 2) Hexano-AcOEt 75%-25%, 3) Hexano-AcOEt 50%-50%, 4) Hexano-AcOEt 25%-75%, 5) AcOEt 100%, 6) AcOEt-MeOH 75%-25%, 7) AcOEt-MeOH 50%-50%, 8) AcOEt-MeOH 25%-75% y 9) MeOH 100%.

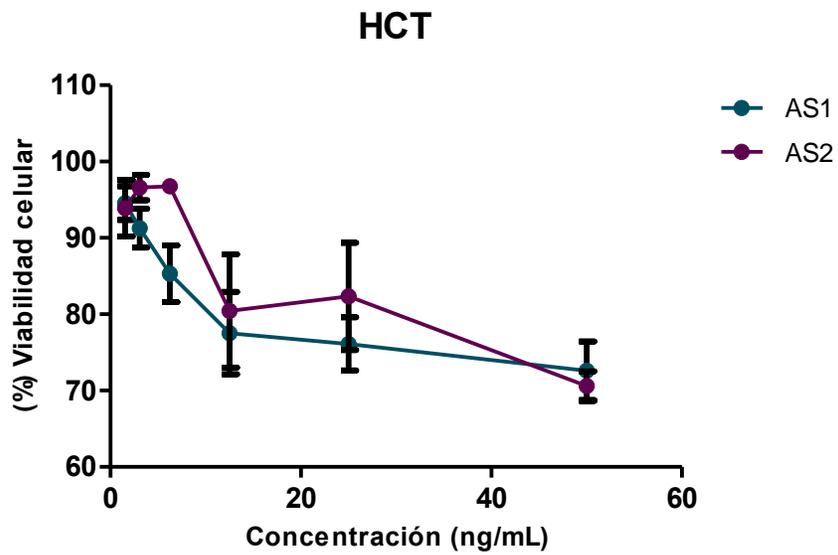
Se evaluó la actividad citotóxica de las primeras ocho fracciones obtenidas, en células HeLa y HCT. La fracción dos resultó ser la más activa en ambas líneas celulares (**Figura 9**). Sin embargo, en esta fracción se observaron pequeños cristales transparentes, un polvo blanco y uno color beige. Para separar esta mezcla, la fracción fue disuelta con hexano y filtrada. De esta manera se obtuvieron nuevamente dos fracciones, 272.1 mg de una fracción soluble en acetato de etilo (AS1) y 430.3 mg de una fracción soluble en hexano (AS2). Las dos fracciones fueron analizadas por CCF (**Placa 5**) y evaluadas nuevamente en células HCT (**Figura 10**) y HeLa (**Figura 11**). Ambas fracciones disminuyeron la viabilidad celular hasta el 50 % en células HeLa, por lo que se pudo determinar la  $IC_{50}$  (concentración que produce una disminución de la viabilidad celular al 50 %); sin embargo, la fracción AS1 presentó una mayor potencia en células HeLa con un  $IC_{50}$  de 40.46 ng/mL (**Cuadro 8**).



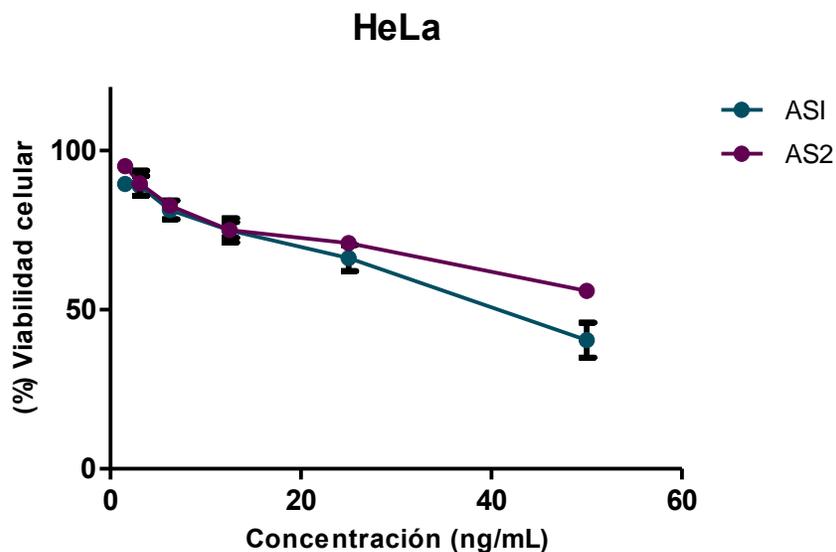
**Placa 5:** Cromatografía en capa fina de las subfracciones del extracto de AcOEt. 1) Fracción 2 del extracto de AcOEt 2) Fracción soluble en hexano (AS2) y 3) Fracción soluble en AcOEt (AS1).



**Figura 9:** Efecto de la fracción 2 del extracto de AcOEt sobre la viabilidad de las células HeLa y HCT. Los valores son promedios  $\pm$  error estándar, n=3.



**Figura 10:** Efecto de la fracción AS1 y AS2 del extracto de AcOEt sobre la viabilidad de las células HCT. Los valores son promedios  $\pm$  error estándar, n=3.



**Figura 11:** Efecto de la fracción AS1 y AS2 del extracto de AcOEt sobre la viabilidad de las células HeLa. Los valores son promedios  $\pm$  error estándar,  $n=3$ .

**Cuadro 8:** Evaluación citotóxica de las subfracciones del extracto de acetato de etilo en dos líneas celulares.

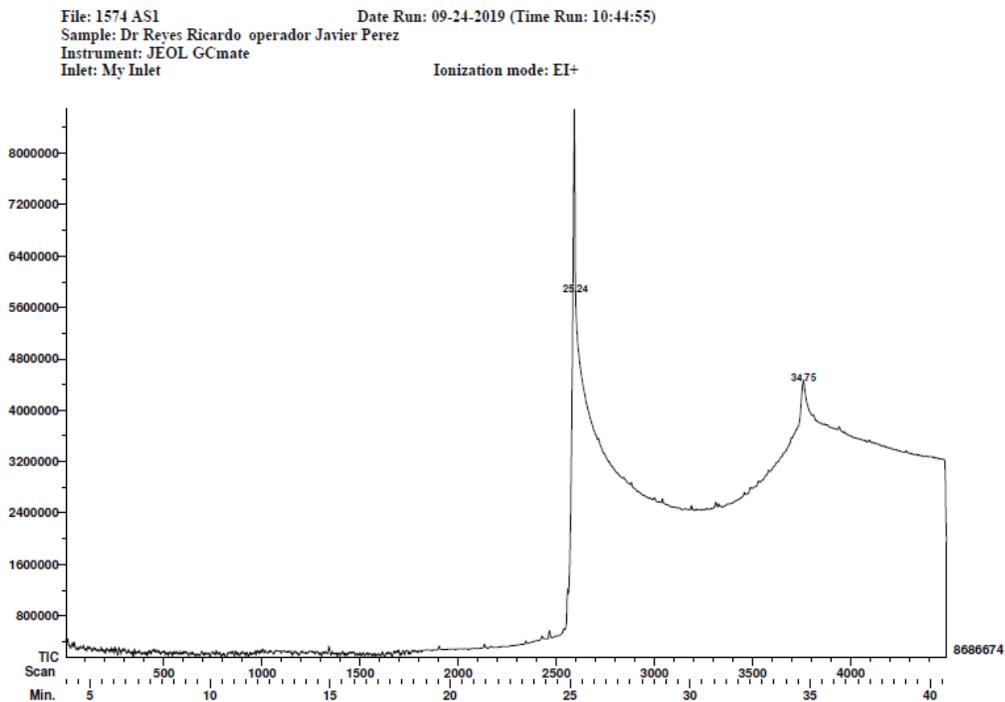
Línea celular	Fraciones de la fracción 2 del extracto de AcOEt	Mayor concentración evaluada (ng)	IC <sub>50</sub> (ng/mL)*
HeLa	1 (AS1) soluble en AcOEt	50	40.46 $\pm$ 3.17
	2 (AS2) soluble en Hexano	50	55.85 $\pm$ 2.20
HCT	1 (AS1) soluble en AcOEt	50	>50
	2 (AS2) soluble en Hexano	50	>50

\*IC<sub>50</sub>  $\pm$  error estándar,  $n=3$ .

#### 7.4.2. Análisis por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM)

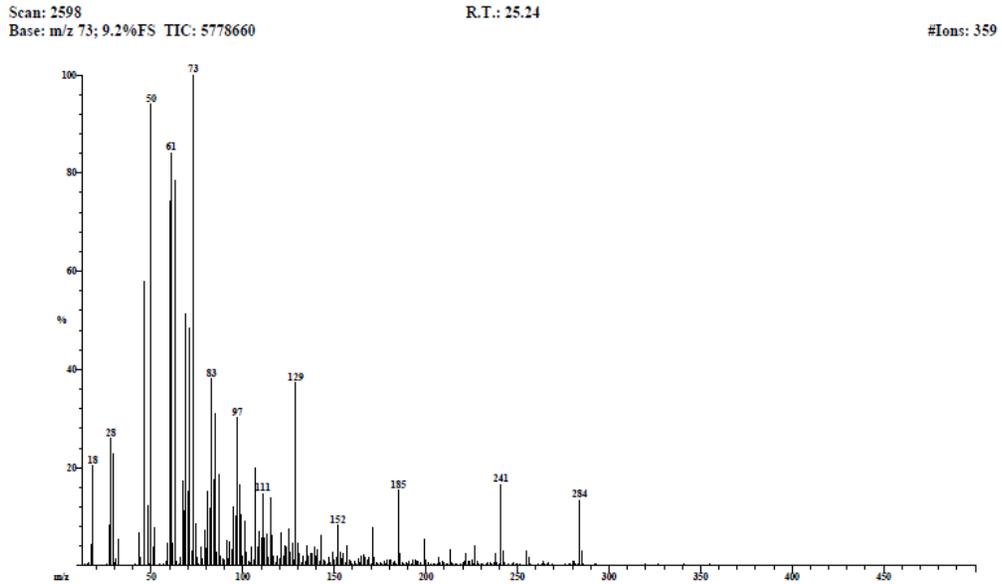
Debido a que las dos subfracciones obtenidas (AS1 y AS2) presentaron una disminución de la viabilidad celular al 50 % en células HeLa, se decidió realizar un análisis mediante CG-EM para conocer el perfil cromatográfico de ambas fracciones, de acuerdo con los compuestos volátiles presentes en ellas y su abundancia. Este análisis permitió separar los compuestos volátiles dentro de una muestra e identificarlos gracias a la comparación de su espectro obtenido experimentalmente contra los espectros contenidos en una base de datos (NIST). Los espectros de masas nos dieron información sobre la masa molecular de los compuestos y su patrón de fragmentación para identificar o caracterizar dichas moléculas.

Para la fracción AS1 se detectaron dos compuestos (**Figura 12**): uno mayoritario con un TR de 25.24 y un  $m/z$  de 73 (284) (**Figura 13**), el cual correlaciona en un 9.2% al de la base de datos para el ácido esteárico (**Figura 14**) y otro con un TR de 34.75 y un  $m/z$  de 60 (396) (**Figura 15**). Para la fracción AS2 se detectaron cuatro compuestos, con los siguientes tiempos de retención: TR 24.39  $m/z$  88 (312), TR 22.01  $m/z$  88 (286), TR 23.56  $m/z$  28 (299) y TR 24.02  $m/z$  28 (341) (**Figura 16**) (**Anexo 1-3**). El espectro de masas del compuesto mayoritario (**Figura 17**) con tiempo de retención de 24.39, correlaciona en un 89.8% al de la base de datos para el etil éster del ácido undecanoico (**Figura 18**).

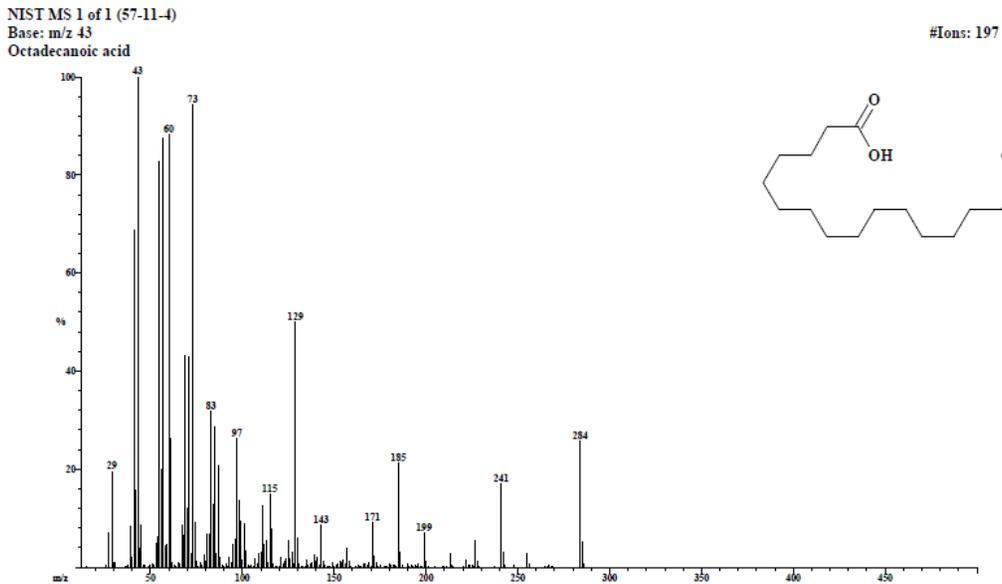


**Figura 12:** Cromatograma de la fracción AS1, se observan dos señales correspondientes a los dos compuestos presentes en la fracción, los cuales tienen un tiempo de retención de 25.24 y 34.75.

File: 1574 AS1 Date Run: 09-24-2019 (Time Run: 10:44:55)  
Sample: Dr Reyes Ricardo operador Javier Perez  
Instrument: JEOL GCmate  
Inlet: My Inlet Ionization mode: EI+

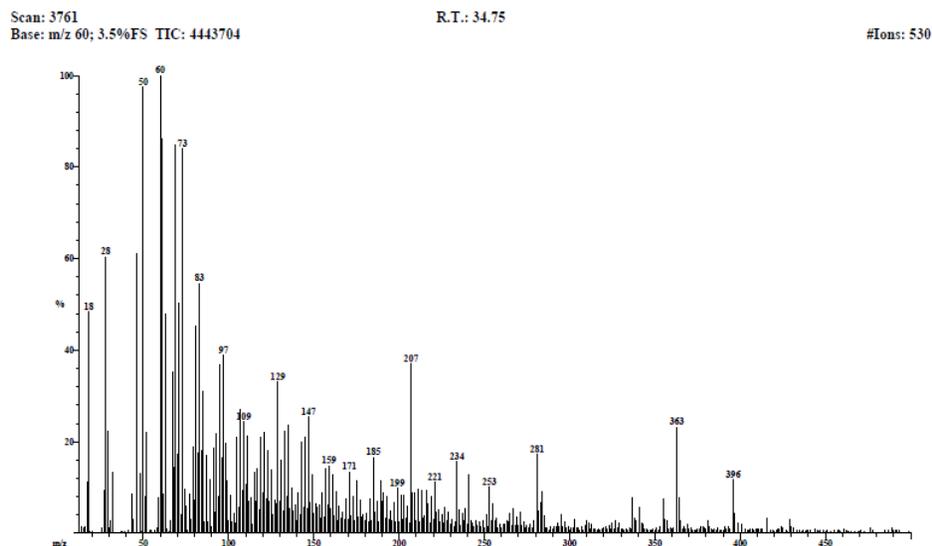


**Figura 13:** Espectro de masas experimental del compuesto mayoritario presente en la fracción AS1, con un tiempo de retención de 25.24 y un  $m/z$  de 73 (284). El espectro de masas correlaciona en un 9.2% al espectro de masas para el ácido esteárico.



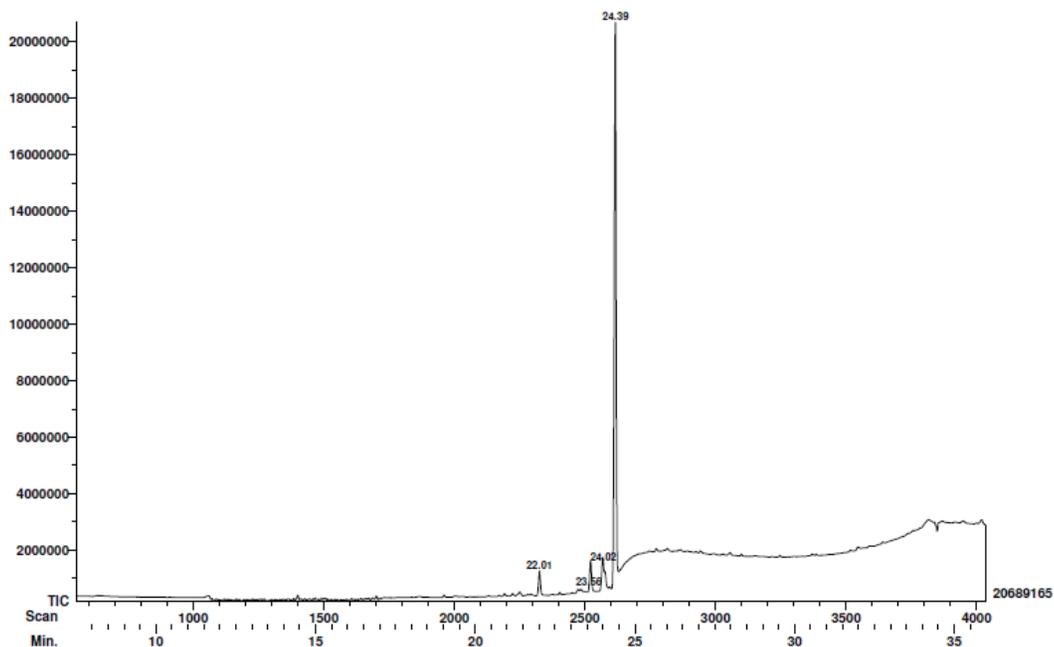
**Figura 14:** Espectro de masas de la base de datos correspondiente al ácido esteárico.

File: 1574 AS1 Date Run: 09-24-2019 (Time Run: 10:44:55)  
Sample: Dr Reyes Ricardo operador Javier Perez  
Instrument: JEOL GCmate  
Inlet: My Inlet Ionization mode: EI+



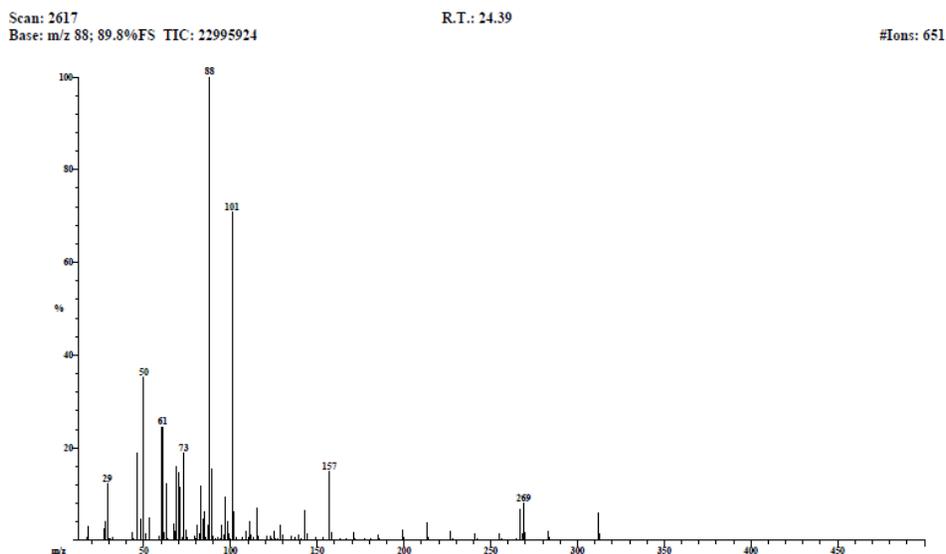
**Figura 15:** Espectro de masas del segundo compuesto mayoritario presente en la fracción AS1, con un tiempo de retención de 34.75 y un  $m/z$  de 60 (396).

File: 1575 AS2 Date Run: 09-24-2019 (Time Run: 13:15:23)  
Sample: Dr Reyes Ricardo operador Javier Perez  
Instrument: JEOL GCmate  
Inlet: My Inlet Ionization mode: EI+

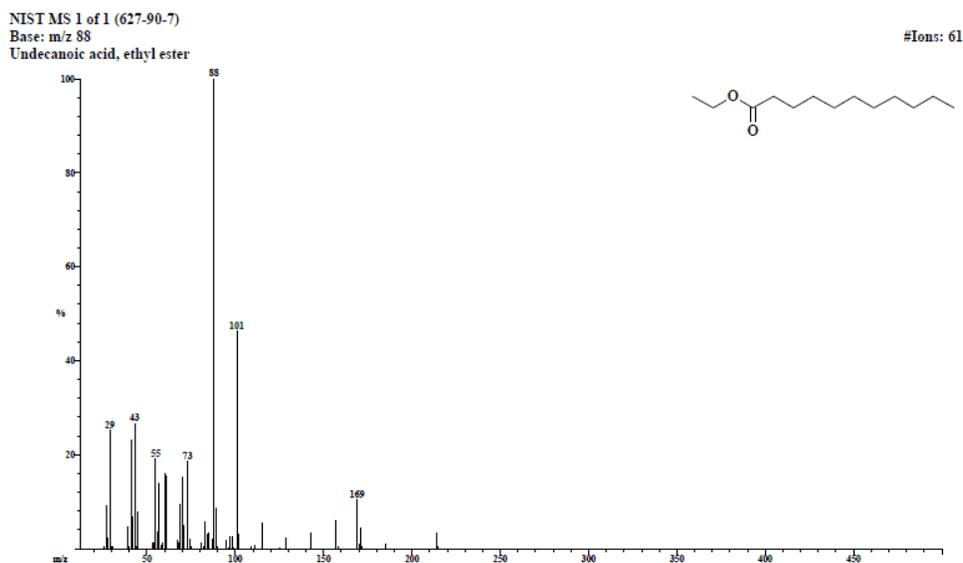


**Figura 16:** Cromatograma de la fracción AS2, se observan cuatro señales correspondientes a los cuatro compuestos presentes en la fracción, de los cuales hay un mayoritario con un tiempo de retención de 24.39.

File: 1575 AS2 Date Run: 09-24-2019 (Time Run: 13:15:23)  
Sample: Dr Reyes Ricardo operador Javier Perez  
Instrument: JEOL GCmate  
Inlet: My Inlet Ionization mode: EI+



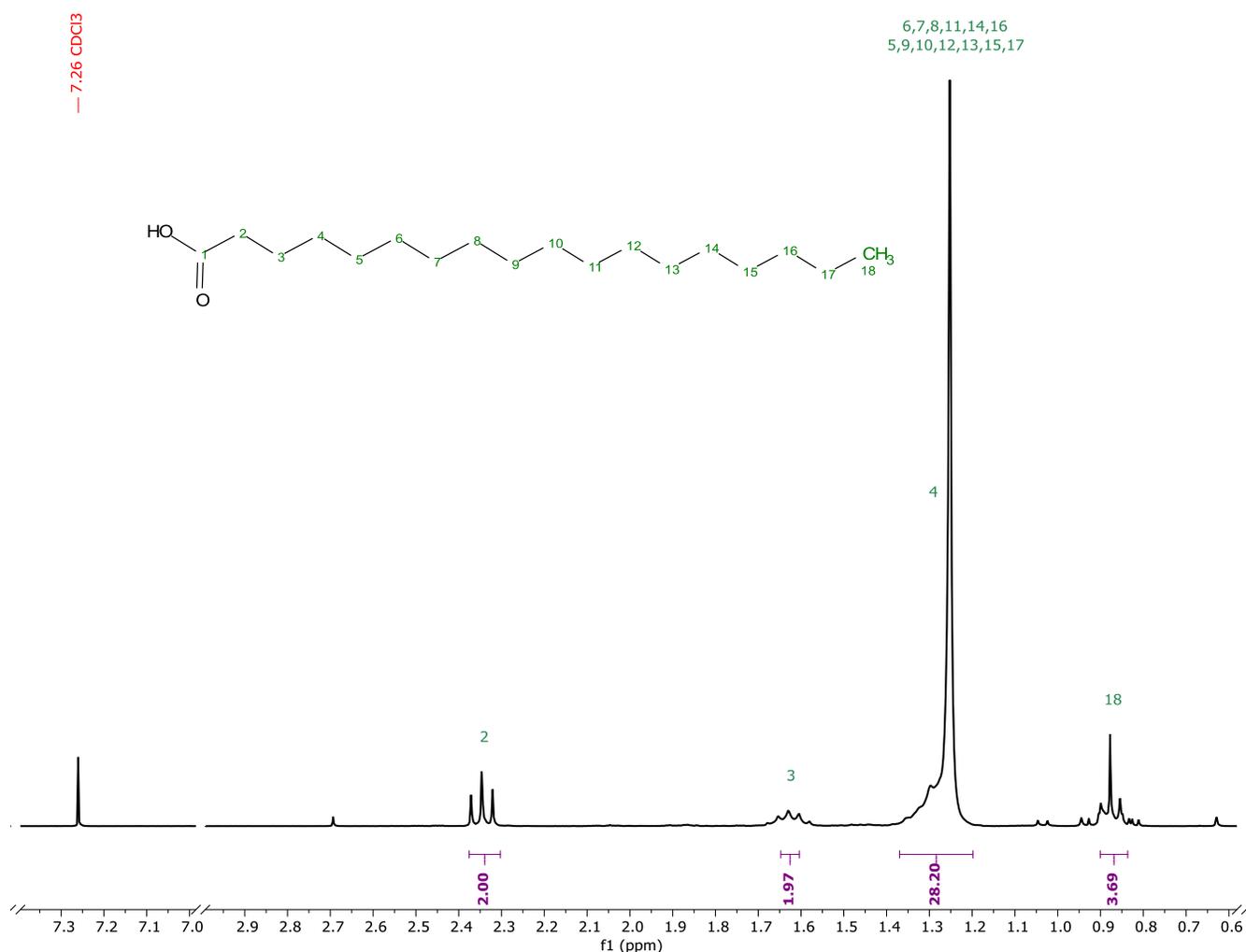
**Figura 17:** Espectro de masas experimental del compuesto mayoritario presente en la fracción AS2, con un tiempo de retención de 24.39. El espectro de masas correlaciona en un 89.8 % al espectro de masas de la base de datos, el cual corresponde al etil éster del ácido undecanoico.



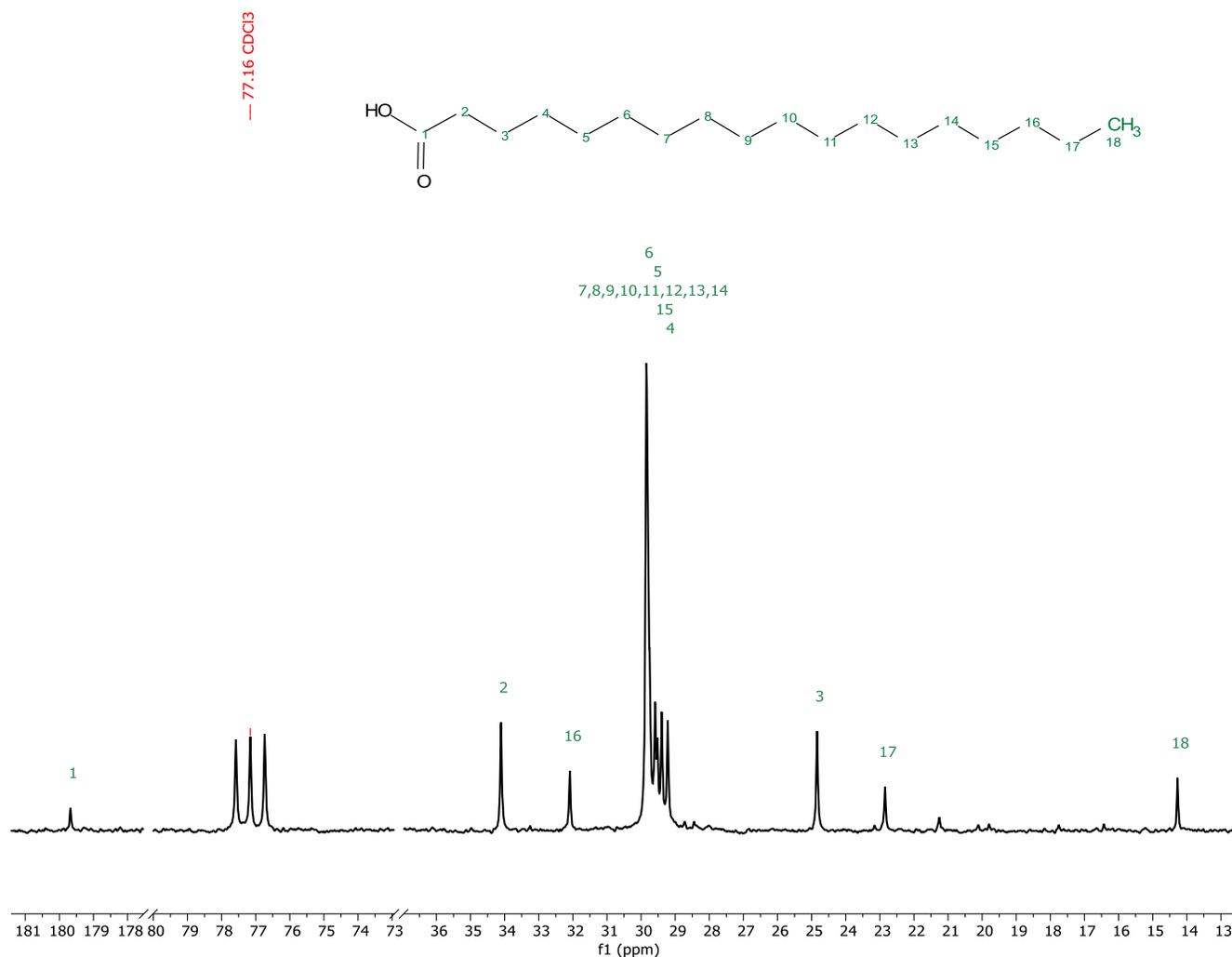
**Figura 18:** Espectro de masas de la base de datos correspondiente al etil éster del ácido undecanoico.

### 7.4.3. Resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono (RMN $^1\text{H}$ , RMN $^{13}\text{C}$ )

La fracción AS1 presentó el mayor efecto citotóxico en la línea celular HeLa, y de acuerdo con el análisis mediante CG-EM, esta fracción presenta como compuesto mayoritario al ácido esteárico. Para corroborar esto, se realizó un análisis de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono (RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ ) a 300 MHz, con el objetivo de elucidar la estructura química del compuesto aislado o de la posible mezcla obtenida. La fracción AS1 resultó ser efectivamente una mezcla; sin embargo, se logró identificar al ácido graso detectado mediante CG-EM, el cual corresponde con el ácido octadecanoico o esteárico. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$ , se observaron señales correspondientes a los hidrógenos y carbonos para la estructura del ácido esteárico (**Figuras 19 y 20**).



**Figura 19:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , se muestran en azul los desplazamientos químicos de las señales obtenidas, en purpura la integración de cada señal (número de hidrógenos) y en verde se señala el número de hidrogeno de la estructura del ácido esteárico al cual corresponde cada señal.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  2.35 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 1.62 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 1.25 (s, 28H), 0.90 – 0.85 (m, 3H).



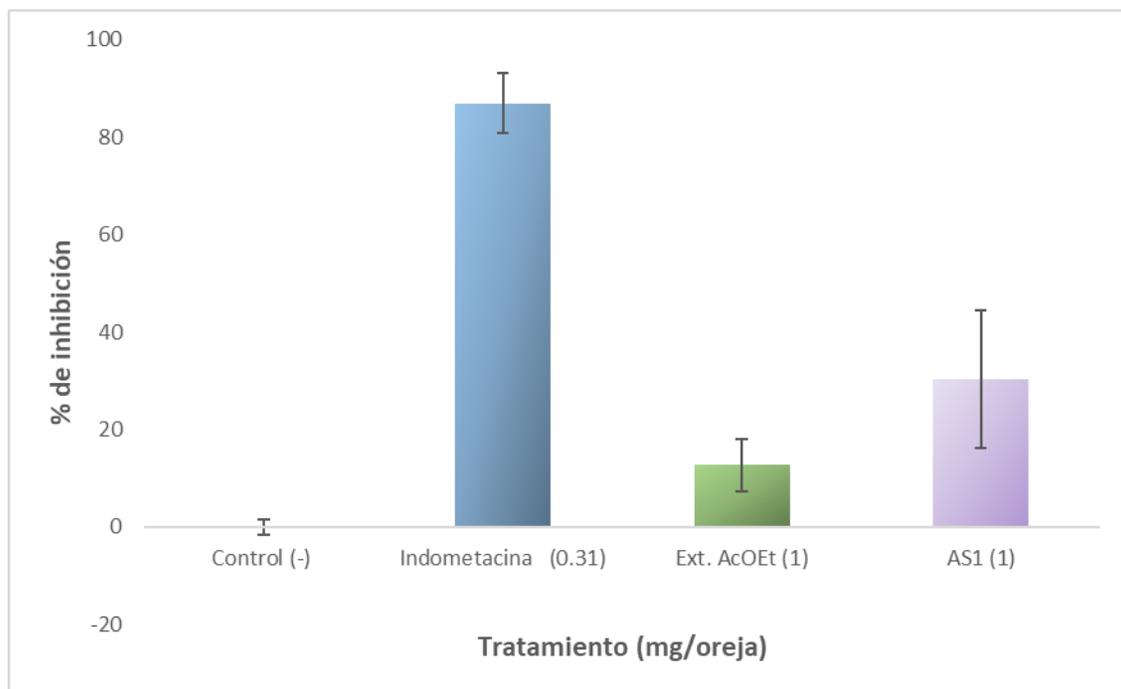
**Figura 20:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C, en verde se señala el número del carbono de la estructura del ácido esteárico al cual corresponde cada señal. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 34.11, 32.09, (29.84, 29.59, 29.52, 29.39, 29.22), 24.84, 22.85, 14.27.

Cabe destacar que una vez que se corroboró que en la fracción AS1 se encontró el ácido esteárico como mayoritario, se evaluó la actividad citotóxica del ácido esteárico puro, obtenido de una muestra estándar (Sigma) y a las mismas concentraciones con las que se evaluó la fracción AS1 (1.56 a 50 ng/ml). El ácido esteárico no disminuyó la viabilidad celular de las líneas tumorales humanas HeLa y HCT. Por lo cual, cabe la posibilidad de que la actividad citotóxica de la fracción AS1 se deba a un sinergismo o potenciación debida a la mezcla de los compuestos presentes en dicha fracción.

#### 7.4.4. Actividad anti-inflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA

Finalmente se evaluó la actividad anti-inflamatoria del extracto de AcOEt y la fracción AS1, esto teniendo en cuenta que algunos ácidos grasos, como el ácido palmítico presentan un efecto anti-inflamatorio (López-Miranda, 2018). Además de que las líneas tumorales humanas HeLa y HCT, corresponden con tipos de cáncer en los que la inflamación juega un papel muy importante en su desarrollo.

Los resultados de la actividad anti-inflamatoria del extracto y la fracción se muestran en la **Figura 21**, se observa que el extracto de AcOEt no presenta actividad antiinflamatoria, mientras que la fracción AS1 si, aunque sigue siendo baja, ya que solo disminuye la inflamación en un 30 %.



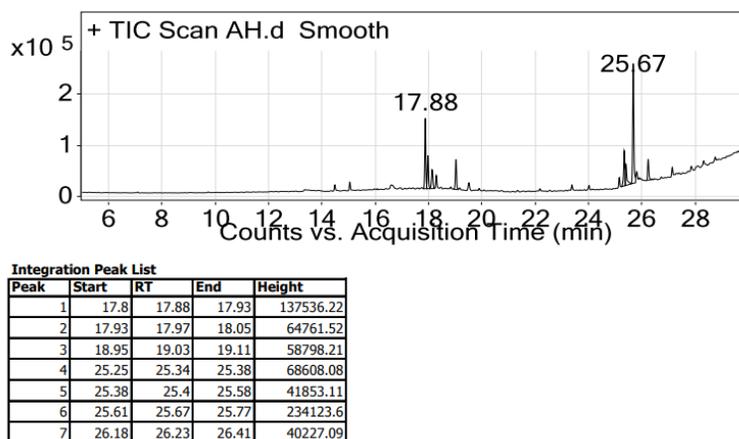
**Figura 21:** Los datos representan el promedio de tres repeticiones con el error estándar de la media. Los resultados se analizaron mediante una prueba de *Dunnett*, los valores de  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*\*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

## 7.5. Estudio biodirigido: actividad anti-inflamatoria

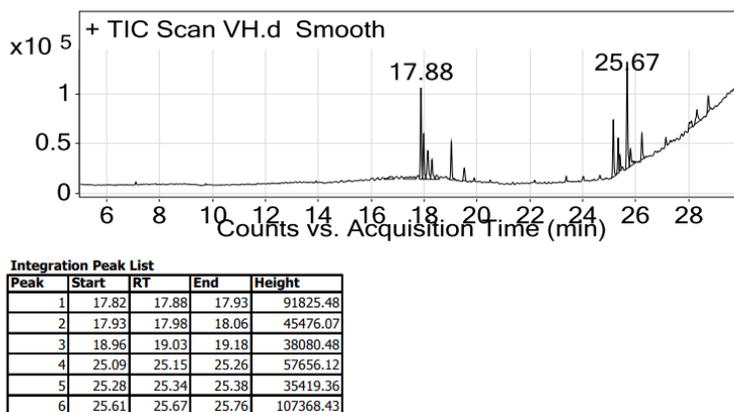
### 7.5.1. Análisis por Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas (CG-EM)

Se realizó un análisis mediante CG-EM de los extractos hexánicos de los basidiomas de las distintas localidades, para conocer el perfil cromatográfico de estos y si son similares entre sí, de acuerdo con los compuestos volátiles presentes en los extractos y su abundancia.

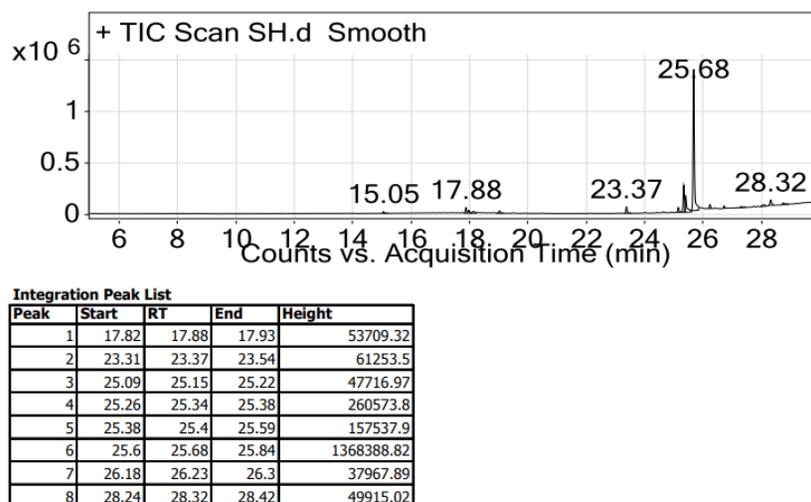
En las **Figuras 22, 23 y 24**, se muestran los cromatogramas obtenidos de los tres extractos hexánicos, en los cuales se observan los compuestos volátiles más abundantes y su tiempo de retención (TR). Los cromatogramas obtenidos muestran que el perfil cromatográfico de los tres extractos es similar (**Cuadro 9 y Anexo 4-10**) y los compuestos mayoritarios en los tres extractos hexánicos son los mismos, esto de acuerdo con su TR y sus espectros de masas (**Figuras 25 y 26**).



**Figura 22:** Cromatograma del extracto hexánico de los basidiomas de *L. indigo* procedentes de Avándaro, con dos picos mayoritarios con tiempo de retención (TR) de 17.88 y 25.67.

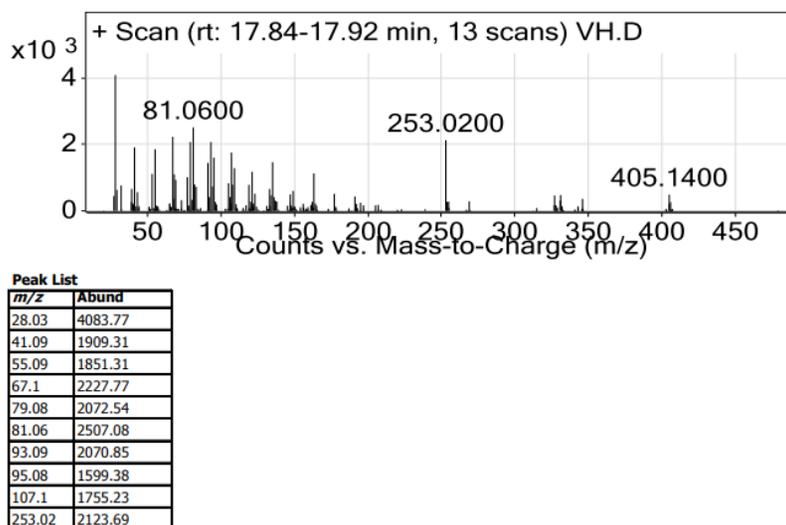


**Figura 23:** Cromatograma del extracto hexánico de los basidiomas de *L. indigo* procedentes de Valle de Bravo, con dos picos mayoritarios con tiempo de retención (TR) de 17.88 y 25.67.

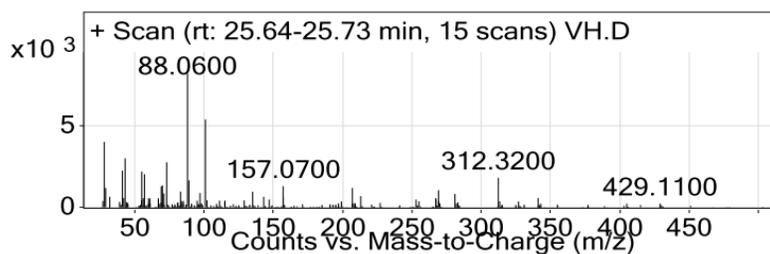


**Figura 24:** Cromatograma del extracto hexánico de los basidiomas de *L. indigo* procedentes de San Lucas del Pulque, con un pico mayoritario con tiempo de retención (TR) de 25.68.

Espectro de masas de los picos mayoritarios:



**Figura 25:** Espectro de masas de un pico mayoritario de los tres extractos hexánicos de los basidiomas de *L. indigo*, con RT de 17.88 y *m/z* de 28 (405).



Peak List		
m/z	z	Abund
28.01		4017
41.09		2251.2
43.08		3008.27
55.1		2190.53
57.08		2029.67
73.06		2761.67
88.06		8209.73
89.07		1651.07
101.02		5399.33
312.32	1	1812.07

**Figura 26:** Espectro de masas de un pico mayoritario de los tres extractos hexánicos de los basidiomas de *L. indigo*, con RT de 25.67 y  $m/z$  de 88 (429).

**Cuadro 9:** Compuestos detectados por CG-EM en los extractos hexánicos de los basidiomas de *L. indigo* con diferentes procedencias.

m/z	RT	Avándaro	Valle de Bravo	San Lucas del Pulque
28(253)	17.88	**	**	**
28(253)	17.97	*	*	
28(252)	19.03	*	*	
88(157)	23.37			*
210(281)	25.15			*
28(206)	25.34	*	*	*
88(312)	25.67	**	**	**
28(341)	26.24	*	*	*
70(340)	28.32			*

Se detectaron seis compuestos en el extracto procedente de Avándaro, seis en el obtenido en Valle de Bravo y siete en la muestra de San Lucas del Pulque.

\* Presencia de compuestos en cada extracto de los basidiomas. \*\* Compuestos más abundantes en cada extracto de los basidiomas.

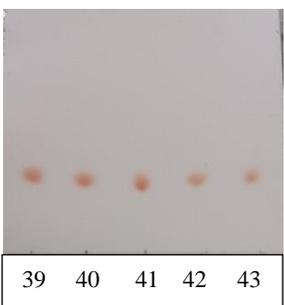
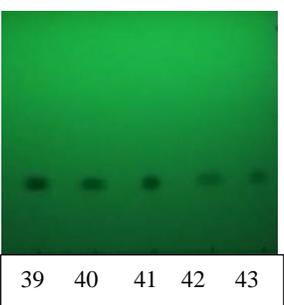
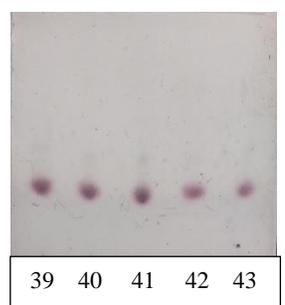
Además, el análisis mediante CG-EM presentó una ventaja al identificar los compuestos presentes en los extractos, ya que cuenta con una base de datos de espectros de masas de algunos compuestos volátiles. En el **Cuadro 10**, se muestran los compuestos sugeridos en los extractos hexánicos de acuerdo con el tiempo de retención y la base de datos. La mayoría de los compuestos sugeridos son ácidos grasos y dos son identificados como azulenos, sin embargo, la estructura propuesta no es similar a las ya reportadas para el género *Lactarius*, ya que carecen de dobles enlaces conjugados.

**Cuadro10:** Lista de compuestos detectados mediante CG-EM, en los extractos hexánicos de los basidiomas de *L. indigo*, de acuerdo con la base de datos NIST.

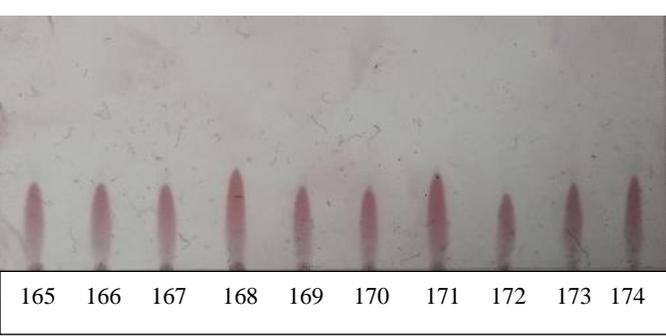
Tiempo retención (min)	Nombre del compuesto	Score	Área	Fórmula	%
17.88	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,4.beta.,4a.beta.,7.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]-	82.5	264881.2		30.91
17.97	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,4.beta.,4a.beta.,7.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]-	78.4	104808.2		12.23
19.03	7-Oxabicyclo[4.1.0]heptane, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-	80.1	103055.4		12.03
25.15	4,4'-Biphenyldicarboxaldehyde	75	22644.2		2.64
25.34	Linoleic acid ethyl ester	81.4	131218.3		15.31
25.67	Octadecanoic acid, ethyl ester	95	175077.4		20.43
26.24	Stearic acid, TMS derivative	81.3	55163		6.44
			856847.7		

## 7.5.2. Cromatografía en Columna

Debido a que en el análisis por CG-EM de los extractos hexánicos se obtuvieron dos espectros de masas similares a los azulenos, se realizó una cromatografía en columna con 1 g de extracto hexánico de las muestras de Avándaro, para aislar estos compuestos y determinar su estructura química. Se obtuvieron 349 fracciones en total. De la fracción 30-50 se obtuvieron 157.2 mg (**Placa 6**) y de la 205-214 se obtuvieron 24.5 mg, ambos conjuntos de fracciones coloreadas (violetas), dieron positivo al ser revelados con vainillina, sin embargo, al ser revelados se observa que no se trata sólo de un compuesto en cada fracción, sino de una mezcla. También se obtuvieron otras fracciones que revelaron con vainillina, pero que por la forma de elución podrían pertenecer a los ácidos grasos detectados mediante CG-EM (**Placa 7**).

			Fracciones del extracto hexánico Fase móvil: Hexano/AcOEt 95:5
Luz visible	Revelada a 254 nm	Revelado con vainillina	

**Placa 6:** Cromatografía en capa fina de las fracciones 39 a la 43 del extracto hexánico de *L. indigo*. Se observa un compuesto colorido en la placa (naranja), el cual revela en luz UV a 254 nm y con vainillina dando una coloración purpura.

	Fracciones del extracto hexánico Fase móvil: Hexano/AcOEt 95:5
Revelada con vainillina	

**Placa 7:** Cromatografía en capa fina de las fracciones 165 a la 174 del extracto hexánico de *L. indigo*. Se observa un compuesto que por sus características podría corresponder con un ácido graso.

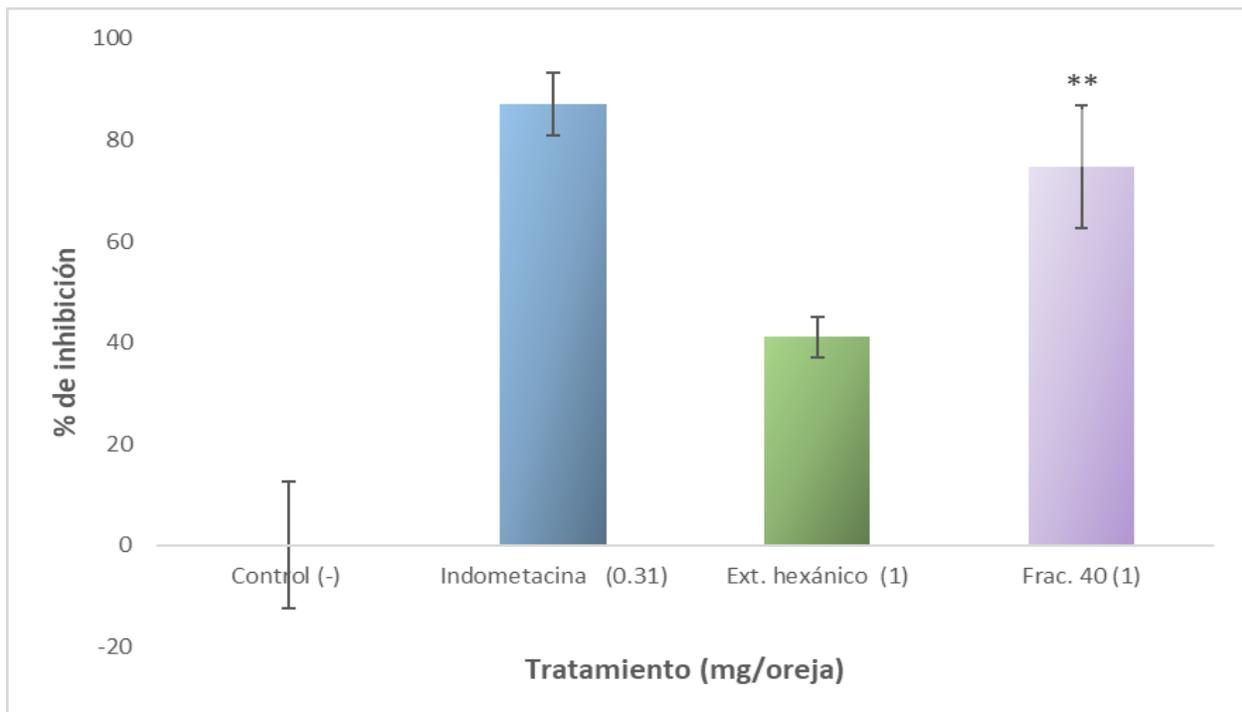
La mayoría de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna y analizadas por RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz resultaron ser mezclas y en muchas de ellas se detectan espectros similares a los encontrados en la literatura para los ácidos grasos que se detectaron mediante CG-EM. En cambio, en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de las fracciones coloridas se observaron señales correspondientes a hidrógenos aromáticos (similares a las de los azulenos); sin embargo, estas

eran opacadas por otras de mayor intensidad características de ácidos grasos, por lo que posteriormente se realizó una mejor purificación de una de las fracciones coloridas.

### 7.5.3. Actividad anti-inflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA

Adicionalmente, se evaluó la actividad antiinflamatoria de la fracción 40 obtenida mediante cromatografía en columna del extracto hexánico, esto debido a que algunos azulenos presentan actividad antiinflamatoria, tal es el caso del camazuleno, un azuleno producto de transformación de la matricina presente en los extractos de la manzanilla (*Matricaria recutita* L.) (Safayhi *et al.*, 1994).

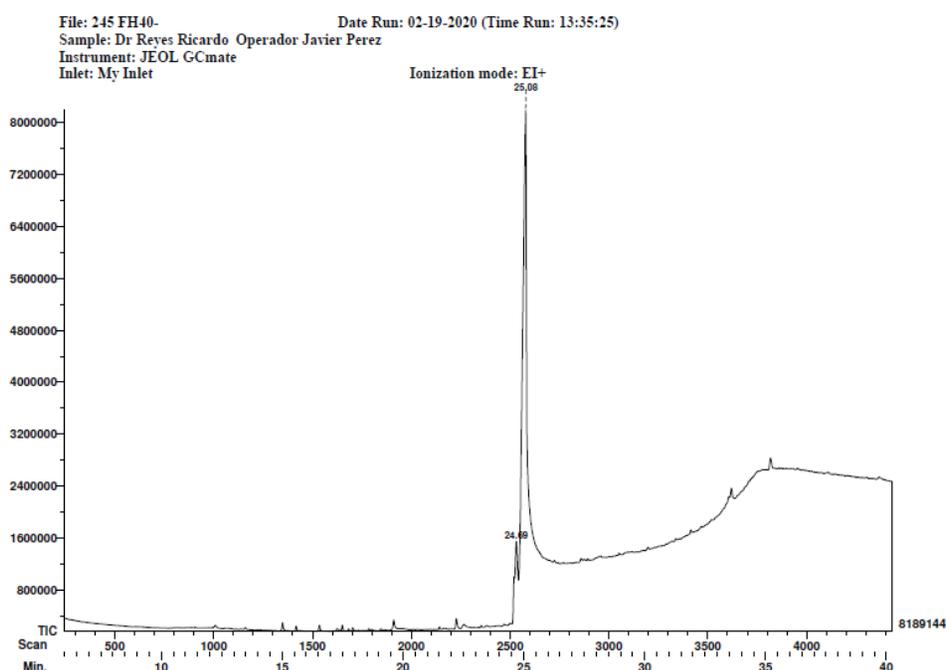
Los resultados de la actividad antiinflamatoria del extracto y la fracción se muestran en la **Figura 27**, se observa que el extracto hexánico no presenta una actividad anti-inflamatoria significativa, mientras que la fracción 40 si, ya que presenta un 74 % de inhibición de la inflamación.



**Figura 27:** Los datos representan el promedio de tres repeticiones con el error estándar de la media. Los resultados se analizaron mediante una prueba de *Dunnett*, los valores de  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*\*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.  $n=3$ , barras de error estándar.

### 7.5.4. Análisis por Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas (CG-EM).

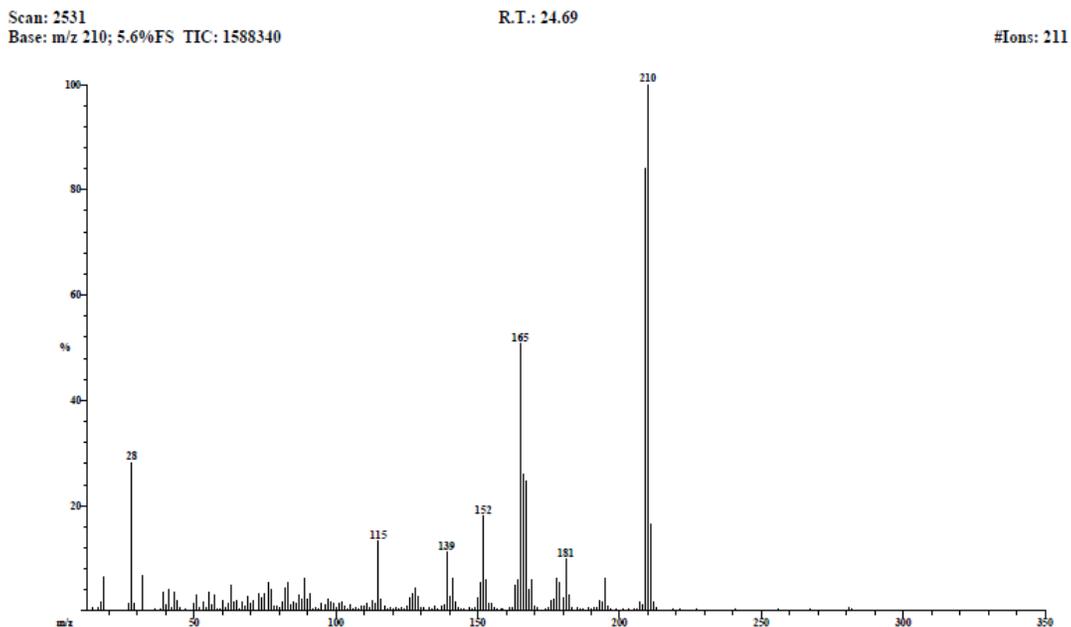
Debido a que la fracción 40 del extracto hexánico presentó actividad anti-inflamatoria, se decidió realizar un análisis de CG-EM, para identificar el azuleno y el ácido graso presente y su proporción en la fracción evaluada. En la **Figura 28** se observa el cromatograma de la fracción 40, en el cual se observan los tiempos de retención de los dos compuestos, los cuales fueron identificados gracias a su espectro de masas (**Figuras 28, 29 y 30**). Los cuales corresponden con el azuleno lactaroviolin (7-isopropenil-4-metil-1-azulenocarboxaldehído) con un tiempo de retención de 24.69 y un 9.34 % de abundancia y el ácido esteárico con un TR de 25.08 y un 90.66 % de abundancia, por lo que en la fracción 40, evaluada en el modelo de TPA estos compuestos se encontrarían en una proporción de 1:10 respectivamente.



**Figura 28:** Cromatograma de la fracción 40, con dos picos mayoritarios con tiempo de retención (TR) de 24.69 y 25.08.

File: 245 FH40- Date Run: 02-19-2020 (Time Run: 13:35:25)  
Sample: Dr Reyes Ricardo Operador Javier Perez  
Instrument: JEOL GCmate  
Inlet: My Inlet

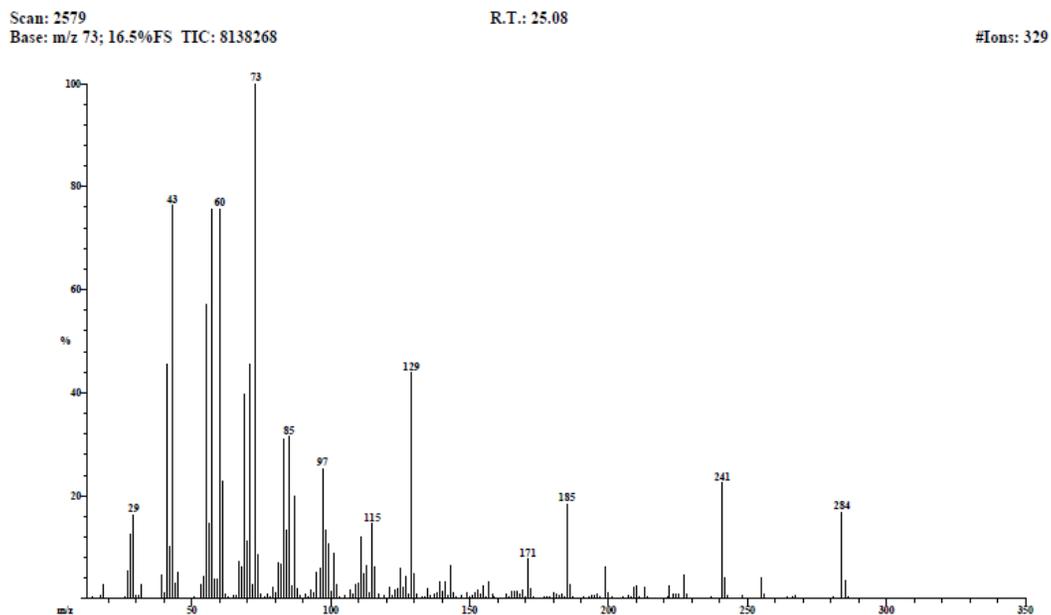
Ionization mode: EI+



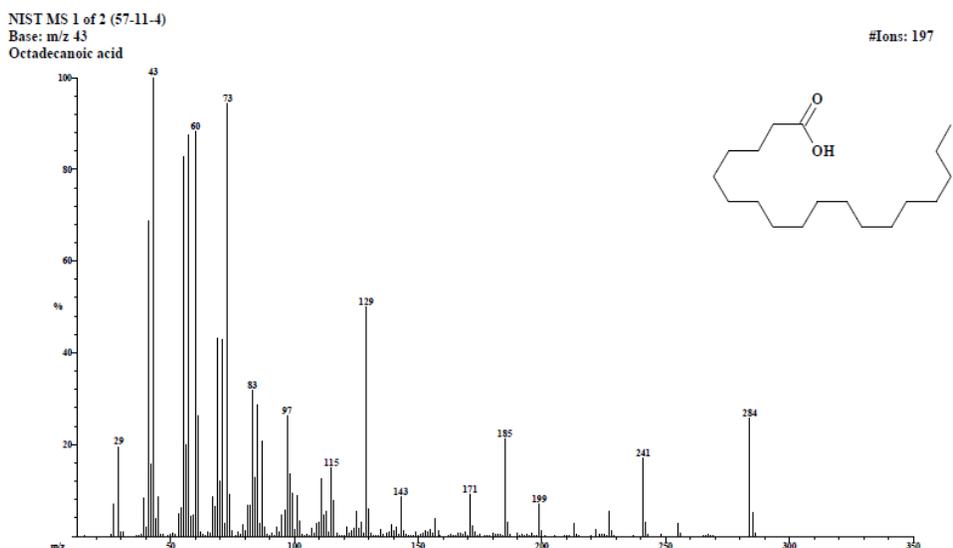
**Figura 29:** Espectro de masas del lactaroviolin presente en la fracción 40, con un RT de 24.69 y  $m/z$  de 165 (210).

File: 245 FH40- Date Run: 02-19-2020 (Time Run: 13:35:25)  
Sample: Dr Reyes Ricardo Operador Javier Perez  
Instrument: JEOL GCmate  
Inlet: My Inlet

Ionization mode: EI+



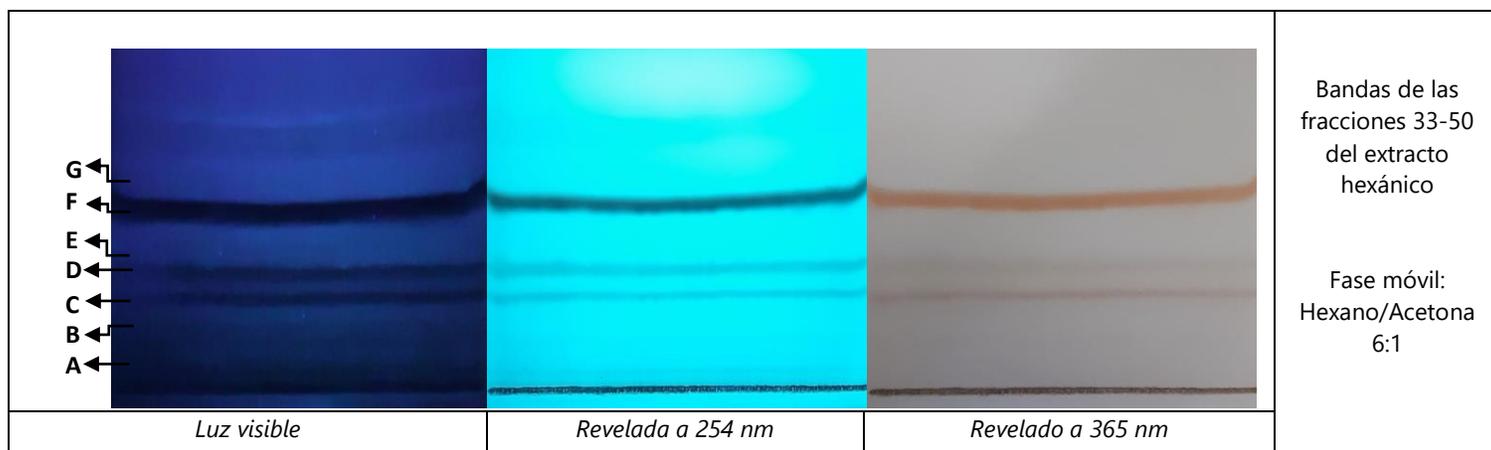
**Figura 30:** Espectro de masas del pico mayoritario de la fracción 40, que corresponde al ácido esteárico, con RT de 25.08 y  $m/z$  de 73 (284).



**Figura 31:** Espectro de masas del ácido esteárico de la base de datos, el cual es similar al obtenido por CG-EM de la fracción 40.

### 7.5.5. Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP)

Con referencia a lo observado en la CG-EM, se decidió realizar una CCFP (**Placa 8**), para separar el azuleno y el ácido graso presente en las fracciones 33 a la 50 del extracto hexánico (60 mg). Se obtuvieron siete bandas (**A-G**), esto debido a que el azuleno original se degradó debido al proceso de separación. La banda **F** corresponde a lactaroviolin, del cual se obtuvieron 6.1 mg, la banda **G** al ácido esteárico (32 mg) y las bandas **A** (3.2 mg), **B** (2.3 mg), **C** (2.3 mg), **D** (3.6 mg) y **E** (3.5 mg) a los derivados de lactaroviolin, de los cuales se obtuvieron bajas cantidades, por lo que no fue posible identificar específicamente cada derivado.



**Placa 8:** CCFP de las fracciones 33 a la 50 del extracto hexánico, se muestran las siete bandas obtenidas A-G. Donde la banda F corresponde al azuleno lactaroviolin.

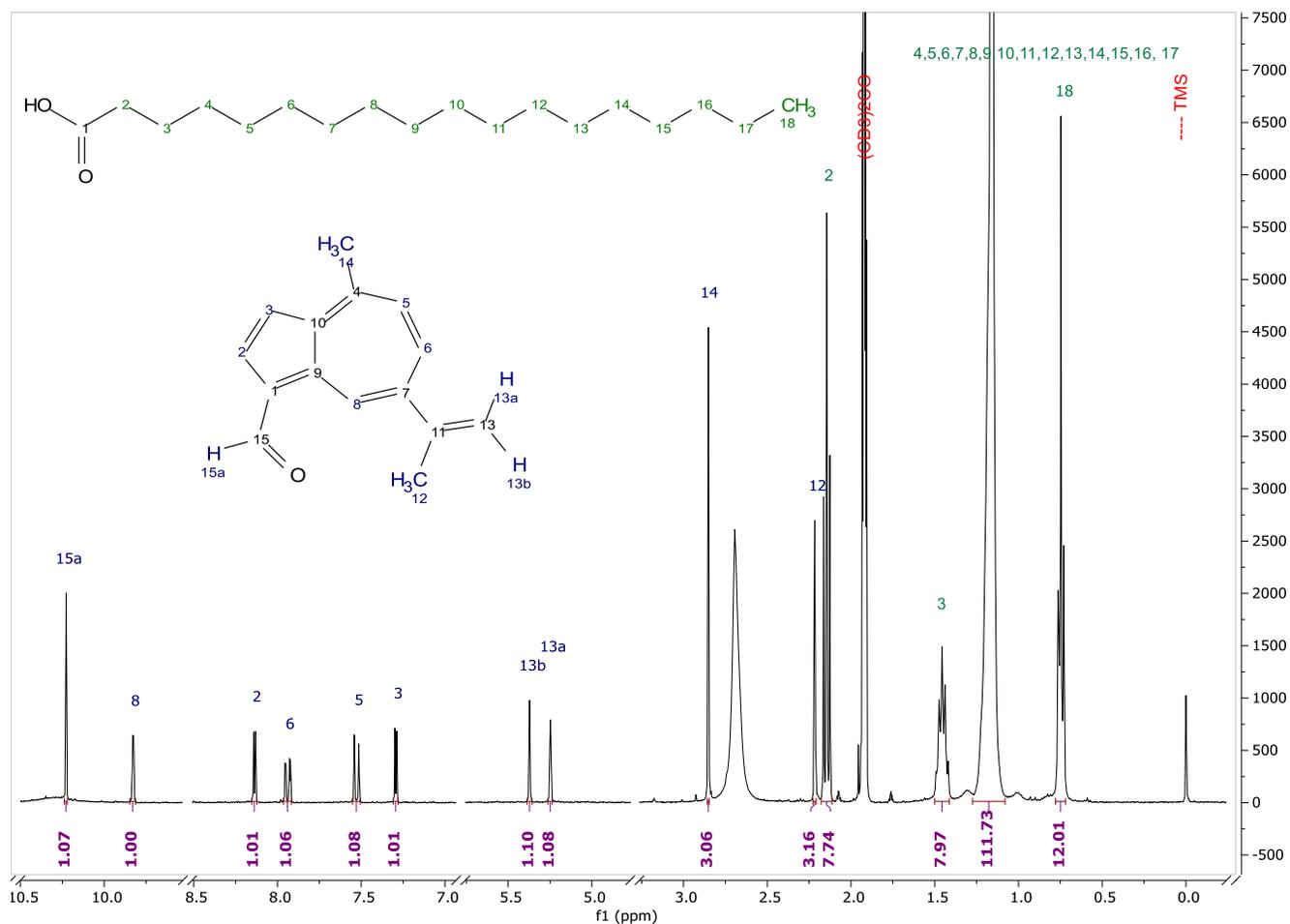
### 7.5.6. Resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono (RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C)

Para corroborar que la banda **F** obtenida por CCFP, correspondiera a lactarviolín, se realizó un análisis mediante RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, lo cual confirmó lo observado mediante CG-EM, ya que los datos obtenidos corresponden a la referencia de lactarviolín (Yang *et al.*, 2006) (**Cuadro 11**). Sin embargo, este azuleno no se obtuvo puro, aún se encontraba una cantidad importante de ácido esteárico, en proporción 4:1. En las **Figuras 32 y 33** se muestran los espectros de <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C de la banda **F**, con las señales para el lactarviolín y el ácido esteárico.

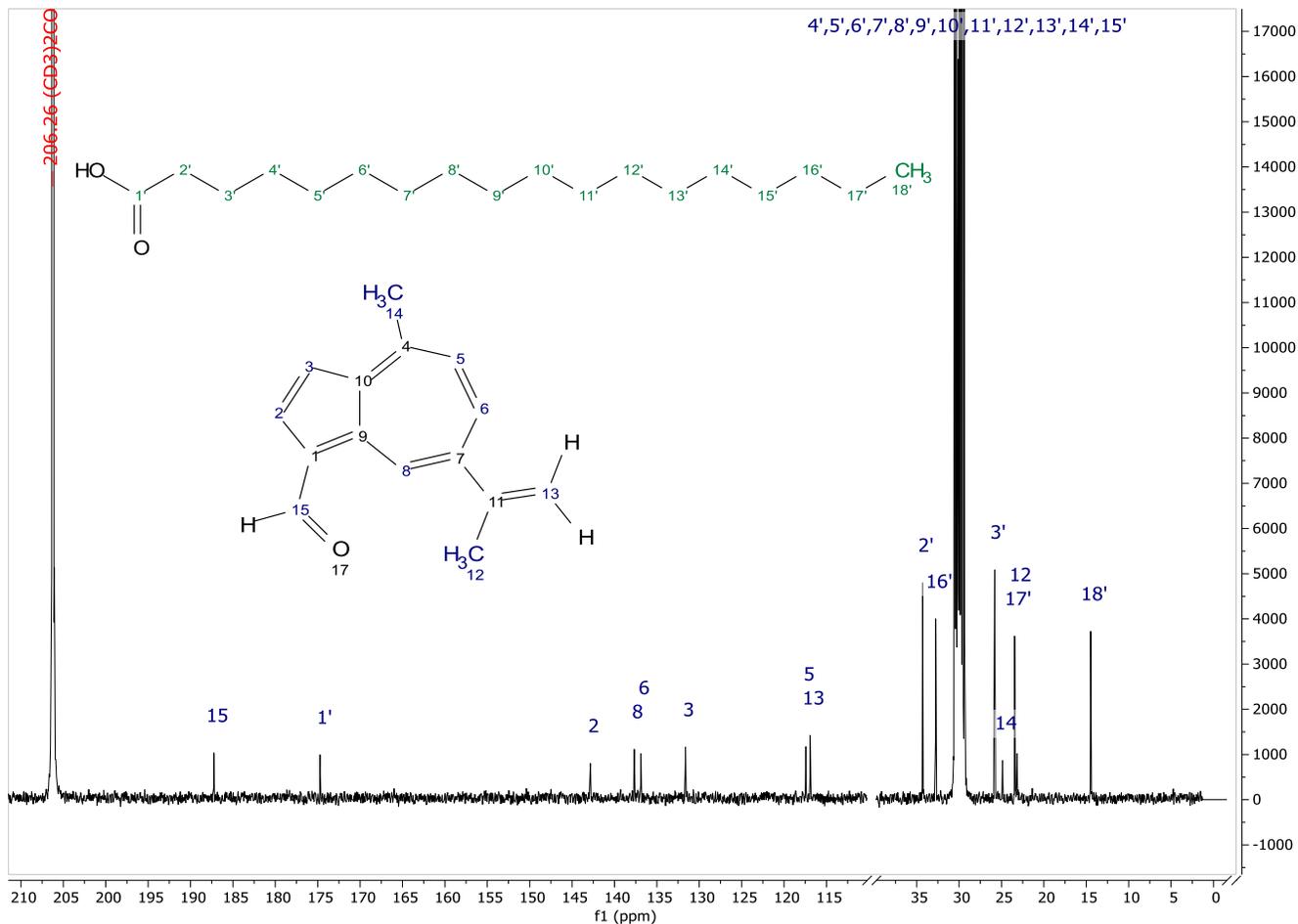
**Cuadro 11:** RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, en 125 y 400 MHz del compuesto lactarviolín de referencia (1) y el experimental (2).

Posc.	1		2	
	δ (C) (DEPT)	δ (H)	δ (C)	δ (H)
<b>1</b>	139.0 (s)			
<b>2</b>	142.6 (d)	8.20 (d, 4.2)	142.84	8.14 (d, 4.2)
<b>3</b>	131.4 (d)	7.34 (d, 4.2)	131.63	7.29 (d, 4.2)
<b>4</b>	150.1 (s)			
<b>5</b>	117.2 (d)	7.56 (d, 10.8)	117.43	7.53 (d, 10.8)
<b>6</b>	136.7 (d)	7.99 (dd, 10.8, 2.5)	136.89	7.94 (dd, 10.8, 2.1)
<b>7</b>	147.2 (s)			
<b>8</b>	137.3 (d)	9.89 (d, 2.5)	137.66	9.83 (d, 2.1)
<b>9</b>	144.4 (s)			
<b>10</b>	127.9 (s)			
<b>11</b>	129.9 (s)			
<b>12</b>	23.0 (q)	2.30 (s)	23.16	2.22 (dd, 1.3, 0.7)
<b>13</b>	116.7 (t)	5.35 (s)	116.93	5.25 (s)
		5.47 (s)		5.37 (s)
<b>14</b>	24.7 (q)	2.91 (s)	24.88	2.85 (s)
<b>15</b>	187.0 (d)	10.32 (s)	187.24	10.23 (s)

\*Ambas muestras fueron disueltas en CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> y la constante de acoplamiento está dada en Hz.



**Figura 32:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H, se muestran en azul los desplazamientos químicos de las señales para lactaroviolin, en púrpura la integración de cada señal (número de hidrógenos) y en verde se señala el número de hidrógeno de la estructura del ácido esteárico al cual corresponde cada señal. Lactaroviolin: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) δ 10.23 (s, 1H), 9.83 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 7.94 (dd, *J* = 10.8, 2.1 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 5.37 (s, 1H), 5.25 (s, 1H), 2.85 (s, 3H), 2.22 (dd, *J* = 1.3, 0.7 Hz, 3H). Ácido esteárico: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) δ 2.15 (t, *J* = 7.4 Hz, 8H), 1.46 (q, *J* = 7.3 Hz, 8H), 1.16 (s, 112H), 0.78 – 0.72 (m, 12H).



**Figura 33:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , se muestran en azul los desplazamientos químicos de las señales para lactaroviolin y en azul con tilde las señales para el ácido esteárico. Lactaroviolin:  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ )  $\delta$  187.24, 142.84, 137.66, 136.89, 131.63, 117.43, 116.93, 24.88, 23.16. Ácido esteárico:  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ )  $\delta$  174.72, 34.30, 32.76, 29.96, 25.79, 23.45, 14.47.

Debido a que el azuleno (lactaroviolin) no se obtuvo puro y a que la cantidad obtenida fue mínima (6.1 mg), no fue posible evaluarla de forma independiente en la prueba de TPA.

## 8. DISCUSIÓN

*Lactarius indigo* es un hongo micorrízico comestible y es muy apreciado como alimento (Robles *et al.*, 2018 y Pérez-Silva *et al.*, 2006). Esto se refleja en su venta en mercados locales (Montoya *et al.*, 2001 y Carrera *et al.*, 2005) y en sus distintas formas de preparación; desde la más sencilla y mayormente empleada en las comunidades rurales que es asado en el comal o a las brasas (Bautista, 2013), hasta las más elaboradas, las cuales llegan a formar parte de platillos gourmet. Por ejemplo, en Valle de Bravo, Edo de México, se impulsó la incorporación de hongos comestibles a la cocina gourmet gracias al Primer Festival Gastronómico de Valle de Bravo. *L. indigo* fue uno de los hongos silvestres empleados para la elaboración de platillos de alta calidad, con preparaciones como los raviolos con salsa de hongo azul, el pastel de hongo azul y hongos azules en tempura (Food and Travel México, 2017).

La importancia cultural de *L. indigo* no se ve únicamente reflejada en su uso alimenticio, sino también, en la cantidad de nombres locales con los que se le reconoce en algunos estados de la República Mexicana, los cuales hacen alusión a ciertas características del basidioma, como lo es la forma (orejitas), el color e incluso la presencia del látex que es de un tono azul muy intenso, por lo cual también resulta ser muy llamativo. Debido a eso no fue extraño encontrar 44 nombres locales dentro de nueve grupos étnicos (**Cuadro 2**), de los cuales mayormente los nahuas, otomíes, tzeltales y matlatzincas hacen referencia a la forma y el color azul de los basidiomas de *L. Indigo* y un nombre en zapoteco que hace referencia principalmente al látex del basidioma. Además, resulta interesante saber que algunos grupos étnicos lo nombran por el parecido en color al plumaje de ciertas aves azules, tal es el caso de los mixtecos en Oaxaca y los nahuas en Tlaxcala.

El color azul intenso de los basidiomas de *L. Indigo* facilita la identificación y uso de esta especie, sin embargo, en ciertas localidades como Acambay, Estado de México (Estrada-Torres y Aroche, 1987), es una característica que hace que se le considere como un hongo tóxico. Si bien no existen reglas generales para la identificación de especies tóxicas en cuanto a las formas de reconocimiento popular en base a las características como el olor, color, sabor y la presencia de gusanos en los basidiomas, esto genera que se pueda desaprovechar a ciertas especies como potenciales recursos alimenticios en ciertas localidades. Aunado a esto, la prohibición de la recolección, consumo y venta de hongos silvestres por temor a intoxicaciones también contribuye a la pérdida de conocimiento de los recursos fúngicos y sus potenciales usos, ya que el conocimiento y las prácticas tradicionales que se transmiten de generación en generación se pierden a través del tiempo (Ruan-Soto *et al.*, 2012 y Ruan-Soto *et al.*, 2018).

Los hongos silvestres además de ser una fuente alterna de alimentación en temporada de lluvias, también tienen un uso medicinal, el cual es aún poco estudiado. En este sentido, se encontraron algunos reportes del uso medicinal que se le da a los basidiomas de *L. indigo*

(**Cuadro 1**), principalmente en dos grupos étnicos: los otomíes del Edo. de México y los nahuas de Hidalgo y Tlaxcala (Bautista, 2013), donde la mayoría de las preparaciones incluyen a otras especies de hongos y/o plantas, principalmente en caldos para tratar enfermedades del sistema urinario y digestivo. El uso individual de *L. indigo* se reporta en una preparación de los otomíes en el Edo. de México, como un macerado en crudo del basidioma con agua o con leche y que funciona como purgante (Estrada-Torres y Aroche, 1987), este efecto purgante es discutido debido a que *L. indigo* es comestible, sin embargo, se puede notar que en todos los casos, la forma de preparación para uso alimenticio consiste en la cocción de los basidiomas y específicamente para esta receta medicinal el basidioma se emplea crudo, por lo que de esta forma se podría explicar cómo es que *L. indigo* puede tener este efecto purgante en crudo y a la vez ser comestible, el o los compuestos responsables del efecto purgante tendrían que sufrir una degradación con calor.

Recientemente a *L. indigo* se le ha considerado como a muchos otros hongos, un "alimento funcional" (Piqueras, 2004; Juárez-Montiel *et al.*, 2011; Soler-Rivas y Reglero, 2012; Nieto-Ramírez *et al.*, 2012), entendiéndose que un alimento funcional es aquel que además de su valor nutritivo, pueden ejercer acciones beneficiosas sobre ciertas funciones del organismo y el riesgo de contraer ciertas enfermedades (Eckhardt, 2001).

Esta información acerca del uso comestible y medicinal de *L. indigo*, así como los nombres comunes que se encontraron, son un reflejo de la importancia cultural que tiene esta especie. Teniendo en cuenta que la importancia de los hongos comestibles silvestres se ha evaluado utilizando indicadores precisos, como el número de nombres del hongo, de usos y el conocimiento de la biología, ecología y fenología de los hongos (Estrada-Torres, 1989). Además, se tiene que tomar en cuenta que la importancia cultural de un organismo está determinada por su valor para un grupo específico de individuos (Hunn, 1982). Respecto a esto, ya existen algunos reportes acerca de la importancia cultural de *L. indigo* en determinadas localidades, San Mateo Huexoyucan, Tlaxcala, en donde se identificaron las especies más importantes de hongos silvestres que crecen en un bosque de encinos, *L. indigo* se encontró dentro de las seis especies de hongos consideradas significativamente importantes por evaluación intracultural (Alonso-Aguilar *et al.*, 2014). En la localidad de Tlazala, en el municipio Isidro Fabela, Edo de México, *L. indigo* también es reportado como uno de los hongos con mayor importancia cultural en la localidad (Marín *et al.*, 2019). Estos reportes y los datos recopilados en el presente trabajo nos indican lo importante que es culturalmente este hongo azul en el país y sobre todo en las comunidades rurales, aunque faltan muchos estudios por realizar abarcando más grupos étnicos a lo largo del país, lo cual podría aumentar la información acerca de los usos, nombres locales y conocimiento en general que se tiene actualmente de la especie.

Otro aspecto importante relacionado a esta especie en particular, es la revisión de su biología, ecología y fenología. En cuanto a la fenología, resulta imprescindible considerar de qué forma los procesos de desarrollo del micelio y la fructificación del mismo sufren cambios debidos a las variaciones estacionales y/o por perturbación de los bosques, ya que es común escuchar

que los hongueros han reportado una disminución de la cantidad de hongos recolectados. Incluso cuando realizamos la colecta de esta especie para el desarrollo de este trabajo fue difícil encontrar basidiomas en sitios donde previamente habían sido reportados, como en Valle de Bravo, donde la única forma de obtención de los basidiomas fue por medio de compras a las afueras del mercado municipal, o en San Juan Atzingo, donde la caminata para recolectar los basidiomas tuvo que ser guiada por hongueros que conocen los sitios de crecimiento de la especie.

La disminución de la cantidad de hongos se le atribuye principalmente a asentamientos humanos irregulares y deforestación. Y esto no solo se observa en el estado de México, sino también en Chamula Chiapas, donde los hongos comestibles son considerados un recurso escaso (Ruan-Soto, 2018) debido a la reducción de bosques por la tala, crecimiento poblacional o aumento de las zonas de cultivo. Los estudios de deforestación y fragmentación desde 1990 y hasta 2000 de los Altos de Chiapas, muestran una reducción de aproximadamente el 40 % de la cobertura vegetal del bosque de pino, encino y bosque de niebla (Cayuela, 2006). Esta pérdida de hábitat afecta la riqueza y abundancia de los basidiomas, principalmente los macromicetos que forman micorrizas.

*L. indigo* puede formar micorrizas tanto con pinos como con encinos, esta asociación micorrizica con distintas especies y otras características tanto macroscópicas como microscópicas de los basidiomas ya han sido discutidas, por lo que actualmente se considera que *L. indigo* no es una especie, sino más bien un complejo de especies (L. Montoya, dato no pub.). A pesar de estas observaciones, hasta la fecha no se ha publicado ningún trabajo taxonómico acerca de las especies que conforman este complejo, y mucho menos sobre la descripción de las características de importancia taxonómica para la determinación de las especies dentro del complejo, así como tampoco análisis de ADN. Hasta ahora, la característica principal para distinguir al menos a las dos posibles especies, es el tipo de vegetación, haciendo énfasis en la asociación micorriza que tiene el hongo con las distintas especies de pinos o de encinos.

Por lo que la descripción sobre las características macroscópicas y microscópicas de los ejemplares obtenidos en los diferentes sitios de recolecta (**Cuadro 3 y Cuadro 4**) realizada en este trabajo, para verificar que todas las muestras correspondieran a la misma especie, es de suma importancia. Tanto las características microscópicas, principalmente basidiosporas y basidios, como las macroscópicas resultaron ser similares para todas las muestras y correlacionaron con lo ya reportado por Kong (1995). Solo dos localidades de las cinco totales fueron recolectas *in situ* y las tres restantes fueron compras en mercados locales, en este caso no fue posible saber el tipo de vegetación al que estaba asociado y por ende con que especie de pino o encino estaba formando la asociación micorrizica. Sin embargo, se pudo realizar la correcta identificación de la especie. Cabe destacar que la compra de basidiomas fue requerida debido a la poca cantidad (mg) de los extractos orgánicos obtenidos de las recolectas *in situ*, y por ende también de los compuestos activos que se pudieran obtener para ser evaluados biológicamente y caracterizados químicamente.

En cuanto a la extracción, los mayores rendimientos obtenidos son con respecto al peso seco de los ejemplares recolectados *in situ* (**Cuadro 5**), esto debido a que el porcentaje de agua en los basidiomas es aproximadamente del 80-90 % y el resto se subdivide en todos los componentes del basidioma y los compuestos presentes en ellos, por lo que, al ver los rendimientos de acuerdo con el peso fresco (**Cuadro 6**), se observa que el porcentaje de extracto obtenido disminuye hasta un 96 %. Sin embargo, a pesar de esto, se decidió que el procesamiento de los ejemplares que fueron comprados en los mercados locales fuese distinto a los que se recolectaron *in situ*, y esto porque observamos que el proceso de secado de los basidiomas degradaba en gran medida a los compuestos responsables de la coloración azul intensa tan característica. Al cambiar ese proceso de secado por un proceso de congelamiento, logramos obtener en los extractos hexánicos los azulenos presentes en los basidiomas (**Placa 1**), además del resto de compuestos presentes en los diferentes extractos (**Placa 2**).

Ahora bien, este cambio en el pretratamiento de los ejemplares antes de la extracción podría representar un problema en cuanto a la cantidad total que se puede obtener de un compuesto activo, pero esto se compensaría si los compuestos activos presentes son potentes, lo que disminuiría la cantidad de compuesto que se necesita para obtener el efecto deseado, o si en vez de un compuesto activo se contara con un extracto o mezcla con actividad farmacológica que actué de forma sinérgica para obtener los efectos esperados; ambos casos fueron observados en el presente trabajo.

Los compuestos presentes en los distintos extractos orgánicos de los basidiomas de *L. indigo* procedentes de los distintos sitios de recolecta son similares y concuerdan con los ya reportados, tal es el caso de los ácidos grasos, como el ácido esteárico, linoleico y raquídico (León-Guzmán *et al.*, 1997). Además de ácidos grasos, en los basidiomas de *L. indigo* también se ha reportado un azuleno que le da ese color azul intenso tan característico (Harmon *et al.*, 1980), sin embargo, en el presente trabajo se logró identificar mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  otro azuleno, el lactaroviolin (**Cuadro 11, Figura 32 y 33**), el cual ha sido aislado previamente en *L. deliciosus* (Yang *et al.*, 2006). Si bien se han identificado diversos azulenos en distintas especies del género *Lactarius*, es imprescindible mencionar que su aislamiento no es sencillo debido a la degradación que sufren estos compuestos con el pretratamiento de los basidiomas antes de la extracción y durante el aislamiento, por lo que la estandarización del método para aislar este tipo de compuestos es imprescindible si se quiere conocer exactamente la composición de azulenos presente en los basidiomas de esta especie y en general del género *Lactarius* (Bergendorff y Sterner, 1988).

Como ya se mencionó, los azulenos son los responsables de producir el color tan característico de los basidiomas formando parte del látex, no obstante, queda aún la incertidumbre sobre la importancia biológica y/o ecológica que tienen estos compuestos. Y aunque aún es ambiguo, un estudio sobre el papel ecológico que podrían tener ciertos

aldehídos de sesquiterpenos tipo guayano (Camazine *et al.*, 1983), refleja la posibilidad de que la formación y transformación de sesquiterpenos protege a los basidiomas contra parásitos y mamíferos, por lo que podrían ser parte de un "sistema de defensa químico" de los basidiomas en *Lactarius*.

Desde el punto de vista de la utilidad para los seres humanos, estos compuestos tienen un efecto en el organismo, tal es el caso del efecto citotóxico de los compuestos presentes en los basidiomas de *L. indigo*. Anteriormente había sido reportada la actividad citotóxica del extracto metanólico y de acetato de etilo, los cuales inhibieron la proliferación de células HeLa (cáncer cervicouterino) en concentraciones de 50 a 1000 ng/mL (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2011), por lo que en este estudio se decidió evaluar estos y otros extractos adicionales, además de utilizar otras líneas celulares en la que se pudiera estudiar también el efecto citotóxico. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el efecto citotóxico también se presentaba en la línea celular HTC (cáncer de colon), sin embargo, esto fue solamente observado con el extracto de acetato de etilo (**Figura 8**). Estos resultados concuerdan con lo publicado y proporciona nueva información acerca de la concentración de los extractos, ya que observamos que a mayores concentraciones se presentó una disminución en la viabilidad de las células no tumorales (COS), por lo que las concentraciones se mantuvieron por debajo de los 50 ng/mL, de esta manera se dejó fuera del análisis al extracto metanólico.

Por otro lado, la subfracción AS1 del extracto de acetato de etilo de los basidiomas de *L. indigo*, presenta una actividad citotóxica relevante en la línea tumoral humana HeLa, con una IC<sub>50</sub> de 40.46 ng/mL (**Figura 11, Cuadro 8**). Al realizar un análisis mediante CG-EM, notamos que esta subfracción AS1 es una mezcla (**Figura 12**), sin embargo, el valor de la IC<sub>50</sub> es bajo, por lo que resulta prometedor. Mediante RMN y CG-EM, corroboramos que la subfracción AS1 contiene en su mayoría ácido esteárico (**Figura 13, 19 y 20**) y debido a que corroboramos que el ácido esteárico no tiene algún efecto citotóxico por sí mismo, proponemos que el efecto citotóxico de esta mezcla puede deberse a un sinergismo entre los dos compuestos presentes o que el efecto citotóxico este dado por la acción de un único compuesto minoritario y desconocido con *m/z* de 396/60 (**Figura 15**). En este último caso, el compuesto minoritario tendría que ser muy potente para que podamos observar este efecto a una concentración tan baja y de ser así, valdría la pena tratar de aislar e identificar este compuesto.

Finalmente, con lo que respecta al extracto hexánico, se corroboró la presencia de azulenos en los basidiomas de *L. indigo*, esto mediante CG-EM (**Cuadro 10**). Al comparar el perfil cromatográfico de los extractos de los distintos sitios de recolecta, notamos que, si bien era similar para todos, había dos compuestos mayoritarios que estaban presentes en todas las muestras, uno correspondía aparentemente a un azuleno y el otro al ácido esteárico (**Cuadro 9**). Posteriormente al realizar una CC y RMN del extracto hexánico de los ejemplares procedentes de Avándaro, se logró identificar al lactaroviolin (**Cuadro 11, Figura 32 y 33**), un azuleno previamente aislado en *L. deliciosus* (Bergendorff y Sterner, 1988; Yang *et al.*, 2006).

Aunque este azuleno ya ha sido aislado, hasta la fecha no se había evaluado su actividad antiinflamatoria, la cual es prometedora.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el modelo de TPA en ratón, la fracción 40 del extracto hexánico inhibió en un 74 % la inflamación (**Figura 27**), esta fracción está conformada por 90.66 % de ácido esteárico y 9.34 % de lactarviolín. Este resultado es significativo debido a que no se ha reportado el efecto antiinflamatorio del ácido esteárico, por lo que se puede sugerir que el lactarviolín es el responsable del efecto antiinflamatorio. Otro dato que puede corroborar esto, es lo ya reportado en la literatura sobre los efectos farmacológicos de los azulenos, en un caso particular, el camazuleno (un azuleno de la manzanilla), presenta actividad antiinflamatoria al inhibir la síntesis de leucotrienos, además de producir efectos antioxidantes adicionales (Safayhi *et al.*, 1994). Así mismo el camazuleno incluso ha llegado a recomendarse como agente terapéutico para ensayos clínicos contra la inflamación osteoartrítica (Ma *et al.*, 2020). Estructuralmente hablando el camazuleno y el lactarviolín son similares (**Anexo 11**), el lactarviolín presenta como sustituyente un isopropenilo en el carbono 7 y un aldehído en el carbono 1, en el cual el camazuleno presenta un metilo. Por lo que esto corroboraría que la actividad antiinflamatoria es ciertamente debida al lactarviolín, y aún mejor, tomando en cuenta la proporción de ácido esteárico y lactarviolín. Si bien la concentración de lactarviolín es mínima en la mezcla, es potente ya que logra disminuir un 74 % la inflamación, por lo que a futuro sería indispensable poder aislar el lactarviolín para evaluar su actividad antiinflamatoria y determinar así una DE<sub>50</sub>.

## 9. CONCLUSIONES

- Se logró determinar la composición química, actividad citotóxica y actividad antiinflamatoria de los extractos obtenidos de basidiomas de *Lactarius indigo*.
- Tanto en el extracto hexánico como en el de acetato de etilo, se detectó la presencia de ácidos grasos, principalmente el ácido esteárico.
- El extracto de AcOEt fue el único que presentó un efecto citotóxico a las concentraciones evaluadas (1.56-50 ng/mL).
- La fracción 2 del extracto de AcOEt mostró una mayor actividad citotóxica en comparación con el extracto de AcOEt.
- La fracción AS1 presentó una actividad citotóxica relevante en la línea tumoral humana HeLa, con una IC<sub>50</sub> de 40.46 ng/mL.
- La actividad citotóxica de la fracción AS1 se podría deber a un sinergismo o potenciación de los compuestos que la conforman: ácido esteárico y un compuesto desconocido con *m/z* de 60 (396).
- La actividad antiinflamatoria de la fracción AS1 resultó ser mayor a la del extracto de AcOEt, sin embargo, no es significativa.
- La fracción 40 del extracto hexánico de *L. indigo* presentó la mayor actividad antiinflamatoria, con un 74 % de inhibición.
- La actividad antiinflamatoria de la fracción 40 del extracto hexánico de *L. indigo*, se podría deber al azuleno presente (lactaroviolin).

## 10. PERSPECTIVAS

- Ampliar el estudio de campo en cuanto a la utilización de *L. indigo* en la medicina tradicional.
- Ampliar las descripciones taxonómicas tanto macroscópicas como microscópicas de los basidiomas de *L. indigo*, así como la aplicación de herramientas moleculares para la correcta identificación de las especies dentro del complejo.
- Determinar si las diferentes especies del complejo *L. indigo* presentan diferencias químicas en sus componentes o en la abundancia de estos.
- Aislar el lactaroviolin para su evaluación antiinflamatoria en el modelo de TPA y en otros modelos, para corroborar su actividad.
- Aislar los compuestos presentes en la fracción AS1, para determinar si su efecto citotóxico se debe al sinergismo entre ambos compuestos o si se debe a uno de ellos.
- Determinar la toxicidad de la lactaroviolin y de los compuestos presentes en la fracción AS1.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Fernández, M. (1998). Contribución al conocimiento de la micobiota (Hongos comestibles) de la Sierra Norte de Oaxaca, México. In *Resúmenes del III Congreso Mexicano de Etnobiología. Oaxaca, México* (Vol. 3, p. 60). En Garibay Orijel, R. (2009). Los nombres zapotecos de los hongos. *Revista mexicana de micología*, 30, 43-61.
- Alonso-Aguilar, L. E., Montoya, A., Kong, A., Estrada-Torres, A., & Garibay-Orijel, R. (2014). The cultural significance of wild mushrooms in San Mateo Huexoyucan, Tlaxcala, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10(1), 27.
- Altuntaş, D., Allı, H., Kaplaner, E., & Öztürk, M. (2016). Bazı *Lactarius* türlerinin yağ asidi bileşenlerinin ve makrobesinsel özelliklerinin belirlenmesi. *Turkish JAF Sci. Tech*, 4, 216-220.
- Balkwill, F., Charles, KA y Mantovani, A. (2005). La inflamación latente y polarizada en el inicio y la promoción de la enfermedad maligna. *Célula cancerosa*, 7 (3), 211-217.
- Bandala, V. M., Montoya, L., & Chapela, I. H. (1996). Wild edible mushrooms in Mexico: a challenge and opportunity for sustainable development. *Mycology in sustainable development: expanding concepts, vanishing borders*. Parkway Publishers, Inc. Carolina del Norte. 76-90.
- Baniyash, M. (2006). Inflamación crónica, inmunosupresión y cáncer: nuevas ideas y perspectivas. En *Seminarios en biología del cáncer*, 16 (1) 80-88.
- Barranco, P. G., Ocanas, L. G., Cabrera, L. V., Carmona, M. C. S., Ocanas, F. G., Gomez, X. S. R., y Rangel, R. L. (2010). Evaluation of antioxidant, immunomodulating, cytotoxic and antimicrobial properties of different strains of Basidiomycetes from Northeastern Mexico. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(17), 1762-1769.
- Barros, L., Baptista, P., Estevinho, L. M., y Ferreira, I. C. (2007). Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius* sp. mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8766-8771.
- Bautista-González, J. A. (2013). Conocimiento tradicional de hongos medicinales en seis localidades diferentes del país. *Tesis de licenciatura*, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Bautista-González y Moreno-Fuentes (2014). Capítulo "Los hongos medicinales de México" en el libro: La etnomicología en México por Ángel Moreno Fuentes y Roberto Garibay Origel. 145-176.
- Bergendorff, O., y Sterner, O. (1988). The sesquiterpenes of *Lactarius deliciosus* and *Lactarius deterrimus*. *Phytochemistry*, 27(1), 97-100.
- Bertelli, D. J. y Crabtree, J. H. (1968). Hidrocarburos fulvene de origen natural. *Tetrahedron*, 24 (5), 2079-2089.
- Boa, E. R. (2004). *Hongos comestibles silvestres: una visión global de su uso e importancia para las personas* (No. 17). Alimentos y Agricultura Org.
- Brizuela, M. A., García, L., Pérez, L., & Mansur, M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol*, 15, 69-74.

- Burrola-Aguilar, C., Montiel, O., Garibay-Orijel, R., & Zizumbo-Villarreal, L. (2012). Conocimiento tradicional y aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en la región de Amanalco, Estado de México. *Revista mexicana de micología*, 35, 01-16.
- Camazine, S. M., Resch, J. F., Eisner, T., & Meinwald, J. (1983). Mushroom chemical defense. *Journal of chemical ecology*, 9(10), 1439-1447.
- Carmichael, J., Mitchell, J. B., DeGraff, W. G., Gamson, J., Gazdar, A. F., Johnson, B. E., Glatstein, E. y Minna, J. D. (1988). Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *British Journal of Cancer*, 57(6), 540.
- Carrera, D. M., Nava, D., Sobal, M., Bonilla, M., & Mayett, Y. (2005). Marketing channels for wild and cultivated edible mushrooms in developing countries: the case of Mexico. *Micología Aplicada Internacional*, 17(2), 9-20.
- Cayuela, L. (2006). Deforestación y fragmentación de bosques tropicales montanos en los Altos de Chiapas, México. Efectos sobre la diversidad de árboles. *Revista Ecosistemas*, 15(3), 192-198.
- Chacón, S., & Guzmán, G. (1995). Observations on the phenology of ten fungal species in the subtropical forests at Xalapa, Mexico. *Mycological research*, 99(1), 54-56.
- Contreras Cortés, LEU, Vázquez García, A. y Ruan-Soto, F. (2018). Etnomicología y venta de hongos en un mercado del Noroeste del estado de Puebla, México. *Scientia fungorum*, 47, 47-55.
- Coussens, L. M. y Werb, Z. (2002). Inflamación y cáncer. *Nature*, 420 (6917), 860-867.
- Daba, A. S., & Ezeronye, O. U. (2003). Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 672-678.
- De Silva, D. D., Rapior, S., Sudarman, E., Stadler, M., Xu, J., Alias, S. A., & Hyde, K. D. (2013). Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Diversity*, 62(1), 1-40.
- Delgado, A., Villegas, M., & Cifuentes, J. (2005). Glosario ilustrado de los caracteres macroscópicos en Basidiomycetes con himenio laminar. *Facultad de Ciencias. UNAM, México*. 84.
- Dulger, B., Yilmaz, F. y Guçin, F. (2002). Actividad antimicrobiana de algunas especies de *Lactarius*. *Biología Farmacéutica*, 40 (4), 304-306.
- Dundar, A., Okumus, V., Ozdemir, S., Celik, K. S., Boğa, M., & Ozcagli, E. (2016). Determination of cytotoxic, anticholinesterase, antioxidant and antimicrobial activities of some wild mushroom species. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1178060.
- Eckhardt, R. B. (2001). Genetic research and nutritional individuality. *The Journal of Nutrition*, 131(2), 336S-339S.
- Estrada-Torres, A., & Aroche, R. M. (1987). Acervo etnomicológico en tres localidades del Municipio de Acambay, Estado de México. *Revista Mexicana de Micología*, 3, 109-131.
- Estrada-Torres, A. (1989). La etnomicología: Avances, problemas y perspectivas. *Examen pre doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. México*.
- Food and Travel México (2017). Hongos, las estrellas del festival gastronómico Valle de Bravo. <https://foodandtravel.mx/hongos-las-estrellas-del-festival-gastronomico-valle-de-bravo/>

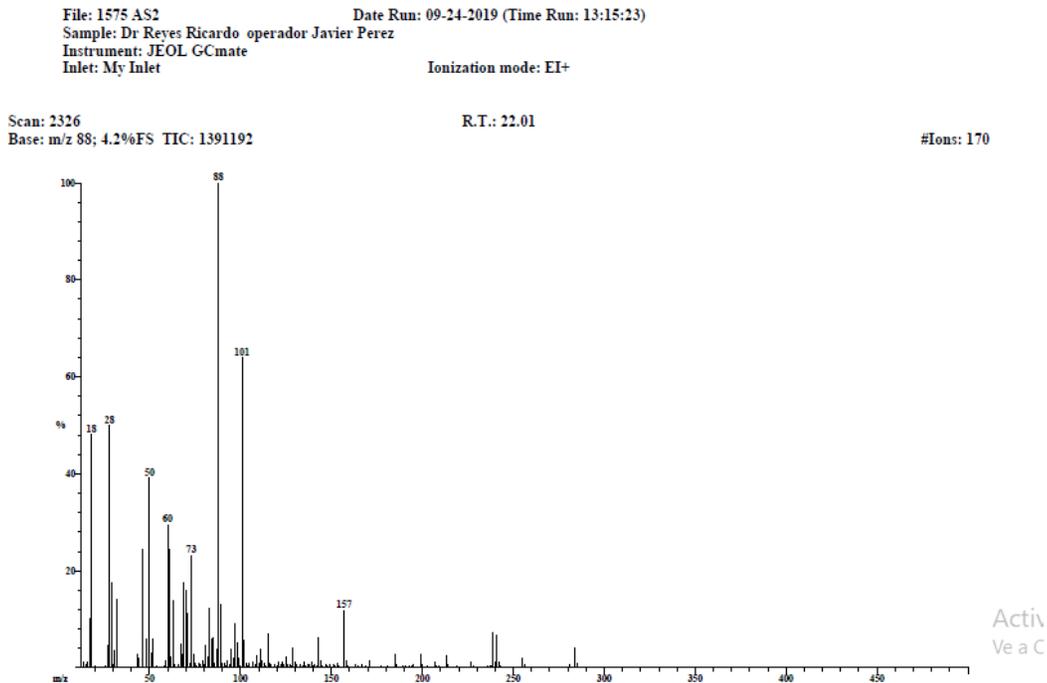
- Fries, E. M. (1838). *Epicrisis systematis mycologici, seu synopsis Hymenomycetum*. e Typographia Academica, 341.
- Garibay-Orijel, R., Cordova, J., Cifuentes, J., Valenzuela, R., Estrada-Torres, A., & Kong, A. (2009). Integrating wild mushrooms use into a model of sustainable management for indigenous community forests. *Forest Ecology and Management*, 258(2), 122-131.
- Garibay-Origel y Felipe Ruan-Soto (2014). Capitulo "Listado de los hongos silvestres consumidos como alimento tradicional en México" en el libro: La etnomicología en México por Ángel Moreno Fuentes y Roberto Garibay Origel 91-109.
- Gallegos, R. A., & Sánchez, J. E. (2020). Uso de los hongos en el Tacaná. *Ecofronteras*, 14-17.
- Guler, P., Akata, I., & Kutluer, F. (2009). Antifungal activities of *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr) Karst and *Lactarius vellereus* (Pers.) Fr. *African journal of biotechnology*, 8(16), 3811-3813.
- Guzmán, G. (2008). Diversity and use of traditional Mexican medicinal fungi. A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 10(3).
- Harmon, A. D., Weisgraber, K. H., & Weiss, U. (1980). Preformed azulene pigments of *Lactarius indigo* (Schw.) Fries (Russulaceae, Basidiomycetes). *Experientia*, 36(1), 54-56.
- Heilbronner, E., & Schmid, R. W. (1954). Zur Kenntnis der Sesquiterpene und Azulene. 113. Mitteilung. Azulenaldehyde und Azulenketone: Die Struktur des Lactarviolins. *Helvetica Chimica Acta*, 37(7), 2018-2039.
- Hesler, L. R., y Smith, A. H. (1960). Studies on *Lactarius*-I: The North American Species of Sect. *Lactarius*. *Brittonia*, 119-139.
- Hesler, L. R., y Smith, A. H. (1979). *North American species of Lactarius*. University of Michigan Press, pp.841.
- Hunn, E. (1982). The utilitarian factor in folk biological classification. *American Anthropologist*, 84(4), 830-847.
- Hutchison, L. J. (1991). Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America. *Mycotaxon*, 42, 387-504.
- IARC (The International Agency for Research on Cancer). (2020). *Cancer Research for Cancer Prevention* on the occasion of the 20th anniversary of World Cancer Day, 4 February 2020. Consultado el 04/03/2020. En: <https://www.iarc.fr/featured-news/new-world-cancer-report/>.
- INEGI 2018. "Estadísticas a propósito del... día mundial contra el cáncer (4 de febrero)". Consultado el 05/08/19. En: [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018\\_nal.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_nal.pdf).
- Juárez-Montiel, M., Ruiloba de León, S., Chávez-Camarillo, G., Hernández-Rodríguez, C., y Villa-Tanaca, L. (2011). El huitlacoche (tizón del maíz), causado por el hongo fitopatógeno *Ustilago maydis*, como alimento funcional. *Rev. iberoam. micol*, 69-73.
- Kong, A. (1995). "Estudio taxonómico sobre el género *Lactarius* (Russulales, Mycetae) en el volcán La Malintzi, Tlaxcala". Tesis profesional de licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales, Iztacala. UNAM. Tlalnepantla, Edo. De México. 158.

- Kosanić, M., Ranković, B., Rančić, A., & Stanojković, T. (2016). Evaluation of metal concentration and antioxidant, antimicrobial, and anticancer potentials of two edible mushrooms *Lactarius deliciosus* and *Macrolepiota procera*. *Journal of food and drug analysis*, 24(3), 477-484.
- Kornerup, A. y Wanscher, J. H. (1978). *Methuen handbook of color*. Londres: Methuen.
- Koul, S. K., Taneja, S. C., Ibrahim, S. P., Dhar, K. L., & Atal, C. K. (1985). A C-formylated azulene from *Lactarius deterrimus*. *Phytochemistry*, 24(1), 181-182.
- Krawczyk, E., Łuczak, M., Kobus, M., Bańka, D., y Daniewski, W. (2003). Antiviral activity of N-benzoylphenylisoserinates of *Lactarius* sesquiterpenoid alcohols in vitro. *Planta medica*, 69(06), 552-554.
- Krawczyk, E., Łuczak, M., Kniotek, M., Majewska, A., Kawecki, D., y Nowaczyk, M. (2005). Immunomodulatory activity and influence on mitotic divisions of N-benzoylphenylisoserinates of *Lactarius* sesquiterpenoid alcohols in vitro. *Planta medica*, 71(09), 819-824.
- Krawczyk, E., Kniotek, M., Nowaczyk, M., Dzieciatkowski, T., Przybylski, M., Majewska, A., y Luczak, M. (2006). N-acetylphenylisoserinates of *Lactarius* sesquiterpenoid alcohols-cytotoxic, antiviral, antiproliferative and immunotropic activities in vitro. *Planta medica*, 72(07), 615-620.
- León-Guzmán, M. F., Silva, I., y López, M. G. (1997). Proximate chemical composition, free amino acid contents, and free fatty acid contents of some wild edible mushrooms from Querétaro, México. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(11), 4329-4332.
- Lin, W. W., y Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1175-1183.
- López-Mirada D. Y. (2018). Estudio etnobotánico, fotoquímico y antiinflamatorio de *Aristolochia grandiflora* Sw. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.
- López-Vázquez, E., Prieto-García, F., Gayosso-Canales, M., Sánchez, E. O., & Ibarra, J. V. (2017). Phenolics acids, flavonoids, ascorbic acid,  $\beta$ -glucans and antioxidant activity in mexican wild edible mushrooms. *Italian Journal of Food Science*, 29(4).
- Ma, D., He, J., & He, D. (2020). Chamazulene reverses osteoarthritic inflammation through regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and NF- $\kappa$ B pathway in in-vitro and in-vivo models. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 84(2), 402-410.
- Marín Á. U., Ávila A. V. y Burrola. A. C. (2019). Biodiversidad y servicios ecosistémicos de los hongos silvestres de Tlazala, municipio de Isidro Fabela, estado de México. En: Ávila V., González T. (coordinadores). *Biodiversidad, Servicios Ecosistémicos y los Objetivos del Desarrollo Sostenible en México*, UAEMex. México, 275.
- Méndez, R. M., Pérez, L. M. S., & Montes, C. A. C. (2001). Proceso de recolección y comercialización de hongos comestibles silvestres en el Valle de Toluca, México. *CIENCIA ergo-sum*, 8(1), 30-40.
- Merlos, M., Gomez, L. A., Giral, M., Vericat, M. L., García-Rafanell, J., & Forn, J. (1991). Effects of PAF-antagonists in mouse ear oedema induced by several inflammatory agents. *British journal of pharmacology*, 104(4), 990.
- Mlinarič, A., Kac, J., Fatur, T., & Filipič, M. (2004). Anti-genotoxic activity of the mushroom *Lactarius vellereus* extract in bacteria and in mammalian cells in vitro. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59(3), 217-221.

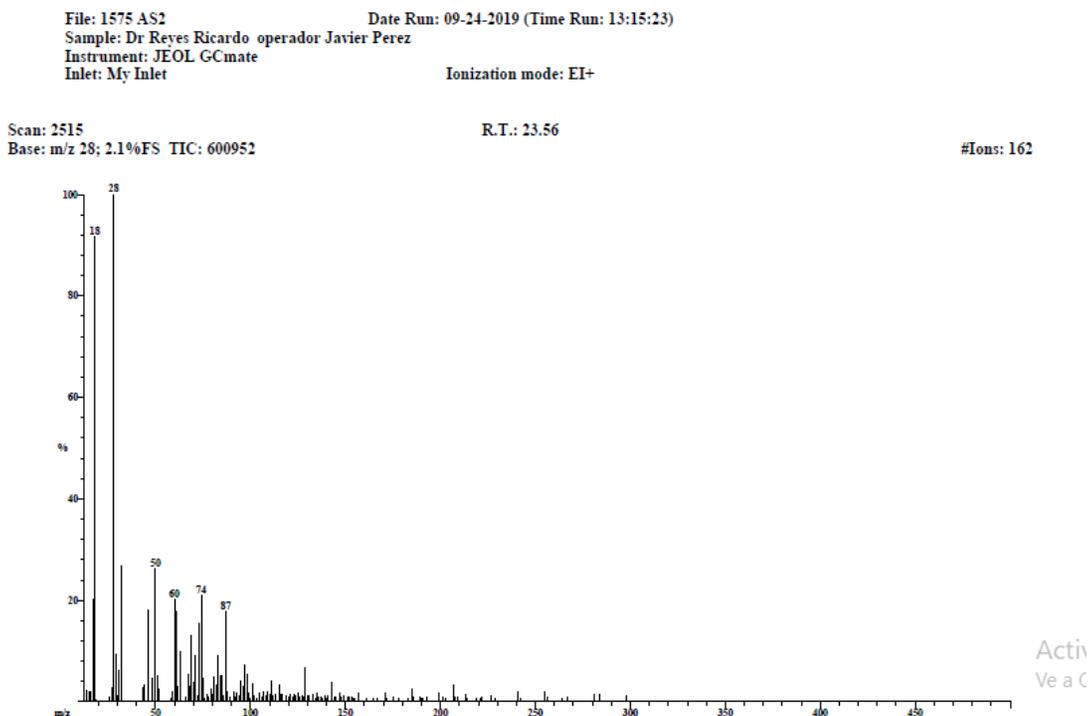
- Molina-Castillo, S., Thomé-Ortiz, H., y Espinoza-Ortega, A. (2019). Conocimiento ecológico tradicional y aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en el centro de México. *AgroProductividad*, 12(5).
- Montoya-Esquivel, A., Estrada-Torres, A., Kong, A., & Juárez-Sánchez, L. (2001). Commercialization of wild mushrooms during market days of Tlaxcala, Mexico. *Micología Aplicada Internacional*, 13(1), 31-40.
- Montoya, A., Hernández-Totomoch, O., Estrada-Torres, A., Kong, A., & Caballero, J. (2003). Traditional knowledge about mushrooms in a Nahuatl community in the state of Tlaxcala, México. *Mycologia*, 95(5), 793-806.
- Montoya, L., V.M. Bandala. (1996). Additional new record son *Lactarius* from Mexico. *Mycotaxon* 57: 425-450.
- Nieto-Ramírez, I., Rojas-Luna, R., & Suarez, C. (2012). Evaluación del estipe de Shiitake como aportante de fibra y bioactivos con miras a su empleo en alimentos funcionales. *Vitae*, 19(1), S331-S333.
- Ochoa-Zarzosa, A., Vázquez-Garcidueñas, M. S., Robinson-Fuentes, V. A., & Vázquez-Marrufo, G. (2011). Antibacterial and cytotoxic activity from basidiocarp extracts of the edible mushroom *Lactarius indigo* (Schw.) Fr.(Russulaceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(2), 281-288.
- Organización Mundial de la Salud. (2020). Temas de salud. Cáncer. Consultado el 04/03/2020. En: <https://www.who.int/topics/cancer/es/>.
- Palomino N. A. (1990). "Etnomicología Tlahuica de San Juan Atzingo, Estado de México". Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM.
- Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Yescas-Pérez, A., Delgado-Alvarado, A., & Xoconostle-Cázares, B. (2008). Wild mushroom markets in central Mexico and a case study at Ozumba. *Economic Botany*, 62(3), 425-436.
- Pérez-Silva, E., Esqueda, M., Herrera, T., & Coronado, M. (2006). Nuevos registros de Agaricales de Sonora, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 77(1), 23-33.
- Piqueras, J. (2004). Los hongos como alimentos funcionales. *Laboratoris Clínics, Hospital Universitari del Vall d'Hebrón, AM Font i Quer*, 2, 46-8.
- Robles-García, D., Suzán-Azpiri, H., Montoya-Esquivel, A., García-Jiménez, J., Esquivel-Naranjo, E. U., Yahia, E., & Landeros-Jaime, F. (2018). Ethnomycological knowledge in three communities in Amealco, Querétaro, México. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 14(1), 7.
- Ruan-Soto, F., Méndez, R. M., y Alvarado, R. (2012). Intoxicaciones mortales por consumo de hongos: una cadena de errores. *Ecofronteras*, 12-14.
- Ruan-Soto, F. (2018). Recolección de hongos comestibles silvestres y estrategias para el reconocimiento de especies tóxicas entre los tsotsiles de Chamula, Chiapas, México. *Scientia fungorum*, 48, 1-13.
- Safayhi, H., Sabieraj, J., Sailer, E. R., & Ammon, H. P. T. (1994). Chamazulene: an antioxidant-type inhibitor of leukotriene B4 formation. *Planta medica*, 60(05), 410-413.
- Santiago, F. H., Moreno, J. P., Cázares, B. X., Suárez, J. J. A., Trejo, E. O., de Oca, G. M. M., & Aguilar, I. D. (2016). Traditional knowledge and use of wild mushrooms by Mixtecs or Ñuu savi, the people of the rain, from Southeastern Mexico. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 12(1), 35.

- Soler-Rivas, C., y Reglero, G. (2012). El champiñón como alimento funcional. Avances en la tecnología de la producción comercial del champiñón y otros hongos cultivados 4, 7.
- Šorm, F., Benešová, V., & Herout, V. (1954). Über terpene LIV. Über die struktur des lactarazolens und des lactarviolins. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 19(2), 357-364.
- Sterner, O., Bergman, R., Franzén, C., & Wickberg, B. (1985). New sesquiterpenes in a proposed Russulaceae chemical defense system. *Tetrahedron letters*, 26(26), 3163-3166.
- Tala, M. F., Qin, J., Ndongo, J. T., & Laatsch, H. (2017). New azulene-type sesquiterpenoids from the fruiting bodies of *Lactarius deliciosus*. *Natural products and bioprospecting*, 7(3), 269-273.
- UNAM. (2018). Portal de datos abiertos UNAM colecciones universitarias. Consultado el 06/08/2018. En: <https://datosabiertos.unam.mx/biodiversidad/>.
- Villarreal, L., y Pérez-Moreno, J. (1989). Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral. *Micología Neotropical Aplicada*, 2, 77-114.
- Vokáč, K., Samek, Z., Herout, V., y Šorm, F. (1970). On terpenes. CCV. The structure of two native orange substances from *Lactarius deliciosus* L. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 35(4), 1296-1301.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Springer Science & Business Media.
- Wasser, S. P., & Weis, A. L. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives. *International Journal of medicinal mushrooms*, 1(1).
- Wu, Q., & Mueller, G. M. (1997). Biogeographic relationships between the macrofungi of temperate eastern Asia and eastern North America. *Canadian Journal of Botany*, 75(12), 2108-2116.
- Yang, X. L., Luo, D. Q., & Liu, J. K. (2006). A new pigment from the fruiting bodies of the basidiomycete *Lactarius deliciosus*. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 61(9), 1180-1182.

## 12. ANEXOS



**Anexo 1:** Espectro de masas experimental de un compuesto presente en la subfracción AS2, con un tiempo de retención de 22.01 y un  $m/z$  de 88 (286).



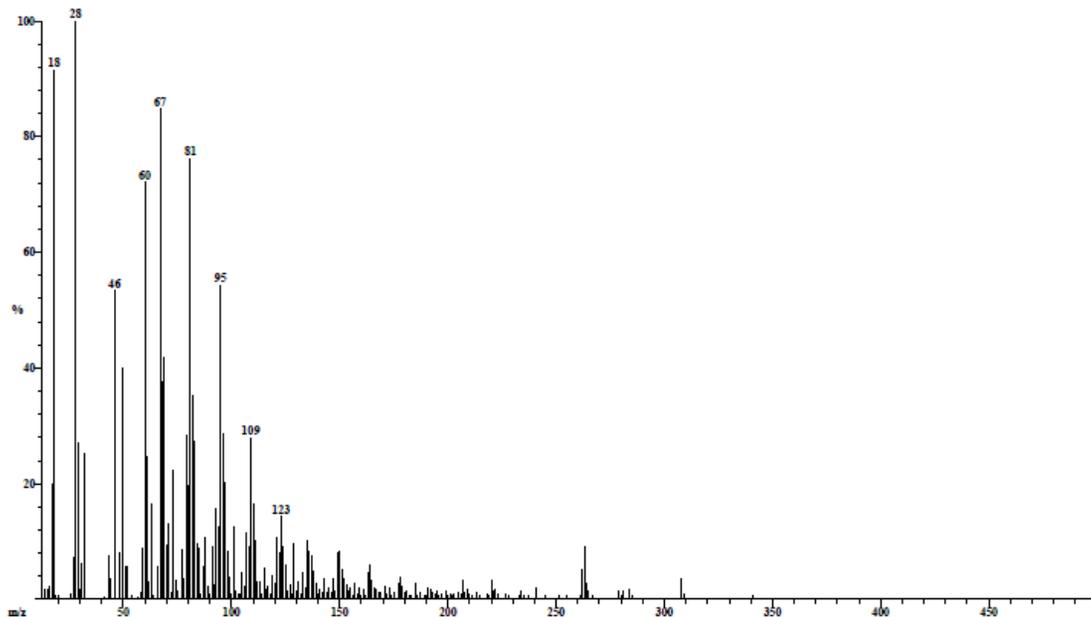
**Anexo 2:** Espectro de masas experimental de un compuesto presente en la subfracción AS2, con un tiempo de retención de 23.56 y un  $m/z$  de 28 (299).

File: 1575 AS2 Date Run: 09-24-2019 (Time Run: 13:15:23)  
 Sample: Dr Reyes Ricardo operador Javier Perez  
 Instrument: JEOL GCmate  
 Inlet: My Inlet Ionization mode: EI+

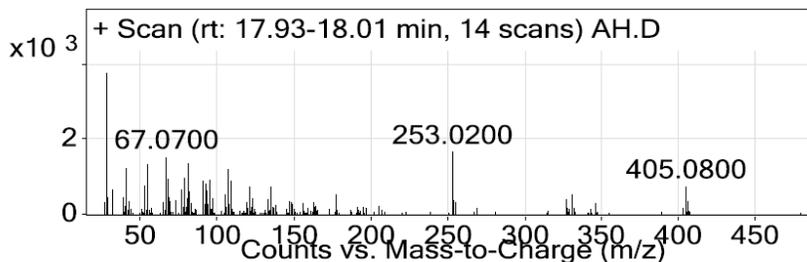
Scan: 2571  
 Base: m/z 28; 2.2%FS TIC: 1525964

R.T.: 24.02

#Ions: 221

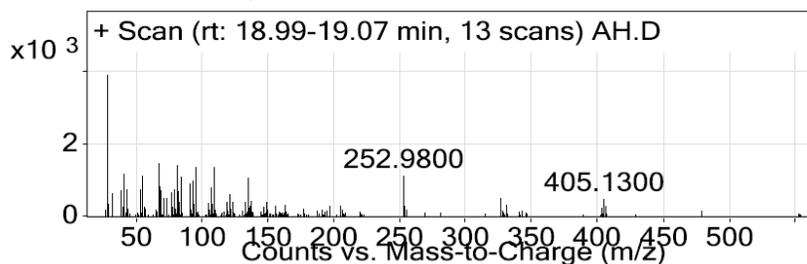


**Anexo 3:** Espectro de masas experimental de un compuesto presente en la subfracción AS2, con un tiempo de retención de 24.02 y un  $m/z$  de 28 (341).



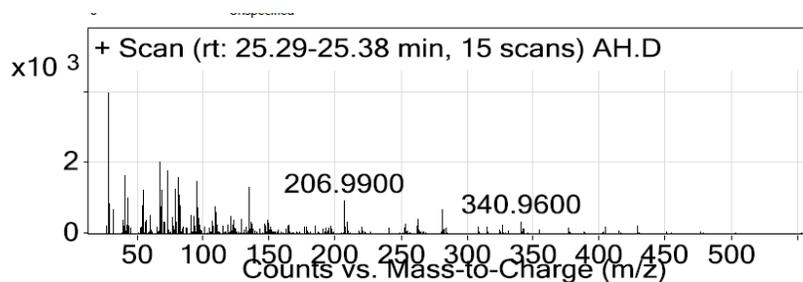
Peak List	
$m/z$	Abund
28.04	3745.79
41.1	1209.43
55.08	1328.43
67.07	1510.21
68.07	926.57
79.1	951.14
81.1	1341.29
95.1	901.29
107.09	1196.36
253.02	1641

**Anexo 4:** Espectro de masas experimental de un compuesto presente en los extractos hexánicos de los basidiomas de *L. indigo* procedentes de Avándaro y Valle de Bravo, con un tiempo de retención de 17.97 y un  $m/z$  de 28 (253).



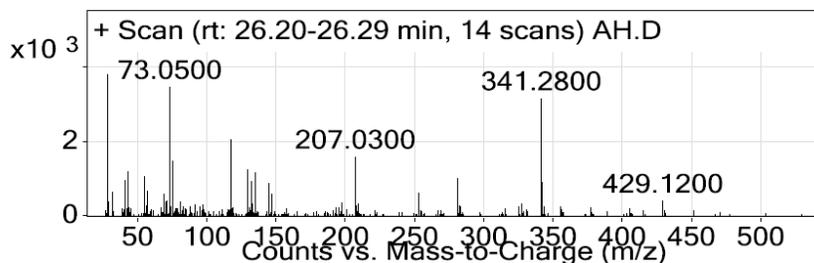
Peak List	
<i>m/z</i>	Abund
28.02	3890.23
41.1	1166.46
55.06	1089.23
67.06	1463.85
81.1	1387.31
84.09	1078.46
95.07	1337.77
109.08	1330.69
135.06	1050.38
252.98	1093

**Anexo 5:** Espectro de masas experimental de un compuesto presente en el extracto hexánico de los basidiomas de *L. indigo* procedentes de Avándaro y Valle de Bravo, con un tiempo de retención de 19.03 y un *m/z* de 28 (252).



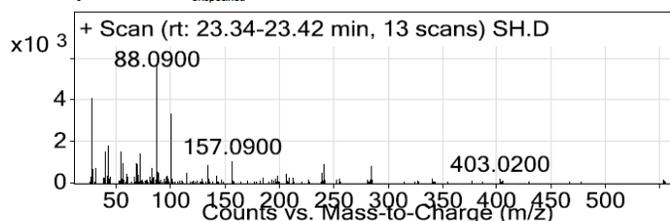
Peak List	
<i>m/z</i>	Abund
28.02	3968.93
41.07	1632.2
55.1	1215.2
67.1	2018.53
69.07	1231.13
73.05	1772.4
79.04	1241.8
81.1	1575
95.1	1473.67
135.04	1290.67

**Anexo 6:** Espectro de masas experimental de un compuesto presente en el extracto hexánico de los basidiomas de *L. indigo* procedentes de Avándaro, Valle de Bravo y San Lucas del Pulque, con un tiempo de retención de 25.34 y un *m/z* de 28 (206).



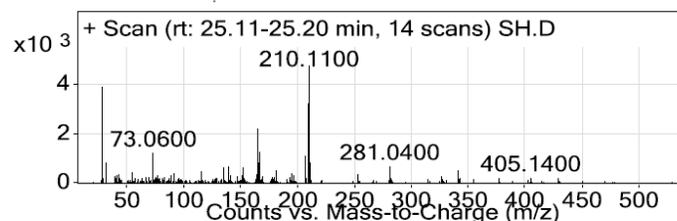
Peak List	
m/z	Abund
28.02	3788.5
43.08	1180.57
55.04	1057.5
73.05	3449.5
75.08	1456.86
117.02	2035.5
129.05	1236.79
135.06	1141.86
207.03	1566.57
341.28	3144.07

**Anexo 7:** Espectro de masas experimental de un compuesto presente en el extracto hexánico de los basidiomas de *L. indigo* procedentes de Avándaro, Valle de Bravo y San Lucas del Pulque con un tiempo de retención de 26.24 y un m/z de 88 (341).



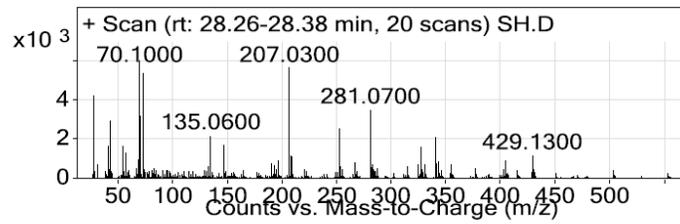
Peak List		
m/z	z	Abund
28.05		4047.69
41.04		1492.54
43.08		1788.69
55.08		1497.85
57.07		917
69.08		946.54
73.06		1404
88.09	1	5637.23
101.06		3340.77
157.09		1024.77

**Anexo 8:** Espectro de masas experimental de un compuesto presente en el extracto hexánico de los basidiomas de *L. indigo* procedentes de San Lucas del Pulque con un tiempo de retención de 23.37 y un m/z de 88 (157).



Peak List	
m/z	Abund
28.01	3879.29
31.97	773.21
73.06	1167
165.1	2165.57
165.99	809.43
167.08	1214.57
207.01	1050.36
209.09	3208.71
210.11	4748.07
211.08	777.21

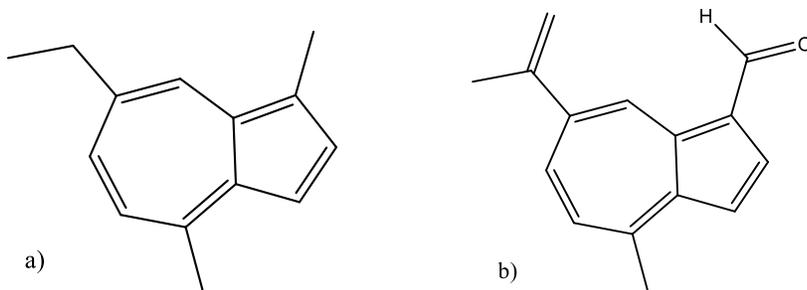
**Anexo 9:** Espectro de masas experimental de un compuesto presente en el extracto hexánico de los basidiomas de *L. indigo* procedentes de San Lucas del Pulque con un tiempo de retención de 25.15 y un m/z de 210 (281).



Peak List

m/z	z	Abund
28.02		4206.4
43.09		2937.7
70.1		5975.45
71.09		3151.15
73.08		5373.35
135.06		2124.7
207.03	1	5667.8
253.02		2518.2
281.07		3441.15
340.99		2064.05

**Anexo 10:** Espectro de masas experimental de un compuesto presente en el extracto hexánico de los basidiomas de *L. indigo* procedentes de San Lucas del Pulque con un tiempo de retención de 28.32 y un  $m/z$  de 70(340).



**Anexo 11:** Estructura de azulenos: a) camazuleno y b) lactaroviolin