

ESTUDIO DE *AMANITA PORPHYRIA* Y *A. BRUNNESCENS* DE LA SECCION *MAPPÆ* EN MEXICO*

Por Regla María Aroche**
Evangelina Pérez-Silva**
y Pablo Fuentes***

STUDY OF *AMANITA PORPHYRIA* AND *A. BRUNNESCENS* OF THE SECTION *MAPPÆ* IN MEXICO

SUMMARY

A chemotaxonomic study on *Amanita porphyria* and *A. brunnescens* is presented supporting the identification of these species withing Section *Mappæ* of *Amanita* (Agaricales) in Mexico. Information was obtained from herbarium specimens deposited in MEXU and FCME. On the basis of our results, we propose further alternatives on research of these species.

RESUMEN

Se presentan los estudios quimiotaconómicos que apoyan la identificación de *Amanita porphyria* y *A. brunnescens* en la Sección *Mappæ* del género *Amanita* (Agaricales) en México. La información se obtuvo de material herborizado y depositado en los Herbarios MEXU y FCME. Con base en los resultados obtenidos, se plantean las alternativas futuras sobre la investigación de estas especies.

INTRODUCCION

Las especies ubicadas dentro de la Sección *Phalloidæ* y *Mappæ* (Singer, 1975) han sido estudiadas quimiotaconómicamente, con el objetivo de apoyar por un lado, su ubi-

* Parte de este trabajo se presentó en el III Congreso Latinoamericano de Botánica, Lima, Perú.

** Laboratorio de Micología, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM, México, D.F. 04510.

*** Laboratorio de Patología de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales, Iztacala, UNAM.

cación taxonómica y por otro, para caracterizar su potencial tóxico (Tyler y Groger, 1964; Willand y Faulstich, 1978 y Stijve, 1979). En la actualidad se ha precisado mediante estos estudios, que las especies con características taxonómicas típicas de la Sección *Phalloidiae* pueden contener de forma más o menos variable ciclopéptidos tóxicos: amanitinas y faloidinas (Yocum y Simmons, 1977 y Andary *et al.*, 1979); sustancias que no se van a registrar en las especies de la Sección *Mappae*, en las cuales se presentan derivados de la triptamina, incluyendo a la bufotenina (Andary *et al.*, 1978a) y/o algunas otras moléculas indólicas cuya estructura química se desconoce (Lincoff, 1977).

En México, la Sección *Mappae* se encuentra representada por tres especies: *Amanita brunnescens* Atk., *A. citrina* (Schaeff.) Pers. y *A. porphyria* (A. & S.) Secr. Por otra parte, *A. brunnescens* Atk. ha sido citada por Pérez-Silva *et al.* (1970) y por Guzmán (1977) como una especie tóxica, por lo que se consideró en este estudio. *A. citrina* (Schaeff.) Pers., fue registrada para la micoflora mexicana por Pérez-Silva y Aroche (1980). Aroche y Pérez-Silva (1982) registraron *A. porphyria* (A. & S.) Secr. en la micoflora mexicana, utilizando los mismos criterios y la metodología realizada para el registro de *A. citrina*.

Con fundamento en lo anterior y con la intención de ofrecer en forma integral los criterios quimiotaconómicos utilizados previamente para la Sección *Mappae*, se presentan los estudios realizados con *A. brunnescens* y *A. porphyria*, mediante el análisis cromatográfico y de bioensayo.

MATERIALES Y METODOS

Para el análisis de las características microscópicas de las especies estudiadas, se utilizaron cortes de láminas obtenidos mediante las técnicas convencionales. Los cortes fueron examinados utilizando además de la solución de Melzer y lactofenol con azul algodón, con KOH al 5% y con agua amoniacal al 5% para hidratar el material.

El registro de los derivados triptamínicos se realizó mediante la prueba de Meixner de acuerdo con Beutler y Vergeer (1980), con la cual fragmentos de 10-20 mg del tejido seco de cada carpóforo fueron extraídos con 50 μ l de metanol, presionando con una varilla de vidrio, evaporando, colocando nuevamente 20 μ l del mismo solvente para finalmente aplicar 10 μ l en un fragmento de papel sin impresiones (Gaceta UNAM). Previo secado de la mancha, se aplicó 0.05 μ l de ácido clorhídrico concentrado en el centro de la mancha.

Para la prueba macroquímica de Andary *et al.* (1978b), se utilizaron dos reactivos: (a) solución de ácido sulfanílico al 5% (p/v) en ácido clorhídrico 2N, (b) solución de nitrito de sodio al 5% en agua destilada. Se colocaron de 10-20 mg del tejido seco de cada carpóforo en 2 ml de una solución de acetato de sodio al 15% en agua destilada. Se agitó y pasados dos o tres minutos se adicionaron cuatro gotas del reactivo (a) y cuatro del reactivo (b), se agitó momentáneamente.

Cuando se trabajó con material fresco, se colocaron sobre el píleo, dos gotas de la solución (a) y pasados dos minutos de la solución (b). Con el objetivo de verificar la validez de esta prueba, para el registro cualitativo de la bufotenina, fueron seleccionadas para ser utilizadas como muestras testigos, dos especies que poseen ciclopeptidos tóxicos: *A. virosa* (MEXU 12464) y *A. bisporigera* (MEXU 7327); así como también una especie comestible: *A. caesarea* (MEXU 16858), que no presenta ciclopéptidos.

La cromatografía para el registro de los derivados de la triptamina; particularmente bufotenina, se realizó con base en la metodología utilizada por Pérez-Silva y Aroche (1980). La extracción metanólica se realizó con 300-500 mg del tejido seco de cada carπόforo en un aparato Soxhlet; la concentración en baño María, la cromatografía de los extractos investigados, del estándar de monooxalato de bufotenina (Sigma B 8757) y de los extractos obtenidos del material de E.U.A. y de Europa fueron revelados con cinaaldeído y vapores de ácido clorhídrico concentrado.

El material estudiado se encuentra depositado en el Herbario Nacional del Instituto de Biología (*A. porphyria*, MEXU 13895; MEXU 16831), Herbario de la Facultad de Ciencias (*A. porphyria*, FCME 913. *A. brunnescens*, FCME 280; FCME 282) y Herbario Virginia Polytechnic Institute (*A. brunneceus*, OKM 16948).

Con el objeto de conocer los efectos producidos por estas especies, y por otro lado, confirmar los resultados obtenidos de su evaluación taxonómica y química, se realizó el protocolo farmacológico preliminar de Malone y Robichaud (1962). Los extractos crudos carentes de metanol, fueron inyectados por vía intraperitoneal con un vehículo acuoso de agar (Difco 0140-01) al 0.25% en un volumen constante de dosis de 5 ml/Kg. Se utilizaron lotes de 5 ratones (Cepa Winster) cada uno para probar dos dosis máximas (100 mg/Kg) y dos dosis mínimas (10 mg/Kg) de cada uno de los extractos de *A. porphyria* y de *A. brunnescens*; se utilizó un ratón como testigo. Un total de 10 extractos fueron investigados. Los ratones tratados fueron marcados con una solución de ácido pícrico al 0.5% en etanol al 70%.

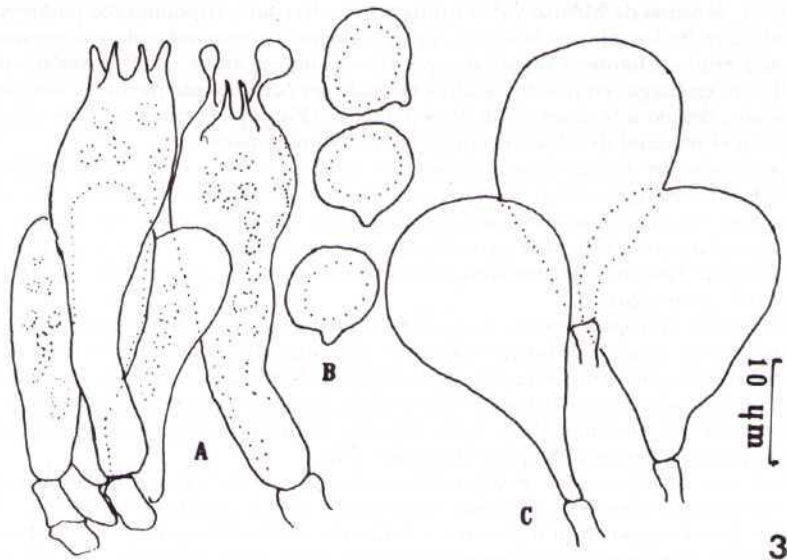
Las observaciones *in vivo* se realizaron a los 5, 10, 15, 30 y 60 minutos; 2, 4, 6, 12 y 24 horas; y 2, 4, y 7 días después de la inoculación. Después del séptimo día se realizó la necropsia sacrificando a los animales por decerebración craneovertebral, extirpándose el hígado, los riñones y excepcionalmente estómago, intestino; bazo, pulmón, corazón y cerebro. Anotando las características macroscópicas para la correlación anatomoclínicas, se realizó el estudio histopatológico con la técnica de inclusión en parafina y tinción de hematoxilina y eosina. Se evaluó el efecto de los extractos estudiados por comparación con los resultados obtenidos en la histopatología de los animales testigos.

RESULTADOS

Amanita porphyria (Fr.) Secr., *Mycographie Suisse*, 1983. In Pomerleau. 1966. Figs. 1-3.

Pfleo de 4-7 cm de diámetro, convexo, después extendido, subviscoso, de color moreno grisáceo, con tonalidad violácea en el centro, cubierto con restos de volva de color grisáceo. Láminas blancas, libres, numerosas, ventricosas. Estípites de 80-90 × 6-7 mm, cilíndrico, hueco, blanco grisáceo, terminado en un bulbo de 18 mm, protegido por la volva. Anillo membranáceo, de borde irregular, blanco grisáceo, frágil. Carne blanca. Olor a rábano. Esporada blanquecina. Esporas de 8.5 — 10.2 μm de diámetro, esféricas, lisas, apéndice hilar visible, amiloideas, con un glóbulo de grasa. Basidios de 38-40 × 8-10 μm, claviformes, tetrasporados. Células del velo esféricas.

Hábitat y distribución: Solitaria, en bosques mixtos de *Quercus* - *Pinus* - *Liquidambar*, en suelos arcillosos cubiertos por humus. Conocida solamente de Hidalgo.



Figs. 1-3.- *Amanita porphyria* (Fr.) Secr. 1.- Carpóforos en su hábitat natural, se observan restos de velo universal y volva. 2.- Carpóforo mostrando himenio y anillo delicado. 3.- A. Basidios. B. Esporas. C. Pelos marginales $\times 100$.

Importancia: Especie de poca frecuencia, considerada en la bibliografía como comestible mediocre, tanto por su sabor desagradable como por su poca carnosidad. Fácil de reconocer y diferenciar de *A. citrina*, por su color gris en el borde, con tonalidades violáceas en el centro del píleo, así como por la presencia de restos de velo en el mismo.

ESTUDIO QUIMICO

La prueba de Meixner realizada tanto con los extractos crudos de *A. porphyria* como en los obtenidos por microextracción de 10-20 mg del tejido seco de cada carpóforo, registró un gradiente de colores que va del rojo-púrpura-azul-gris; correspondiente a la presencia de diversos derivados de la triptamina, entre los cuales se localiza a la bufotenina en el púrpura. *A. brunnescens* fue negativa en esta prueba. La prueba macroquímica de Andary *et al.* (1978), reveló constantemente tanto en el procedimiento para el material seco como fresco de *A. porphyria* de México (MEXU 13895) y de Europa (MEXU 16831), una coloración rojo-dorada, la cual varía en intensidad en relación directa a la concentración de la bufotenina presente en cada carpóforo. Las muestras utilizadas como testigos (*A. virosa*, MEXU 12464; *A. bisporigera*, MEXU 7327 y *A. caesarea* MEXU 16858) fueron negativas al igual que *A. brunnescens* de México y de E.U.A. (FCME 280; FCME 282 y OKM 16948).

El análisis cromatográfico confirmó la presencia de bufotenina en todos los ejemplares de *A. porphyria* de México y de Europa. Otros derivados triptamínicos pudieron ser visualizados en las mismas muestras, probablemente correspondiendo a la serotonina y/o al 5-hidroxitriptofano registrados por otros autores (Stijve, 1979 y Andary *et al.*, 1978); sin embargo, en nuestro análisis no pudo ser corroborado mediante este procedimiento, debido a la ausencia de los estándares (Fig. 4). *A. brunnescens* fue negativa tanto en el material de México como en el de Norte América.

La evaluación farmacológica preliminar utilizando el protocolo de Malone y Robichaud (1962), reveló en todos los animales tratados con los extractos crudos de *A. brunnescens* un incremento de su actividad motora y de su curiosidad, durante los siete días de tratamiento. Este incremento fue notable entre los 5 a 15 minutos después de la inoculación. Los animales tratados con los extractos de *A. porphyria* se comportaron igual que los testigos.

Durante la necropsia practicada a todos los animales, no se identificaron daños macroscópicos en ninguna de las vísceras tanto en los experimentales como en los testigos. El análisis histopatológico se realizó por cortes seriados de las muestras de *A. porphyria* y de *A. brunnescens* a dosis máximas, en las cuales se identificó congestión glomerular, medular y cortical en riñón (Figs. 5-6); tumefacción turbia, degeneración vacuolar e incremento de células de Kupffer en hígado (Fig. 7).

Todas las muestras de *A. porphyria* se consideraron nefrotóxicas y hepatotóxicas ya que mostraron cariorrexis, cariólisis, tumefacción turbia, esteatosis de gota fina, congestión portal, regeneración positiva e infiltrado inflamatorio (Figs. 7-10). Para *A. brunnescens* las lesiones se consideran reversibles con base en la tumefacción turbia observada en el hígado en dosis mínima y máxima y en la normalidad de los riñones en las dosis mínimas y congestión renal en dosis máxima.

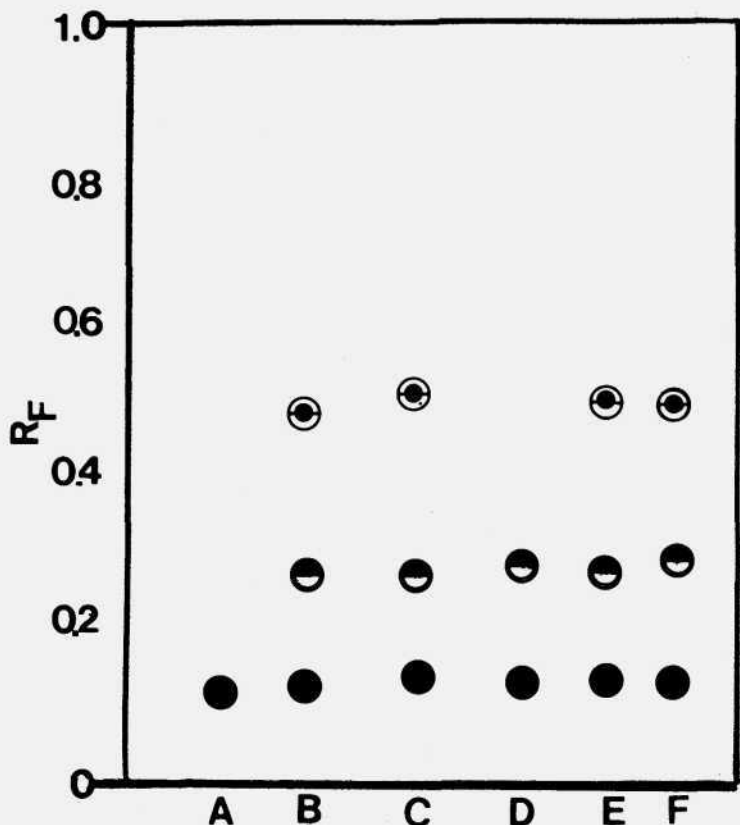
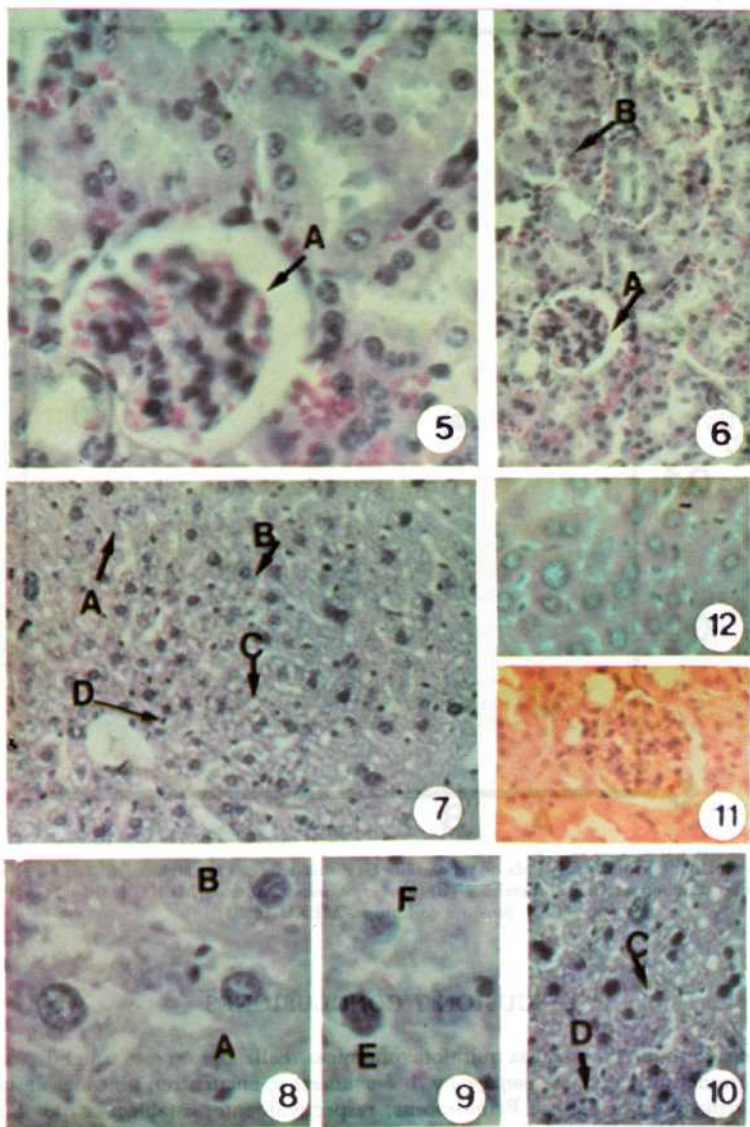


Fig. 4. Cromatografía en capa delgada de gel de sílice G. de los extractos metanólicos de *Amanita porphyria*. (A) Estándar de monooxalato de bufotenina. (B)-(E) *A. porphyria* de México. (MEXU 13895 y FCME 913). (F) *A. porphyria* de Europa (MEXU 16831).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Se considera que las pruebas quimiotaconómicas realizadas en este trabajo, apoyan de manera definitiva que *A. porphyria* y *A. brunnescens* se encuentren ubicadas en la Estirpe Citrina y en la Estirpe Brunnescens, respectivamente, establecidas por Singer (1975). Nuestros resultados demuestran que estas especies recolectadas en México, se comportan de forma similar a las citadas de E. U. A. y Europa, respecto a la presencia o ausencia de compuestos que determinan Estirpes dentro de la Sección *Mappaee*; así como también, con base en los resultados obtenidos en el análisis histopatológico, se determina que ambas especies deben ser consideradas sospechosas de toxicidad, como



Figs. 5-12. 5.- Congestión glomerular del riñón A, 400 \times . 6.- Congestión glomerular del riñón A y medular B. 160 \times . 7.- Tumefacción turbia del hígado A., degeneración vacuolar B., esteatosis de gota fina C, infiltrado inflamatorio D. 160 \times . 8.- Tumefacción turbia A., vacuolar B. 400 \times . 9.- Cariorrhexis E., Cariolysis F. 10.- Esteatosis gota fina C. Infiltrado inflamatorio D. 11.- Riñón normal. 12.- Hígado normal.

hasta la fecha han sido situadas para México (Pérez-Silva *et al.*, 1970) y para el extranjero (Lincoff, 1977 y Miller, 1980).

De lo anteriormente citado, se deduce que las alternativas futuras para la investigación de estas especies en México se relacionan con la obtención de datos cuantitativos que nos permitan precisar adecuadamente dicho potencial tóxico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Dr. O.K. Miller, Jr. y al Biól. J. Cifuentes, por haberles permitido utilizar el material de Herbario del Instituto Politécnico de Virginia (OKM) y de la Facultad de Ciencias de la UNAM (FCME), respectivamente. Al Dr. A. Peña, Director del Centro de Investigaciones en Fisiología Celular de la UNAM, por las facilidades brindadas. A los doctores G. Privat, C. Andary y E. Motte de la Facultad de Farmacia de Montpellier, Francia y al Dr. G. Guzmán, del Herbario ENCB, las facilidades para la consulta del material bibliográfico y de herbario.

LITERATURA CITADA

- Andary, C., G. Privat y J. P. Rascol, 1978a. Mise en évidence le dosage fluorodensitométrique des dérivés 5- hydroxyindoliques. Application au dosage de la sérotonine, de la bufoténine et du 5- hydroxytryptophane chez *Amanita citrina* Fr. ex Schaeef. *Trav. Soc. Pharm. Montpellier* 38: 247-256.
- _____, _____, J. J. Serrano y C. François, 1978b. *Champignons toxiques*. Collection de médecine légale et de toxicologie médicale. Ed. Masson. Paris, Francia. 43-54 pp.
- _____, _____, F. Enjalbert y B. Mandrou, 1979. Teneur comparative en amanitines de différentes Agaricales toxiques d'Europe. *Doc. Myc. X. Fasc. 37-38*: 61-70.
- Aroche, R. M. y E. Pérez-Silva, 1982. *Amanita porphyria* en la micoflora mexicana. Resumen, III Congreso latinoamericano de Botánica, Lima, Perú.
- Beutler, A. J. y P. P. Vergeer, 1980. Amanotoxins in Americans mushrooms: Evaluation of Meixner Test. *Mycologia* 72: 1142-1149.
- Guzmán, G., 1977. *Identificación de los hongos comestibles, venenosos y alucinantes*. Limusa, México, D.F. 235 p.
- Lincoff, G., 1977. *Toxic and Hallucinogenic Mushrooms Poisoning*. Va Nostrand Reinhold, New York. 267 p.
- Malone, M. H. y R. C. Robichaud, 1962. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia* 25: 320-332.
- Miller, O. K., 1980. *Mushrooms of North America*. Dutton. New York. 368 p. 482 f.
- Pérez-Silva, E., T. Herrera y G. Guzmán, 1970. Introducción al estudio de los macromicetos tóxicos de México. *Bol. Soc. Mex. Micol.* 4: 49-53.
- _____, y R. M. Aroche, 1980. Chromatographic and taxonomic evaluation of *Amanita citrina*. Abstract VII Inter. Symposium Natural Products Chemistry. Monterrey, N.L.
- Pomerleau, R., 1966. Les Amanites du Québec. *Nat. Can.* 93: 861-867.
- Singer, R., 1975. *The Agaricales in Modern Taxonomy*. Cramer, Weinheim, 912 pp.
- Stijve, t., 1979. Bufotenine concentrations in carpophores of *Amanita citrina* (Schaeef.) S. P. Gray. *Trav. Chim. Aliment. Hyg.* 70: 246-253.
- Tyler, V. E. y D. Groger, 1964. Investigation of the alkaloids of *Amanita* species II. *Amanita citrina* and *Amanita porphyria*. *Planta Med.* 12: 397-402.
- Willand T. y H. Faulstich 1978. Amatoxins, phallotoxins, phallolysin and antamanide: The biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. *C. R. C. Critical Reviews in Biochemistry* 5 (3), 185-260.
- Yocum, R. R. y D. M. Simoñs, Amatoxins and phallotoxins in *Amanita* species of the Northeastern United States. *Lloydia* 40: 178-190.