

Evaluación fitoquímica del cultivo in vitro del hongo *Laccaria laccata*



Colaboración

Baleria María Hernández Chávez; Alma Dolores Pérez Santiago; Iván Antonio García Montalvo Marco Antonio Sánchez Medina, Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Oaxaca; María del Socorro Pina Canseco, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca

RESUMEN: *Laccaria laccata* es un hongo basidiomiceto que pertenece al filo Basidiomycota, posee basidios con basidiosporas (esporas sexuales). *L. laccata* es una seta comestible que normalmente habita en los bosques de la Sierra Norte y Valles Centrales de Oaxaca y su producción es limitada en ciertas épocas del año. Pocos son los reportes sobre *L. laccata* sobre la presencia de metabolitos de interés biotecnológico como ergosterol y ácido oleico. El objetivo de este trabajo fue identificar en cultivos de *L. laccata* la presencia de lectinas y metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, saponinas, cumarinas, taninos, quinonas, sesquiterpenlactonas y glúcidos cardiotónicos, utilizando la prueba directa de hemaglutinación y métodos colorimétricos.

Se identificó la presencia de lectinas tanto en medio sólido como en medio líquido, y metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides como xantonas y flaonas, saponinas y ácido gálico, en medio líquido. Se determinó ausencia de cumarinas, quinonas, glucósidos cardiotónicos y sesquiterpenlactonas.

PALABRAS CLAVE: alcaloides, flavonoides, *Laccaria laccata*, lectina, píleo, saponinas, taninos.

ABSTRACT: *Laccaria laccata* is a basidiomycete fungus that belongs to the Basidiomycota phylum, it has basidia with basidiospores (sexual spores). *L. laccata* is an edible mushroom that normally lives in the forests of the Sierra Norte and Central Valleys of Oaxaca and its production is limited at certain times of the year. Few are the reports on *L. laccata* on the presence of metabolites of biotechnological interest such as ergosterol and oleic acid. The objective of this work was to identify in cultures of *L. laccata* the presence of lectins and secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids, saponins, coumarins, tannins, quinones, sesquiterpenlactones and cardiotonic glucosides, using the direct hemagglutination test and colorimetric methods.

The presence of lectins was identified in both solid and liquid media, and secondary metabolites such as xanthonas and flaonas, saponins and gallic acid, in liquid medium. The absence of coumarins, quinones, cardiotonic glucosides and sesquiterpenlactones was determined.

KEYWORDS: alkaloids, flavonoids, *Laccaria laccata*, lectin, pileo, saponins, tannins.

INTRODUCCIÓN

El reino fungi posee una amplia diversidad biológica y cuenta con un aproximado de 1,5 millones de especies que se diferencian unas de otras por su ciclo de vida y morfología variables [1]. Los hongos son alimentos nutricionales y funcionales, así como una importante fuente de medicamentos fisiológicamente beneficiosos, debido a las rutas metabólicas que tienen.

Metabolismo primario

Es el mecanismo en que un microorganismo realiza reacciones metabólicas necesarias para obtener moléculas generalmente sencillas, que son esenciales para el crecimiento y desarrollo de un individuo, son casi idénticos en todos los organismos, son más baratos y sencillos de producir, tienen bajo contenido de "actividad biológica" [2]. Por ejemplo las lectinas: que son un grupo heterogéneo de proteínas o glucoproteínas de origen no inmune que se unen de manera específica y reversible a los carbohidratos de los glicoconjugados [3].

Metabolismo secundario

Incluye aquellos procesos metabólicos que tienen lugar después de terminado el crecimiento, a través de las vías biosintéticas específicas que no tienen función estructural ni de reserva [4], en esta fase se producen los metabolitos secundarios, los cuales son estructuras químicas únicas que poseen actividades biológicas interesantes y por lo tanto, tienen el potencial de ser valiosos recursos químicos [5], por ejemplo: antibióticos, toxinas, alcaloides que participan de caminos metabólicos no-esenciales, pero confieren capacidades de supervivencia en situaciones de estrés [2].

Relación entre las dos fases: trofofase e idiofase

En el metabolismo secundario las fases de crecimiento se denominan trofofase, fase de crecimiento logarítmico donde normalmente no se producen los metabolitos secundarios, e idiofase, la fase estacionaria donde normalmente se producen los metabolitos secundarios. Aunque es una simplificación pensar sólo en dos fases, esto nos permite comprender mejor la fermentación industrial de los metabolitos secundarios, como se muestra en la Figura 1. Es decir, si nosotros queremos producir un metabolito secundario primero debemos asegurar las condiciones apropiadas durante la trofofase para un buen crecimiento y después, debemos alterar esas condiciones en el momento adecuado para asegurar una excelente producción del metabolito secundario.

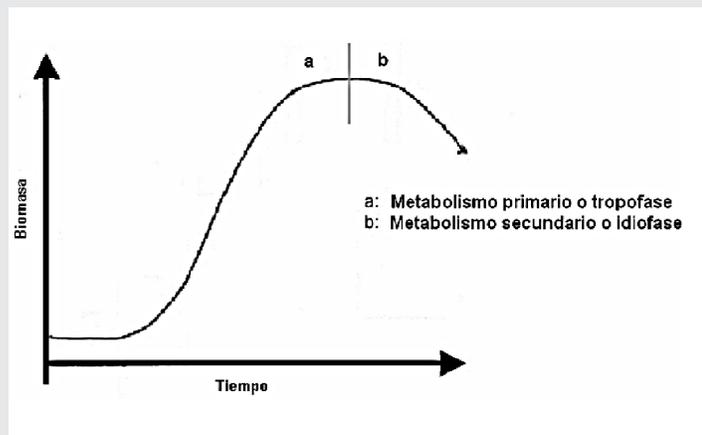


Figura 1. Esquema general del metabolismo fúngico [6].

Abundancia de hongos en México

En México existen alrededor de 200,000 especies de hongos [7], sobre lo cual se ha estimado que más de 300 especies de hongos silvestres son comestibles [8].

Capacidad bioactiva de los metabolitos

Los metabolitos pueden poseer diversas aplicaciones en el campo de la medicina, dando así al auge de su uso en el tratamiento de numerosos padecimientos como el cáncer o diabetes debido a la capacidad bioactiva que tienen, como se muestra en la Tabla 1 [9, 10,11 y 12].

Tabla 1. Capacidad bioactiva de los metabolitos.

Metabolitos	Capacidad bioactiva
Lectinas	Agente anticancerígeno
Alcaloides	Agentes analgésicos
Flavonoides	Agente antioxidante
Saponinas	Actividad hemolítica
Taninos	Agente antioxidante
Cumarinas	Agente anticoagulante
Quinonas	Agente antimicrobiano
Glucósidos cardiotónicos	Efecto inotrópico positivo
Sesquiterpenlactonas	Actividad citotóxica

METODOLOGÍA

En la Figura 2, se muestra la metodología empleada para la evaluación fitoquímica de metabolitos del cultivo in vitro de *Laccaria laccata*.

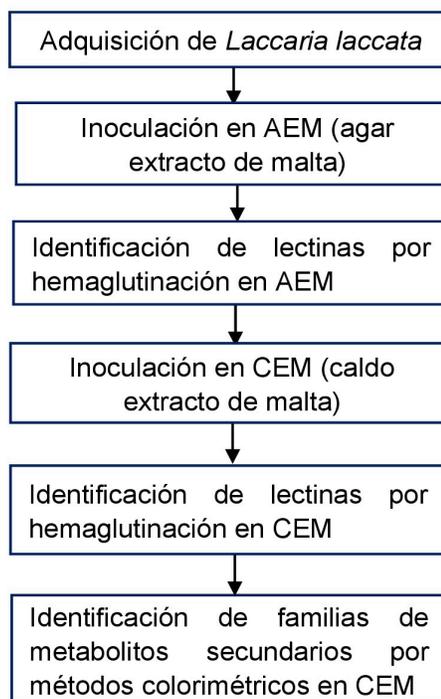


Figura 2. Diagrama de flujo de la evaluación fitoquímica en cultivos in vitro de *L. laccata*.

y 2018 se adquirió aproximadamente 1 kg de carpóforos de *Laccaria laccata* en el mercado de la Central de Abastos de la ciudad de Oaxaca.

Los hongos frescos se almacenaron de acuerdo al siguiente procedimiento: se lavaron con agua destilada, se dejaron escurrir por 30 minutos, se colocaron en bolsas de papel; posteriormente los hongos se congelaron a una temperatura de -20°C hasta su uso.

Inoculación en AEM (agar extracto de malta)

Se realizó el fraccionamiento del hongo *L. laccata*, obteniendo tres secciones: lámina (lamela, himenio), píleo (sombrero) y estipe o estípote (pie). De estas fracciones se utilizaron aproximadamente 0.5 cm^2 de cada uno para inocular en cajas Petri con AEM.

Identificación de lectinas por hemaglutinación en AEM

Se depositaron muestras de 1 cm^2 de cada cultivo en tubos Eppendorf en condiciones estériles y se diluyeron en $200\mu\text{l}$ de Buffer Fosfato Salino (conocido también por sus siglas en inglés, PBS, de phosphate buffered saline), pH 7.2. Estas fracciones del hongo se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos en una centrifuga marca SOL-BAT para utilizar la biomasa.

Para el ensayo de hemaglutinación se utilizó la técnica de diluciones seriadas empleando una solución de eritrocitos humanos tipo O, al 3 % [13]. Para identificar la actividad hemaglutinante se emplearon placas de microtitulación de 96 pozos de fondo "U" (lavadas con agua destilada y desinfectadas previamente con cloro), de acuerdo al siguiente protocolo: en la primera fila se aplicó un control del ensayo colocando solamente $50\mu\text{l}$ de PBS pH 7.2 y $25\mu\text{l}$ de eritrocitos en cada pozo, en la segunda fila se colocaron (en ese orden) $50\mu\text{l}$ de PBS a partir del pozo 1 hasta el pozo 12, enseguida se depositó $50\mu\text{l}$ de muestra problema al primer pozo y se fue diluyendo en toda la fila de pozos, y desechando los últimos $50\mu\text{l}$ del último pozo. Finalmente se colocaron $25\mu\text{l}$ de eritrocitos al 3 % en cada pozo. La placa se agitó suavemente y se dejó reposar por 45 minutos a temperatura ambiente para su posterior lectura.

Inoculación en CEM (caldo extracto de malta)

Se inoculó aproximadamente 1 cm^2 de cada cultivo (medio sólido) en cada matraz Erlenmeyer con 30 ml de cultivo de CEM. Estos se incubaron a 25°C con una velocidad de agitación de 60 rpm durante 17 días.

Identificación de lectinas por hemaglutinación en CEM

Se tomaron muestras de $200\mu\text{l}$ en tubos Eppendorf en condiciones estériles, las cuales se sometieron al mismo proceso de centrifugación para utilizar la biomasa y el sobrenadante de los cultivos. Se colocaron $50\mu\text{l}$ de muestra en cada pozo de la placa de microtitulación, repitiendo el procedimiento anterior de evaluación de actividad hemaglutinante.

Identificación de familias de metabolitos secundarios por métodos colorimétricos

Se seleccionó el cultivo con la fracción píleo de *L. laccata* para la identificación de las familias de metabolitos secundarios por pruebas fitoquímicas colorimétricas [14, 15 y 16].

- 1) Para la identificación de alcaloides se empleó el ensayo Drangendorf y el ensayo Wagner;
- 2) Para la identificación de flavonoides se adicionaron 3 gotas de NaOH a una porción de muestra diluida en etanol, la presencia del color amarillo después de la reacción indica que es positiva;
- 3) Para la identificación de saponinas se empleó la técnica de la espuma, es positivo si la altura de la espuma es $>0.5\text{ cm}$ por 30 minutos;
- 4) Para taninos se empleó el reactivo de gelatina, y el reactivo de FeCl_3 ;
- 5) Cumarinas, a una muestra con etanol se le añadieron 2 gotas de NH_4OH , una coloración azul-violeta significa positivo;
- 6) Quinonas, al residuo seco obtenido de 1ml de muestra se le añadió etanol y NaOH, da positivo si hay una coloración rojo-violeta;
- 7) Glucósidos cardiotónicos, se empleó la prueba de Baljet;
- 8) Sesquiterpenlactonas, a la muestra se le agregó 2 gotas de clorhidrato de hidroxilamina 2N, 1 gota de KOH y metanol, se calentó a ebullición durante 2 minutos, se acidificó a pH 1 y finalmente se adicionó 1 gota de FeCl_3 , es positivo si vira a rojo, violeta o rosa en fase acuosa.

RESULTADOS

Conservación de los hongos obtenidos

El hongo *L. laccata* (Figura 3) en estas condiciones a -20°C en bolsas de papel, mantienen discretamente su actividad bioactiva.



Figura 3. *Laccaria laccata*
Elaboración: Autora, 2019

Actividad de lectina en AEM

El cultivo de la fracción estipe de *L. laccata* presentó 13 pozos positivos (empezando en la fila 1 de izquierda

a derecha, continuando en la fila 2, de igual forma de izquierda a derecha) al octavo día de crecimiento como se muestra en la Figura 4.



Figura 4. Actividad hemaglutinante de *L. laccata* en AEM: 1) con 13 pozos + y fila 2) continuación (izquierda-derecha).



Figura 6. Actividad hemaglutinante del cultivo de *L. laccata* en CEM. Fila 1: sobrenadante de estipe, fila 2: biomasa de estipe, fila 3: sobrenadante de lámina, fila 4: biomasa de lámina, fila 5: sobrenadante de pileo y fila 6: biomasa de pileo.

En la Figura 5, se representa la actividad de lectina en cultivos de estipe y lámina durante 17 días, donde los cultivos presentan mayor actividad, con 13 y 12 pozos positivos respectivamente, en el octavo día de crecimiento; mientras que la fracción de pileo muestra una actividad hemaglutinante baja, en el doceavo día con sólo 3 pozos positivos.

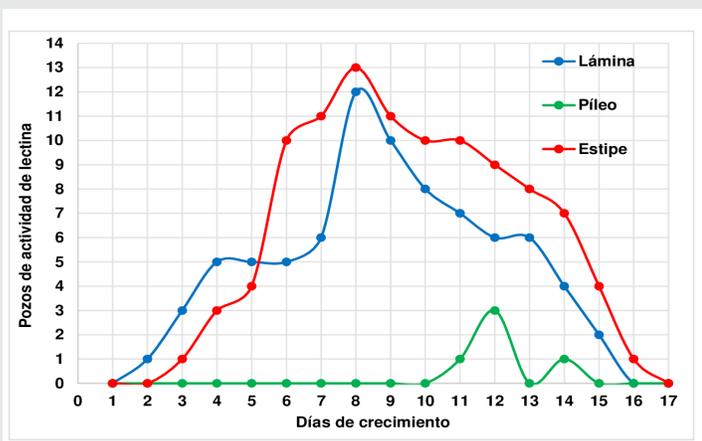


Figura 5. Cinética de Actividad de lectina de *Laccaria laccata* en medio AEM.

Actividad de lectina en CEM

En la Figura 6 se observa que en la biomasa de las fracciones: estipe y lámina se obtuvieron 5 y 4 pozos de actividad de lectina respectivamente de actividad (fila 2 y 4). Esto significa que la lectina del hongo *L. laccata* se encuentra en la biomasa y no se está liberando al medio. Mientras que la biomasa y sobrenadante del cultivo de la sección pileo no presentaron actividad hemaglutinante, esto puede indicar la presencia de otros compuestos que intervienen en la actividad de lectina.

En la Figura 7, se observa que no existe actividad hemaglutinante del cultivo de la fracción pileo; las fracciones de lámina y estipe alcanzan su máxima capacidad hemaglutinante en el día 5 de crecimiento, el cultivo de lámina presenta 4 pozos de actividad, se mantiene estable por 4 días más y empieza a decaer, por otra parte la fracción estipe obtiene 5 pozos de actividad, posteriormente al sexto día presenta disminución actividad hemaglutinante de forma gradual.

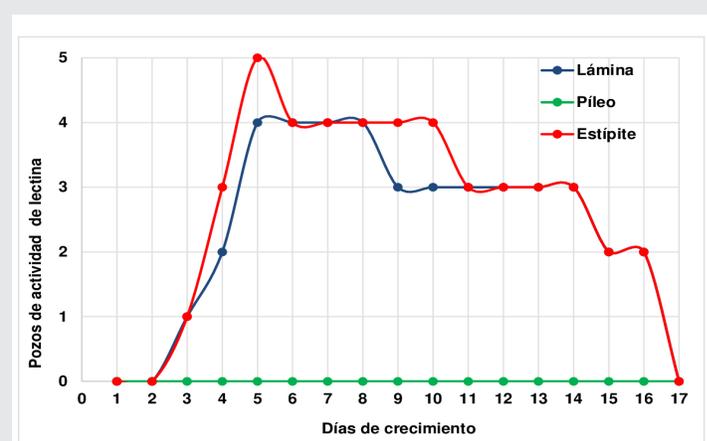


Figura 7. Cinética de actividad de lectina de *Laccaria laccata* en medio líquido CEM.

Identificación de familias de metabolitos secundarios por métodos colorimétricos

1) **Alcaloides:** El ensayo con el reactivo Drangendorf arrojó resultados positivos para la fracción sombrero de *L. laccata*. Se observó la formación de un precipitado color naranja (Figura 8a), debido a la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extracto ácido), de combinarse con el yodo y metales pesados como el bismuto, mercurio, tungsteno formando precipitados [17]. Con el reactivo Wagner (Figura 8b) presentó una

precipitación de color café-naranja que es indicio de un alcaloide.

2) **Flavonoides:** La prueba de flavonoides indicó la presencia de xantonas y flaonas al presentar un precipitado de color amarillo (Figura 8c) en cultivo de la fracción sombrero de *L. laccata*, mientras que dieron negativos para antocianinas y chalconas.

3) **Saponinas:** La muestra de la fracción sombrero del hongo al agitarla vigorosamente en un tubo de ensaye, presentó 1 cm de altura de espuma durante 30 minutos (Figura 8d).

4) **Taninos:** Prueba 1, al agregar el reactivo de gelatina no formó el precipitado blanco indicativa de positiva. Prueba 2, se formó un precipitado de color azul-negro denotando la presencia de ácido gálico (Figura 8e).

5) **Cumarinas:** El resultado dio negativo al no presentar el color azul a violeta; simplemente la muestra se tornó más claro con respecto al control (Figura 8f).

6) **Quinonas:** Este ensayo dio negativo al no presentar la coloración de rojo a violeta que es indicativa de positiva (Figura 8g).

7) **Glucósidos cardiotónicos:** En la prueba de Baljet, solo hubo cambios de color debido a la propia coloración del reactivo (Figura 8h).

8) **Sesquiterpenlactonas:** Al darle un tratamiento previo a la muestra de sombrero y después se agregó cloruro férrico al 1%, no presentó ninguna coloración roja, violeta o rosa indicativa de prueba positiva. Solo tomó un aspecto más turbio (Figura 8i).

CONCLUSIONES

Se concluye que los cultivos in vitro de *L. laccata* pueden ser empleados como herramienta biotecnológica para la producción de metabolitos primarios y secundarios.

En este estudio se encontró que las lectinas de *L. laccata* en AEM se sintetizan en un periodo de 8 días de crecimiento y en CEM necesitan 5 días de para presentar actividad hemaglutinante. Así mismo las fracciones que tuvieron mayor actividad tanto en AEM como en CEM fueron: estipe y lámina.

En la fracción pileo de *L. laccata* se identificaron por pruebas fitoquímicas colorimétricas la presencia de 4 metabolitos secundarios: alcaloides, flavonoides: xantonas y flaonas, saponinas y taninos como el ácido gálico. Estos resultados obtenidos sirven de preámbulo para estudios futuros en donde se puede implementar alguna técnica de extracción de metabolitos para profundizar en las propiedades antitumorales, antibacterianas, antioxidantes, antifúngicas, entre otras, que puede poseer el hongo. Es necesario continuar los estudios de investigación farmacéutica, industrial y alimentario de *Laccaria laccata*.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Elvira Aguirre Acosta, Miguel Ulloa, Samuel Aguilar, Joaquín Cifuentes y Ricardo Valenzuela. (2014). *Biodiversidad de hongos en México [versión electrónica]. Revista Mexicana de Biodiversidad, volumen 85, pages. 76-81.*

[2] Miryan Cassanello. (n.d.). *Biotechnología Industrial Producción industrial de Metabolitos en Bio-reactores. PINMATE - Dep. Industrias, FCEyN-UBA.*

[3] Chumkhunthod, P. (2006). *Purification and Characterization of an N-acetyl-Dgalactosamine-specific Lectin From the Edible Mushroom Schizophyllum commune. Biochimica et Biophysica. 1760(1):326 - 332.*

[4] De Baets S. (2000). *Vitamins and related bio-factors, microbial production. Encyclopedia of microbiology. Academic, London, pag. 837-853.*

[5] Kim, S. E., Hwang, B. S., Song, J. G., Lee, S. W., Lee, I. K., y Yun, B. S. (2013). *New bioactive compounds from Korean native mushrooms. Journals Mycobiology, Vol. 41, Num. 4, pages.171-176.*

[6] Aura P. Chaparro P. (2010). *Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa nativa SPG 321 de Mucor circinelloides y evaluación de su actividad antimicrobiana. Magister en microbiología, Pontificia Universidad Javeriana; Bogotá D.C., pp 31.*

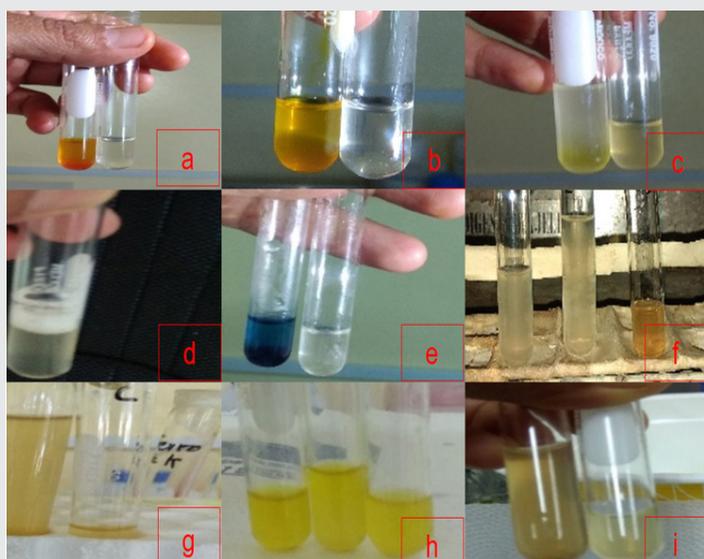


Figura 8. Identificación de metabolitos secundarios en el cultivo de pileo de *L. laccata*: a) y b) Alcaloides; c) Flavonoides: xantonas y flaonas; d) Saponinas; e) Taninos; f) Cumarinas; g) Quinonas; h) Glucósidos cardiotónicos e i) Sesquiterpenlactonas.

[7] Guzmán, G. (2008). *Diversity and use of traditional Mexican medicinal fungi. A review. International J. Medicinal Mushrooms Vol 10, pags. 209-217.*

[8] Boa, E. (2004). *Los hongos silvestres comestibles. Perspectiva global de su uso e importancia para la población, No. 17. FAO, Roma, p.161.*

[9] Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoterapia y Plantas Medicinales. 2a. Edición. España. Editorial Acribia, S. A.*

[10] Enzio Foy V. (2005). *Extracción, identificación y evaluación de saponinas en Agaricus bisporus. Biotempo, Vol. 5, pags. 31- 36.*

[11] Oliveros A. (2018). *Extracción y cuantificación de cumarinas mediante HPLC-UV en extractos hidroetanolicos de semillas de Dipteryx odorata. Revista Latinoamericana de Química. Vol. 39, pags. 17-39.*

[12] Casamtjana N. (2018). *Glucósidos cardiotónicos. Centro de información del medicamento. Colegio oficial de farmacéuticos de Barcelona.*

[13] Jaffé, W. G. *Hemagglutinin. (1980). Toxic constituents of plant foodstuff. Ed. by I.E. Liener. New York, U.S.A., Academic Press, pags. 73-102.*

[14] María del Socorro Pina C. Angelia Hernández M. y Zurisaday Victoriano D. (n. d.) *Determinación de metabolitos secundarios por pruebas fitoquímicas colorimétricas a extractos de hongos comestibles (Informe). Facultad de Medicina y Cirugía Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.*

[15] Suhul L. y Carlos A. (2011). *Determinación de metabolitos secundarios presentes en el hongo Schizophyllum commune (oreja de palo) cultivados en laboratorio, provenientes de cepas aisladas en 5 localidades de Guatemala. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC;*

[16] Gabriel J. Arango A. (2008). *Alcaloides y compuestos nitrogenados. Tesis de licenciatura. Facultad de Química Farmacéutica; Medellín.*

[17] Ríos H. Erika N. (2012). *Determinación de metabolitos secundarios y código de barras de ADN de vitroplantas de Turbinicarpus valdezianus. Tesis de maestría, (pp. 11). México: Saltillo Coahuila.*