

**ESTUDIO FITOQUÍMICO
Y EVALUACIÓN
DEL EFECTO
ANTIAGREGANTE
DE LOS EXTRACTOS
ACUOSOS Y ETANOLICO
DEL HONGO *Amanita
muscaria***

Itzel Patricia Vásquez-Martínez

Centro de Investigación Facultad de
Medicina UNAM-UABJO, Facultad de
Medicina y Cirugía UABJO, Oaxaca City,
México

ORCID: 0000-0001-6598-1143

Luis Ángel Laguna-Barrios

Centro de Investigación Facultad de
Medicina UNAM-UABJO, Facultad de
Medicina y Cirugía UABJO, Oaxaca City,
México

ORCID: 0000-0002-1710-0679

Laura Pérez-Campos Mayoral

Centro de Investigación Facultad de
Medicina UNAM-UABJO, Facultad de
Medicina y Cirugía UABJO, Oaxaca City,
México

ORCID: 0000-0003-4140-4661

María del Socorro Pina-Canseco

Centro de Investigación Facultad de
Medicina UNAM-UABJO, Facultad de
Medicina y Cirugía UABJO, Oaxaca City,
México

ORCID: 0000-0002-9486-5093

All content in this magazine is
licensed under a Creative Com-
mons Attribution License. Attri-
bution-Non-Commercial-Non-
Derivatives 4.0 International (CC
BY-NC-ND 4.0).



Eduardo Pérez-Campos

Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Oaxaca, Oaxaca City, México
ORCID: 0000-0001-6720-7952

Eduardo Pérez-Campos Mayoral

Centro de Investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO, Facultad de Medicina y Cirugía UABJO, Oaxaca City, México
ORCID: 0000-0002-6032-7609

Carlos Alberto Matias-Cervantes

CONACyT, Facultad de Medicina y Cirugía UABJO, Oaxaca City, México
ORCID: 0000-0002-3476-1743

Juan Alpuche-Osorno

Centro de Investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO, Facultad de Medicina y Cirugía UABJO, Oaxaca City, México
ORCID: 0000-0002-8532-6717

María Teresa Hernández-Huerta

CONACyT, Facultad de Medicina y Cirugía UABJO, Oaxaca City, México
ORCID: 0000-0003-2182-2540

Resumen: *Amanita muscaria* es el hongo enteógeno más antiguo usado por el hombre como alucinógeno, su ingestión produce al inicio intoxicación gástrica seguida de alteraciones nerviosas con percepción de alucinaciones y en dosis elevadas produce coma. El objetivo de este trabajo fue realizar identificar los metabolitos secundarios y evaluar el efecto antiagregante de los extractos acuoso y etanólico de *Amanita muscaria* sobre plaquetas. Se realizó una marcha fitoquímica para identificar la presencia en el extracto de alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, glicósidos cardiotónicos,

sesquiterpenlactonas y quinonas. Posteriormente, para evaluar el efecto sobre la función plaquetaria, se seleccionaron 15 sujetos con índice de masa corporal normal (18.5-24.9 kg/m², bajo riesgo cardiovascular), sin enfermedad aparente y con edades entre 22 y 44 años, y por punción venosa se realizó la extracción de 10 mL de sangre. La muestra de sangre fue centrifugada para obtener Plasma Rico en Plaquetas y centrifugadas con buffer CGS-EDTA para obtener solo plaquetas. La respuesta de agregación plaquetaria se midió utilizando 80,000 plaquetas y 3µg/µL de los extractos, como agonistas control se emplearon trombina y Adenosín difosfato. El tamizaje fitoquímico mostró la presencia de alcaloides, saponinas, taninos, sesquiterpenlactonas y quinonas, mientras que en los ensayos de agregación plaquetaria se observó que los extractos de *Amanita muscaria* son capaces de inhibir la agregación plaquetaria inducida por Adenosín difosfato y trombina en un 50% y 25%, respectivamente. En conclusión, este trabajo muestra la presencia de metabolitos activos con potencial de antiagregantes plaquetarios, lo que podría representar un problema en caso de producirse intoxicación por *Amanita muscaria*, sin embargo, esta actividad antiagregante podría ser utilizada para la obtención de compuestos utilizados para prevenir la formación de trombos en situaciones de riesgo de episodios obstructivos coronarios y cerebrales, cirugía vascular o diálisis.

Palabras clave: Plaquetas, antiagregante, intoxicación, eventos adversos cardiovasculares.

INTRODUCCIÓN

Los hongos, microscópicos o macroscópicos, cumplen una función determinante en los ecosistemas al participar como descomponedores de materia orgánica, además de otras aplicaciones para

el ser humano. El interés por los hongos macroscópicos (también conocidos como macromicetos o macrohongos) ha aumentado en los últimos años por su faceta culinaria, sus actividades biológicas y por su gran potencial como fuente de metabolitos secundarios. No obstante, se desconocen las propiedades de muchos macromicetos porque la gran mayoría de estudios se enfocan hacia las especies más abundantes o aquellas relacionadas con algún caso de intoxicación (Ruiz et al., 2017).

Por su gran número de especies y endemismos, México ocupa el quinto lugar en el mundo contando con el 10% de la diversidad terrestre. De acuerdo con (Guzmán, 1998)), se calcula que en México existen más de 200 000 especies de hongos, de los cuáles se estiman que se conocen 4500 especies de macromicetos. Oaxaca es el estado con mayor riqueza biocultural de México y se cree que hay más de 2500 especies de hongos macroscópicos (Bautista & Aguilar, 2019).

En México y particularmente en Oaxaca aún predomina la antigua tradición de recolectar y consumir hongos silvestres, sin embargo, hay algunos que poseen sustancias tóxicas al ser consumidos y que pueden provocar desde un simple cuadro gastrointestinal hasta la muerte. Al conjunto de síntomas provocados por la ingesta de este tipo de hongos se le denomina micetismo. Aunque no se conoce el total de hongos tóxicos se estima que existen alrededor de 100 especies tóxicas o sospechosas de toxicidad, principalmente especies del género *Amanita* (Ramírez & Aranda, 2019).

Dentro de las especies más conocidas, podemos mencionar a *Amanita muscaria*, caracterizada por un sombrero rojo recubierto de verrugas blancas, esta especie contiene derivados isoxazólicos (ácido iboténico y muscimol) que producen efectos sobre el sistema nervioso central, principalmente. Los síntomas que se conocen incluyen náuseas,

vómito, sensación de embriaguez, mareos, distorsiones visuales, auditivas, entre otros. De igual manera, se cuentan con escasos reportes de compuestos con antecedentes de efectos en la coagulación, por ende, en el presente trabajo se evaluó el efecto de *Amanita muscaria* sobre la agregación plaquetaria inducida por adenosín difosfato y trombina, y se identificaron las posibles familias de metabolitos responsables.

MATERIAL Y MÉTODOS

RECOLECCIÓN DE MUESTRA

Los ejemplares del hongo *Amanita muscaria* fueron recolectados el día 29 de julio del 2019 en la localidad de San Antonio Cuajimoloyas (longitud -96.4523000 y latitud 17.1189300), Oaxaca. Se lavaron para eliminar restos de tierra y posteriormente se deshidrataron en un secador convectivo a 50° C durante 6 horas. Las muestras se almacenaron en bolsas plásticas y a su vez en un contenedor hermético.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Se prepararon dos extractos, acuoso y etanólico, a partir de 0.5 g de muestra con 50 mL de agua destilada y etanol 96°, respectivamente. Se llevaron a agitación durante 24 horas, y posteriormente se utilizó para realizar el tamizaje fitoquímico y ensayo cromatográfico. Para los ensayos de agregación plaquetaria, se evaporó el solvente en baño María y se reconstituyeron en Buffer Fosfato Salino pH 7.4 para obtener una concentración final de 1 mg/mL.

TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico se realizó siguiendo la metodología de Domínguez, 1988 para identificar 9 familias de metabolitos (alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, glicósidos cardiotónicos, sesquiterpenlactonas y quinonas).

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA Y BIDIMENSIONAL

Se utilizaron placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Millipore), y los sistemas de fase móvil (acetato de etilo-acetona 80:20 v/v, hexano-acetato de etilo en proporciones 75:25 y 90:10 v/v). La identificación de metabolitos fue a 254 y 365 nm utilizando la lámpara UVP UVGL-58 (Analytikjena) y como reveladores se utilizó Vainillina-Ácido sulfúrico (saponinas), Citrobórico, Borntrager (flavonoides), Hidróxido de Potasio (derivados antracénicos), Dragendorff Modificación Munier (alcaloides) y Cloruro férrico-ferrocianuro de potasio (fenoles).

PRUEBAS DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA

Se seleccionaron 15 sujetos aparentemente sanos, entre 22 y 44 años, con IMC entre 19.6 y 29.3 Kg/m², que no presentaran enfermedades aparentes ni consumo de medicamentos o alcohol en las últimas 48 horas, y en el caso de las mujeres, que no estuvieran en su periodo menstrual.

Las muestras de sangre obtenidas mediante punción venosa fueron recolectadas en tubos con anticoagulante ACD (ácido cítrico, citrato de sodio, dextrosa). Para los ensayos con ADP, se separó el plasma rico mediante centrifugación lenta (900 rpm) durante 12 minutos, y plasma pobre en plaquetas por centrifugación rápida (1800 rpm) durante 5 minutos. En cuanto a los ensayos con trombina, se utilizaron plaquetas lavadas con CGS-EDTA (citrato de sodio, cloruro de sodio, EDTA sódico, dextrosa anhidra) y CGS (citrato de sodio, dextrosa anhidra, cloruro de sodio). Se realizó el conteo celular y se ajustó a 200 000 y 80 000 plaquetas para cada técnica respectivamente.

Se evaluaron diferentes concentraciones de Adenosin difosfato (0.58, 1.17 y 2.34 μ M), de Trombina (1U) y de los extractos de

Amanita muscaria (3 μ g/ μ L). Los ensayos se llevaron a cabo manteniendo la temperatura a 37° C utilizando el agregómetro Chrono-log, los agonistas se añadieron a los 30 segundos de iniciada la agregación y el tiempo de ejecución fue de 8 minutos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó la prueba *t* para datos no pareados de dos colas, con un intervalo de confianza al 99% utilizando el software GraphPad Prism 5.02. El valor de $p < 0.001$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

En el tamizaje fitoquímico se identificaron familias de metabolitos como: alcaloides, saponinas, taninos, sesquiterpenlactonas (acuoso) y quinonas. Asimismo, mediante cromatografía en capa fina y bidimensional utilizando reveladores se pudieron identificar flavonoides, saponinas y cumarinas.

Para confirmar la presencia de los metabolitos secundarios en los extractos de *Amanita muscaria* se utilizó la cromatografía de capa fina, la cual se basa en la diferencia de la velocidad de migración de cada uno de los componentes a través de la fase estacionaria, arrastrada por la fase móvil. Se utilizaron diferentes reveladores, obteniéndose las siguientes cromatografía con el extracto acuoso (Figura 1) y el extracto etanólico (Figura 2).

AGREGACIÓN PLAQUETARIA

El plasma rico en plaquetas se utilizó para evaluar el efecto sobre adenosin difosfato, mientras que las plaquetas se utilizaron para evaluar el efecto sobre trombina, en ambos casos se utilizó el extracto de *Amanita muscaria* antes de agregar los agonistas.

Familia de metabolitos secundarios	Extracto acuoso	Extracto etanólico	Actividades biológicas relacionadas con homeostasia
Alcaloides */**	+/-	+/-	Antihipertensiva, antiarrítmica.
Saponinas */**	+/+	+/+	Hemolítica, antiagregante plaquetario.
Taninos/Fenoles */**	+/-	+/-	Hemostáticos, antihemorrágicos.
Sesquiterpenlactonas*	-	+	
Quinonas*	+	+	
Flavonoides**	-	+	Antihemorrágicos, antiarrítmicos.
Cumarinas */**	+/-	-/-	Anticoagulante

*Tamizaje fitoquímico, ** Cromatografía en capa fina.

Tabla 1. Metabolitos secundarios identificados en *Amanita muscaria*.

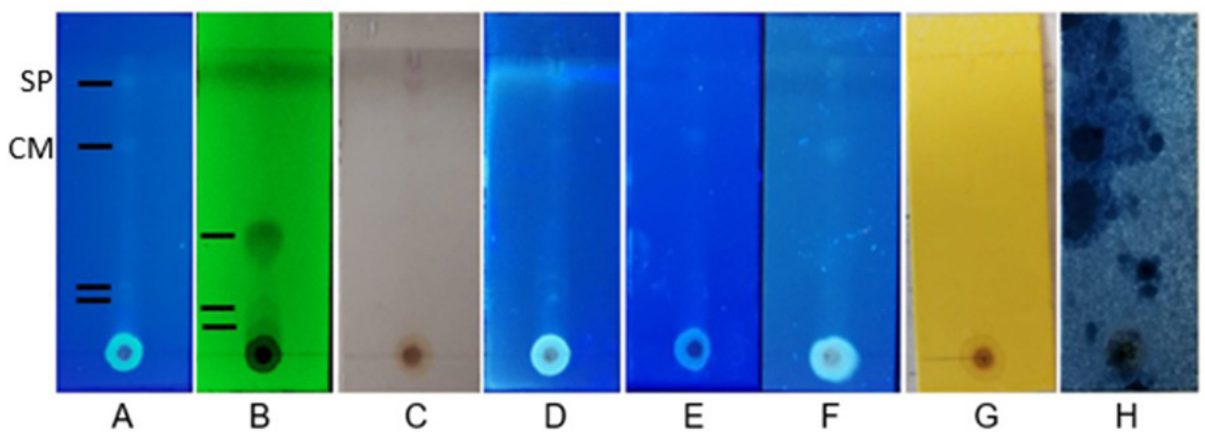


Figura 1. Cromatografía de Capa Fina del extracto acuoso. A) Control 365 nm, B) Control 254 nm, C) Saponinas (SP), D) Flavonoides, E) Derivados antracénicos, F) Cumarinas (CM), G) Alcaloides, H) Fenoles.

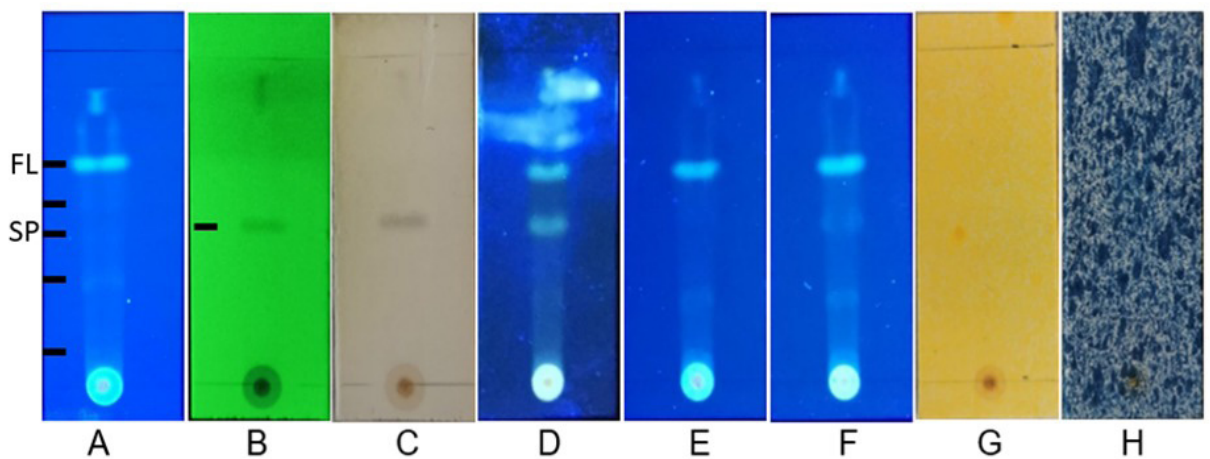


Figura 2. Cromatografía de Capa Fina del extracto etanólico. A) Control 365 nm, B) Control 254 nm, C) Saponinas (SP), D) Flavonoides, E) Derivados antracénicos, F) Cumarinas (CM), G) Alcaloides, H) Fenoles.

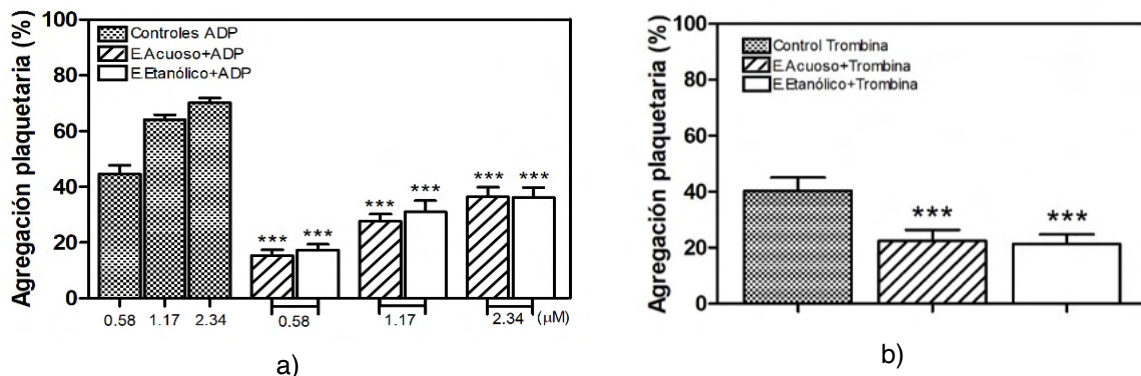


Figura 3. Efecto de los extractos de *Amanita muscaria* sobre la agregación plaquetaria inducida con a) ADP (0.58, 1.17 y 2.34 μM) y b) Trombina (1U) expresada como porcentaje (±DE n=20). *** $p < 0.0001$ comparado con los controles.

Ambos extractos (acuoso y etanólico) causaron una inhibición de la agregación plaquetaria inducida por ADP y trombina, siendo más marcada en los ensayos con ADP.

DISCUSIÓN

La activación de las plaquetas conduce a muchos eventos incluyendo cambios morfológicos, adhesión, secreción y agregación plaquetaria, además de sus funciones fisiológicas, desempeñan un papel crucial en la patogénesis de algunas enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial, aterosclerosis (Kurrelmeyer et al., 2003) y eventos isquémicos (Fateh-Moghadam et al., 2007).

Este estudio destaca las propiedades antiplaquetarias de *Amanita muscaria*, se demostró que los extractos acuoso y etanólico de dicho hongo inhibieron la agregación plaquetaria inducida tanto por ADP como por trombina de una manera dependiente.

Por sí solos, los extractos favorecieron la agregación plaquetaria en porcentajes similares, 27% el acuoso y 28% el etanólico, sin embargo, fueron capaces de disminuir la agregación inducida por ADP y trombina en más del 50%, lo cual sugiere que *Amanita muscaria* podría actuar sobre algunos

mediadores vinculados con las vías de señalización de ADP y trombina, tales como los receptores P2Y1, P2Y12, PAR1 y PAR4.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los reportados en otras especies de hongos, como *Auricularia polytricha* (Yoon et al., 2003), *Ganoderma lucidum* (Wang et al., 1991), *Lentinus edodes* (Tiratana et al., 1992) y *Amanita phalloides*, que de igual manera presentaron efectos antiagregantes.

Por otra parte, el tamizaje fitoquímico y cromatográfica arrojó la presencia de alcaloides, saponinas de tipo triterpenoide, fenoles, quinonas y cumarinas. Estos resultados son similares a los reportados por Rey y Vargas (2009), quienes, mediante cromatografía en capa fina evaluaron extractos de *A. muscaria* con éter de petróleo y diclorometano, identificando terpenoides, cumarinas, flavonoides y glicósidos cardiotónicos.

El efecto antiagregante de *Amanita muscaria* podría atribuirse a los metabolitos presentes en ella, como saponinas, taninos, cumarinas y glicósidos cardiotónicos, los cuales ya han sido reportados con efectos sobre la hemostasia (Friedman et al., 1977) (Wollny et al., 1999) (Jeon et al (2015) (Lei

et al., 2015) (Olas et al., 2020) (Schoner & Scheiner-Bobis, 2007).

CONCLUSIÓN

En conclusión, en este trabajo se demostró que los extractos etanólico y acuoso de *Amanita muscaria* ejercen efecto de antiagregante plaquetario. Los componentes de *Amanita muscaria* pueden interaccionar con alguno de los mediadores vinculados con las vías de señalización proagregantes de Adenosin difosfato o trombina, sin embargo, para confirmar esto se deben de realizar más estudios para caracterizar e identificar cada uno de los principios activos y sus mecanismos de acción. La presencia de metabolitos activos con potencial de antiagregantes plaquetarios podría representar un problema en caso de producirse intoxicación por *Amanita muscaria*, sin embargo, esta actividad antiagregante demuestra potencial para la obtención de compuestos utilizados para prevenir la formación de trombos en situaciones de riesgo de episodios obstructivos coronarios y cerebrales, cirugía vascular o diálisis.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (634257) y al Centro de Investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO por el soporte del trabajo. Los autores también agradecen al C. Ofelio Méndez Hernández, Biólogo Héctor Aguilar Reyes y al Dr. Juan Rodríguez Ramírez (Laboratorio de Tecnología Agroalimentaria, CIIDIR IPN Oaxaca) por su asesoramiento en la recolección, identificación y secado de *Amanita muscaria*.

REFERENCIAS

- Bautista, B., & Aguilar, H. (2019). **Los hongos en Oaxaca**. Edición especial(87), 66-67.
- Fateh-Moghadam, S., Htun, P., Tomandl, B., Sander, D., Stellos, K., Geisler, T., Langer, H., Walton, K., Handschu, R., Garlich, C., Daniel, W. G., & Gawaz, M. (2007). **Hyperresponsiveness of platelets in ischemic stroke**. *Thrombosis and Haemostasis*, 97(6), 974-978.
- Friedman, P. A., Rosenberg, R. D., Hauschka, P. V., & Fitz-James, A. (1977). **A spectrum of partially carboxylated prothrombins in the plasmas of coumarin-treated patients**. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 494(1), 271-276. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(77\)90155-6](https://doi.org/10.1016/0005-2795(77)90155-6)
- Guzmán. (1998). **Inventario de los hongos de México**. 7, 369-384.
- Jeon, B. R., Kim, S. J., Hong, S. B., Park, H.-J., Cho, J. Y., & Rhee, M. H. (2015). **The inhibitory mechanism of crude saponin fraction from Korean Red Ginseng in collagen-induced platelet aggregation**. *Journal of Ginseng Research*, 39(3), 279-285. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2015.02.001>
- Kurrelmeyer, K., Becker, L., Becker, D., Yanek, L., Goldschmidt-Clermont, P., & Bray, P. F. (2003). **Platelet hyperreactivity in women from families with premature atherosclerosis**. *Journal of the American Medical Women's Association (1972)*, 58(4), 272-277.
- Lei, L., Xue, Y., Liu, Z., Peng, S., He, Y., Zhang, Y., Fang, R., Wang, J., Luo, Z., Yao, G., Zhang, J., Zhang, G., Song, H., & Zhang, Y. (2015). **Coumarin derivatives from *Ainsliaea fragrans* and their anticoagulant activity**. *Scientific Reports*, 5, 13544. <https://doi.org/10.1038/srep13544>
- Olas, B., Urbańska, K., & Bryś, M. (2020). **Saponins as Modulators of the Blood Coagulation System and Perspectives Regarding Their Use in the Prevention of Venous Thromboembolic Incidents**. *Molecules*, 25(21), 5171. <https://doi.org/10.3390/molecules25215171>
- Ramírez, A., & Aranda, B. (2019). **Los hongos tóxicos en México**. Edición especial(87), 74-77.
- Rey, D., & Vargas, C. (2009). **Caracterización química y evaluación de actividad antifúngica de extractos de *Amanita muscaria***. Pontificia Universidad Javeriana.
- Ruiz, L. E., Vázquez, J. A., Vega, F., Guzmán, L., & Guerrero, S. R. (2017). **Evaluación del efecto tóxico de hongos Basidiomycota en la eclosión de quistes de *Artemia franciscana***. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(4), 220-224. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.03.007>
- Schoner, W., & Scheiner-Bobis, G. (2007). **Endogenous and exogenous cardiac glycosides: Their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth**. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 293(2), C509-536. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00098.2007>
- Tiratana, T., Rachanee, S., & Triratana, S. (1992). **Effects of *Lentinus edodes* extracts on platelet aggregation**. 6(1), 1-6.
- Wang, C. N., Chen, J. C., Shiao, M. S., & Wang, C. T. (1991). **The inhibition of human platelet function by ganodermic acids**. *Biochemical Journal*, 277(Pt 1), 189-197.
- Wollny, T., Aiello, L., Di Tommaso, D., Bellavia, V., Rotilio, D., Donati, M. B., de Gaetano, G., & Iacoviello, L. (1999). **Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: A role for increased nitric oxide production**. *British Journal of Pharmacology*, 127(3), 747-755. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702586>
- Yoon, S.-J., Yu, M.-A., Pyun, Y.-R., Hwang, J.-K., Chu, D.-C., Juneja, L. R., & Mourão, P. A. S. (2003). **The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin**. *Thrombosis Research*, 112(3), 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2003.10.022>