

UACM

**Universidad Autónoma
de la Ciudad de México**

Nada Humano me es ajeno

**COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
LICENCIATURA EN PROMOCIÓN DE LA SALUD
PLANTEL CASA LIBERTAD**

**“ESTUDIO QUÍMICO Y EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DEL HONGO
Sclerotium rolfsii Sacc CULTIVADO EN DOS DISTINTOS MEDIOS DE
CULTIVO”**

**TRABAJO RECEPCIONAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN PROMOCIÓN DE LA SALUD**

PRESENTA:

Ismael Villicaña Sánchez

Director del trabajo recepcional: **M. en B. Edgar Sierra Palacios**

México D.F. Noviembre, 2015.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

EL PRESENTE TRABAJO FUE ELABORADO CON EL APOYO DEL PROYECTO PI2014-28 DEL CONVENIO UACM/SECITI/060/2013 Y DE LA BECA UACM-ASAMBLEA LEGISLATIVA DEL DISTRITO FEDERAL VI LEGISLATURA Y LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO.

DEDICATORIA

La dedico principalmente a dios padre por permitirme formar parte de la vida y de de una familia maravillosa.

A mis padres: Lidia Sánchez y Manuel Villicaña quienes me han apoyado durante mi desarrollo escolar e inicios de mi desarrollo profesional.

A mis hermanas: María de Jesús Villicaña Sánchez e Irma Villicaña Sánchez, quienes me han brindado de su apoyo en las buenas y en las malas durante toda mi vida.

A mis sobrinos Daian y Leonardo con quienes comparto grandes momentos.

A mi cuñado Isrrael Granados que me ha ayudado en etapas de mi vida.

En general toda mi familia con quienes he vivido momentos especiales e inolvidables.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por mi formación profesional como licenciado en Promoción de la Salud.

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por el apoyo de empastados del trabajo recepcional.

Al Mtro. en Biotecnología, Edgar del Carmen Cierra Palacios por su valiosa enseñanza y su compromiso sincero a lo largo del desarrollo de la tesis, por su paciencia y apoyo a mí crecimiento tanto profesional como personal.

Gracias a mis lectores: la Mtra. Alma Rosa Plaza García, al Mtro. Dairo Jesús Orjuela Henry, al Dr. Pablo Claudio Rojas Lara, y al Dr. Edmundo Arturo Pérez Godínez. Gracias por brindarme de su tiempo, así como sus valiosas observaciones y recomendaciones para la elaboración de la tesis.

A todos los profesores que me apoyaron durante mi formación profesional, estoy agradecido por haber tenido maestros buenos como ustedes, que me han motivado para continuar impulsándome para la vida y seguir adelante, mil gracias.

A todos mis amigos: Ana Rita, Fernanda, Ariana, Héctor Noel, María Luisa, Ausencio, Norberto, Luís, Roció, David, Misael, Erika, Flor, Miguel, Eduardo, Yesenia, Edgar y demás compañeros, muchas gracias por los momentos que pasamos juntos y por brindarme de su apoyo y motivación en todo momento.

ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
Abreviaturas	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	2
2.1 Generalidades de los hongos	4
2.2 Taxonomía de los hongos	5
2.2.1 Zigomicetes	6
2.2.2 Ascomycetes	7
2.2.3 Basidiomicetes	7
2.2.4 Chytridiomicetes	8
2.2.5 Glomeromicetes	8
2.3 Aspectos morfológicos básicos de los hongos	8
2.3.1 Esporas	9
2.3.2 Micelio	10
2.4 Los hongos como productores de compuestos farmacológicos	11
2.5 Uso medicinal de los hongos	13
2.6 El hongo <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc	14
2.7 Metabolitos secundarios con actividad farmacológica	15
2.7.1 Alcaloides	15
2.7.2 Antraquinonas	16
2.7.3 Taninos	17
2.7.4 Cumarinas	18
2.7.5 Saponinas	18
2.7.6 Terpenos	19
2.7.7 Flavonoides	19
2.8 Métodos para la caracterización química de los hongos	20
2.8.1 Cromatografía	20
2.8.1.1 Cromatografía de capa fina (TLC)	20

2.8.1.2 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	21
2.8.1.3 Cromatografía de gases	21
2.8.2 Espectrofotometría	22
2.8.2.1 Espectrometría Uv/vis	22
2.8.3 Espectrometría	23
2.8.3.1 Espectrometría de masas	23
2.8.4 Espectroscopia	23
2.8.4.1 Resonancia magnética nuclear	23
2.8.4.2 Espectroscopia de infrarrojo	24
2.9 Identificación molecular de hongos	24
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
4. JUSTIFICACION	26
5. OBJETIVOS	27
5.1 General	27
5.2 Particulares	27
6. METODOLOGÍA	28
6.1 Diseño experimental	28
6.2 Obtención del hongo <i>Sclerotium rolsfii</i> Sacc	29
6.3 Cultivo del hongo <i>Sclerotium rolsfii</i> Sacc	29
6.3.1 Medio sólido PDA	29
6.3.2 Medio líquido PD	29
6.3.3 Medio líquido de extracto en malta	29
6.4 Obtención de los extractos del hongo <i>Sclerotium rolsfii</i> Sacc	30
6.5 Extracción de ADN del hongo <i>Sclerotium rolsfii</i> Sacc	30
6.6 Amplificación del marcador LSU por PCR	31
6.7 Electroforesis en gel de agarosa	32
6.8 Análisis de secuencias de ADN e identificación molecular	35
6.9 Caracterización química de los extractos de <i>Sclerotium rolsfii</i> Sacc	35
6.9.1 Espectro de uv-visible	35
6.9.2 Determinación de antraquinonas	35
6.9.3 Determinación de alcaloides	36

6.9.4 Determinación de taninos	36
6.9.5 Determinación de saponinas	36
6.9.6 Determinación de cumarinas volátiles	36
6.10 Evaluación farmacológica <i>In vitro</i> de los extractos de <i>S. rolfsii</i> Sacc	37
6.10.1 Contenido de flavonoides totales	37
6.10.2 Contenido de fenoles totales	37
6.10.3 Capacidad antioxidante DPPH	38
6.10.4 Evaluación de la toxicidad <i>In vitro</i> en <i>Artemia salina</i>	39
7. RESULTADOS	40
7.1 Obtención de Biomasa	40
7.2 Obtención de ADN	42
7.3 Amplificación de LSU por PCR	42
7.4 Identificación molecular del hongo <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc	43
7.5 Caracterización química de los extractos	46
7.5.1 UV-visible	46
7.5.2 Evaluación química cualitativa	47
7.6 Evaluación farmacológica	48
7.6.1 Determinación de fenoles totales <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc	48
7.6.2 Determinación de flavonoides totales en <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc	49
7.6.3 Determinación de la capacidad antioxidante en <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc	50
7.6.4 Determinación de la toxicidad <i>In vitro</i> en el modelo de <i>Artemia salina</i>	52
8. DISCUSIÓN	53
9. CONCLUSIÓN	55
10. PERSPECTIVAS EXPERIMENTAL	55
11. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN LA PROMOCIÓN DE LA SALUD	56
12. BIBLIOGRAFÍA	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de hongos en las culturas prehispánicas de México y Centroamérica	4
Figura 2. Árbol filogenético de los hongos.	6
Figura 3. Esporas de hongo	10
Figura 4. Micelio de hongo	11
Figura 5. Arreglo de los genes ribosomales en el genoma nuclear de los hongos	25
Figura 6. Diseño experimental de la investigación	28
Figura 7. Preparación de un gel de agarosa	34
Figura 8. Gráfica del promedio del crecimiento radial del hongo <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc cultivado en caja de Petri con medio PDA	40
Figura 9. Reactores de cultivo de <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc	41
Figura 10. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	42
Figura 11. Electroforesis en agarosa del producto de PCR del marcador molecular LSU	43
Figura 12. Secuencia parcial del gen 28S o LSU de <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc	44
Figura 13A. Espectro de uv-visible de los caldos de cultivo del hongo <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc	46
Figura 13B. Espectro de uv-visible de los extractos etanólicos del hongo <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc	47
Figura 14. Gráficas del comportamiento de la toxicidad de los extractos y caldos de cultivo de <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc en el modelo <i>in vitro</i> de <i>Artemia salina</i>	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reacción de PCR para la amplificación del fragmento del marcador de ADN LSU	32
Tabla 2. Condiciones de corrida para la amplificación del marcador molecular LSU en el termociclador MaxyGen II	32
Tabla 3. Concentraciones de agarosa de acuerdo al tamaño del fragmento de ADN a separar	33

Tabla 4. Cantidad de micelio obtenido y empleado en la elaboración de los extractos de etanol, acetona y acetato de etilo del <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc	41
Tabla 5. Porcentajes de similitud de la secuencia nucleotídica de LSU de <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc y su valor E	45
Tabla 6. Resultado de las pruebas cualitativas de grupos químicos funcionales obtenidas del micelio de <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc cultivado en medio PD	47
Tabla 7. Resultado de las pruebas cualitativas de grupos químicos funcionales obtenidas del micelio de <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc cultivado en medio extracto en malta	48
Tabla 8. Resultados de la evaluación del contenido de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante DPPH en en <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc	51

ÍNDICE DE ANEXOS

A. Reactivos y materiales	66
Reactivos	66
Materiales	67
Equipos	68
B. Cálculos de fenoles totales	69
C. Cálculos de flavonoides totales	71
D. Capacidad antioxidante	73
E. Datos de toxicidad en <i>Artemia salina</i>	75
F. Constancia del congreso de micología	76

Abreviaturas

°C	grados celcius
Abs	absorbancia
CLAR	cromatografía líquida de alta resolución
cm	centímetros
g	gramos
h	horas
L	litro
mg	miligramos
µg	microgramos
ml	mililitros
nm	nanómetros
p/v	peso/volumen
pb	pares de bases
pH	potencial de hidrógeno
ppm	partes por millón
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
TLC	cromatografía de capa fina
uv	ultravioleta
uv-vis	ultravioleta-visible

v/v	volumen/volumen
x g	campos gravitacionales
μL	microlitros
μm	micrómetros
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
PBS	buffer de fosfatos salinos.
PCR	reacción en cadena de la ADN polimerasa
TAE	tris/Acetic Acid/EDTA Boffer

1. INTRODUCCIÓN

Los fósiles más antiguos de hongos tienen aproximadamente 400 millones de años, lo que habla de la aparición de estos organismos en la biosfera del planeta, sin embargo, se piensa que los hongos en realidad han evolucionado poco. Su antigüedad nos permite hipotetizar sobre su relación con el hombre, la cual ha sido estrecha, ya que algunos restos humanos encontrados en Europa demuestran que los hongos eran empleados para generar fuego y curar algunos padecimientos médicos. Ahora sabemos que se han caracterizado unas 300 especies de hongos como medicinales, siendo 20 las empleadas por la medicina tradicional e inclusive estas mismas especies son altamente comercializadas como suplementos para aliviar algunos problemas de salud. Aunque, los hongos juegan diversos papeles para la sociedad, presentan un gran número de usos como: alimento para los seres humanos, tónicos, degradadores de materia muerta, existen plantas que viven en simbiosis con hongos para su sobrevivencia, etc. (Fersain y Sigifredo, 2001). En la actualidad se sabe que ciertos hongos son capaces de producir una gran cantidad de metabolitos que tienen diversas aplicaciones, los cuales están en constante proceso de investigación (De Diego, 2011; Mayett et al; 2006).

Los hongos son los primeros organismos pluricelulares en la evolución, siguen hasta hoy en día manteniendo una estructura sencilla. Presentan una alta diversidad en su forma, con una cantidad no cuantificable de actividades bioquímicas, ya que pueden alimentarse casi de cualquier fuente de carbono u otros elementos químicos.

Los hongos son de los organismos más diversos en la naturaleza solo rebasados por los insectos. Se estima que existen alrededor de 1,500,000 especies (Hawksworth, 2001), pero algunos autores estiman que la diversidad de especies es superior a lo estimado., no obstante solo se ha estudiado un 5% de esa cantidad de especies. En México de acuerdo a las estimaciones de Guzmán (1998a), existen 200,000 especies de las cuales se tiene información de un 4%, situación que deja claro que son un grupo de organismo numeroso pero poco estudiado. Por lo que es importante continuar desarrollando investigación para permitir una mayor exploración en el conocimiento de estos organismos.

A nivel global la mayor parte de la investigación en hongos se ha centrado en los hongos fitopatógenos y comestibles. En México la situación no es distinta, sabemos que tenemos reportados 1,500 especies de hongos fitopatógenos y 200 son las especies comestible que se consumen en nuestro país (Guzmán, 1998b; Mata et al; 2007). Si bien, respecto a los hongos fitopatógenos, son pocos los estudios orientados hacia la parte química y farmacológica de estos organismos (García, 2004). De aquí, la importancia de estudiar estos hongos, como es el caso de *Sclerotium rolfsii* Sacc un hongo fitopatógeno, al cual se le evaluaron varios grupos químicos (alcaloides, antraquinonas, taninos, cumarinas volátiles y saponinas) y actividades farmacológicas (flavonoides, fenoles totales, poder antioxidante y toxicidad en el modelo de *Artemia salina*). Además, se estandarizó las condiciones de cultivo en medio sólido y líquido de papa-dextrosa-agar y extracto de malta. Por último, se realizó la identificación molecular empleando el marcador de ADNr de la subunidad mayor del ribosoma LSU ó 28S.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

De acuerdo a distintas fuentes arqueológicas los hongos aparecieron alrededor de hace 40-400 millones de años. El humano y los hongos han experimentado el proceso evolutivo de forma similar, situación que permitió al hombre aprovechar a estos organismos para su alimentación, como medicina para aliviar ciertos padecimientos y en sus rituales religiosos. Datos conocidos al día de hoy proporcionan información del uso de los hongos por parte de los hombres prehistóricos de Europa, dicha información hace patente el uso de los hongos deshidratados para generar fuego y como alimento (Bertelsen; 2013).

La importancia de los hongos se deja ver en la leyenda de la civilización Micénica, donde se cree que el nombre de dicha civilización se debe a que Perseo empleó una seta u hongo como vaso improvisado para calmar la sed, situación presentada hace unos 3,500 años.

Una civilización que hizo un uso importante de los hongos fueron los egipcios, emplearon los hongos en la alimentación de forma directa, pero también los utilizaron para desarrollar ciertos alimentos como el pan y la cerveza, además de emplearlos en ciertos rituales religiosos (Abdel-Azeem, 2010).

Los griegos dejaron evidencia escrita y gráfica del uso de los hongos en su alimentación, además de documentar las primeras intoxicaciones debidas al consumo de hongos tóxicos. Siendo Teofrasto el primero en dejar evidencia de la definición de los hongos como plantas imperfectas, carentes de raíz, hojas, flores y frutos.

Para los romanos los hongos tenían una alta estima en la alimentación, es en esta etapa donde los hongos son considerados un alimento “gourmet”, situación que permeo a la nomenclatura científica de algunos hongos como la *Aminta caesarea*. Es ampliamente conocida la historia del empleo de los hongos tóxicos para la eliminación de ciertos personajes importantes de esta cultura. Situación que llevo a que Plinio el Viejo elaborará las primeras normas para distinguir entre hongos comestibles y tóxicos (Dugan, 2008).

Los primeros hongos que afectan a las plantas fueron observados durante la edad media, la presencia del cornezuelo (*Clavicep purpurea*) en los cereales, dejó claro que existen hongos que pueden provocar daños considerables a ciertos tejidos del cuerpo e incluso llevar a la muerte, esto principalmente por la presencia de ciertas sustancias químicas producidas por los hongos, como es el caso de los alcaloides del hongo antes mencionado.

El uso de los hongos en las culturas prehispánicas de México y Centroamérica fue conocido gracias a los escritos de fray Bernardino de Sahagún, quien realizó una recolección de información de los libros sagrados de los mayas y náhuatl, como el Popol Vuh y Chilam Balam. Los restos arqueológicos de hongos en piedra con figuras humanas o de dioses en la base, fueron comunes en la cultura maya (figura 1A). En el Códice Vindobonensis donde se describen diferentes aspectos de la cultura mixteca, el arqueólogo mexicano Alfonso Caso identificó un ritual de consumo de hongos alucinógenos por toda una pléyade de dioses de dicha cultura. Esta ilustración no es única, en el Códice Magliabechiano se observa a un individuo que ingiere estos hongos, llamados *teonanacatl* (carne de los dioses) ante la presencia de una deidad (Figura 1B) (Ruiz, 2001).

La expansión del conocimiento científico sobre los hongos se presenta indudablemente durante los siglos XIX, XX y XXI., se logra crear un sistema de clasificación, se colocan en un reino separado de las plantas y se avanza

enormemente en el conocimiento de su biología celular, molecular, bioquímica, genética, etc.

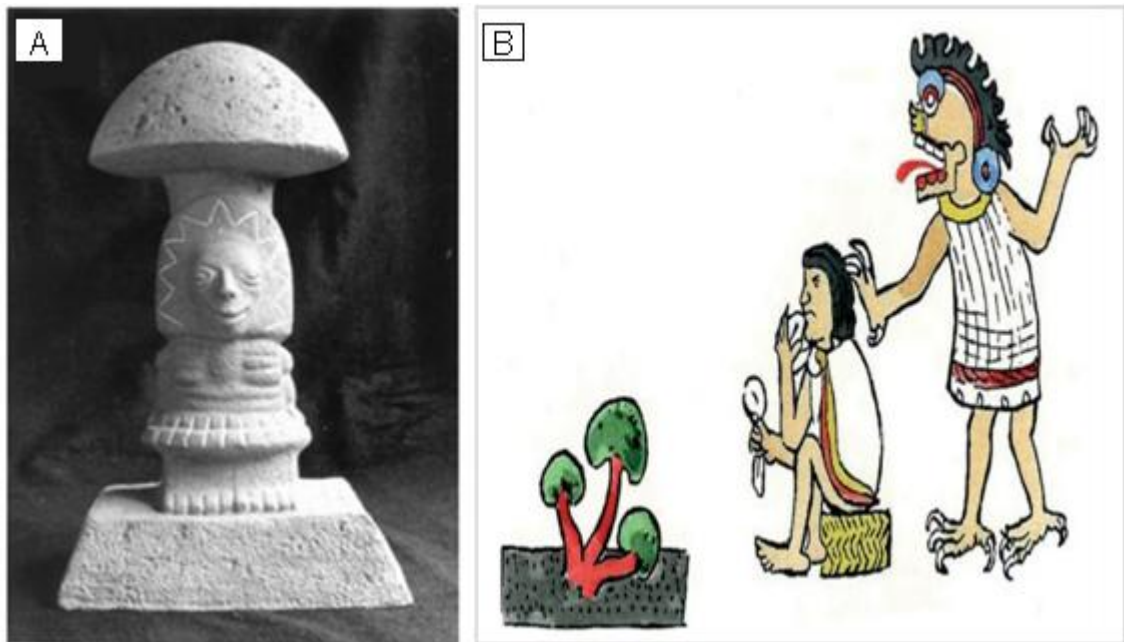


Figura 1. Representación de hongos en las culturas prehispánicas de México y Centroamérica. A. Replica de un hongo de piedra, el original fue descubierto en Guatemala a finales del siglo XIX, el original está en Suiza (fotografía del Dr. Daniel Martínez-Carrera). B. Representación del uso de los hongos en la cultura mixteca, encontrada en el Códice Magliabechiano (Ruíz, 2012).

2.1. Generalidades de los hongos

Los hongos son organismos de amplia distribución en la naturaleza, son cosmopolitas puesto que se encuentran en distintos hábitats, incluyendo ambientes extremos como los desiertos o en los sedimentos de los fondos marinos, así como en áreas de extremada salinidad. La mayoría son terrestres, aunque algunos son estrictamente acuáticos (Guzmán et al., 1993; Raghukumar y Raghukumar, 1998; Vaupotic et al., 2008; Le Calvez et al., 2009). Según su ecología se pueden clasificar en cuatro grupos: saprófitos, liquenizados, micorrizógenos y parásitos. Los hongos son de gran importancia debido a que contribuyen al mantenimiento de los bosques, por ser los degradadores primarios de la materia muerta de plantas y animales de muchos ecosistemas, como tal, poseen un papel ecológico relevante en los ciclos

biogeoquímicos, además son capaces de formar asociaciones con diferentes especies de árboles (Hawksworth, 2006).

Los hongos son organismos eucariotas cuyas células contienen un núcleo bien definido, presentan mitocondrias y ribosomas, así como otros orgánulos rodeados de membrana, carecen de cloroplastos y por consiguiente no fotosintetizan. Sus células están rodeadas por paredes celulares cuyos principales constituyentes son glucanos y quitina, siendo este último componente más resistente que la celulosa a la degradación por microorganismos (Alexopoulos et al., 1995). Debido a que son heterótrofos no tienen la capacidad de sintetizar su propia materia orgánica. Los hongos secretan enzimas digestivas y después absorben el alimento predigerido a través de su pared celular y membrana plasmática. Además, pueden obtener nutrientes de otros organismos vivos a los que parasitan (Shoji et al., 2006).

La mayoría de los hongos crecen como hifas, estructuras cilíndricas y filiformes, las cuales crecen en sus ápices, las estructuras nuevas se forman por la aparición de nuevos ápices a lo largo de hifas preexistentes por un proceso llamado de ramificación. La reproducción de los hongos se lleva a cabo por medio de esporas, las cuales se dispersan en un estado latente, y sólo crecen cuando se hallan en condiciones favorables para su germinación. En condiciones óptimas, la espora germina, surgiendo de ella la hifa, por cuya extensión y ramificación se va constituyendo el micelio (Harris, 2008).

2.2. Taxonomía de los hongos

La clasificación de los hongos siempre ha sido compleja, se cree que la primera clasificación de estos organismos tuvo que ser bajo los criterios de utilidad para el hombre, hongos buenos (comestibles y medicinales) y hongos malos (tóxicos y parásitos). Las primeras formas científicas de ordenar a los hongos, se basaron en la nomenclatura botánica y zoológica, por lo que el reino fungi está organizado desde esos tiempos en las jerarquías linneanas (reino, phylum, clase, orden, familia, género, especie y pudiendo llegar a subespecie). Durante el siglo XIX los hongos estuvieron clasificados en el reino Plantae. Linneo los colocó en la clase Cryptogamia junto a musgos, líquenes, algas y helechos dentro del reino Plantae. Es hasta 1969 cuando Whittaker propone la creación

del reino fungi para todos aquellos organismos eucariotas que no presentaban pigmentos fotosintéticos. En los años 90's Woese propone que el reino fungi este dentro del dominio Eukarya de acuerdo a la información contenida en los genes ribosomales. La taxonomía de los hongos en la última década ha cambiado de forma permanente debido al desarrollo de la biología molecular, sin embargo en estos momentos se reconocen 5 grupos o phylum de hongos dentro del reino fungi (figura 2) (Contreras-Ramos, 2007), los cuales se describen de forma breve a continuación.

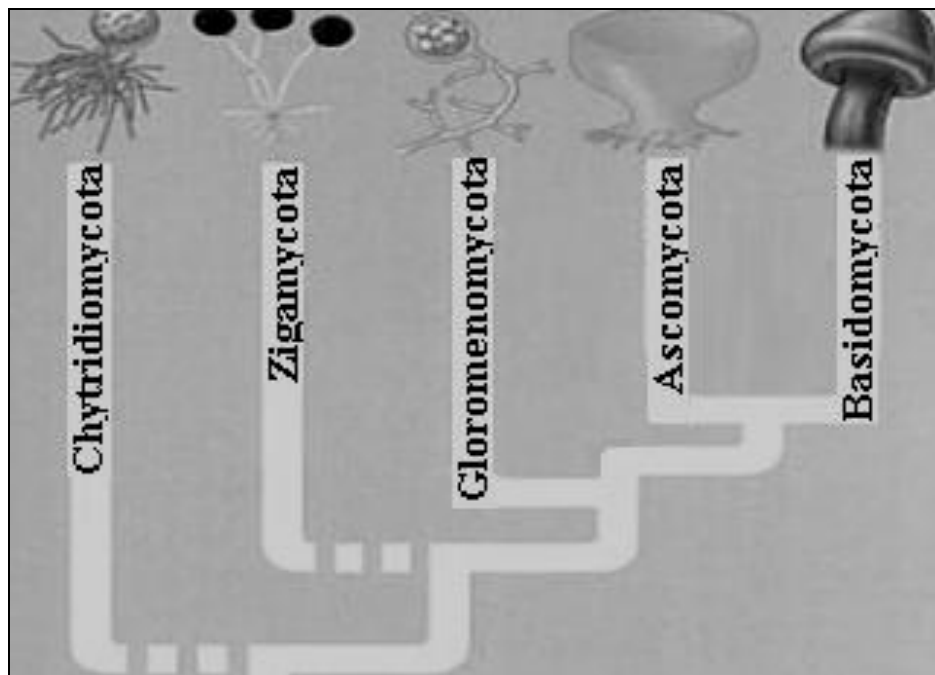


Figura 2. Árbol filogenético de los hongos. Actualmente se reconocen 5 grupos de hongos dentro del reino fungi (Campbell, 2007).

2.2.1 Zigomicetes

Los hongos pertenecientes a este grupo son en su mayoría terrestres, viven sobre materia muerta vegetal o animal; sus células carecen de septos, por lo que se observan multinucleadas; se reproducen asexualmente por medio de esporangiosporas desarrolladas en los esporangios. Su reproducción sexual se lleva a cabo mediante la conjugación de hifas positivas (+) e hifas negativas (-) para formar gametangios, de los que se derivan la zigosporas, la cual constituye la estructura de resistencia y determina el nombre de la división

celular (Arora, 2004). Dentro de este grupo de hongos se encuentran géneros como *Mucor sp.* y *Rhizopus sp.*

2.2.2. Ascomycetes

Los ascomicetos agrupa hongos con hifas septadas, se desarrollan favorablemente sobre madera podrida, en suelos con materia orgánica muerta, sobre estiércol, aguas dulces o marinas, entre otros sustratos; algunos de los hongos de este grupo viven en asociación íntima con algas formando líquenes.

El nombre de este grupo se debe a que durante la reproducción sexual, en el extremo de la hifa se desarrolla un saco (llamado asca), dentro del cual se forman ocho ascosporas. En algunas especies de esta división, las ascas están en el interior del cuerpo fructífero o seta, se distinguen en el ambiente por su singular forma de copa o botella de colores muy vistosos. Ahora bien, cuando la reproducción es asexual, se lleva a cabo mediante la formación de conidios solitarios o en cadena en el extremo de un conidióforo.

Entre las especies representativas de este grupo de hongos están *Neurospora sp.*, *Morchela sp.*, *Peziza onotica*, las levaduras del jugo de la uva *Saccharomyces sp.* y las especies parásitas como las que producen el cornezuelo del centeno (*Claviceps purpurea*) (Beug et al; 2014).

2.2.3 Basidiomicetes

Son hongos formados por hifas septadas que presentan dos núcleos o dicarióticas, forman unas estructuras en forma de botella llamadas basidios y que contienen esporas llamadas basidiosporas. Dentro de este grupo de hongos se encuentran los organismos macroscópicos, como las setas, hongos tóxicos, alucinógenos y fitopatógenos.

Las hifas del micelio se pueden unir a larga distancia formando unas estructuras denominadas grapas de conexión. Estos hongos presentan una reproducción sexual y asexual, en la primera, forman esporas haploides + y -, que después de germinar por separado se unen para formar un micelio diploide que posteriormente dará origen a esporas sexuales haploides + y -. Para la reproducción asexual estos hongos forman unas esporas llamadas artrosporas u oídios.

Dentro de este grupo encontramos hongos como: *Pleurotus sp*; *Amanita sp*; *Boletus sp*; *Psilocybe sp*; *Hemileia vastatrix*, etc. (Montoya, 2008; Anke T 1989).

2.2.4 Chytridiomicetes

Estos hongos se caracterizan por ser los más primitivos que constan de una sola célula, con un micelio rudimentario con hifas cenocíticas. Presentan una forma de reproducción sexual por medio de zoosporas flageladas, lo que permite la movilidad de estas últimas. Estos hongos los podemos encontrar en ambientes acuáticos (agua dulce la mayoría), terrestre, materia orgánica viva y en descomposición (saprofitos). Algunos de estos hongos son anaerobios y se caracterizan por formar parte del sistema digestivo de rumiantes donde tienen la función de degradar materiales vegetales (Hibbett et al., 2007; Montoya, 2008). Algunos hongos pertenecientes a este grupo son *Olpidium sp*; *Synchytrium sp.* y *Urophlyctis sp.*, todos patógenos de plantas.

2.2.5 Glomeromicetes

Este grupo de hongos está altamente emparentado con los basidiomicetes y zigomicetes, todavía hace algunos años estaban integrados dentro de los zigomicetes. Se tienen datos de que su aparición fue hace muchos millones de años por los que se les considera hongos antiguos. No se conoce en ellos la forma de la reproducción sexual, además de que son simbioses obligados de plantas, lo que conocemos como micorriza. Presentan esporas de tamaño grande, el micelio se caracteriza por hifas no septadas y multinucleadas. Algunos organismos integrados en este grupo son *Glomus sp*; *Diversispora sp*; *Otospora sp*; *Acaulospora sp*; etc. (Stockinger et al., 2010; Schüßler et al., 2001).

2.3 Aspectos morfológicos básicos de los hongos

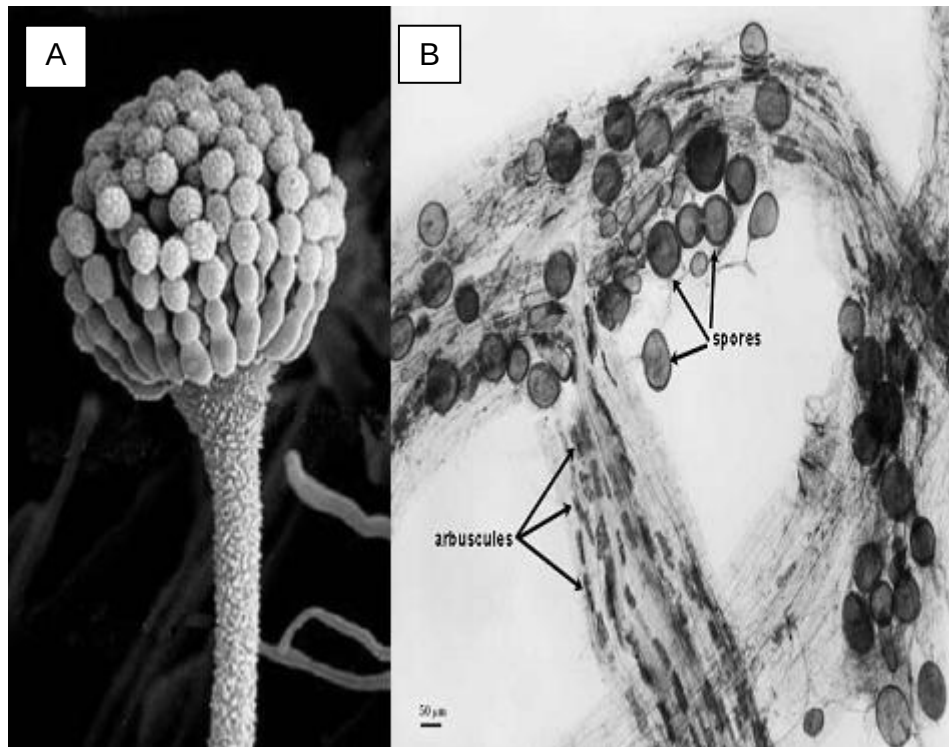
Las características morfológicas generales de los hongos es que crecen en forma de maraña de tubos muy delgados, los cuales miden generalmente una centésima a una décima de mm (10-100 μm), que parten de la espora o el fragmento que les dio origen y se dispersan en todas las direcciones. Esta red

tubular constituye al llamado “talo” o “micelio”. Cada uno de los tubos que lo forman se denomina “hifa”. Las hifas pueden estar divididas en segmentos o no, dependiendo del tipo de hongo, por unas paredes llamadas septos las cuales nunca se cierran del todo, si no que dejan un poro central que permite el flujo de material celular a lo largo de las hifas incluyendo los orgánulos y el núcleo. Las hifas están rodeadas por una capa rígida que les confiere resistencia ante la diferencia de presiones interna y externa, ésta es la llamada pared celular. El citoplasma de las hifas tiene una alta presión osmótica debido a la acumulación de diferentes sustancias (nutrientes y metabolitos). Esta alta presión contrasta con la baja presión del medio ambiente en que crecen normalmente los hongos. La pared celular de los hongos tiene una composición compleja, formada principalmente por polisacáridos, proteínas y una pequeña cantidad de lípidos, su rigidez la debe a un polisacárido llamado N-acetilglucosamina (Ruíz, 2013; Cole, 1996).

2.3.1 La espora

La mayoría de los hongos forman esporas, los cuales son para los hongos el equivalente de las semillas de las plantas. De ahí su nombre de origen griego que significa semilla. Las esporas son las estructuras de reproducción y dispersión de los hongos. En su mayoría son asexuales, pero algunos hongos generan esporas sexuales. El mecanismo de reproducción sexual y el tipo de esporas que forman los hongos constituyen la base de clasificación en grandes grupos. Su clasificación más fina generalmente se basa en la morfología del micelio aéreo (reproductor) y en la forma de las esporas (figura 3).

Los tres grandes grupos de hongos terrestres zigomicetos, ascomicetos y basidiomicetos, se reconocen por el mecanismo de formación de sus esporas a través del proceso sexual. El otro grupo de hongos, chytridiomicetes, se distingue por sus esporas asexuales móviles (Kendrick, 1992; Cole, 1996).

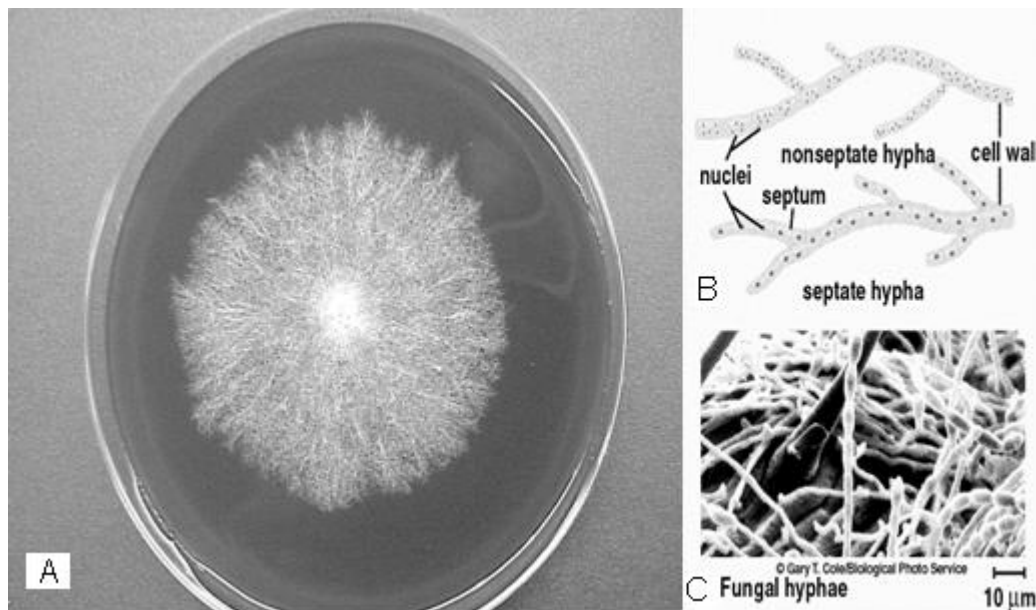


Fuente: <http://invam.wvu.edu/methods/assays> (20-07-2015)

Figura 3. Esporas de hongo. A. Estructura de soporte de las esporas, en este caso un conidióforo. B. Esporas de una micorriza (hongo simbiótico de raíz).

2.2.2 Micelio

El micelio consta de una masa de citoplasma multinucleado encerrada dentro de un sistema de tubos rígidos y ramificados que son de un diámetro bastante uniforme. Los tubos que encierran al protoplasma representan a una estructura protectora homóloga a la pared celular de un organismo unicelular. Normalmente un micelio surge de la germinación y posterior crecimiento de una sola célula reproductora o espora. Después de la germinación, la espora emite un largo filamento o *hifa* que se ramifica repentinamente a medida que se va alargando para formar un sistema ramificado de hifas que constituye el micelio (figura 4). El crecimiento fúngico está conformado característicamente a los ápices de las hifas, a medida que el micelio no es fijo, en tanto que haya nutrientes disponibles, el crecimiento de las *hifas* puede continuar, en algunos basidiomicetes un sólo micelio puede alcanzar hasta 16 m de diámetro (Kavanagh, 2005; Cole, 1996).



Fuente(A):[http://www.epubbud.com/read.php?q=DJ\(20-07-2015\)](http://www.epubbud.com/read.php?q=DJ(20-07-2015))

Fuente (B y C):

http://www.desertbruchid.net/4_GB_Lecture_figs_f/4_GB_21_Fungi_Figf/Mader_FungiMycelium_Mold.gif (20-07-2015).

Figura 4. Micelio de un hongo. A. Micelio creciendo en medio de cultivo en caja de Petri. B. Tipos de micelio: septado y no septado. C. Fotografía de microscopía electrónica de las hifas que conforman el micelio.

2.4 Los hongos como productores de compuestos farmacológicos

Se estima que existen poco más de 1,6 millones de especies de hongos y solo alrededor de 100,000 especies se conocen actualmente (Hawksworth 2004)., teniendo conocimiento de un estimado de 20.000 metabolitos bioactivos de origen microbiano (Berdy, 2005). Los hongos son de gran importancia, son organismos eucariotas, mismos que proveen una gran cantidad de metabolitos secundarios para la elaboración y producción de fármacos semi-sintéticos (Mitchell et al., 2008, Stadler y Keller, 2008). El descubrimiento de varios compuestos farmacológicos producidos a partir de diferentes hongos como: la penicilina (antibiótico de *Penicillium sp.*), la ciclosporina (inmunosupresor de *Tolypocladium inflatum* y *Lucidum Cyllindrocarpon*), el agente antifúngico griseofulvina de *Penicillium griseofulvum*, lovastatina inhibidor de la biosíntesis de colesterol del hongo *Aspergillus terreus* y los antibióticos beta-lactámicos de varios taxones de hongos, por esta razón estos organismos son de gran importancia para el desarrollo de nuevos fármacos (Selim et al; 2012).

El uso de los hongos es de gran importancia para el tratamiento de enfermedades tanto de personas como de animales. En el siglo XXI, existía un involucramiento industrial de al menos de 10 a 20 productos farmacológicos para el tratamiento de enfermedades. Dos estatinas contra el colesterol, la penicilina como antibiótico y el inmunosupresor ciclosporina se localiza dentro de los primeros diez, de cada uno de ellos se obtiene ventas de más de mil millones de pesos al año, por lo que los estudios para el descubrimiento de nuevos fármacos continúan. Los siguientes compuestos se han aprobado recientemente para uso humano: micafungina es un agente antifúngico; micofenolato se usa para prevenir el rechazo de tejidos; rosuvastatina es usada para reducir el colesterol y cefditoren como un antibiótico (Gazzero et al; 2012).

Suryanarayanan et al; (2009), reporta que los hongos producen muchos metabolitos secundarios de diferentes estructuras químicas y con actividad biológica de amplio espectro. Esto nos muestra la gran cantidad de producción de metabolitos en hongos (Suryanarayanan y Hawksworth, 2005). Se había informado de la existencia de 1,500 metabolitos fúngicos con actividad antitumoral y antibiótica (Peláez, 2005), algunos se han aprobado y utilizado como medicamentos, por mencionar algunos: la micafungina, un metabolito antifúngico de *Coleophoma empetri* (Frattarelli et al; 2004), micofenolato un producto de *Penicillium brevicompactum*, se utiliza para la prevención del rechazo de trasplante renal (Curran y Keating, 2005), rosuvastatina de *Penicillium citrinum* y *P. brevicompactum*, que se utiliza para tratar las dislipidemias (Scott et al; 2004) y pivoxilo cefditoren, un antibiótico de amplio espectro derivado de *Cephalosporium sp.* (Darkes y Plosker, 2002). Otros incluyen derivados de la fumagilina, un antibiótico producido por *Aspergillus fumiga* (Chun et al; 2005) e iludina-S, un sesquiterpenoides de *Illudens Omphalotus* (McMorris et al; 1996) que exhibe actividad anti-cancerosa.

Pocos son los científicos que han realizado estudios para la aplicación de pruebas biológicas, como es la capacidad de producción de medicamentos además del control biológico. Esto muestra que son pocos los estudios realizados para encontrar más compuestos de importancia biológica. Los hongos de más interés han sido los del suelo, siendo los géneros *Acremonium*,

Aspergillus, *Fusarium* y *Penicillium* mismos que han demostrado su capacidad para la producción de metabolitos con actividad de compuestos bioactivos. Más del 30% de los metabolitos aislados son de *Aspergillus* y *Penicillium* (Berdy 2005). Los hongos generalmente son obtenidos del mismo nicho ecológico utilizando los mismos métodos de aislamiento, de manera que las cepas de los hongos fueron re-aislados y esto llevó al re-descubrimiento debido a que estos organismos producen el mismo tipo de metabolitos.

2.5 Uso medicinal de los hongos

La utilización de los hongos por el hombre para el tratamiento de enfermedades, se remonta a los primeros tiempos de la antigüedad. Existen datos sobre el uso de los hongos para curar heridas infectadas hace más de 4,500 años. En América, Incas, Mayas y Aztecas conocían bien los secretos farmacológicos de las setas, empleadas en todo tipo de prácticas, dentro de la medicina tradicional y también en la brujería. Algunos de esos rituales han llegado hasta nosotros a través chamanes como María Sabina, algunos hechiceros siguen practicando la tradición de los aztecas en el uso de los hongos alucinógenos con fines paganos o simplemente lúdicos (Schultes y Hofmann, 1979).

En Europa existen datos sobre el uso de ciertos hongos, como el cornezuelo, trufa, etc., utilizados como medicina desde hace miles de años. Un ejemplo de ello ha sido el hallazgo reciente de una momia congelada en el glaciar de los Alpes, entre Austria e Italia, que presentaba excelentes condiciones de conservación, con una antigüedad aproximadamente de 5,300 años. Junto el cadáver había un bolsa de cuero que contenían varios hongos: “yesca común” (*Fomes fomentarius*), “yesca del abedul” (*Piptoporus betulinus*) y “Cornuzuelo” (*Claviceps purpurea*), entre otros. Los dos primeros con propiedades terapéuticas para el tratamiento de infecciones broncopulmonares, el cornezuelo con una inmensa gama de actividades, debido a la presencia de más de 50 alcaloides en su composición, se le puede considerar como provitamina D; antihistamínicos, vasodilatadores de acción eficaz en los preámbulos del parto (ergotamina, ergobasina) y alucinógeno, así como otros tóxicos (ergotóxina), que produce vaso constricción periférica y puede provocar

dos procesos patológicos graves; uno gangrenoso, con pérdida de las extremidades por falta de irrigación sanguínea, enfermedad que se conoce como “ergotismo gangrenoso” y otro que se manifiesta como un cuadro nervioso, con ataques epilépticos, que acaban matando al paciente con mayor rapidez que el primer caso, se le conoce como “ergotismo convulsivo” (Wainwright, 2008).

Existen hongos que han marcado un antes y un después en el transcurso de la humanidad. Uno es el *Ganoderma lucidum*, conocido en China y Japón con los nombres populares de “Ling zhi” y “Reishi”, respectivamente; en estos dos países se viene empleando en la medicina tradicional desde hace más de 4,000 años (Wachtel-Galor et al; 2011).

En México, se han utilizado los hongos en rituales, además como hongos comestibles y medicinales para curar enfermedades. Se han utilizado 70 especies de hongos en prácticas de medicina tradicional para el tratamiento de 40 tipos de enfermedades en humanos, tales como antiinflamatorios, para el mejoramiento de la vista, tratamiento respiratorio, infecciones gastrointestinales, dolores de cabeza, tratamiento de lumbalgia y esquelalgia, entumecimiento de miembros, tonificante del estómago, tratamiento de bronquitis, tratamiento de la hepatopatía, etc. (Guzmán, 2008).

2.6 *Sclerotium rolfsii* Sacc

Es un hongo fitopatógeno, habitante del suelo, con un amplio rango de hospedadores, concretamente alrededor de 500, en los que causa podredumbre de raíz y tallo. La enfermedad que produce recibe muchas denominaciones diferentes en la literatura: pudrición basal de tallo y raíz, mal del esclerocio, añublo sureño o tizón sureño, son algunas de ellas. Algunos de los cultivos que se ven afectados por este patógeno son: frijol, jitomate, manzano, remolacha, girasol y fresa.

Tiene una amplia distribución en el mundo, pero es más frecuente en regiones tropicales y subtropicales. Le favorecen los climas calurosos y suelos fundamentalmente ácidos. Se ha descrito que en Europa central y sur, puede ser en determinadas condiciones muy destructivo (Smith, 1992); en España se ha descrito en cultivos de tomate (Tello y del Moral, 1995) y en Austria se ha

detectado causando daños en cultivos de cierto tipo de frijol (González et al., 2004).

Este hongo puede sobrevivir como micelio en los tejidos infectados o en desechos de plantas. Persiste como esclerocio y se disemina por prácticas culturales (suelos infectados o herramientas contaminadas), plántulas infestadas, aguas de irrigación, viento y posiblemente semillas. El patógeno penetra el tejido y produce una masa considerable de micelio en la superficie de la planta, este proceso dura aproximadamente de 2 a 10 días.

El pH es importante en la inducción de la formación de esclerosis. *S. rolfsii* Sacc es capaz de sobrevivir dentro de un amplio rango de condiciones ambientales. El micelio puede crecer a pH de 3 a 5 y la germinación de los esclerocios ocurre entre 2 a 5 °C. La germinación es inhibida a pH por encima de 7. El máximo crecimiento micelial ocurre entre 25 y 35°C. Se requiere una humedad muy alta para el crecimiento del hongo, el cual produce abundantes esclerocios redondeados de color canela a marrón-rojizo o marrón oscuro de un tamaño semejante al de las semillas de mostaza. Los esclerocios están unidos al micelio en la superficie de la planta (Punja, 1985).

2.7 Metabolitos secundarios con actividad farmacológica

Los principios activos, son sustancias químicas que son sintetizadas por plantas, algas, helechos, hongos etc., tienen la capacidad de una vez ingresadas en el metabolismo de un organismo, modificar el funcionamiento bioquímico de células, tejidos y órganos. El desarrollo de la farmacología ha permitido conocer una gran variedad de compuestos que se clasifican como principios activos, los cuales se han agrupado en ciertos grupos, tales como alcaloides, antraquinonas, cumarinas, flavonoides, terpenos, etc. (Pengelly, 1996); algunos se describen a continuación:

2.7.1 Alcaloides

Los alcaloides deriva de los vocablos *alkali* y *eidos*, cuyo significado literal es semejante a un *álcali*, esta palabra fue utilizada por primera vez por W. Meissner para designar a algunos compuestos presentes en sustancias naturales que reaccionan químicamente como bases.

Desde el punto de vista químico, son compuestos nitrogenados, en los que el nitrógeno forma parte de un heterociclo. Además están constituidos por carbono e hidrógeno, algunos llevan oxígeno y raramente azufre. En la naturaleza se encuentran combinados con ácidos minerales o ácidos orgánicos, dando lugar a los correspondientes citratos, malatos, benzoatos o tartratos y a compuestos más específicos como meconatos o aconitatos., en ocasiones se combinan también con taninos.

Los alcaloides derivan de los aminoácidos, lo que permite clasificarlos en: alcaloides derivados de la ornitina y lisina, alcaloides derivados de la tirosina y fenilalanina, alcaloides derivados del triptófano, alcaloides derivados del ácido nicotínico y alcaloides derivados de la histidina.

Los alcaloides suelen presentar actividad farmacológica muy intensa a dosis bajas, con gran variedad de actividades farmacológicas. Algunos son especialmente tóxicos, como la aconitina del acónito (*Aconitum napellus*), la coníina de la cicuta (*Conium maculatum* L), los alcaloides hepatotóxicos del senecio (*Senecio spp*) y la nicotina, el alcaloide principal del tabaco que tiene una actividad muy tóxica, a unos 50 mg puede producir la muerte de un hombre por parálisis respiratoria. Otros se usan como medicamentos, como la teobromina, cafeína, anfetamina, atropina, codeína, colchicina, efedrina, teofilina, morfina, etc. (Primo; 2007).

2.7.2 Antraquinonas

Las antraquinonas se localizan principalmente en vegetales superiores, existen ejemplos de compuestos provenientes de insectos y microorganismos. También se han aislado derivados reducidos de antraquinonas como antronas y antralones. El ácido acético es un precursor biogenético casi exclusivo de estos compuestos.

Las quinonas constituyen un grupo importante de pigmentos vegetales y animales. El ejemplo más antiguo es la alizarina proveniente de *Rubia tinctorum*, una antraquinona usada desde hace más de 2,000 años para teñir telas (Lorenzo et al; 2008).

Las antraquinonas altamente oxigenadas se encuentran en los insectos. Dos ejemplo son el ácido cármico y el ácido kermésico, provenientes de *Dactylopius*

y *Kermococcus illicis*, respectivamente son utilizados comercialmente en preparaciones cosméticas, en la industria alimentaria y textil.

Las fuentes más abundantes para los dímeros de las antraquinonas son los hongos del género *Penicillium*, algunas se encuentran relacionadas con los líquenes, pero son poco frecuentes en vegetales superiores, por ejemplo en vegetales superiores se tiene los sennósidos A y B (estereoisómeros en C10 y C10) que son los principales laxantes de la hoja del sen (*Cassia angustifolia*, leguminosas) (Luis et al; 2009). Algunas antraquinonas con actividad farmacológica son: emodina, crisofanol, fisción, aloé-emodina, reína, ácido emódico (Ringuelet y Viña, 2013).

2.7.3 Taninos

Estos compuestos son abundantes realmente en ciertas variedades pigmentadas de cereales, legumbre, frutas y bebidas (té, cacao o vino tinto). Se caracterizan por otorgar al alimento un sabor amargo además de tener una protección a la planta del ataque microbiano y fúngico. Los taninos pueden tener un papel protector impidiendo la absorción de metales pesados, en los últimos años se han destacado los efectos benéficos para la salud por la actividad antioxidante, ya que previenen enfermedades cardiovasculares y se consideran anticancerígenos (Rebolo, 2007).

Los taninos se pueden clasificar según su naturaleza de las moléculas elementales: taninos hidrolizables (gálicos), comprenden a los galotaninos y a los alagitaninos, liberando por hidrólisis ácida respectivamente ácido gálico y ácido elágico, ambos contienen una molécula de glucosa. Los más abundantes pertenecen a los elagitaninos, donde destacan la vescalagina y la catalagina que al hidrolizarse se transforman respectivamente en vescalina y castalina.

Los taninos condensados, son polímero más o menos complejos de flavan-3-oles o 3-flavonoles, también llamados catequinas. Estas sustancias se localizan principalmente en las semillas, aunque se han detectado también trazas de monómeros y dímeros en la pulpa de algunos frutos (Rebolo, 2007). Existen varios taninos con actividad farmacológica como el galato de epigallocatequina (EGCG), (-) - galato de epicatequina (ECG), corilagin, geraniin, etc.

2.7.4 Cumarinas

Las cumarinas son productos naturales que poseen una estructura idéntica, pertenecen al grupo de compuestos conocidos como benzopironas, constituidas por un anillo bencénico unido a una pirona (un anillo heterocíclico de seis miembros que contienen un átomo de oxígeno y cinco de carbono). El derivado de la cumerina (7-HC es una sustancia cristalina sólida blanco-amarilla que tiene baja solubilidad en agua pero alta solubilidad en etanol). Esta cumerina y otros compuestos relacionados presentan actividades biológicas de importancia terapéutica entre los que destaca la capacidad de reducir el tamaño de los tumores por lo que se usan como fármacos anticancerígeno. Las acciones biológicas y clínicas de las cumarinas y de la 7-HC aparecen ampliamente descritas en la bibliografía (O' Kennedy y Thornes, 1997).

Las lactonas aromáticas, metabolitos característicos (C₆C₃), cuya biosíntesis suele producirse a partir de ácidos cinámicos, generalmente del ácido p-hidroxicinámico. Se pueden clasificar en tres grupos: hidroxycumarinas, furanocumarinas y piranocumarinas.

Las hidroxycumarinas, como la umbeliferona y sus correspondientes eterósidos, se encuentran en plantas superiores, aproximadamente en 100 familias, las faracumarinas y las piracumarinas aparecen generalmente en frutos y raíces de dos familias, *Umbeliferae* y *Rutaceae*. Las faracumarinas (con anillo furano) son biológicamente más activas que las hidroxycumarinas, sin embargo en algunos casos son alergénicas.

Algunas furanocumarinas lineales (psoralenos) se utilizan como protección a los rayos UV, en el tratamiento de alteraciones como vitiligo; las presentes en *Umbeliferae* y *Compositae* han sido citadas como antifúngicos (Ojala, 2001).

2.7.5 Saponinas

Las saponinas son un grupo de glucósidos amorfos coloidales hidrosolubles que producen espuma cuando se agita en solución acuosa, son excelentes agentes emulsionantes y las soluciones acuosas de algunos de ellos, por ejemplo de la corteza de la *Quillaja saponaria*, se usaron antes como detergentes en reemplazo del jabón. Muchos de estos glúcidos tienen la fórmula general C₈H₂₄O₁₀.

Las agluconas se suelen preparar por hidrólisis catalizada por ácido y se denominan saponinas, se conocen bien dos tipos generales de éstas, a saber los esteroides, como la digitonina, provenientes del género *Dioscorea* y la hecogenina, la monogenina y la gitogina de especies de agave.

Muchas saponinas son tóxicas y se denominan sapotóxicas, por lo general ejercen una poderosa acción hemolítica sobre los eritrocitos; se han usado como veneno contra los peces (Remington, 2003).

2.7.6 Terpenos

Los terpenos se forman con moléculas de isopreno cuando estas se unen entre sí, produciendo cadenas y anillos de forma y tamaño variables. Por otra parte, desde el punto de vista funcional se trata de compuestos que tiene propiedades muy variables, hay algunos terpenos que son productos aromáticos de ciertas plantas, como el caso del pineno, componente del aguarrás, el mentol de la menta, etc; otros son vitaminas liposolubles A, E y K.

Los terpenos pueden encontrarse solos o formando glicósidos. Estos últimos son más frecuentes en triterpenos, aunque hay algunos ejemplos de glicósidos de terpenos de menor tamaño, como es el caso del 1-glucosilmircerol, aislado de *Tagete patula*, fuente comercial de B-carotenos y la paeoniflorina, un hemi-orto-éster de diez átomos de carbono, que se aísla como glucósido a partir de *Paeonia albiflora*, utilizada en la medicina tradicional japonesa como antialérgico, analgésico, antiespasmódico y sedante (Marcano y Hasegawa, 2002).

La unidad fundamental que define estos esqueletos contiene cinco átomos de carbono y se conoce como *isoprenos*. De manera general, los terpenos obedecen a lo que se conoce como regla de *isopreno*, es decir, la secuencia de los átomos que conforman un terpeno es tal que puede localizarse en varias unidades consecutivas de isopreno (Ringuelet y Viña, 2013).

2.7.7 Flavonoides

La estructura básica de los flavonoides consta de un esqueleto de 15 carbonos. La estructura más simple consta de 2 anillos fenólicos conectados entre sí por un puente de tres carbonos (compuestos C₆C₃C₆). Se encuentran

ampliamente distribuidos en los vegetales y son biosintetizados a partir del ácido shikímico y de la acetilcoenzima A vía malonilCoA.

El ácido shikímico y los compuestos relacionados (ácido corísmico y otros) sirven de precursores de una serie de ácidos benzoicos hidroxilados y aaminados. En el mayor de los casos los compuestos aromáticos derivados del ácido shikímico se forman por diseminación de aminoácidos aromáticos (fenilalanina y triptófano), suelen ser compuestos bencénicos con una cadena de 3 átomos de carbono (fenilpropanoides, C_6C_3).

Los flavonoides son el grupo mayoritario dentro de los compuestos fenólicos presentes en las plantas, se pueden clasificar en 5 grupos diferentes: antocianinas (pigmentos), flavonoides menores (que incluyen flavononas, dihidroflavonoles y dihidrochalconas), flavonas, isoflavonoides y taninos condensados (Martínez-Flórez et al; 2002). Algunos como la genisteina, quercetina, apigenina, coumestrol, naringina, etc., tienen actividad farmacológica.

2.8 Métodos para la caracterización química de los hongos

2.8.1. Cromatografía

2.8.1.1 Cromatografía de capa fina (TLC)

Es una de las cromatografías más ampliamente utilizadas por su facilidad, rapidez y bajo costo. Para su desarrollo se emplea una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. La fase estacionaria normalmente se encuentra adherida a una superficie sólida, pudiendo ser esta última sílica gel, alúmina u otros polímeros sintéticos (por ejemplo C18). La fase móvil normalmente es un solvente o una mezcla de los mismos. La muestra es colocada cerca de un extremo de la placa recubierta con la fase estacionaria, la placa es colocada de forma vertical en una cámara donde en la parte inferior se encuentra la fase móvil, esta última comienza su movimiento por la fase estacionaria debido al proceso de capilaridad, el movimiento de la fase móvil permite el desplazamiento de los analitos por la fase estacionaria, la interacción química de cada uno de los analitos con la fase estacionaria, permite la separación de los compuestos químicos presentes en la muestra.

Este tipo de cromatografía se utiliza para determinar la pureza de un compuesto, comparar muestras, prueba inicial de cromatografía e incluso en análisis clínico o detección de drogas (Sharapin y Pinzón, 2000; Walton y Reyes, 2005).

2.8.1.2 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

La cromatografía de alta resolución es una técnica ampliamente extendida en los laboratorios de análisis químico. Se ha convertido en una herramienta de uso cotidiano debido a su versatilidad, sencillez y alta resolución. La mezcla a resolver se inyecta en un sistema donde un solvente o una mezcla de solventes la arrastran a través de un sólido o de un líquido que recubre a un sólido. El solvente en el cual se disuelve la muestra recibe el nombre de fase móvil y el sólido es nombrado fase estacionaria. La interacción de los componentes químicos de la mezcla con la fase móvil y la fase estacionaria permite que se separen y eluyan a distintos tiempos. La fase estacionaria normalmente esta empaqueta en una columna de longitud y diámetro variable, dichas características están íntimamente relacionadas con la capacidad de separación de los componentes de una mezcla, misma función presenta la composición de la fase móvil (Hernández, 2005).

2.8.1.3 Cromatografía gases

Esta técnica se utiliza para separar diferentes compuestos volátiles de una muestra. En la fase móvil se usa un gas inerte (nitrógeno o helio) mismo que transporta la muestra volatilizada a la columna de cromatografía. La fase estacionaria por lo general está compuesta por una columna de metil polixilosano o sus derivados. Los compuestos se separan según el grado de velocidad (punto de ebullición, peso molecular) y la afinidad por la fase estacionaria. Uno de los detectores más utilizados es el detector "FID" que por su alta velocidad, es usado para la determinación de compuesto.

En esta técnica los analitos se mueven por el flujo de una fase móvil de gas inerte. Los analitos de cromatografía de gases, deben tener puntos menores de ebullición a 350°C y no descomponerse por debajo de esta temperatura; estas muestras pueden ser gases, líquido o sólidos (los últimos deben ser

vaporados). Los compuestos extraídos de las plantas y hongos pueden ser complejos, requiere métodos de separación de alta resolución, como lo es la cromatografía de gases (McNair y Miller, 1998; Schreir, 1984).

Para la identificación de los diferentes compuestos, se emplean los índices de retención de Kovats, los cuales son utilizados para determinar compuestos, comparándolos con los tiempos de retención de n-alcanos, analizados bajo las mismas condiciones operacionales (Rubinson, 2000).

2.8.2 Espectrofotometría

2.8.2.1 Espectrofotometría uv-visible

La absorción de radiación uv o visible proviene de la excitación de los electrones enlazantes y como consecuencia, las longitudes de onda de los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlace que existen en las especies en estudio. Esta técnica se fundamenta en la intensidad de la luz, donde la intensidad inicial (I_{in}) incide en la muestra y absorbe una parte de la luz, mientras que la diferencia de luz pasa por el capilar con menos intensidad (I_{out}), misma que es detectada por el fotodetector. Con este método es posible determinar varios compuestos y grupos funcionales en una muestra. Esta técnica generalmente utiliza una columna, esta permite el paso de la luz blanca producida por la lámpara de deuterio, misma que se envía a un monocromador que selecciona la longitud de onda para producir una luz que atraviesa el capilar de un punto de separación. La luz que atraviesa el capilar es recogida por el fotodiodo.

El principio de detección en fotometría uv/visible es la ley de Lambert-Beer, donde A, la absorbancia viene dada por:

$$A = \log 1/T = abC$$

Donde:

a= absortividad

b= longitud de pazo de luz

C= concentración de soluto

En la uv/visible directa, se trabaja en longitudes de onda entre 190 y 800 nm. La parte de uv comprende desde 190 a 350 nm mientras que la visible desde

350 hasta 800 nm, aunque la mayoría absorben desde 190 nm, pero esta técnica depende del tipo de muestra a analizar, ya que debe de tener la presencia de algún grupo cromóforo (es un grupo responsable de la absorción de luz por una molécula).

En la uv/visible indirecta, es un método muy empleado en la electroforesis capilar, permite analizar varios compuestos, como iones inorgánicos y orgánicos, que no poseen grupos cromóforo en su molécula y absorben poca luz (Cruces, 1998).

2.8.3 Espectrometría

2.8.3.1 Espectrometría de masas

Este método nos permite estudiar compuestos de naturaleza diversa: orgánica, inorgánica o biológica (incluyendo biopolímeros y macromoléculas naturales o artificiales), además nos permite obtener información cualitativa y cuantitativa. Mediante la interpretación de la espectrometría de masas es posible encontrar información de la masa molecular del compuesto de interés o por el contrario solamente encontrar la existencia de dicho compuesto. Por medio de la separación cromatográfica (HPLC, GC) los componentes de la muestra son separados, posteriormente los componentes son ionizados, los iones se separan en función de su masa/carga (m/z) mediante aplicación de campos eléctricos magnéticos y por último detectados. El detector produce una señal eléctrica y la manda a una computadora. El registro se denomina registro de masas de compuestos iónicos en función de su masa/carga (Chang, 2010; Harvey, 2002).

2.8.4 Espectroscopia

2.8.4.1 Resonancia magnética nuclear

Es una técnica espectroscópica no destructiva, ampliamente utilizada para elucidar estructuras químicas y conocer los compuestos presentes en una muestra determinada. Su éxito dentro del análisis químico se debe a la simplicidad de la preparación de la muestra, el procedimiento de medida, la estabilidad instrumental y la facilidad para la interpretación de los datos. Esta técnica estudia el comportamiento de algunos núcleos atómicos presentes en

un campo magnético externo. En el momento del desdoblamiento de los niveles energía nuclear producida por el campo magnético aplicado, a partir de aquí ocurre la absorción de una radiación electromagnética adecuada. La propiedad de energía de las moléculas como el entorno electrónico y las interacciones entre ambos, de esta forma la intensidad forma señales en el espectro relacionadas con la estructura molecular, esta técnica proporciona valiosa información acerca de la estructura del compuesto que lo origina (Joshi, 2012). Sus aplicaciones en la actualidad abarcan desde la ingeniería de materiales, farmacología, bioquímica, ecología y la ciencia de los alimentos.

2.8.4.2 Espectroscopia de infrarrojo (IR)

La espectroscopia de absorción de infrarrojo se basa en el comportamiento de las vibraciones de los átomos en las moléculas, consiste en un espectro de absorción que pasa por varios niveles de vibración. Las moléculas poliatómicas tienen un grado de libertad de vibración, el espectro de infrarrojo puede presentar algunas bandas de absorción, cada banda corresponde a una frecuencia específica. Para lograr la absorción de la vibración se debe hacer un cambio en el momento dipolar de la molécula. De esta forma el infrarrojo detectará las ondas cuanto mayor sea el cambio en el momento dipolar de las moléculas. La importancia radica en que los grupos funcionales tienen cierto grado de individualidad en las moléculas y se ven afectados por las vibraciones, dichas vibraciones exponen a los compuestos.

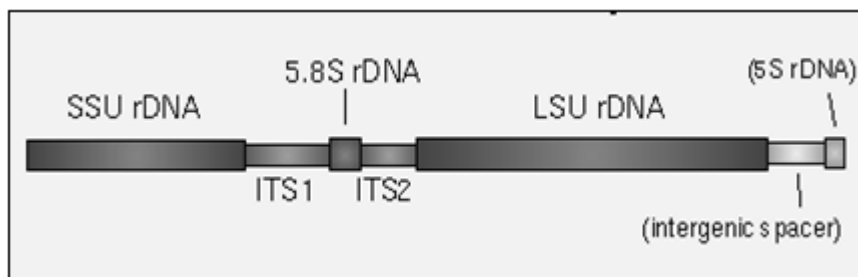
$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

En la siguiente formula, la letra K es la constante de fuerza de enlace y μ la masa reducida del sistema. Esta última determina que los grupos funcionales están localizados en diferentes frecuencias de vibración, mismas que se van asociando a las bandas del espectro de infrarrojo (Stuart, 2004).

2.9 Identificación de los hongos

La identificación de los hongos se puede realizar de varias formas, la más sencilla es la comparación con ilustraciones de manuales o libros donde se aborda la descripción de los distintos grupos de hongos. Un nivel más

avanzado en la identificación es el empleo de la microscopía, en el que se analiza la estructura y forma de la espora y el micelio. Una forma de reforzar la identificación de los hongos es realizando pruebas bioquímicas, como el crecimiento del hongo en ciertos medios de cultivo, la producción de micotoxinas o la producción de ciertas enzimas. Una forma más rápida, sencilla y eficaz de identificación de los hongos es el empleo de marcadores moleculares de ADN. Esta técnica hace uso de la reacción en cadena de la ADN polimerasa para amplificar ciertas regiones del genoma del hongo. Los principales marcadores moleculares de ADN empleados en la identificación de hongos son el gen 28S ADNr (subunidad mayor del ribosoma –LSU), 18S ADNr (subunidad menor del ribosoma –SSU) y los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) (figura 5). Los fragmentos obtenidos de la amplificación del ADN de cada uno de los marcadores difiere en tamaño, para el caso del marcador de ADN LSU, el fragmento amplificado tiene un tamaño aproximado de 900 pb; mientras que el marcador SSU proporciona fragmentos de 600 pb y el ITS2 que es uno de los marcadores más empleados genera fragmentos de aproximadamente 400 pb. En la bibliografía se describen varios juegos de primers para amplificar los distintos marcadores antes mencionados (Tarqui, 2011).



Fuente: http://www.melkonian.unikoeln.de/research_phylogeny_about.htm (29-07-2015)

Figura 5. Arreglo de los genes ribosomales en el genoma nuclear de los hongos. Normalmente los genes están dispuestos en repeticiones en tándem¹ en el ADN genómico de los hongos, este esquema representa una unidad de repetición. SSU rDNA corresponde al gen 18S, LSU rDNA corresponde al gen 28S e ITS corresponde a los espaciadores de los transcritos ribosomales.

¹ Repetición en tándem. Algunos genes forman enormes agrupamientos que tiene numerosas copias adyacentes (Lewin, 1994).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente en nuestra sociedad estamos observando el incremento de un número considerable de padecimientos que afectan de manera importante a nuestra población, entre estos padecimientos se encuentra el cáncer, la diabetes, la hipertensión, obesidad y enfermedades cardíacas (Córdova-Villalobos et al; 2008). Aunque existen fármacos para controlar estos padecimientos, no funcionan para todas las personas, esto debido a las variantes genéticas y metabólicas presentes en cada uno de los individuos, aunado a lo anterior, sabemos que cualquier fármaco que utilicemos tendrá repercusiones secundarias hacia nuestro organismo (Oliva y Taboada, 2006). Por lo que desde hace muchos años se ha tratado de buscar nuevas moléculas terapéuticas que tengan una mayor eficacia en los tratamientos y un bajo efecto secundario, inicialmente esta búsqueda comenzó en las plantas, lo que ha permitido obtener una cantidad considerable de fármacos provenientes del conocimiento de las plantas medicinales. El empleo de los hongos como organismos portadores de compuestos bioactivos es muy reciente, sin embargo, los estudios se han centrado en un grupo reducido de estos organismos, los cuales de cierta manera ya están caracterizados química y farmacológicamente, por lo que es inevitable la búsqueda de compuestos con actividad terapéutica en otros hongos no catalogados como medicinales, siendo este el caso del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc.

4. JUSTIFICACIÓN

Se ha calculado que los hongos son de los grupos de organismos más numerosos en el planeta. Se estima que hay más de 1,600,000 especies, por lo que su impacto en el ambiente es de gran importancia. En México se ha determinado que tenemos más de 200,000 especies, de la cuales se tiene registro de apenas unas 4,500 de macrohongos y 2,500 de microhongos, lo que representa el 3.2%. Se tienen registro que dentro de los microhongos 1,500 son fitopatógenos, mientras que en el mundo se conocen alrededor de 8,000 especies (Aguirre-Acosta et al; 2014).

Actualmente diversos reportes han demostrado que los hongos sintetizan diversos metabolitos primarios y secundarios, los cuales presentan actividad

terapéutica, tales como polisacáridos, heteroglicanos, proteoglicanos, polisacaropéptidos, glicoproteínas, terpenos, lectinas, antibióticos, etc., (Wasser, 2011). Para el caso de México el número de documentos especializados sobre farmacología de hongos medicinales reportados es limitado, lo que demuestra la poca exploración de estos organismos.

Los hongos fitopatógenos han sido estudiados ampliamente en cuanto a las formas de infección de los cultivos, pero poco se ha estudiado de los metabolitos que producen y que pudieran tener efecto terapéutico. En los pocos reportes sobre el potencial biomédico de los hongos fitopatógenos, se ha encontrado que cepas de *Fusarium sp.* y *Sclerotium rolfsii* Sacc son capaces de producir sustancias con actividad antimicrobiana. Por lo que creemos que es altamente probable que la cepa de *Sclerotium rolfsii* Sacc empleada en este estudio puede biosintetizar una cantidad importante de metabolitos con actividad farmacológica.

5.- OBJETIVOS

5.1 General

Caracterizar de forma química y farmacológica el hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc cultivado en dos distintos medios de cultivo.

5.2 Particulares

- a. Estimar el crecimiento en medio de cultivo sólido agar-dextrosa-papa (PDA) del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc.
- b. Identificar mediante métodos moleculares de ADN el hongo estudiado.
- c. Estandarizar las condiciones de cultivo líquido para el hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc.
- d. Extraer y caracterizar químicamente los metabolitos a partir del micelio y el medio de cultivo del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc, por medio de técnicas espectrofotométricas y de cromatografía de capa fina.
- e. Determinar el potencial farmacológico *in vitro* del medio de cultivo y del micelio (extracto de etanol, acetona y acetato de etilo) del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc.
- f. Evaluar la toxicidad *in vitro* en *Artemia salina* de los extractos etanólicos y de los caldos de cultivo del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc.

6. METODOLOGÍA

6.1 Diseño experimental

La investigación se diseñó en tres etapas, en la primera se cultivó el hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc en medio papa-dextrosa-agar (PDA) para la obtención de su ADN y la posterior identificación molecular del hongo. Las otras dos etapas consistieron en cultivar a *Sclerotium rolfsii* Sacc en dos medios de cultivo líquido distintos, en medio papa-dextrosa y en extracto de malta, esto con el objetivo de poder comparar si existían diferencias en el perfil de metabolitos sintetizados y en el potencial farmacológico (figura 6).

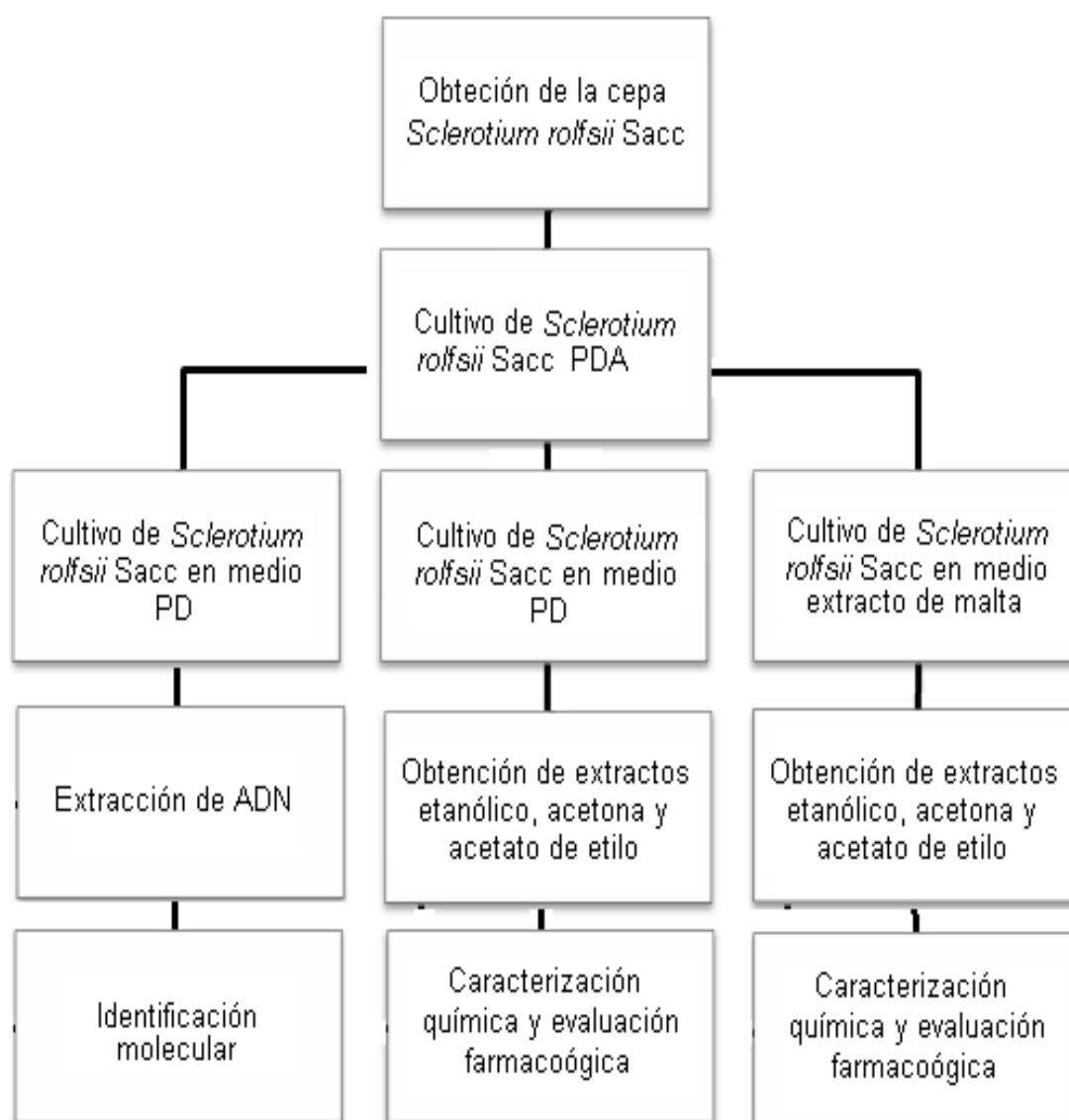


Figura 6. Diseño experimental de la investigación.

6.2 Obtención del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc

La cepa del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc empleada en el presente estudio fue proporcionada por el Dr. Marcelo Acosta Ramos del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH).

6.3 Cultivo del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc

6.3.1 Medio sólido papa-dextrosa-agar (PDA)

Para el cultivo de la cepa del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc en medio PDA, se pesaron 3.9 g de medio de cultivo para preparar 100 mL, se esterilizó a 121 °C en la autoclave vertical Yamato® durante 15 minutos. Posteriormente se colocó a cada caja de Petri 30 mL de medio de cultivo. Cada una de las cajas fueron inoculadas con micelio del hongo y puestas en una incubadora Felisa® durante 1 semana a una temperatura de 25 °C. Durante 3 días se monitoreó el crecimiento de *Sclerotium rolfsii* Sacc para conocer su tasa de crecimiento en medio PDA.

6.3.2 Medio líquido papa-dextrosa (PD)

Se preparó 9 L de medio de cultivo papa-dextrosa, para ello se pesaron 1,800 g de papas peladas y troceadas, se colocaron en 500 ml de agua destilada y fueron calentadas hasta ebullición en una parrilla de calentamiento Thermo scientific® durante 20 minutos. Posteriormente, se tomó la fracción líquida y se le agregó 90 g de dextrosa, se ajustó el pH a 3 con HCl al 10%. Se vertieron 1,000 ml de medio de cultivo a cada uno de los reactores, mismos que tienen una capacidad de 3.78 L de volumen total. Los reactores con el medio de cultivo fueron esterilizados en la autoclave Yamato® durante 15 minutos a 121 °C. Cada uno de los reactores fue inoculado con una caja de micelio de *Sclerotium rolfsii* Sacc de 100x15 mm e incubados a temperatura ambiente durante 1 mes, cada reactor fue oxigenado dos veces al día durante 1 h.

6.3.3 Medio líquido de extracto de malta

Se elaboró 9 L de medio de cultivo de extracto de malta, para ello se pesó 270 g de extracto de malta y 180 g de sacarosa comercial, disolviéndolos en agua destilada con agitación. A continuación, se ajustó el pH a 3 con HCl al 10%.

Enseguida los 9 L de medio de cultivo se repartieron en 9 reactores, cada reactor fue esterilizado en una autoclave Yamato® durante 15 minutos a 121°C. Cada uno de los reactores fue inoculado con una caja de micelio de *Sclerotium rolfsii* Sacc de 100x15 mm, posteriormente, fueron incubados a temperatura ambiente durante 1 mes, oxigenando cada uno de los reactores dos veces al día durante 1 h.

6.4 Obtención de los extractos del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc

Se prepararon los extractos del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc en diferentes solventes: acetona, acetato de etilo y etanol. Se obtuvo 488 g de micelio húmedo del hongo proveniente de tres reactores. El micelio se separó del caldo de cultivo por filtración, después fue molido en presencia de 350 ml de cada uno de los solventes mencionados, a continuación se dejó en reposo durante 15 días a temperatura ambiente. Lo mismo se realizó con el micelio cultivado en el extracto de malta.

Después de transcurrido el tiempo de maceración, el extracto fue filtrado, recuperando la parte líquida concerniente al solvente con los metabolitos arrastrados del micelio. Enseguida, el filtrado fue colocado en un rotovapor R3 Buchi® a presión reducida para separar el solvente de los metabolitos provenientes del micelio. Estos últimos fueron utilizados para realizar las pruebas químicas e identificar la presencia de: antraquinonas, alcaloides, taninos, saponinas y cumarinas volátiles; además, se evaluó la cantidad de flavonoides totales, fenoles totales, capacidad antioxidante (DPPH) y toxicidad *in vitro* en el modelo de *Artemia salina*.

6.5 Extracción de ADN del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc

Se molió en una licuadora 10 g de micelio húmedo del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc cultivado en medio líquido papa dextrosa, después se tomó 1 ml de suspensión de micelio molido y fue colocado en un tubo estéril de microcentrifuga de 2 ml, posteriormente se centrifugó a 5,000 rpm durante 1 minuto. A continuación, se adicionó con una pipeta 1 ml buffer de fosfatos salinos (PBS), se mezcló y centrifugó de nuevo a 5,000 rpm durante un minuto,

se desechó el sobrenadante. Por último se agregaron 350 µL de buffer PBS en el tubo de microcentrífuga y se homogenizó con el vortex.

Para la extracción de ADN se empleó el kit AxyPrep Multisource Genomic de la marca Axygen® (cat AP-MN- MS-GDNA-50), se siguió el protocolo establecido del proveedor.

Al micelio homogenizado se le agregó 0.9 µL de Rnasa, mezclando con el vortex durante 30 s. Enseguida se adicionó 20 µL de proteinasa K y 150 µL de buffer CL, nuevamente se homogenizó durante 1 minuto con el vortex. A continuación, se incubó en el termoblock a 56 °C por 10 minutos.

Al término de la incubación, se añadieron 350 µL de buffer PD y se mezcló durante 30 s con el vortex. Posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 12,000 x g, el sobrenadante fue colocado en una columna de purificación. Enseguida, se centrifugó de nuevo durante 1 minuto a 12,000 x g, desechando el filtrado. Luego se agregó 500 µL de buffer W1 a la columna, centrifugando nuevamente la columna bajo las condiciones antes mencionadas. El filtrado fue desechado.

A continuación, se realizó un segundo lavado de la columna de purificación, se adicionó 700 µL de buffer W2, se centrifugó 1 minuto a 12,000 x g y se eliminó el filtrado. Este paso se repitió dos veces. Posteriormente, la columna sola fue centrifugada durante 1 minuto a 12,000 x g para eliminar los residuos del buffer de lavado.

Por último, la columna de purificación fue pasada a un tubo de 1.5 ml estéril, enseguida se le aplicó 120 µL del buffer de elución, dejando incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Después se centrifugó durante 1 minuto a 12,000 x g, el filtrado contenía el ADN, el cual se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

6.6 Amplificación de subunidad mayor del ribosoma (LSU) por la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)

Para la amplificación del marcador de ADN LSU del hongo *Sclerotium rolfssii* Sacc se realizó una dilución de 1/100 del ADN extraído para elaborar una reacción de 50 µl de volumen final. Para la amplificación del fragmento de LSU se emplearon los primer LSU-F: 5´-acc cgc tga act taa gc-3´ y LSU-R: 5´-tcc tga

ggg aaa ctt cg-3' junto con otros reactivos (ver tabla 1), bajo las condiciones de temperatura y tiempo del termociclador MaxyGene II® que se muestran a continuación (ver tabla 2).

Tabla 1. Reacción de PCR para la amplificación del fragmento del marcador de ADNr LSU o 28S.

Reactivos	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Control -
dH ₂ O	40.7 µl	41.7 µl
Buffer de enzima 10X	5 µl	5µl
dNTPs (10mM)	1 µl	1µl
Primer LSU-F (10 µM)	1 µl	1µl
Primer LSU-R (10 µM)	1 µl	1µl
ADN (Dilución 1/100)	1 µl	----
Enzima <i>Vent pol.</i> (5u/µl)	0.3 µl	0.3µl

Tabla 2. Condiciones de corrida para la amplificación del marcador molecular LSU en el termociclador MaxyGen II®.

Etapas	Temperatura °C	Tiempo.
Desnaturalización inicial	95°C	3 min.
Desnaturalización	95°C	30 seg.
Hibridación	56°C	45 seg.
Polimerización	72°C	60 seg.
Polimerización final	72°C	5 min.
Almacenamiento	18°C	Indeterminado

30
ciclos

El producto obtenido de la amplificación del marcador molecular LSU fue corrido en un gel de agarosa al 1% (p/v) con Gelred^{MR} y visualizado en un fotodocumentador MultiDoc de la marca UVP® para su comprobación.

6.7 Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización del ADN extraído y el obtenido del PCR se empleó la electroforesis en gel de agarosa. La concentración del gel de agarosa depende

del tamaño del fragmento de ADN que se requiere separar, como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 3.- Concentraciones de agarosa de acuerdo al tamaño del fragmento de ADN a separar.

Concentración de Agarosa (%p/v)	Tamaño de los fragmentos de ADN
0.3	5-60kpb
0.5	1-30kpb
0.7	0.8-12kpb
1.0	0.5-10kpb
1.2	0.4-7kpb
1.5	0.2-3kpb
2.0	0.05-2kpb

Fuente: Sierra-Palacios, 2005.

Los geles de agarosa elaborados fueron de 0.8% (p/v) para el análisis de ADN proveniente de las extracción del ADN genómico de *Sclerotium rolfsii* Sacc y 2.0 % (p/v) para el productos de PCR del marcador LSU amplificado (tabla 3).

De acuerdo a la concentración requerida del gel, se pesó la cantidad adecuada de agarosa y se colocó el volumen exacto de TAE 0.5X² en un matraz ErlenMeyer. Los componentes colocados en el matraz fueron calentados hasta punto de ebullición en un horno de microondas durante 1 minuto, posteriormente se recuperó el agua evaporada y se agregó 0.3 µL de una solución de Gelred (1µL del stock en 6 µL de agua) para la visualización del ADN.

Una vez que la solución de agarosa alcanzó los 45°C, fue vaciada en la cubeta de electroforesis Galileo bioscience®. Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente hasta que la agarosa se solidifico.

² TAE 0.5X: 2.42 g Tris base; 0.57 ml de ácido acético y 0.37 g de EDTA aforado con agua destilada a 1 L . pH 8.0.

Posteriormente las muestras de ADN fueron preparadas con la adición de 8 μ l de ADN y 4 μ l de buffer de carga 6X³. Cada muestra fue colocada en un pocillo del gel de agarosa como se muestra en la (figura 7).

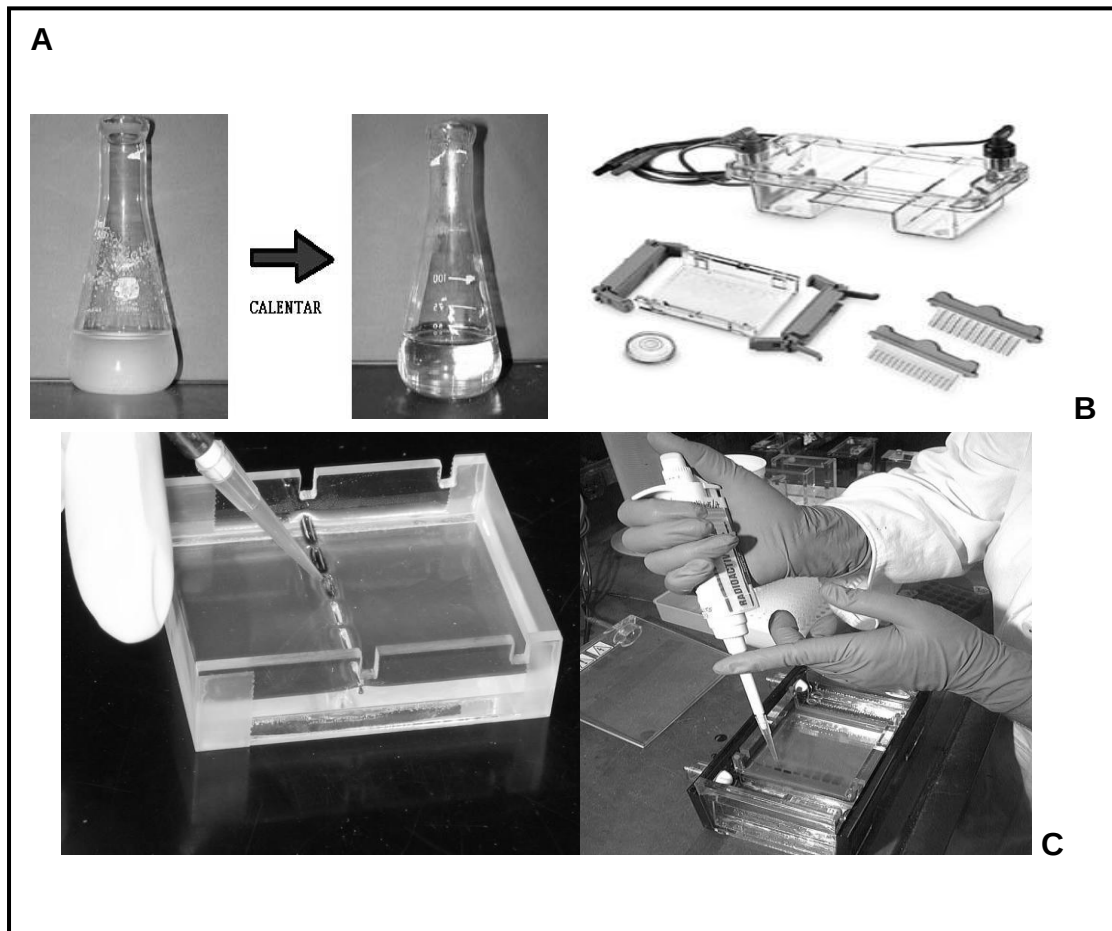


Figura 7. Preparación del gel de agarosa. A. Disolución de la agarosa por calentamiento hasta ebullición. B. Cámara de electroforesis. C. Cargado de las muestras de ADN en el gel de agarosa.

En los geles, la primera muestra cargada fue un marcador de ADN con tamaño de fragmentos conocido (marcador de tamaño), la electroforesis se corrió con tampón TAE 0.5X a 85 volts durante 2 hora. Terminada la corrida electroforética, el gel fue colocado en un fotodocumentador Multi Doc UVP® para la visualización del ADN.

³ Buffer de carga 6x: 40% (v/v) glicerol y 0.25% (p/v) orange G.

6.8 Análisis de la secuencia de ADN e identificación molecular

El conocimiento de la secuencia nucleotídica del ADN es la forma de llegar a la identificación de un organismo, el producto obtenido por PCR del marcador molecular LSU, se comprobó en un gel de agarosa, posteriormente la banda de ADN observada fue purificada con el kit QIAEX II Gel Extraction, una vez purificado el ADN se secuenció en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

La secuencia obtenida se analizó comparándola con secuencias del GenBank del National Center for Biotechnology Information, la base de secuencias de ADN europea (ENA/EMBL), la base de secuencias de ADN de Japón (DDBJ) y con la base especializada en secuencias de ADN de hongos MycoBank. En cada una de las bases de datos se utilizó el algoritmo Blast, este permitió la comparación de nuestra secuencia con las secuencias almacenadas en cada una de las bases de datos de ADN. El resultado obtenido de la búsqueda en cada una de las bases de datos de ADN nos proporcionó la identificación del hongo (Oliva, 2006).

6.9 Caracterización química de los extractos de *Sclerotium rolfsii* Sacc

6.9.1 Espectro de uv-visible

Para la elaboración de esta técnica se hizo una dilución del extracto a 500 ppm, se colocó 5 mg de extracto etanólico del micelio o del caldo de cultivo de *Sclerotium rolfsii* Sacc en 10 ml de etanol. La prueba fue realizada en un espectrofotómetro Jenway® en un rango de longitud de onda de 190 a 1,100 nm.

6.9.2 Determinación de antraquinonas

Para esta técnica se realizaron tres repeticiones, se utilizaron 24 placas de cromatografía en capa fina (silica gel 60, F₂₅₀) con dimensiones de 1 x 5 cm. En un extremo de la placa se colocó una aplicación de extracto con ayuda de un capilar. A continuación, la placa se colocó en una cámara de cromatografía con una mezcla de 0.125 µL de metanol y 2,375 µL de diclorometano, después de que los solventes cubrieron la matriz de la placa, esta fue puesta bajo luz

ultravioleta, la aparición de una coloración fluorescente marrón, rojo o violeta indicó la presencia de antraquinonas (Peralta *et al*; 2013).

6.9.3 Determinación de alcaloides

Para determinar la presencia de alcaloides en los diferentes extractos se utilizaron 24 placas de silica gel 60 F₂₅₀ de 1 x 5 cm, se colocó una aplicación del extracto con ayuda de un capilar, a continuación se corrió las placas en una mezcla de 0.125 µL de metanol y 2375 µL de diclorometano, después de observar la presencia de antraquinonas, se le aplicó 800 µl del reactivo Dragendorff a la placa, la presencia de alcaloides se determinó por la presencia de coloración roja o marrón, se realizaron tres repeticiones (Palomino, 2012).

6.9.4 Determinación de taninos

Para esta prueba se utilizaron los extractos acetona, acetato de etilo, etanol y los dos caldos de cultivos, en la prueba se utilizaron 3 tubos de ensayo por extracto, disolviendo 2 mg del extracto en 10 ml de agua destilada, al primer tubo se le agregó 10 mg de grenetina en polvo; al segundo 10 mg de grenetina y 100 mg de sal de mesa (NaCl) y al tercero 100 mg sal de mesa (NaCl). La presencia de color blanquecino en cualquiera de los tubos de ensayo demuestra la presencia de taninos (Peralta *et al.*, 2013).

6.9.5 Determinación de saponinas

Para esta determinación se utilizaron los extractos acetona, acetato de etilo, etanol y los dos caldos de cultivos. Se tomaron 2 mg de los extracto, mismos que se disolvieron en 10 ml de agua destilada, después se agregó 100 mg de sal de mesa (NaCl), se agitó fuertemente, la aparición de espuma con una duración de 60 a 120 segundos indica la presencia de saponinas (Peralta *et al.*, 2013).

6.9.6 Determinación de cumarinas volátiles

Para esta prueba se utilizaron los extractos acetona, acetato de etilo, etanol y los dos caldos de cultivos. Se colocaron 2 mg del extracto y 100 mg sal de mesa (NaCl) en 10 ml de agua destilada en un tubo de ensayo, luego se colocó

en la boca del tubo de ensayo un pedazo de papel filtro previamente humedecido en una solución de 1 g de hidróxido de sodio (NaOH) en 15 ml de agua destilada, posteriormente el tubo se puso en baño María a punto de ebullición. Después de 3 minutos se retiró el papel filtro, se dejó reposar hasta que se evaporó toda la humedad, a continuación se reveló bajo la acción de luz ultravioleta, la presencia de una coloración amarillo fluorescente indicó la existencia de cumarinas volátiles (Peralta et al., 2013).

6.10 Evaluación farmacológica *in vitro* de los extractos de *Sclerotium rolfsii* Sacc

6.10.1 Contenido de flavonoides totales

Se colocó de 0.1520 a 0.2499 g de extracto etanólico en 2 ml de metanol al 80 %, de esta solución se tomó 0.5 ml y se adicionó 2,800 µL de agua destilada, 0.1 ml de acetato de potasio 1 M, 0.1 ml de cloruro de aluminio al 10 % (p/v) y 1.5 ml de metanol, se dejó reposar durante 30 minutos, posteriormente se midió a una longitud de onda de 415 nm en un espectrofotómetro Jenway®.

Para la obtención de los flavonoides del caldo de cultivo se colocaron de 0.3005 a 1.2601 g del medio de cultivo líquido concentrado, el cual se re-suspendió en 2 ml de metanol al 80 %, de esta solución se tomó 0.5 ml y se le adicionó 2,800 µL de agua destilada, 0.1 ml de acetato de potasio 1 M, 0.1 ml de cloruro de aluminio al 10 % (p/v), 1.5 ml de metanol, se dejó reposar durante 30 minutos, posteriormente se midió a una longitud de onda de 415 nm en un espectrofotómetro Jenway®, esta prueba tubo tres repeticiones. Los resultados del contenido de flavonoides fueron reportados en µg de quercetina por ml de extracto del hongo (Parra, 2013).

6.10.2 Contenido de fenoles totales

Para esta prueba se utilizó el reactivo Folin Ciocalteu mediante la técnica de Singleton y Rossi (1965). Se colocó de 0.020 a 0.0503 g de extracto etanólico diluido en 2 ml de metanol al 80 %. De esta solución se tomaron 200 µL y se le adicionó 1 ml del reactivo de Folin Ciocalteu diluido 1:10 en un tubo de ensayo. A continuación, se dejó en reposo durante 1 minuto a temperatura ambiente, posteriormente se añadió 800 µL de una solución carbonato anhídrido de sodio

al 7.5 % (p/v). La reacción se dejó en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Jenway® a una longitud de onda de 715 nm, los valores de densidad óptica estuvieron en un rango de 0.3 a 0.7.

Para calcular los fenoles totales del caldo de cultivo se utilizaron de 0.0206 a 0.3509 g del medio de cultivo concentrado, mismo que se diluyó en 2 ml de metanol al 80 % (v/v) en tubo de ensayo, de esta solución se tomaron 200 µL y se le adicionó 1 ml del reactivo Folin Ciocalteu diluido 1:10. A continuación, se dejó reposar durante 1 minuto a temperatura ambiente, posteriormente se le añadió 800 µL de la solución carbonato anhídrido de sodio al 7.5 % (p/v). La reacción se dejó en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Jenway® a una longitud de onda de 715 nm, el rango de la lectura utilizado fue de 0.3 a 0.7 de densidad óptica, en esta prueba se realizaron tres repeticiones. Los resultados del contenido fenólico fueron expresados como µg de ácido gálico por ml de extracto del hongo (Singleton y Rossi 1965; Parra, 2013).

6.10.3 Capacidad antioxidante DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil)

Para la determinar la capacidad antioxidante del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc se utilizó el método descrito por Brand-Williams et al., (1995), empleando el reactivo DPPH. Se preparó una solución stock con 12 mg del reactivo DPPH disuelto en 50 ml de metanol, puesto en un frasco ámbar protegido de la luz con papel aluminio, el frasco se almaceno a 4°C. A partir de esta solución se preparó una solución de trabajo realizando una dilución 1:5 con metanol, a la cual se le ajustó la absorbancia a 1.1 a una longitud onda de 515 nm. Esta última solución fue puesta en un frasco color ambar y protegida de la luz a 4°C. Para la determinación del poder antioxidante del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc, se colocó en un tubo de ensayo 8.5 a 12 µL del extracto etanólico y se ajustó el volumen a 1,000 µL con solución diaria de DPPH, luego se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se colocó la reacción en una celda espectrofotométrica para medir la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm en un espectrofotómetro Jenway®.

Para el caso del caldo de cultivo concentrado se empleó de 43 a 250 μL , ajustando el volumen final a 1000 μL con solución diaria de DPPH, luego se dejó reposar durante 30 minutos, por último se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm en un espectrofotómetro Jenway®, se realizaron tres repeticiones.

Los resultados de la determinación de la capacidad antioxidante por DPPH se reportaron como μM de Trolox^{MR} por ml de extracto (Parra, 2013).

Para evaluar las actividades farmacológicas de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante DPPH, se utilizó el software Statgraphics para realizar las pruebas estadísticas como son: análisis de varianza con dos factores, comparación de medias múltiple de Dunnet y Tukey, análisis de varianza de Cochran y Bartlett, dichas pruebas mostraron significancia.

6.10.4 Evaluación de la toxicidad *In vitro* en *Artemia salina*

Para este método se pesó 185 mg de quistes de *Artemia salina*, los quistes se colocaron en un cristizador con 500 ml agua potable y oxigenación durante 1 h, posteriormente se colocaron en una solución desencapsulante, 0.0277g de hidróxido de sodio con 1.3 ml de salmuera y 1.26 ml de hipoclorito de sodio, durante 8 minutos. Los quistes fueron colocados en un cristizador con 500 ml de salmuera (19 g de sal de mar en 500 ml de agua destilada) se ajustó el pH a 8, bajo condiciones de temperatura de 28°C, luz y oxígeno durante 24 horas, situación que permitió la eclosión de la mayor parte de las *Artemias salinas* (Sorgellos, 1982).

Para esta actividad se utilizaron 60 tubos de ensayo, empleando un control y 2 repeticiones del extracto. En el control solo se colocó 10 ml de salmuera y 10 *Artemias salinas* por tubo de ensayo, en los tubos de ensayo con extracto se probaron 5 distintas concentraciones. Al primer tubo del tratamiento se le adicionó 2 mg de extracto etanólico de *Sclerotium rolfsii* Sacc, en 10 ml de salmuera. A partir del tubo con mayor concentración se tomaron 200 μL y se pasaron a un segundo tubo, se mezcló y se repitió esta acción hasta tener 5 concentraciones distintas. Finalmente a cada tubo con extracto etanólico se les agregó 10 nauplios de *Artemia salina* y se incubó a temperatura ambiente durante 24 horas. Se repitió el mismo procedimiento para evaluar el extracto

etanólico de *Sclerotium rolsii* Sacc cultivado en extracto de malta y los dos distintos caldos de cultivo, papa-dextrosa y extracto de malta (Anexo E).

La actividad observada en el modelo de *Artemia salina* se expresó en porcentaje de concentración letal (CL₅₀), es decir, la dosis mínima del extracto que mata al 50 % de los nauplios de *Artemia salina* (Palomino, 2012).

7. RESULTADOS

7.1 Obtención de biomasa

El hongo se cultivó en medio papa-dextrosa-agar (PDA) y se observó un rápido crecimiento del micelio en un período de 72 h, *Sclerotium rolsii* Sacc cubrió en su totalidad la caja de Petri, con una tasa de crecimiento radial de aproximadamente 24.8 mm por día, un crecimiento altamente acelerado, posterior a este tiempo comenzó la formación de esclerocios (figura 8).

Una vez inoculados los reactores con micelio, el crecimiento del hongo *Sclerotium rolsii* Sacc en la primera semana fue acelerado, posteriormente en las siguientes semanas el crecimiento fue disminuyendo. Al final del período de incubación se obtuvieron 159.61 g de micelio húmedo de cada reactor. Para la elaboración de cada uno de los extractos se empleó el micelio proveniente de 3 reactores, alrededor de 478 g (figura 9, tabla 4).

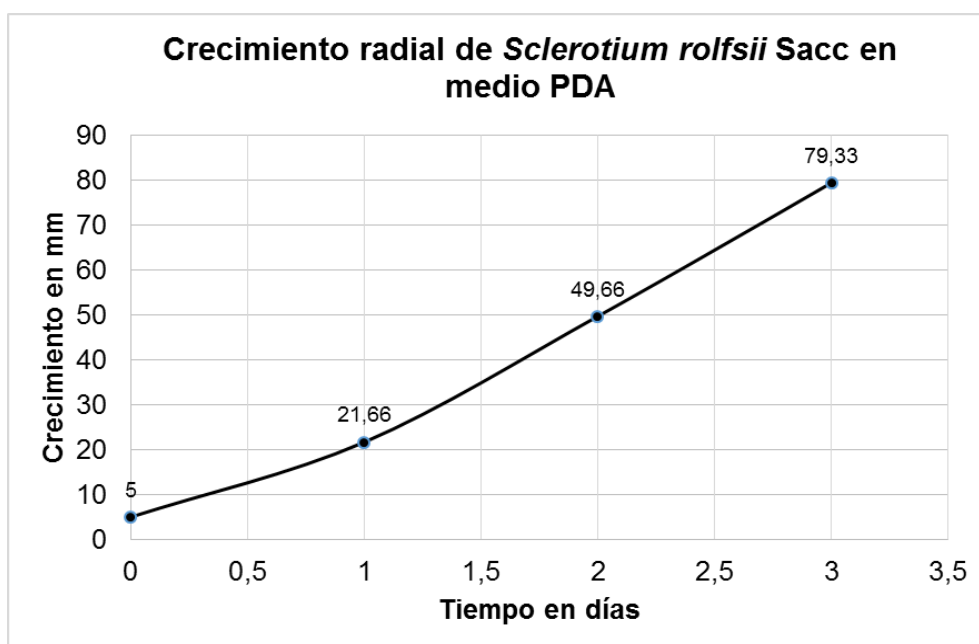


Figura 8. Gráfica del promedio de crecimiento radial del hongo *Sclerotium rolsii* Sacc cultivado en cajas de Petri con medio de cultivo PDA.

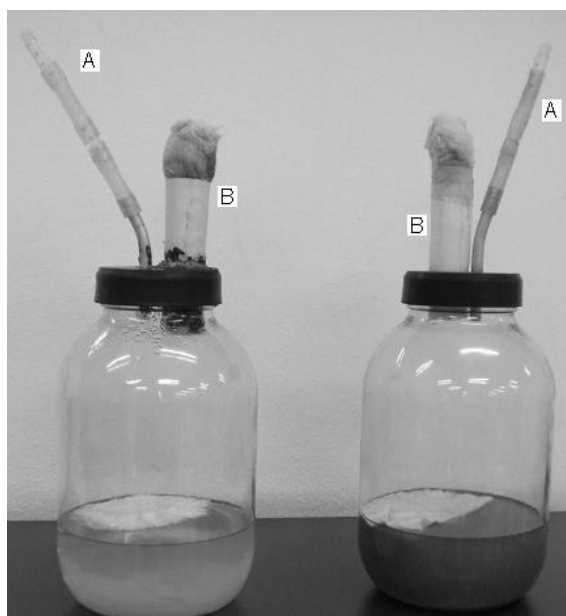


Figura 9. Reactores de cultivo de *Sclerotium rolfii* Sacc. Cada reactor contenía 1 L de medio líquido de papa-dextrosa (PD) o extracto de malta, el reactor tenía una entrada de aire estéril (A) y una salida de CO₂ (B).

Tabla 4. Cantidad de micelio obtenido y empleado en la elaboración de los extractos de etanol, acetona y acetato de etilo de *Sclerotium rolfii* Sacc.

Cultivo de <i>Sclerotium rolfii</i> Sacc en medio papa-dextrosa			
Solventes usados en la obtención de los extracto de <i>Sclerotium rolfii</i> Sacc	Peso húmedo (g)	Solvente adicionado al micelio (ml)	Solvente recuperado (ml)
Acetona	500	400	50
Acetato de Etilo	423	400	95
Etanol	350	400	50
Cultivo de <i>Sclerotium rolfii</i> en medio extracto de malta			
Acetona	499	350	300
Acetato de Etilo	507	350	300
Etanol	594	350	100

7.2 Obtención de ADN

Se empleó 1 mL de una suspensión de micelio molido, el cual fue suficiente para obtener 24 µg de ADN. El ADN extraído fue corrido en un gel de agarosa al 0.8% (p/v) con buffer TAE 0.5X a un voltaje de 85 volts durante 2 horas (figura 10). Como podemos observar el ADN extraído presentó una alta concentración y una buena calidad, con un índice de 260/280 de 1.8, (Joumal, 2010), lo que indica una baja contaminación con proteínas. Además, es una ADN genómico de alto peso molecular ya que no se observó fragmentación del mismo, lo que sirvió para poder realizar las pruebas siguientes con el ADN.

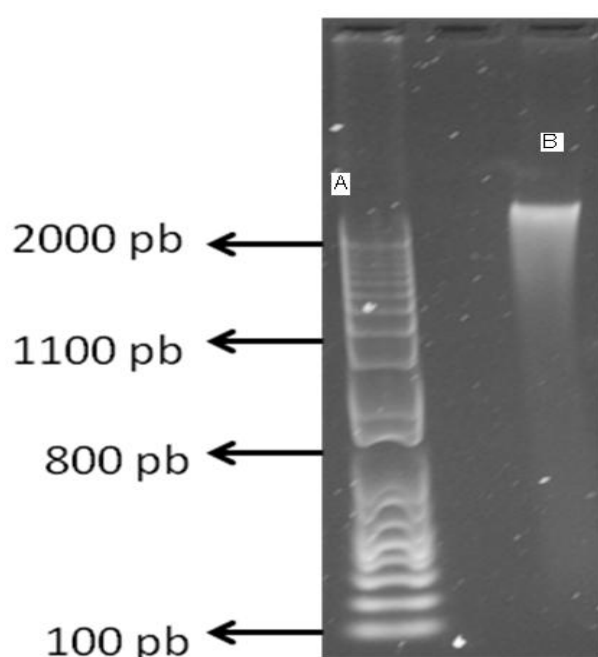


Figura 10. Electroforesis de ADN en gel de agarosa. Corrimiento electroforético de ADN genómico de *Sclerotium rolfsii* Sacc en un gel al 0.8 % (p/v). (A) Marcador de tamaño de ADN [3 µl]. (B) ADN genómico extraído de *Sclerotium rolfsii* Sacc [10 µl].

7.3 Amplificación de LSU por PCR

La amplificación parcial del gen ribosomal 28S se comprobó en un gel de agarosa al 2% (p/v), la amplificación fue altamente específica, ya que solo se observa la amplificación de una sola banda de 970 pb aproximadamente, tamaño ideal para una vez obtenida la secuencia nucleotídica de ADN poder realizar la identificación molecular del hongo (figura 11).

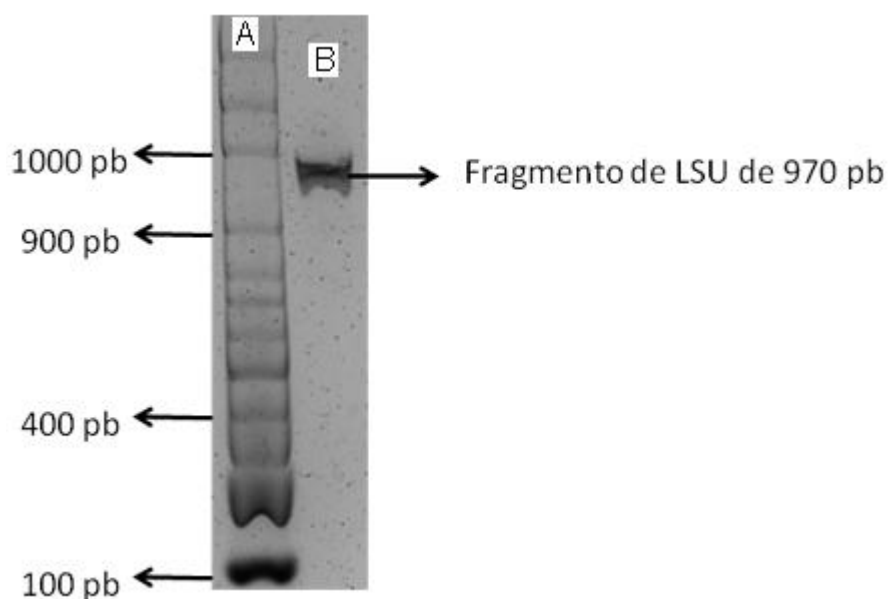


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR del marcador molecular LSU. Análisis electroforético en agarosa al 2 % (p/v) del producto de PCR del gen 28S de la subunidad mayor del ribosoma de *Sclerotium rolfsii* Sacc. (A) Marcador de tamaño de ADN [3 µl]. (B) Fragmento amplificado de LSU [8 µl].

7.4 Identificación molecular del hongo *Sclerotium rolfsii*

El producto de PCR de la amplificación parcial del gen 28S o LSU fue purificado con el kit Qiaex II® y enviado a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. La secuencia nucleotídica obtenida tuvo 816 pb (figura 12). Dicha secuencia fue empleada para realizar la búsqueda en las distintas bases de datos de ADN: GenBank, ENA-EMBL, DDBJ y MycoBank, los resultados indicaron una similitud del 98% de la secuencia obtenida con las reportadas en las distintas bases de datos de ADN. Con valores E de 0.0 a 1e-395 con la secuencia número JN543692 correspondiente a un *Sclerotium rolfsii* Sacc. Con los datos mencionados no existe duda que el hongo que se empleó en este estudio es *Sclerotium rolfsii* Sacc (figura 12 y tabla 5).

```
AATCTGGTAGTCTCTGGCTGCCCCGAGTTGTAATCTGGAGAAGTGTTTTCT
GTGCTGGGCCGTGTAAAGTCTCTTGAATAGAGCGTCATAGAGGGTGAC
AATCCCGTCTTTGACACGGACATCCAGTGCTCTGTGATGCACTCTCAAAC
AGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATTCCATCTA
AAGCTAAATATTGGCAAGAGTCCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAA
AGATGAAAAGAACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGA
AAGGGAAACGCTTGAAGTCAGTCGCGTCTAGCAAGGATCAGCCCTTCTC
GGAGGGTGTATTTCTTGCTCGACGGGTCAACATCAATTTTGACTACTGGA
AAAAGGCCAGGGGAAGGTGGCACCTTCGGGTGTGTTATAGCCTTTGGTC
ATATACAGTAGTTGGGATTGAGGAATTCAGCATGCCTTCATGACTGGGGT
TCGCCCACATTCATGCTCAGGATGTTGGCATAATGGCTTTAAGCGACCC
TCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACAAACCTGCGAGTGTGTGGGTG
TAAAAACTCGAGCGCATAATGACAGTGAAAGTTGAGACCCTCCTAAGGG
CATCGACGCCCGGACCAGACCTTTTGTGACGGATCTGCGGTAGAGCATC
TATGTTGGGACACGAAAGATGGTGAACATATGCGTGAGTAGGGTGAAGCC
AGAGGAAACTCTGGTGGAGGCTCGTAGCGATTCTGACAAGCAAATCGAT
CGTCGAATTTGGGTATAGGGGCGGG
```

Figura 12. Secuencia parcial del gen 28S o LSU de *Sclerotium rolfsii* Sacc. Secuencia nucleotídica del gen 28S de *Sclerotium rolfsii* Sacc obtenida con secuenciación capilar en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Bases nitrogenadas: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T).

Tabla 5. Porcentajes de similitud de la secuencia nucleotídica de ADN de LSU del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc y su valor E

Hongo	Base de datos NCBI		Base de datos DDBJ		Base de datos ENA-EMBL		Código de la secuencia utilizada para realizar la comparación
	% de similitud*	Valor E ^a	% de similitud*	Valor E	% de similitud*	Valor E	
<i>Sclerotium rolfsii</i>	98	1e-395	98	0.0	98	0.0	JN543692

(*) Con secuencias almacenadas en cada una de la bases de datos empleadas. (a) Valor que indica que la búsqueda de la secuencia en la base de datos con mayor similitud a la secuencia problema se realizó de forma aleatoria, entre más pequeño es el valor E, mayor similitud estadística existe entre las secuencias.

7.5 Caracterización química de los extractos

7.5.1 Espectro uv-visible

El crecimiento de *Sclerotium rolfsii* Sacc en dos medios de cultivo mostró diferencias a nivel de la concentración de metabolitos. El caldo de cultivo del extracto de malta reportó una mayor concentración de metabolitos en comparación con el caldo de cultivo de papa-dextrosa. Los perfiles analizados son similares, sin embargo en el caldo de extracto de malta se observa un pico muy pronunciado a 350 nm (figura 13A), mientras que en el caldo de cultivo papa-dextrosa los compuestos en mayor concentración absorben a 320 nm. En el caso de los extractos, la mayor concentración de metabolitos se observó en el extracto etanólico del micelio crecido en el medio de cultivo papa-dextrosa, observándose dos picos claramente uno a 230 y otro a 300 nm, aunque los dos perfiles tienen la misma tendencia (figura 13B). Parece suceder que *Sclerotium rolfsii* Sacc tiene una mayor capacidad secretora de metabolitos en el medio de cultivo extracto de malta, mientras que en el medio papa-dextrosa el hongo mantiene los metabolitos en el interior del micelio.

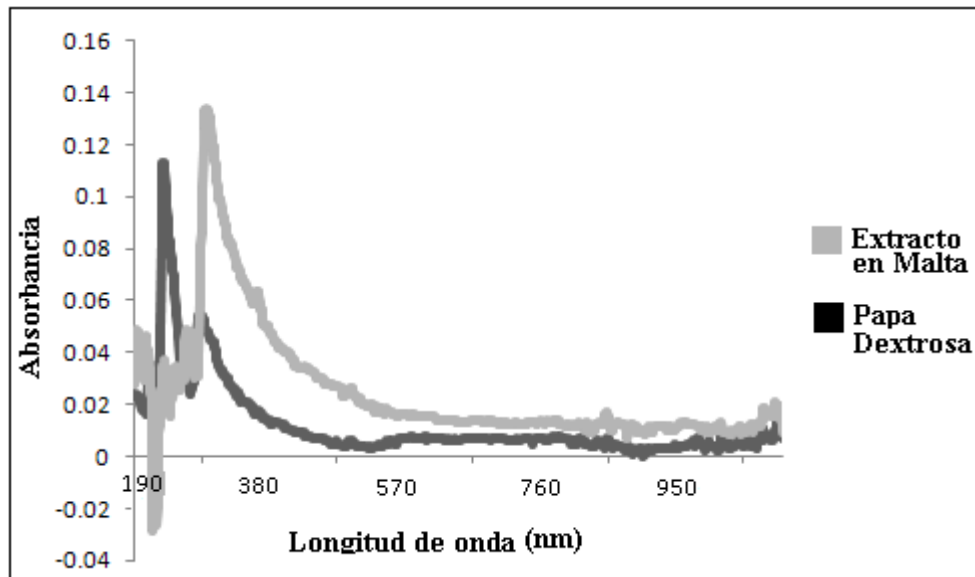


Figura 13 A. Espectro de uv-vis de los caldos de cultivo del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc. Los perfiles de ambos caldos de cultivos son similares, sin embargo en el extracto de malta se observa una mayor concentración de metabolitos.

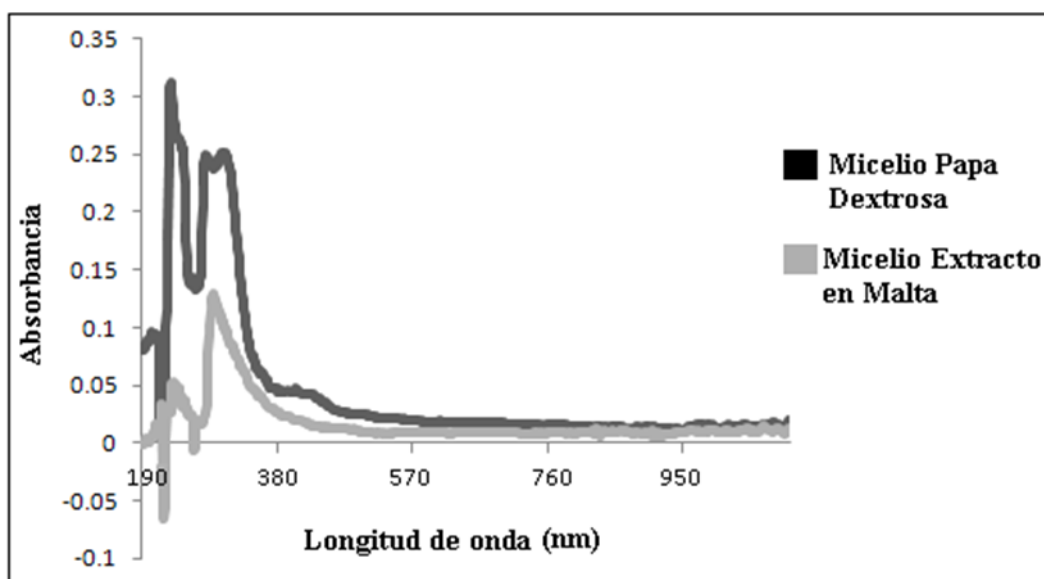


Figura 13 B. Espectro de uv-vis de los extractos etanólicos del hongo *Sclerotium rolfii* Sacc. Extractos del micelio de *Sclerotium rolfii* Sacc cultivado en dos distintos medios de cultivo, la mayor concentración de metabolitos se observa en el micelio crecido en medio de cultivo papa-dextrosa.

7.5.2 Evaluación química cualitativa

Los datos obtenidos del extracto del hongo *Sclerotium rolfii* Sacc en medio de cultivo papa-dextrosa mostraron lo siguiente (ver tabla 6). En los extractos de acetona y acetato de etilo se presentó una baja concentración de antraquinonas, mientras que en el extracto de acetato de etilo se encontró una moderada presencia de alcaloides, ambos compuestos encontrados tienen una polaridad intermedia.

Tabla 6. Resultado de las pruebas cualitativas de los grupos químicos funcionales obtenidas del micelio de *Sclerotium rolfii* Sacc cultivado en medio papa-dextrosa

Extracto	Antraquinonas	Alcaloides	Taninos	saponinas	Cumarinas volátiles
Etanol	-	-	-	-	-
Acetona	+	-	-	-	-
Acetato de etilo	+	++	-	-	-
Caldo de cultivo PD	-	-	-	-	-

Escala cualitativa: (-) No se observó Presencia, (+) escasa, (++) moderada, (+++) abundante.

Los resultados obtenidos del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc cultivado en extracto en malta, mostraron lo siguiente (ver tabla 7). El extracto de acetona y el medio de cultivo de extracto de malta presentaron escasa presencia de antraquinonas de polaridad intermedia. Con lo que respecta a los alcaloides y antraquinonas, estos solo fueron encontrados de forma abundante en el extracto de acetato de etilo, lo que indica que dichos alcaloides presentan una polaridad intermedia. La diferencia en las evaluaciones químicas cualitativas mostró que el medio de cultivo de extracto en malta permitió una mayor producción de metabolitos por parte de *Sclerotium rolfsii* Sacc en comparación con el medio de cultivo papa-dextrosa.

Tabla 7. Resultado de las pruebas cualitativas de los grupos químicos funcionales del micelio del *Sclerotium rolfsii* Sacc cultivado en medio extracto de malta.

Extracto	Antraquinonas	Alcaloides	Taninos	Saponinas	Cumarinas volátiles
Etanol	-	-	-	-	-
Acetona	+	-	-	-	-
Acetato etilo	+++	+++	-	-	-
Caldo de cultivo extracto de malta	+	-	-	-	-

Escala cualitativa: (-) No se observó presencia, (+) escasa, (++) moderada, (+++) abundante.

7.6 Evaluación farmacológica

7.6.1 Determinación de fenoles totales

La evaluación farmacológica se realizó con el extracto etanólico por su polaridad similar a la del agua. Esto con el objetivo de que normalmente en la vida cotidiana se utilizan extractos acuosos como tratamiento para los padecimientos médicos (Barthelemy, 2013). También se evaluó el caldo de cultivo con la finalidad de analizar los compuestos fenólicos y antioxidantes que el hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc puede excretar al medio de cultivo. En este primer estudio realizado con *Sclerotium rolfsii* Sacc se pretendió realizar una evaluación farmacológica de acercamiento, para que en estudios posteriores se

realice la búsqueda e identificación de compuestos fenólicos y antioxidantes que puedan ser empleados en animales o humanos.

En primer lugar se obtuvo el modelo de regresión lineal simple (RLS) de la curva patrón con ácido gálico, para determinar la concentración de fenoles totales, el cual fue el siguiente:

$$[\text{Fenoles totales } (\mu\text{g/mL})] = [\text{Absorbancia} - 0.0126] / 0.0354$$

Dicho modelo fue adecuado para explicar la concentración de fenoles totales, ya que el coeficiente de correlación de Pearson ($r=0.9994$), el coeficiente de determinación ($R^2= 0.9988$) y del ANDEVA se obtuvo una $F= 11300^*$, siendo significativos ($\alpha=0.05$), todos los análisis estadísticos fueron elaborados con el software Statgraphics.

Se obtuvieron entonces las concentraciones de fenoles totales por tratamiento con el modelo de RLS y se determinó que existe diferencia estadística significativa ($F= 12.61^*$; $\alpha=0.05$) entre ellos. Se observó que el promedio de fenoles totales en el caldo de cultivo de malta y el extracto etanólico del micelio cultivado en el mismo medio de cultivo fue menor que los otros tratamientos. De acuerdo a la prueba de comparación de medias múltiple de Tukey, la cantidad promedio de fenoles totales en el caldo de cultivo papa-dextrosa del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc fue mayor que el extracto etanólico del micelio cultivado en el mismo medio de cultivo. Por otro lado, los valores de fenoles totales en el extracto etanólico del micelio cultivado en el medio extracto de malta fueron más altos que los del caldo de cultivo (ver tabla 8). Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por mililitro de extracto (mg EAG/ml).

7.6.2. Determinación de flavonoides totales en *Sclerotium rolfsii* Sacc

Inicialmente se elaboró el modelo de regresión lineal simple (RLS) de la curva patrón con quercetina para determinar la concentración de flavonoides totales, el cual fue el siguiente:

$$[\text{Flavonoides totales (mg/ml)}] = [\text{Absorbancia} - 0.0126] / 0.0063$$

Dicho modelo fue adecuado para explicar la concentración de flavonoides totales, ya que el coeficiente de correlación de Pearson ($r=0.9972$), el coeficiente de determinación ($R^2= 0.9944$) y del ANDEVA se obtuvo una $F= 2848^*$, siendo significativos ($\alpha=0.05$). Se obtuvieron entonces las concentraciones de flavonoides totales por tratamiento con el modelo de RLS y se determinó que existieron diferencias estadísticas significativas ($F= 5.27^*$; $\alpha=0.05$) entre ellos. En el caldo de cultivo papa-dextrosa no se detectaron flavonoides. De acuerdo a la prueba de comparación de medias múltiple de Tukey, se observó que el promedio de flavonoides totales en el extracto etanólico del micelio del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc cultivado en extracto de malta fue menor que el obtenido en el caldo de cultivo, entretanto el extracto etanólico de micelio crecido en el medio de cultivo papa-dextrosa fue intermedio con respecto a los dos tratamientos anteriores (ver tabla 8). Los resultados fueron reportados como miligramos equivalentes de quercetina por mililitro de extracto (mg EQ/ml de extracto).

7.6.3. Determinación de la capacidad antioxidante DPPH en *Sclerotium rolfsii* Sacc

La concentración de los compuestos que tienen capacidad antioxidante, se obtuvo a través de la curva patrón de DPPH, por medio del siguiente modelo de RLS:

$$[\text{DPPH } \mu\text{M/ml}] = [\text{absorbancia} - 1.0552] / -0.0011$$

Dicho modelo fue adecuado para explicar la concentración del poder antioxidante, ya que el coeficiente de correlación de Pearson ($r= -0.987$), el coeficiente de determinación ($R^2= 0.975$) y el ANDEVA se obtuvo una $F= 623^*$, siendo significativos ($\alpha=0.05$). Se obtuvo las concentraciones de equivalentes de Trolox^{MR} por tratamiento con el modelo de RLS y se determinó que no existieron diferencias estadísticas significativas ($F= 0.59$ NS; $\alpha=0.05$) entre ellos (ver tabla 8). Los datos obtenidos del análisis fueron comunicados en

micromoles equivalentes de Trolox^{MR} por mililitro de extracto ($\mu\text{mol ET/ml}$ de extracto).

En todos los análisis se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas de Cochran y Bartlett, encontrando que no había significancia ($\alpha = 0.05$), es decir, las varianzas entre los tratamientos fueron homogéneas.

Tabla 8. Resultados de la evaluación del contenido de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante DPPH en *Sclerotium rolfsii* Sacc. Se presentan las comparaciones de medias múltiples de Tukey de los metabolitos obtenidos del medio de cultivo y del extracto del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc, además se proporciona el error estándar (EE) y el coeficiente de variación (CV).

Tratamiento*	(n)	$\bar{X}$	EE	CV (%)
Fenoles totales (mg EAG/ml extracto)				
CMALTA	3	0.064 ^a	0.005	13.97
EEMALTA	3	0.068 ^a	0.002	5.45
EEPD	3	0.078 ^{ab}	0.002	8.62
CPD	3	0.092 ^b	0.004	3.98
Flavonoides totales (mg EQ/ml de extracto)				
EEMALTA	3	0.183 ^a	0.006	5.8
EEPD	3	0.187 ^{ab}	0.001	2.3
CMALTA	3	0.2 ^b	0.001	1
DPPH ($\mu\text{M ET/ml}$ de extracto)				
CMALTA	3	302 ^a	27.086	15.5
EEMALTA	3	325.94 ^a	7.888	4.2
EEPD	3	351.70 ^a	44.997	15.5
CPD	3	318.70 ^a	1.574	0.9

*Extracto etanólico de papa-dextrosa (EEPD), caldo de cultivo papa-dextrosa (CPD), extracto etanólico de extracto de malta (EEMALTA), caldo de cultivo extracto de malta (CMALTA). **a** y **b** marcan los tratamientos que presentan diferencia estadística dentro de un mismo grupo de análisis.

7.6.4. Determinación de la toxicidad *In vitro* en el modelo de *Artemia salina*

La toxicidad de los extractos metanólicos y los caldos de cultivo de *Sclerotium rolfii* Sacc fueron evaluados con nauplios de *Artemia salina*, ninguno de los extractos analizados alcanzó a eliminar el 50% de la población de artemias, por lo que no fue posible calcular la concentración letal CL₅₀ (dosis mínima del extracto que mata al 50% de los nauplios de *Artemia salina*) con el programa Sigma Plot. La actividad tóxica de los caldos de cultivo y de los extractos etanólicos del micelio de *Sclerotium rolfii* Sacc cultivado en medio PD y extracto de malta proporcionaron una concentración de letalidad LC₅₀ por arriba de 500 ppm, con una sobrevivencia mínima superior al 80% de los nauplios, lo que demuestra que los extractos evaluados no son tóxicos (figura 14).

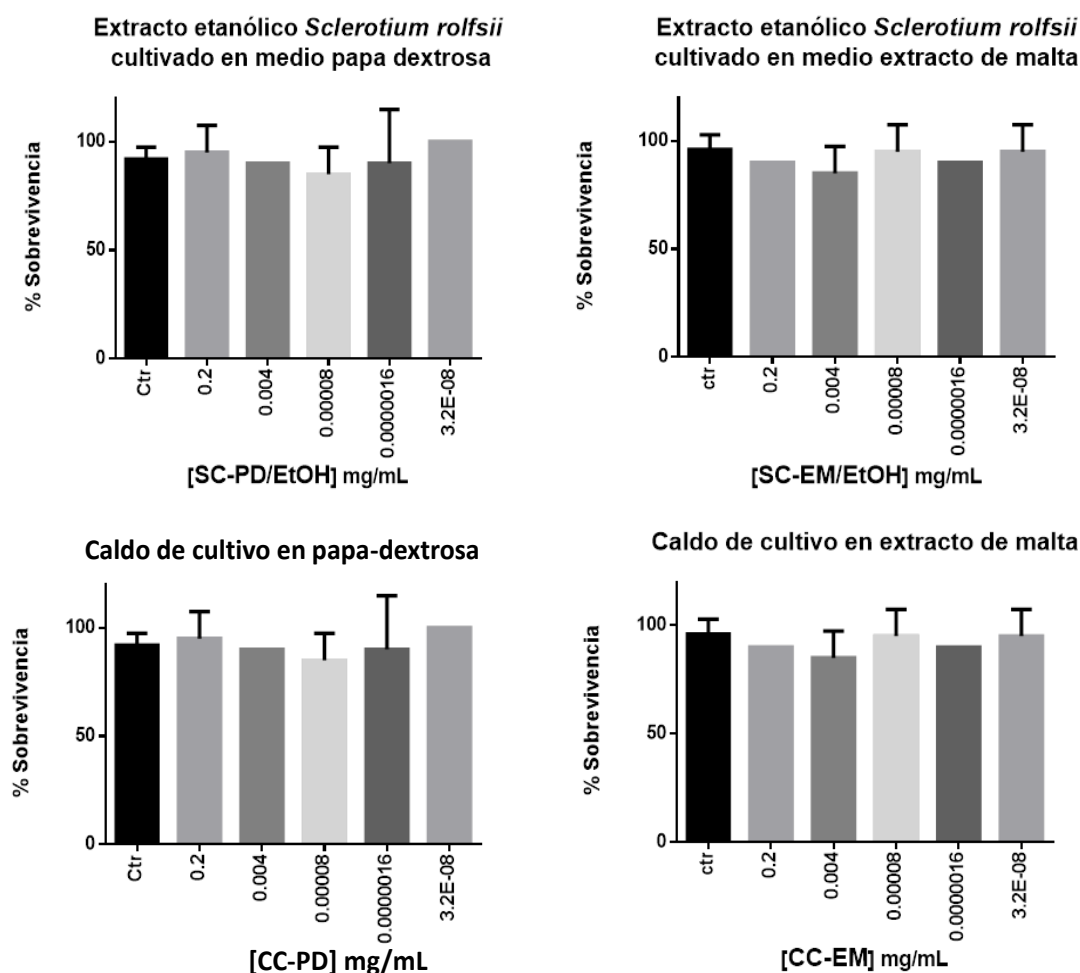


Figura 14. Gráficas del comportamiento de la toxicidad de los extractos y caldos de cultivo de *Sclerotium rolfii* Sacc en el modelo *in vitro* de *Artemia salina*.

8. DISCUSIÓN

La secuencia nucleotídica obtenida de la subunidad mayor del ribosoma (LSU) coincide con secuencias utilizadas en la identificación de *Sclerotium rolfsii* Sacc en otros estudios (Xu et al; 2010).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la caracterización química cualitativa, la presencia de alcaloides ha sido reportada en otros hongos como *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Schizophyllum sp.*, *Psolocybe azures*, *Penicillium oxalicum*, *Fennellia nivea*, entre otros, por lo que los datos obtenidos de *Sclerotium rolfsii* Sacc coinciden con los de otras investigaciones (Li et al. 2015; Panaccione et al. 2014; Wasser, 2011; Yadav et al. 2014). La presencia de antraquinonas se ha reportado escasamente en el caso de hongos, sin embargo, Li et al., (2015), encontraron estos compuestos en géneros como *Alternaria sp.*, *Trametes sp.*, *Fusarium sp.* y *Schizophyllum sp.*, por lo que los resultados producidos en *Sclerotium rolfsii* Sacc presentan una directriz positiva.

La determinación de fenoles totales en hongos presenta pocos reportes, en *Sclerotium sp.* no se encontró ningún reporte de estos compuestos, pero realizando la comparación con otros hongos se observó que los valores obtenidos en esta investigación son inferiores a los reportados en otros trabajos, ya que realizando los cálculos pertinentes para obtener la cantidad de fenoles totales en un gramo de extracto (mg ácido gálico/g de extracto), como lo reportan algunos autores, *Sclerotium rolfsii* Sacc sintetizó en el micelio crecido en el medio de cultivo papa-dextrosa alrededor de 0.0696 mg/g y secretó al caldo de cultivo 0.095 mg/g; mientras que en el medio de cultivo extracto de malta el micelio proporcionó 0.0696 mg/g y 0.046 mg/g en el caldo de cultivo. Li et al; (2015), documentaron valores de fenoles totales en *Alternaria alternata* (20.53±0.08 mg/g); *Fusarium proliferatum* (21.75±0.11 mg/g); *Trametes hirsuta* (11.21±0.25 mg/g) y *Schizophyllum commune* (12.96±0.18). Por otro lado Nagaraj et al; (2014), reportaron 0.071±0.02 mg/g para el cuerpo fructífero o carpóforo del hongo *Ganoderma applanatum*, mientras Arora y Chandra, (2011), encontraron de 13.05 a 16.74 mg/ml de fenoles totales en el caldo de cultivo de *Aspergillus sp.*

En el caso de los flavonoides totales, también se realizaron ajuste a nuestros datos para presentarlos como mg de quercetina por g de extracto, *Sclerotium*

rolfsii Sacc proporcionó 0.93 mg/g para el micelio crecido en medio papa-dextrosa y no se detectaron flavonoides en el caldo de cultivo, entretanto para el medio extracto de malta se obtuvieron 0.925 mg/g en el micelio y 0.995 mg/g en el caldo de cultivo. Dichos datos podríamos considerarlos bajos en comparación con otros hongos estudiados, por ejemplo *Fusarium proliferatum* es capaz de sintetizar 8.27 ± 0.12 mg/g, *Alternaria alternata* 7.36 ± 0.09 mg/g, *Schizophyllum commune* 5.62 ± 0.15 y *Trametes hirsuta* 4.56 ± 0.08 mg/g (Li et al. 2015).

La capacidad antioxidante determinada con DPPH presentó valores inferiores a los reportados en otros hongos, ya que en *Sclerotium rolfsii* Sacc se obtuvieron valores de 0.281 mmol ET/g y 0.314 mmol ET/g para el extracto del micelio crecido en medio extracto de malta y papa-dextrosa, respectivamente. Mientras que en el caldo de extracto de malta se consiguió 0.217 mmol ET/g y 0.332 mmol ET/g en el caldo de papa-dextrosa. Entretanto Chig-Yu, (2013); al estudiar distintos hongos comestibles y medicinales encontró valores de 8.46; 7.3; 7.15; 0.24; 0.02 mmol ET/g para *Volvariella volvacea*; *Cordyceps militaris*; *Agaricus bisporus*; *Ganoderma lucidum* y *Wolfiporia extensa*, respectivamente. De la misma manera Yap et al; (2013; 2014), halló en *Lignosus rhinocerotis* y *L. trigris* valores de 1.12 y 2.53 mmol ET/g de extracto, individualmente.

La toxicidad de los extractados evaluados de *Sclerotium rolfsii* Sacc, proporcionó en cada uno de los extractos valores de CL_{50} por arriba de 500 $\mu\text{g/ml}$ que coincide con una baja toxicidad observada por Ruíz (2014), en ciertos hongos estudiados, como *Scleroderma texense* (CL_{50} 2,552.88 $\mu\text{g/ml}$), *Cantharellus cibarius* (CL_{50} 1,586.63 $\mu\text{g/mL}$), *Cortinarius caerulescens* (CL_{50} 1,397.17 $\mu\text{g/mL}$) y *Ramaria holorubella* (CL_{50} 757.37 $\mu\text{g/mL}$).

Aunque los valores de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante no son especialmente altos en relación a otros organismos del mismo reino, es importante continuar con el ensayo de otras pruebas farmacológicas como citotoxicidad, inflamación, proliferación celular, hipoglucemia, etc., esto con el fin de caracterizar de mejor forma la actividad terapéutica de *Sclerotium rolfsii* Sacc.

9. CONCLUSIÓN

1. Se observó que el mejor crecimiento de *Sclerotium rolfsii* Sacc fue en el medio de cultivo extracto de malta, siendo en este último donde se reportó la mayor concentración de alcaloides, antraquinonas y flavonoides.
2. La secuencia nucleotídica de ADN de la región LSU de *Sclerotium rolfsii* Sacc es ideal para la identificación molecular de este hongo.
3. La cepa de *Sclerotium rolfsii* Sacc utilizada en el presente estudio tiene la capacidad de sintetizar alcaloides, antraquinonas, fenoles y flavonoides, algunos de estos últimos con capacidad antioxidante.
4. La toxicidad del micelio de *Sclerotium rolfsii* Sacc es sumamente baja, al igual que el medio de cultivo donde crece este hongo.

10. PERSPECTIVAS EXPERIMENTALES

- a. Optimizar el proceso de extracción de metabolitos de *Sclerotium rolfsii* Sacc empleando fluidos presurizados o supercríticos con el objetivo de utilizar menor cantidad de muestra y obtener una mayor concentración de metabolitos en los extractos.
- b. Realizar la purificación e identificación de los alcaloides y antraquinonas secretados por *Sclerotium rolfsii* Sacc.
- c. Evaluar farmacológicamente los extractos de *Sclerotium rolfsii* Sacc en modelos animales.

11 PERSPECTIVA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN LA PROMOCIÓN DE LA SALUD

La promoción de la salud surgió como una respuesta a la necesidad de buscar un nuevo acercamiento a los múltiples problemas de salud que exigen solución en el planeta.

De acuerdo con la carta de Ottawa, Canadá de 1986, la promoción de la salud requiere un proceso para capacitar a las personas con el objetivo de que aumenten el control sobre su salud y para que la mejoren. Con la finalidad de alcanzar un estado adecuado de bienestar físico, mental y social.

Los factores políticos, económicos, sociales, culturales, ambientales y biológicos pueden favorecer la salud, siendo esta última la fuente de desarrollo personal, económico y social. La intervención de la promoción de la salud abarca desde los gobiernos, sectores sanitarios, sectores sociales y económicos, por lo que las estrategias y programas de la promoción de la salud están elaboradas bajo el respeto cultural de las diferentes poblaciones ya que cada uno de ellos mantiene su propio sistema económico y político.

Además, la promoción de la salud tiene como objetivo rescatar los saberes de las personas, como el uso de ciertas plantas para curar enfermedades, debido a que son una fuente de compuestos químicos o metabolitos con actividad farmacológica. Razón por la cual es importante elaborar investigaciones que permitan conocer los compuestos químicos con actividad terapéutica de los organismos que forman parte del medio ambiente. La información generada pudiera permitir desarrollar estrategias de uso médico de los recursos naturales estudiados, situación que permite la conservación de ciertas especies de organismos y la disminución del impacto ambiental en las comunidades o en el planeta.

El presente trabajo brinda un primer acercamiento sobre la importancia farmacológica de un recurso natural (*Sclerotium rolfsii* Sacc) que abre las perspectivas para incrementar su estudio y poder llegar en algún momento a ser utilizado como una fuente de fármacos, que permitan el bienestar de las personas.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. **Abdel-Azeem, AM.** 2010. The history, fungal biodiversity, conservation, and future perspectives for mycology in Egypt. *IMA Fungus : The Global Mycological Journal*, 1(2), 123–142.
2. **Alexopoulos, CJ; CW. Mims; M. Blackwell.** 1995. Introductory mycology. New York : John Wiley & Sons.
3. **Anaya, LAL.** 2003. Ecología química. Ed. Plaza Valdés. México.
4. **Anke T.** 1989. Basidiomycetes: A source for new bioactive secondary metabolites. *Progress in Industrial Microbiology* 1989; 27 51-66p.
5. **Arora, DK.** 2004. Handbook of Fungal Biotechnology. Ed. Marcel Dekker Inc. USA.
6. **Arora, DS; Chandra, P.** 2011. Antioxidant Activity of *Aspergillus fumigatus*. *ISRN Pharmacology*. 2011;2011:619395.
7. **Barthelemy GC. Cornago RP.; Esteban SS.; Gálvez, MMM.** 2013. La química de la vida cotidiana. Uned Cuadernos. Edición digital 188-190.
8. **Benedict RG. Brandy LR.** Antimicrobial activity of mushroom metabolites. 1972. *J. Pharm* 61: 1820-1822.
9. **Bérdy, J.** 2005. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)*. 2005 Jan;58(1):1-26.
10. **Bertelsen, CD.** 2013. Mushroom: A Global History. Reaktion Books, London, UK.
11. **Beug, AM; E. Bessette: Arleen, RB.** 2014. Ascomycete Fungi of North America: A Mushroom Reference Guide. University of Texas Press. USA.
12. **Beyer, W.** Manual de química orgánica. 1987. Ed. Reverte. 684. España.
13. **Brand-Williams, W; Cuvelier, ME; Berset, C.** 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology* 1995; 28:25-30.
14. **Campbell, R.** 2007. Biología, séptima edición. Ed. Panamericana. Pp 613. Madrid, España.
15. **Chang, R.** 2010. Química. 10a Ed. Mc Graw Hill. México.
16. **Ching-yu H.** 2013. Evaluation of antioxidant properties of some commercially available culinary and medicinal mushrooms from Taiwan. Newcastle University. United Kingdom.

- 17. Chun, E; Han, CK; Yoon, JH; Sim, TB; Kim, YK; Lee, KY.** 2005. Novel inhibitors targeted to methionine aminopeptidase 2 (MetAP2) strongly inhibit the growth of cancers in xenografted nude model. *International Journal of Cancer* 114, 124–130.
- 18. Cole, GT.** 1996. Basic Biology of Fungi. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8099/>.
- 19. Contreras, RA; Consuelo, CC; Irene, G; Ulises, I.** 2007. La sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- 20. Córdova-Villalobos, JA; JA Barriguet-Meléndez; A. Lara-Esqueda; S. Barquera; M. Rosas-Peralta; M. Hernández-Ávila; ME de León-May; CA Aguilar-Salinas.** 2008. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud Pública Méx* 2008; Vol. 50(5):419-427.
- 21. Cruces, BC.** 1998. Electroforesis capilar. Ed. Universidad de Almería. 124-130. España.
- 22. Curran, MP; Keating, GM.** 2005. Mycophenolate sodium delayed release: prevention of renal transplant rejection. *Drugs* 65, 799–805.
- 23. Darkes, MJM. Plosker, GL.** 2002. Cefditoren pivoxil. *Drugs* 62, 319–336.
- 24. De Diego, CF.** 2011. Hongos medicinales. Ed. Mundi-Prensa. 14-15. México.
- 25. Dugan, FM.** 2008. Fungi in the Ancient World: How Mushrooms, Mildews, Molds, and Yeast Shaped the Early Civilizations of Europe, the Mediterranean, and the Near East. American Phytopathological Society.
- 26. Fersain, AT; Sigrifedo, SE.** 2001. Produccion Casera de Hongos Comestibles. IICA. Bogotá, Colombia.
- 27. Florey HW, Chain W, Heatley NG.** 1949 Antibiotic . London , Oxford University Press, 1949.
- 28. Frattarelli, DAC; Reed, MD; Giacoia, GP; Aranda, JV.** 2004. .Antifungals in systemic neonatal candidiasis. *Drugs* 64, 949–968.

- 29. García, CV.** 2004. Introducción a la microbiología. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Costa Rica.
- 30. Gazzerro, P. y col.** 2012. Pharmacological Actions of Statins: A Critical Appraisal in the Management of Cancer. *Pharmacol Rev* 64: 102–146.
- 31. Geissman, TC.** 1973. Principios de química orgánica Ed. Reverte 872. España.
- 32. González, AJ; Mendoza, MC; Tello, JC.** 2004. Microorganismos patógenos trans-mitidos por semilla de judía tipo granja asturiana. Saneamiento de semilla. Ed. SERIDA/KRK, Oviedo, 160.
- 33. Guzmán, G.** 1998a. Análisis cualitativo y cuantitativo de la diversidad de los hongos en México (Ensayo sobre el inventario fúngico del país). In a diversidad biológica de Iberoamérica II, G. Halffter (ed.). *Acta Zoológica Mexicana*, nueva serie vol. Especial, CYTED e Instituto de Ecología, Xalapa. p. 111-175.
- 34. Guzmán, G.** 1998b. Inventorying the fungi of Mexico. *Biodiversity and Conservation* 7:369-384.
- 35. Guzmán, G.** 2008. Diversity and use of traditional mexican fungi. A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 10: 209-217.
- 36. Guzmán, GG; Mata, D; Salmenes, C; Soto-Velazco, L; Guzmán-Dávalos.** 1993. El cultivo de los hongos comestibles, con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales. I. P. N. México, D. F., 245.
- 37. Harris, SD.** 2008. "Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems". *Mycologia* 100 (6): 823–832. doi:10.3852/08-177. PMID 19202837.
- 38. Harvey, D.** 2002, Química Analítica Moderna, Madrid: Mc Graw Hill / Interamericana de España s.a., 570 pgs.
- 39. Hawksworth, DL.** 2001. The magnitude of fungal diversity: 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105:1422-1432.
- 40. Hawksworth, DL.** 2004. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies in Mycology* 50, 9–18.
- 41. Hawksworth, DL.** 2006. "The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation". *Mycological Research* 95 (6): 641–655. doi:10.1016/S0953-7562(09)80810-1.

- 42. Hernandez, PJM.** 2005. Cromatografía líquida de alta eficacia. Ed cont lab cli; 8: 49-62.
- 43. Hibbett y col.** 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. mycological research 111 (2007) 509–547.
- 44. Jair, DGj.** 2010. Plantas tóxicas de importancia en salud y producción animal en Colombia. Ed. Universidad Nacional de Colombia. 159-160.
- 45. Joshi, DD.** 2012. Herbal Drugs and Fingerprints: Evidence Based Herbal Drugs. Springer India.
- 46. Kavanagh, K.** 2005. Fungi: Biology and Applications. John Wiley. England.
- 47. Kendrick, B.** 1992. The Fifth Kingdom. Focus Information. UK.
- 48. Kennedy, OR; Thornes, RD.** 1997. Coumarins. Biology, applications and mode of action, John Wiley and Sons: Chichester, England.
- 49. Le, CT; Burgaud, G; Mahé, S; Barbier, G; Vandenkoornhuyse P.** 2009. Fungal diversity in deep-sea hydrothermal ecosystems. Appl Environ Microbiol 75: 6415–6421.
- 50. Lewin B.** 1994. Genes. Segunda edición. Ed. Reverte, S. A. 695-696. España.
- 51. Li YL. y col.** 2015. The endophytic fungi of *Salvia miltiorrhiza* Bge.f.alba are a potential source of natural antioxidants. Botanical Studies 56:5.
- 52. Lorenzo, FP; A. Moreno; I. Lizasoain, JC., MA. Moro; A. Portoles.** 2008. Farmacología básica y clínica. 18ª. Edición. Panamericana. Argentina.
- 53. Marcano, D; Hasegawa, M.** 2002. Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Caracas, Venezuela.
- 54. Martínez-Flórez, SJ; González-Gallego; JM. Culebras y MJ. Tuñón.** 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp. XVII (6) 271-278.
- 55. Mata, G; R. Gaitán-Hernández; D. Salmenes.** 2007. Hongos comestibles en México, una industria en crecimiento. (Eds) Zulueta Rodríguez, Ramón; Trejo Aguilar, Dora; Trigos Landa, Angel. En: EL MARAVILLOSO MUNDO DE LOS HONGOS. Universidad Veracruzana. Xalapa. México.
- 56. Mauri, A; Llobat, M; Herráez, R.** 2010. Laboratorio de análisis instrumental. Ed. Universidad de Valencia. 52. España.

- 57. Mayett, Y; D. Martínez-Carrera; M. Sánchez; A. Macías; S. Mora; A. Estrada.** 2006. Consumption trends of edible mushrooms in developing countries: the case of Mexico. *Journal of International Food and Agribusiness Marketing* 18: 151-176.
- 58. McMorris, TC; Kelner MJ. Wang, W; Yu, J; Estes LA; Taetle R.** 1996. (Hydroxymethyl) acylfulvene: an illudin derivative with superior antitumour properties. *Journal of Natural Products* 59, 896–899.
- 59. McNair, HM; Miller, JM.** 1998. *Basic Gas Chromatography*. Canada: John Wiley & Sons, Inc.
- 60. Mitchell, AM. Strobel, GA; Hess, WM; Vargas, PN; Ezra, D.** 2008. *Muscodor crispans*, a novel endophyte from *Ananas ananassoides* in the Bolivian Amazon. *Fungal Diversity* 31: 37-43.
- 61. Montoya, VHH.** 2008. *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Universidad de Antioquia. Colombia.
- 62. Nagaraj, K; N. Mallikarjun; Raja Naika; Venugopal TM.** 2014. Antioxidative activities of wild macro fungi *ganoderma applanatum* (pers.) Pat. *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 7, Suppl2, 2014,166-171.
- 63. Ocampo, CR; Amalia, RVL; Betancur, JLA; Ocampo, SDM.** 2008. Curso práctico de química orgánica, enfocada a biología y alimentos. Primera Edición 53-54.
- 64. Ojala, T.** 2001. *Biological Screening of Plant Coumarins*. PhD Thesis, University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- 65. Oliva, VR; Taboada, VM.** 2006. *Genoma humano: nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento*. Universidad de Barcelona. España.
- 66. Oliva, VR; Vidal TJM.** 2006. *Genoma humano nuevos avances en la investigación, diagnóstico y tratamiento* Ed. Universidad de Barcelona. 69-70 p.
- 67. Palomino, MC.** 2012. Estudio fitoquímico y farmacológico de la planta *Solanum cervantesii* Lag., recolectada en el área natural protegida del Centro de Educación Ambiental Yautlita. Tesis de Licenciatura UACM, México D.F.
- 68. Panaccione, DG., Beaulieu, WT., Cook, D.** 2014. Bioactive alkaloids in vertically transmitted fungal endophytes. *Functional Ecology* 28:299-314.

69. **Parra, BF.** 2013. Estudio farmacológico de las plantas, cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*), chaparro amargo (*Castela erecta ssp.*), gobernadora (*Larrea tridentata (dc) cav*), guarumbo (*Cecropia obtusifolia bertol*), guazima (*Ulmifolia Lam.*), empleadas para el tratamiento de la diabetes en el mercado de sonora. Tesis UACM. México.
70. **Peláez, F.** 2005. Biological activities of fungal metabolites. In: Handbook of Industrial Mycology (An Z., ed.): 49–92. Marcel Dekker, New York, USA.
71. **Pengelly, A.** 1996. The constituents of Medicinal Plants. 2nd Ed. Cabi Publishing, U. K.
72. **Peralta, GS; RC. Aarland; MGC. Lara; MEJ; Lara; MEJ. Alberto.** 2013. Toxicity analysis, phytochemical and pharmacological study of the plant known as mora herb, collected at the environmental education center of yautlica (CEA-Yautlica). Asian J. Plant Sci., 12: 159-164.
72. **Primo, YE.** 2007. Química orgánica básica y aplicada, de la molécula a la industria. Tomo II. Ed. Reverte. 915. España.
73. **Punja, ZK.** 1985. The Biology, Ecology, and Control of *Sclerotium Rolfsh*. Annual Review of Phytopathology. Vol. 23: 97-127.
74. **Raghukumar, C; Raghukumar, S.** 1998. Barotolerance of fungi iso-lated from deep-sea sediments of the Indian Ocean. Aqua Microb Ecol. 15:153–163.
75. **Rebolo, LS.** 2007. Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con D.O.: Ribeiro, Valdeorras y Ribeira Sacra. Front Cover. Univ Santiago de Compostela.
76. **Remington.** 2003. Farmacia.19ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos. Aires. Argentina.Tomo I.
77. **Ringuelet, JA; Viña, SZ.** 2013. Introducción a los productos naturales vegetales. Productos Naturales Vegetales. Lugar: La Plata.
78. **Rubinson, JF; Robinson, KA.** 2000. Química analítica contemporánea. Editorial PHH. España.
79. **Ruíz, GLE.** 2014. Evaluación de la toxicidad de algunos Basidiomycetes del estado de Jalisco sobre *Artemia franciscana*. Tesis Universidad de Guadalajara. México.
80. **Ruíz, HJ.** 2001. El asombroso reino de los hongos. Revista Avance y Perspectiva vol. 20. Sep-Oct.

81. **Ruíz, HJ.** 2013. Viaje al asombroso mundo de los hongos. Fondo de Cultura Económica. México.
82. **Schreier, P.** 1984. Chromatographic studies of biogenesis of plant volatiles, Ed. Hüthig-Verlag, Heidelberg, pp. 35,171.
83. **Schultes, RE; Hofmann, A.** 1979. *Plantas de los Dioses: Orígenes del Uso de Alucinógenos*. New York: McGraw-Hill.
84. **Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C.** 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413–1421.
85. **Scott, LJ. Curran, MP. Figgitt, DP.** 2004. Rosuvastatin: a review of its use in the management of dyslipidemia. *American Journal of Cardiovascular Drugs* 4, 117-138.
86. **Selim, KA. EL-beih, AA. AbdEl-Ranman, TM. EL-Diwany, AI.** 2012. Biology of endophytic fungi. *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.* 2:31-82.
87. **Sharapin, N. Pinzón, RS.** 2000. *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*, Santafé de Bogotá.
88. **Shoji, JY. Arioka, M. Kitamoto, K.** 2006. Vacuolar membrane dynamics in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot Cell.* 2006 Feb; 5(2):411-21.
89. **Sierra-Palacios E.** 2005. Construcción de un cósmido para la clonación y expresión de genes fúngicos. Tesis maestría. UAM-Iztapalapa. México.
90. **Singleton, V.L; Rossi, J. A. Jr.** 1965. Colorimetry of total phenolics with reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965, 16, 144-158.
91. **Smith, IM.** 1992. *Corticium rolfsii*. P: 574. En: *Manual de enfermedades de las plantas*. Smith, I. M., Dunez, J., Phillips, D. M., Lelliott, R.A. y Arche, S.A. (Eds) Ed. Mundi-Prensa, Madrid. España.
92. **Sorgeloos, P.** 1982. Curso *Artemia sp.* en la investigación, la enseñanza y la acuicultura (com. pers.). UAM-Xochimilco, 1982.
93. **Stadler, M; Keller, NP.** 2008. Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. *Mycological Research* 112: 127-130.
94. **Stockinger, H; Krüger, M; Schüßler, A.** 2010. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. Volume 187, Issue 2, pages 461–474, July 2010.

- 95. Stuart, B.** 2004. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications John Wiley & Sons
- Suryanarayanan, TS; Hawksworth, DL. 2005. Fungi from little explored and extreme habitats. In: Biodiversity of Fungi; Their Role in Human Life. (Deshmukh SK, Rai MK, eds.): 33–48. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India.
- 96. Suryanarayanan, TS; Thirunavukkarasu, N; Govindarajulu, MB; Sasse F; Jansen, R; Murali, TS.** 2009. Fungal endophytes and bioprospecting. Fungal Biology Reviews 23: 9–19.
- 97. Tarqui, CNI.** 2012. Implementación de un sistema de código de barras para la sistematización del cepario de hongos del lab. De biotecnología industrial. Tesis IPN. México.
- 98. Tello, JC; Del Moral, J.** 1995. Enfermedades no víricas del tomate. Pp: 523-563. En: Cultivo del tomate. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- 99. Vaupotic, T; P. Veranic; U. Petrovic; N. Gunde-Cimerman. A. Plemenitas.** 2008. HMG-CoA reductase is regulated by environmental salinity and its activity is essential for halotolerance in halophilic fungi. Stud. Mycol., 61: 61-66.
- 100. Wachtel-Galor, S. Yuen, J. Buswell, JA, Benzie IFF.** 2011. *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi): A Medicinal Mushroom. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; 2011. Chapter 9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92757/>.
- 101. Wainwright, M.** 2008. Some highlights in the history of fungi in medicine – A personal journey. Fungal Biology Reviews. Volume 22, Issues 3–4, August–November 2008, Pages 97–102.
- 102. Walton, HF; Reyes, J.** 2005. Análisis químico e instrumental moderno. Ed. Reverté. España.
- 103. Wasser, SP.** 2011. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89:1323-1332.
- 104. Yadav, M; Yadav, A; Yadav, JP.** 2014. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. Asian Pac J Trop Med. 2014 Sep; 7S1:S256-61. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60242-X.

- 105. Yap, HYY., Aziz, AA., Fung, SY., Ng, ST., Tan, CS., Tan, NH.** 2014. Energy and Nutritional Composition of Tiger Milk Mushroom (*Lignosus tigris* Chon S. Tan) Sclerotia and the Antioxidant Activity of Its Extracts. International Journal of Medical Sciences, 11(6), 602–607. <http://doi.org/10.7150/ijms.8341>.
- 106. Yap, HYY., Tan, N., Fung, S., Aziz, AA., Tan, C. Ng, S.** 2013. Nutrient composition, antioxidant properties, and anti-proliferative activity of *Lignosus rhinocerus* Cooke sclerotium. J. Sci. Food Agric., 93: 2945–2952. doi: 10.1002/jsfa.6121

Páginas electrónicas consultadas:

1. <http://www.serida.org/pdfs/5362.pdf> 16/09/14
2. <http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/sclerotium-rolfsii> Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de plagas 30/09/14
3. <https://www.cenam.mx/sm2010/info/carteles/sm2010-c38.pdf> 01/10/2014.
4. <http://www.jove.com/pdf/2565/jove-protocol-2565-nanodrop-microvolume-quantitation-of-nucleic-acids?language=Spanish> NanoDrop microvolumen La cuantificación de ácidos nucleicos 2/09/2015
5. <http://www.bdigital.unal.edu.co/3791/1/197498.2010.pdf> 04/09/2015
6. <http://www.reviberoammicol.com/1998-15/069074.pdf> 04/09/2015

13. ANEXOS

Anexo A. Reactivos, materiales y equipo

1. Reactivos

Reactivo	Marca
Hidróxido de sodio	Técnica Química
Agar Dextrosa y Papa (PDA)	BD Bioxon
Agarosa LE Analítica grade	Promega
Buffer de fosfatos salinos	Sigma
Buffer de referencia de pH	Sigma
Carbonato anhídrido de sodio	JB Beiker
Metanol industrial	HPLC Química
Cloruro de aluminio	JB Beiker
Acetato de potasio	Sigma
Dextrosa	Meyer
DPPH	Sigma
Dragendorff	Sigma
Extracto de malta	AMRESCO
Folin-Ciocalteu	Sigma
Gel red	Biotium
Grenetina comercial	Soriana
Sal de mar	Gal aquarium
Sal de mesa	La fina
Acetona industrial	HPLC Química
Etanol industrial	HPLC Química
Acetato de etilo	HPLC Química
TAE 50X	Biorad
TLC silica gel 60 F254	Merck

2. Materiales

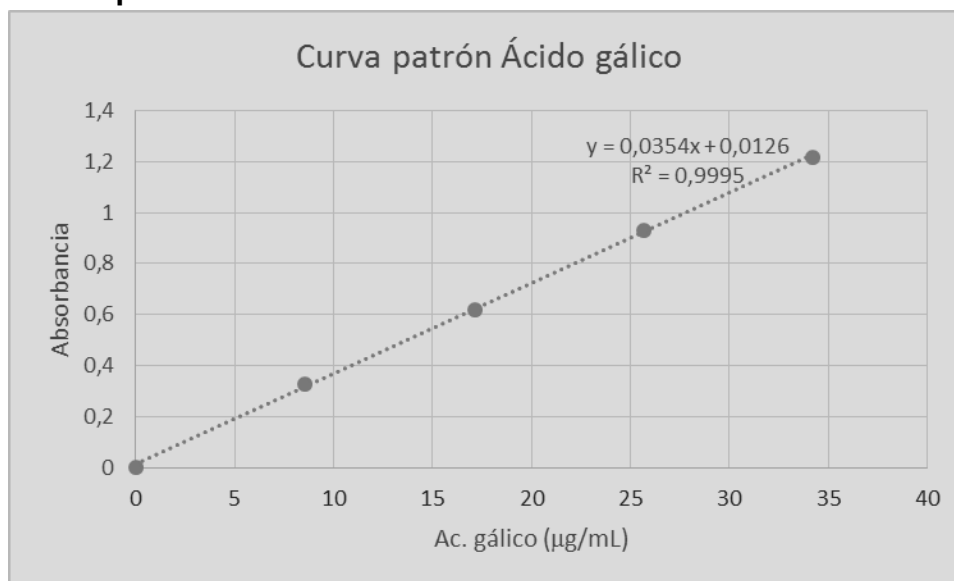
Material	Marca
Agitador magnético	Proveedor científico
Algodón	Soriana
Cajas Petri desechables (100x 15)	Proveedor científico
Capilar de vidrio	Ppernse
Celda de espectrofotómetro	Brand
Charolas de polietileno	Corning
Papel filtro	Proveedor científico
Cristalizador 150 x 75	Kimax
Espátula	Corning
Frascos ámbar de vidrio	America
Gradillas de plástico	Axygen
Guantes de látex	Proveedor científico
Multi-source genomic DNA Kit	Axygen-Bioselec
Manguera flexible	Corning
Matraz de vidrio de 205 ml a 1 L	Kimax
Mortero	Brand
Papel aluminio	Reynolds Wrap
Paraflim	M Pechiney
Perlas de vidrio	Pyrex
Piceta	Brand
Pinzas para tubo de ensayo	Pyrex
Tubos falcon	Axygen
Tubos de microcentrífuga 0.5, 1.5 2 ml	Neptune
Tubos de PCR	Neptune
Micropipetas P2, P20, P1000	RAININ Mabnet
Probeta graduada de 10 ml a 1 L	Corning
Frasco de vidrio	America
Termómetro 100 T°	Brannan
Tubos de ensayo	Pyrex
Vaso precipitado de 250 ml a 1 L	kimax
Viales de 15 ml	America
Papa blanca natural	Soriana
Quistes de artemia	eclosion azul

3. Equipo

Equipo	Marca
Auto calve vertical	Yamato SM200
Rotovapor R3	BUCHI
Baño ultrasónico 5.7	Lab. Companion Jeiotech
Bascula analítica	Adventurer OAAVS
Bascula	Camry
Bomba de aire	Elite
Vortex	Lab-net
Cámara de electroforesis	Galileo Biocience
Campada de extracción	VECO
Campana flujo laminar	VECO
Minicentrífuga	Lab-net
Congelador 20.6 FT3 de -12 a -20	Sanyo
Incubadora	Felisa
Espectrofotómetro 6705	uv/ Jenwey
Fuete de poder para electroforesis	Lab net
Horno de microondas	Mabe
Lámpara UVM-57	ENTE LA
Licuadaora	American
Microcentrifuga	Thermo
Parrilla de agitación	Thermo scientific
Potenciometro	OAKTOWph/mv/°c metre
Refrigerador	Mabe
Fotodocumentador	Multi Doc UVP
Thermoblok	mcr brybath
Termociclador	Axygen

Anexo B. Cálculos de fenoles totales

I. Curva patrón



Conc. A. Gálico (µg/mL)	Absorbancia			Promedio
0	0	0	0	0
8,56	0,362	0,31	0,319	0,330
17,12	0,623	0,622	0,619	0,621
25,68	0,927	0,924	0,934	0,928
34,24	1,217	1,229	1,208	1,218
	Conc. Gálico (µg/mL)	Promedio Abs		
	0	0		
	8,56	0,330		
	17,12	0,621		
	25,68	0,928		
	34,24	1,218		

II. Fenoles del extracto etanólico de *Sclerotium rolfsii* Sacc cultivado en medio papa-dextrosa

Abs	x= (y-b)/a	en 200 µL	µg A.G. presente en 1 ml de extracto	Mg A.G. presente en 1 ml de extracto	Promedio: 0.079
0.582	16.08	16.08	80.4	0.080	Desvest : 0.048 Cv: 8.62
0.517	14.45	14.25	71.25	0.071	
0.611	16.90	16.90	84.5	0.085	

III. Fenoles del caldo de cultivo papa-dextrosa de *Sclerotium rolfsii* Sacc

			µg A.G. presente en 1 ml de extracto	Mg A.G. presente en 1 ml de extracto	Promedio: 0.093
Abs	$x = (y-b)/a$	en 200 µL			Desvest: 0.026
0.656	18.18	18.18	90.90	0.0909	
0.655	18.15	18.15	90.75	0.09075	
0.701	19.45	19.45	97.25	0.09725	Cv: 3.98

**IV. Fenoles del extracto etanólico *Sclerotium rolfsii* Sacc
cultivado en medio extracto de malta**

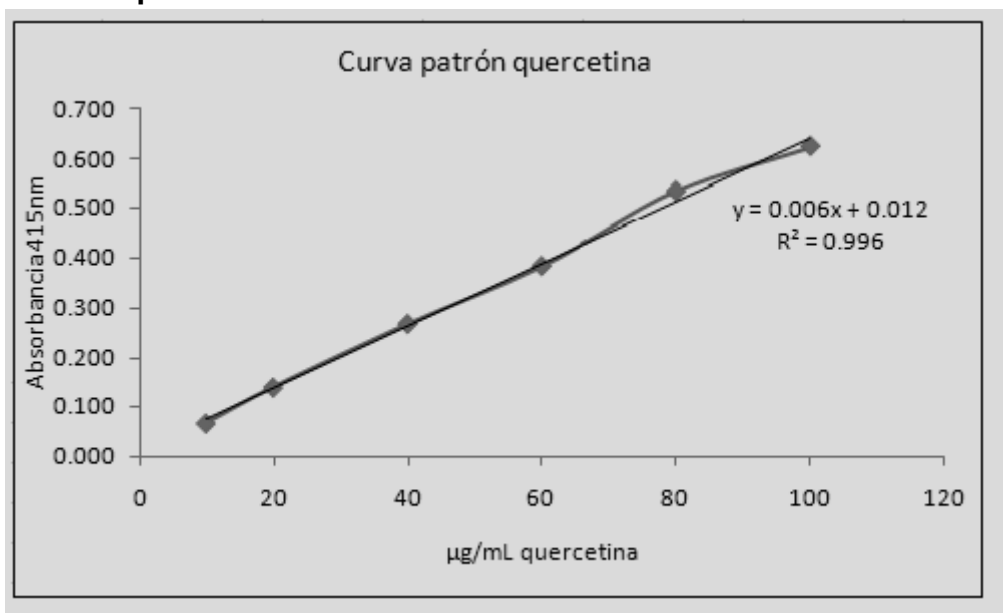
			µg A.G. presente en 1 ml de extracto	Mg A.G. presente en 1 ml de extracto	Promedio: 0.069
Abs	$x = (y-b)/a$	en 200 µL			Desvest: 0.027
0.516	14.22	14.22	71.1	0.071	
0.469	12.89	12.89	64.45	0.064	
0.514	14.46	14.46	70.8	0.071	Cv: 5.45

V. Fenoles del caldo de cultivo extracto de malta de *Sclerotium rolfsii* Sacc

			µg A.G. presente en 1 ml de extracto	Mg A.G. presente en 1 ml de extracto	Promedio: 0.064
Abs	$x = (y-b)/a$	en 200 µL			Desvest: 0.064
0.529	14.59	14.59	72.95	0.073	
0.469	12.89	12.89	64.45	0.064	
0.402	11.0	11	55	0.055	Cv: 13.97

Anexo C. Cálculos de Flavonoides totales

I. Curva patrón



Querc (µg/mL)	Absorbancia		
10	0.056	0.07	0.076
20	0.133	0.138	0.149
40	0.267	0.27	0.268
60	0.379	0.385	0.391
80	0.534	0.528	0.544
100	0.604	0.649	0.618

II. Flavonoides del extracto etanólico *Sclerotium rolfsii* Sacc cultivado en medio papa-dextrosa

Abs	X= (Y-b)/a	X fact. de dil. (en 500 µL)	µg quercetina presente en 1 mL extracto	mg quercetina present. en 1 mL extracto	Promedio 0.187
					Cv: 2.330%
0.606	94.6	94.4	188.7646	0.189	Desviación 0.0043589
0.609	95.1	94.9	189.71599	0.190	
0.584	91.1	90.9	181.78774	0.182	

III. Flavonoides del extracto etanólico *Sclerotium rolfsii* Sacc cultivado en medio extracto de malta

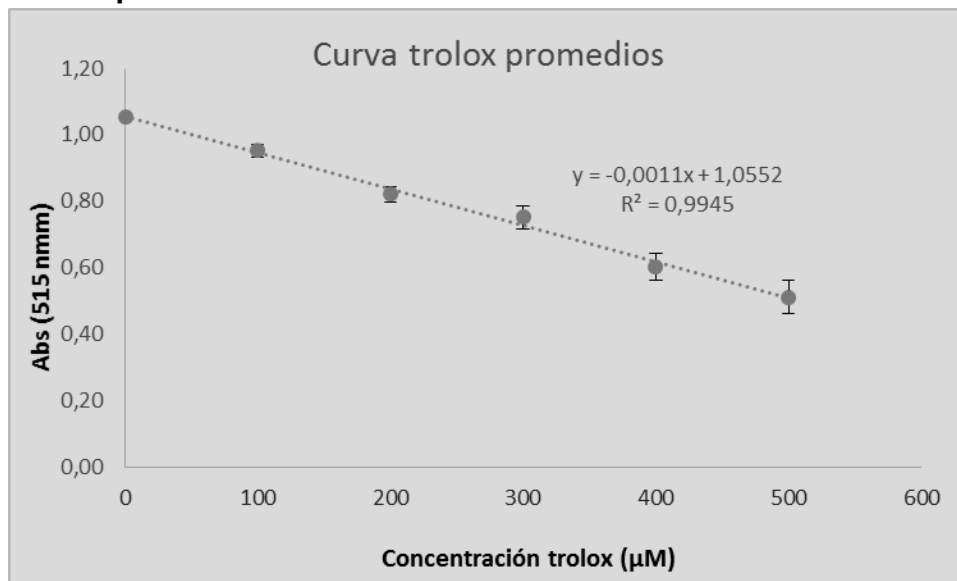
Abs	$X = (Y - b)/a$	X fact. de dil. (en 500 µL)	µg quercetina present. en 1 mL extrac.	mg quercetina present. en 1 mL extracto	Promedio 0.183 Cv: 5.783%
0.612	95.6	95.3	190.66738	0.191	Desviación 0.01058301
0.601	93.8	93.6	187.17895	0.187	
0.551	85.9	85.7	171.32245	0.171	

IV. Flavonoides del caldo de cultivo extracto de malta de *Sclerotium rolfsii* Sacc

Abs	$X = (Y - b)/a$	X fact. de dil. (en 500 µL)	µg quercetina present. en 1 mL extrac.	mg quercetina present. en 1 mL extracto	promedio 0.2 Cv : 1.0%
0.647	101.2	100.9	201.76693	0.202	Desviación 0.002
0.64	100.0	99.8	199.54702	0.200	
0.636	99.4	99.1	198.2785	0.198	

Anexo D. Cálculos de la capacidad antioxidante (DPPH) en dos distintos medios de cultivo

I. Curva patrón



µM trolox	Abs		
0	1.056	1.055	1.045
100	0.974	0.94	0.944
200	0.848	0.815	0.803
300	0.784	0.758	0.715
400	0.645	0.598	0.563
500	0.568	0.493	0.474

II. Capacidad antioxidante del extracto etanólico de *Sclerotium rolfsii* Sacc cultivado en medio papa-dextrosa

Abs	$X=(Y-B)/a$		Promedio de trolox µM/ml	Desvest
0.623	0.4322	392.91	351.70	0.087
0.613	0.4422	402.00		
0.769	0.2862	260.18		

III. Capacidad antioxidante del caldo de cultivo papa-dextrosa de *Sclerotium rolfsii* Sacc

Abs	$X=(Y-B)/a$		Promedio de trolox µM/ml	Desvest
0.708	0.3472	315.64	318.061	0.003
0.706	0.3492	317.45		
.0702	0.3532	321.09		

IV. Capacidad antioxidante del extracto etanólico de *Sclerotium rolfsii* Sacc en medio de cultivo extracto de malta

Abs	$X=(Y-B)/a$		Promedio de trolox $\mu\text{M/ml}$	Desvest
0.691	0.3642	331.0909	325.94	0.015
0.685	0.3702	336.5455		
0.714	0.3412	310.1818		

V. Capacidad antioxidante del caldo de cultivo extracto de malta de *Sclerotium rolfsii* Sacc

Abs	$X=(Y-B)/a$		Promedio de trolox $\mu\text{M/ml}$	Desvest
0.672	0.3832	348.36	302.000	0.053
0.72	0.3352	304.73		
0.777	0.2782	252.91		

Anexo E. Datos de toxicidad *in vitro* del modelo de *Artemia salina*

I. Extracto etanólico <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc cultivado en medio papa dextrosa					
Tubo	N° Vivos	Tubo	N° Vivos	Tubo	N° Vivos
B1	9	1.1	9	2.1	10
B2	9	1.2	9	2.2	9
B3	10	1.3	8	2.3	9
B4	10	1.4	8	2.4	10
B5	10	1.5	10	2.5	10
Total	48		44		48

II. Caldo de cultivo del medio papa-dextrosa					
Tubo	N° Vivos	Tubo	N° Vivos	Tubo	N° Vivos
B1	9	1.1	9	2.1	9
B2	9	1.2	8	2.2	9
B3	9	1.3	7	2.3	8
B4	10	1.4	9	2.4	8
B5	9	1.5	9	2.5	9
Total	46		42		43

III. Extracto etanólico <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc cultivado en medio extracto de malta					
Tubo	N° Vivos	Tubo	N° Vivos	Tubo	N° Vivos
B1	9	1.1	9	2.1	9
B2	10	1.2	9	2.2	8
B3	10	1.3	10	2.3	9
B4	9	1.4	9	2.4	9
B5	10	1.5	10	2.5	9
Total	48		47		44

IV. Caldo de cultivo extracto de malta					
Tubo	N° Vivos	Tubo	N° Vivos	Tubo	N° Vivos
B1	9	1.1	9	2.1	9
B2	10	1.2	9	2.2	8
B3	10	1.3	10	2.3	9
B4	9	1.4	9	2.4	9
B5	10	1.5	10	2.5	9
Total	48		47		44

Anexo F. Constancia del congreso de micología

