

EVALUACIÓN BIOLÓGICA Y FITOQUÍMICA DE CINCO HONGOS NATIVOS DE GUATEMALA

Por: Beatriz Medinilla, Sully Cruz, Gloria Navas, Lucía Arriaga, Osberth Morales, Roberto Cáceres

Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica

Departamento de Farmacología, Departamento de Microbiología

Universidad de San Carlos de Guatemala

El presente trabajo fue financiado por la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología, de la Vicepresidencia de la República de Guatemala. Tuvo por objeto generar información biológica y fitoquímica sobre cinco hongos nativos de Guatemala usados tradicionalmente como medicinales. Para su evaluación biológica se efectuaron ensayos para probar la sensibilidad y acción cicatrizante en ratas, dosis letal media en ratones, acción citotóxica contra *Artemia salina*, así como acción antimicrobiana *in vitro*. Ninguna de las infusiones de los hongos administradas diariamente durante cuatro semanas mostró signos de causar sensibilidad. Todos los ungüentos de los hongos mostraron significativa acción cicatrizante, en comparación con el grupo control negativo y el vehículo del fármaco de referencia. Ninguno de los hongos indujo muertes ni efecto tóxico, luego de su administración por vía oral, a dosis de 1 a 5 g/Kg de peso, por lo que no se pudo establecer la DL₅₀. Todos los hongos presentaron acción citotóxica contra *A. salina*, (CL₅₀ para *Boletus edulis*, *Calvatia cyathiformis*, *Ganoderma applanatum* y *Lycoperdon perlatum* es >0.1%), mientras que para *Pisolithus tinctorius* es >0.05%. *B. edulis*, *P. tinctorius* y *C. cyathiformis* presentaron actividad antimicrobiana contra *Cryptococcus neoformans* C13, hasta 1 mg/mL). La evaluación fitoquímica se efectuó mediante tamizaje preliminar, y luego pruebas más específicas mediante cromatografía en capa fina. Todos los hongos, excepto *C. cyathiformis*, presentaron metabolitos secundarios: *P. tinctorius* cumarinas, saponinas y sesquiterpen-lactonas, mientras que *G. applanatum*, *B. edulis* y *L. perlatum* saponinas. Tomando en cuenta los importantes datos encontrados, se recomienda continuar más a fondo el estudio de los hongos que dieron mejores resultados, para beneficio de la población guatemalteca.

INTRODUCCIÓN

Hasta ahora se han publicado muchos estudios sobre plantas medicinales de Guatemala. Sin embargo, la información científica sobre hongos nativos y su uso en terapéutica es sumamente escasa. Únicamente se cuenta con el conocimiento tradicional adquirido por los pueblos indígenas. El presente proyecto se realizó tomando en cuenta lo importante de iniciar los estudios que permitan validar científicamente las acciones farmacológicas atribuidas a hongos nativos. Se seleccionaron cinco especies con mayor probabilidad de presentar actividad biológica significativa, con el propósito de evaluar sus aspectos biológicos y fitoquímicos más relevantes: *Boletus edulis*, *Pisolithus tinctorius*, *Calvatia cyathiformis*, *Ganoderma applanatum* y *Lycoperdon perlatum*, que fueron sometidos a las siguientes pruebas farmacológicas *in vivo*: ensayo de sensibilidad y acción cicatrizante en ratas, dosis letal media en ratones, y citotoxicidad contra *Artemia salina*. También se evaluó su acción antimicrobiana-antilevadura, y a los extractos con actividad positiva se les determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Además se caracterizó sus metabolitos secundarios.

METODOLOGÍA

Procedencia de los hongos:

Se colectaron en las áreas de Chiantla y Todos Los Santos Cuchumatán, en Huehuetenango, Ixchiguán en San Marcos, Cuilapa y Barberena en Santa Rosa, Tukurú en Alta Verapaz y Poptún en Petén.

Descripción e identificación de hongos:

Se describieron las características macro y microscópicas, las cuales fueron comparadas con la bibliografía. Se deshidrataron a 65°C por tres días, se identificaron con el nombre, descripción, número de referencia, lugar y fecha de colecta. Ejemplares de los hongos fueron depositados en la Micoteca de Macrohongos de Guatemala "Lic. Rubén Mayorga Peralta", del Departamento de Microbiología de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Evaluación de la acción de sensibilidad:

Se utilizaron seis ratas albinas de la raza Wistar por lote, de alrededor de 250 g cada una. Se afeitaron y depilaron, en la parte dorso-lumbar (de la nuca a media espalda), tratando que la depilación no causara irritación ni herida. Se hizo una línea recta imaginaria sobre el área depilada, para dividir en dos. Del lado derecho se aplicó la infusión al 10% del hongo, y del lado izquierdo agua (control negativo). Las aplicaciones se hicieron diariamente, empapando un trozo de algodón ya sea con la infusión o con el hongo, tratando de cubrir toda el área depilada correspondiente. Las observaciones se hicieron cada 24 y 72 horas, y luego cada siete días, hasta cumplir cuatro semanas. Características a tomar en cuenta para la evaluación de los resultados: 0 = no irritación. 1 = irritación leve. 2 = irritación moderada. 3 = irritación e inflamación. 4 = irritación e inflamación grave (1).

Evaluación de la actividad cicatrizante:

Modelo experimental de heridas en rata: Emplear ratas Wistar, de entre 200 y 250 g de peso, organizadas en grupos de cuatro animales del mismo sexo, por lote. Anestesiarse a los animales con pentobarbital sódico (en dosis basadas según el peso). Rasurar la rata en la parte posterior del área dorso-lumbar. Realizar 4 incisiones poco profundas hasta producir un leve sangrado, procurando que sean del mismo tamaño, forma, y equidistantes entre sí. Levantar con pinzas un lado, hasta quitar el cuadrado completo, levantando la epidermis y dermis, sin afectar el músculo, de forma que deje un teji-

do blanquecino. Aplicar a las cuatro ratas el siguiente tratamiento: en el cuadro superior derecho aplicar el fármaco de referencia: Pasta Granúgena. En el cuadro inferior derecho, el vehículo utilizado en la formulación del fármaco de referencia. En el cuadro superior izquierdo, no aplicar nada (control negativo). En el cuadro inferior izquierdo aplicar el ungüento que contiene el hongo en estudio. Los cuatro tratamientos se realizaron diariamente, hasta completa cicatrización en la piel: caída completa de la costra. Parámetro a evaluar: total de días necesarios para ello.

Preparación del fármaco de referencia (Pasta Granúgena): mezclar 10 g de lanolina con 15 g de eugenol. Mezclar 20 g de óxido de zinc con 30 g de talco. Incorporar todo lo anterior, juntamente con 10 g de vaselina.

Preparación del vehículo (pasta sin componentes activos: eugenol + óxido de zinc): Mezclar 33.3 g de talco, 33.3g de lanolina y 33.3 g de vaselina.

Preparación del ungüento partir de cada hongo (en el que la infusión acuosa de éste sustituye a los componentes activos de la Pasta Granúgena): pesar 10 g de hongo seco y pulverizado, agregar 100 mL de agua hirviendo y dejar reposar hasta que enfríe. Mezclar 5 g de la infusión con 55 g de talco, 10 de lanolina y 30 g de vaselina (2, 3).

Evaluación de la dosis letal media (DL50):

Se utilizaron ratones de la misma edad y sexo, de entre 22 a 30 g de peso, que fueron sometidos a la misma alimentación.

Se usaron 5 animales por bloque. Los extractos acuosos de los hongos fueron administrados por vía orogástrica, a dosis de 1 a 5 g/Kg de peso. Se observaron a 1, 4, 8, 12, 48 y 72 horas durante 8 días, en busca de alguna alteración en el pelo y mucosas, anomalías en el sistema nervioso central y periférico, respiratorio, circulatorio, anormal actividad somatomotriz y del comportamiento, temblores, hipersialorrea (flujo excesivo de saliva), sudoración, cromodacriorrea (flujo lagrimal de color), o convulsiones (4).

Ensayo contra *Artemia salina* (camarón salino):

La prueba consiste en preparar un medio salino adecuado, colocar en él los huevos del crustáceo para su posterior eclosión. Transferir la mayor cantidad de nauplios a un erlenmeyer con medio salino fresco. Preparar para cada sustancia de prueba tres niveles de dilución (1000, 500 y 250 μ g) y colocar por triplicado en 9 pozos de la microplaca, haciendo un volumen por pozo de 100 μ L de solución a ensayar. Agregar a cada pozo 100 μ L de medio salino conteniendo de 10 a 15 nauplios y 100 μ L de medio salino. Usar 3 pozos como controles negativos. Prepararlos en forma similar, utilizando como sustancia de prueba el medio de disolución de los extractos. Luego de 24 horas se cuenta el número de sobrevivientes en cada dilución, del que por diferencia con el valor inicial, se calcula el número de decesos. La concentración letal media (CL50) se determina mediante regresión no paramétrica, con el programa Finney, Basic. Las larvas son sensibles a muchas sustancias de prueba, con lo que se determina la bioactividad de las mismas. Como prueba de pre-tamizaje resulta idónea, principalmente en cuanto a la búsqueda de sustancias antibióticas, citotóxicas, antimicrobianas y/o plaguicidas (5, 6, 7).

Tamizaje antimicrobiano y antilevadura:

La medición de esta actividad se hace por métodos de dilución, que sirve tanto para el tamizaje como para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), que se refiere a la más baja del antimicrobiano, en la que no hay crecimiento visible del microorganismo, en la placa de agar. El tamizaje antimicrobiano por dilución se evalúa en el crecimiento exponencial de bacterias y levaduras bioactivas diluidas en el medio. Este procedimiento ofrece una distribución homogénea del compuesto en el agar, y está basado en el descrito por Mitscher *et al* (8).

Caracterización de los metabolitos secundarios:

Se evaluó mediante pruebas preliminares de coloración y cromatografía en capa fina la presencia de alcaloides, flavonoides, antocianinas, antraquinonas, cumarinas, glicósidos cardiotónicos, esteroides o triterpenoides, saponinas, principios amargos, taninos, glicósidos cianogénicos, aceites volátiles, esteroides insaturados y sesquiterpen-lactonas (9, 10, 11).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO:

Boletus edulis Fr.:

Píleo de 115 a 208mm de diámetro, convexo, margen recto, borde entero, superficie lisa, húmeda, color café a café naranja, con el borde blanco, cutícula desprendible con contexto blanco bajo ella. Contexto lleno, caroso de hasta 20mm de ancho, de color blanco. Himenio: Tubos adheridos a subadheridos de hasta 18mm de longitud, de color amarillo oliva en jóvenes a café naranja en adultos o áreas lastimadas, tubos en forma de flauta. Poros circulares a hexagonales, de 2-3/mm. Estípites: de hasta 190mm de longitud, de 40mm diámetro ápice y 80mm diámetro base, superficie reticulada principalmente hacia el ápice de color blanco, sobre un fondo café claro a café y blanquecino en la base. Contexto lleno, caroso fibriloso, de color blanco. Olor y sabor: a hongo, ligeramente a ajo. Hábito: solitario a pequeños grupos de 2-4 ejemplares. Hábitat: bosques de *Pinus*. Procedencia: Ixchiguán, San Marcos.



Calvatia cyathiformis (Bosc.) Morgan:

Basidioma globoso, turbinado, algunas veces aplastado, de 30 a 115 por 65 a 110mm. Exoperidio blanco con tonos púrpuros que en ejemplares maduros se torna púrpura grisáceo, que presenta algunas escamas. Endoperidio papiráceo, púrpura grisáceo. Gleba polvoriento de color café claro, con áreas de color púrpura. Subgleba compacta en la parte superior y celular en la base. Capilicio septado de 3-5 μ m de diámetro, con poros circulares. Hábito: solitario a gregario. Hábitat: crece sobre el suelo, en bosques de *Pinus*. Procedencia: Chiantla y Todos Los Santos Cuchumatán, Huehuetenango.



Ganoderma applanatum (Pers.) Pat.:

Píleo de 800mm de largo por 395mm de ancho, recircular, bilobulado, de consistencia leñosa, superficie con pliegues concéntricos, de color café, algo polvoriento. Contexto leñoso, de color café, de hasta 26mm de grosor. Himenio: poros de color blanco a crema, que al maltrato se tornan cafés, circulares de 2-3/mm. Tubos de hasta 12mm de longitud. Estípites: ausente. Olor y sabor: a hongo. Hábito: solitario o en pequeños grupos de 2 a 3 ejemplares. Hábitat: Troncos de *Quercus*. Procedencia: Tucurú, Alta Verapaz.



Lycoperdon perlatum Pers.:

Basidioma piriforme generalmente, a veces subglobo, de 30 a 70mm de altura por 25-50mm de ancho. Pseudoestípite atenuado hacia la base, parte apical de 2-4mm de ancho por 10-25mm de ancho hacia la base, de 15-40mm de longitud. Exoperidio con forma de espinas cónicas de color blanquecino que luego se tornan café pardo. Posteriormente se desprenden dejando un círculo de verrugas. Endoperidio papiráceo, de color amarillento. Gleba de color oliváceo, subgleba rosáceo parduzco. Capilicio sin septos, con poros, presencia de paracapilicio. Esporas globosas de 3.0-5.0 μm de diámetro, con verrugas. Hábito: gregario. Hábitat: crece sobre el suelo, en áreas abiertas del bosque. Procedencia: Todos Los Santos Cuchumatán, Huehuetenango.



Pisolithus tinctorius (Pers.) Coker & Couch:

Basidioma globoso, subgloboso a piriforme, de 60mm de ancho, superficie de color pardo amarillento, peridio delgado; en ejemplares ma-



duros se observan fragmentos del mismo en áreas de esporulación. Presenta un pseudoestípite central de hasta 50mm de longitud, concoloro a la superficie del basidioma. Hábito: solitario o en pequeños grupos. Hábitat: Bosques de *Pinus*. Procedencia: Barberena, Santa Rosa y Poptún, Petén.

ENSAYO DE SENSIBILIDAD

No se detectó ningún signo de sensibilidad o irritación en las ratas, a lo largo de las cuatro semanas de duración del experimento, luego de la aplicación de las infusiones de los hongos, en comparación con el control negativo (agua).

EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN CICATRIZANTE

Los resultados se expresaron en número de días necesarios para que las ratas cicatrizaran totalmente las heridas de su piel. Al grupo tratado con ungüento de *Calvatia cyathiformis* correspondió un promedio de 16.5 días, al de *Boletus edulis* 14.5, *Ganoderma applanatum* 14.8, mientras que al de *Pisolithus tinctorius* y *Lycoperdon applanatum* 13.3 días. El grupo control positivo, tratado con pasta granúgena presentó un promedio un poco mayor que el correspondiente a estos últimos hongos (13.8 días). Tal como era de esperarse, el grupo control negativo (sin ningún tratamiento después de las heridas) tardó mayor tiempo en cicatrizar (20.5 días). Un período de cicatrización algo inferior (18.3) correspondió al grupo tratado con el vehículo (fármaco de referencia sin eugenol ni óxido de cinc).

En base al análisis de varianza de una vía se encontró diferencia estadísticamente significativa entre todos los tratamientos con los diferentes hongos evaluados, el vehículo, el fármaco de referencia y el control negativo ($F = 6.98$, $P = 0.0001$). La prueba de Dunnet permitió establecer que tanto el fármaco de referencia como los cinco hongos muestran diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo (P menor de 0.05). Por el contrario, el vehículo no presenta diferencia significativa frente al control negativo.

TABLA 1. Duración del período de cicatrización (en días) en los distintos grupos de ratas.

Rata No.	Control +	Control -	Vehículo	<i>C. ciathyiformis</i>	<i>B. edulis</i>	<i>G. applanatum</i>	<i>P. tinctorius</i>	<i>L. perlatum</i>
1	16	23	21	15	14	17	13	10
2	12	19	17	21	15	14	13	16
3	13	20	17	15	15	14	13	16
4	14	20	17	15	14	14	14	11
Promedio	13.8	20.5	18	16.5	14.5	14.8	13.3	13.3

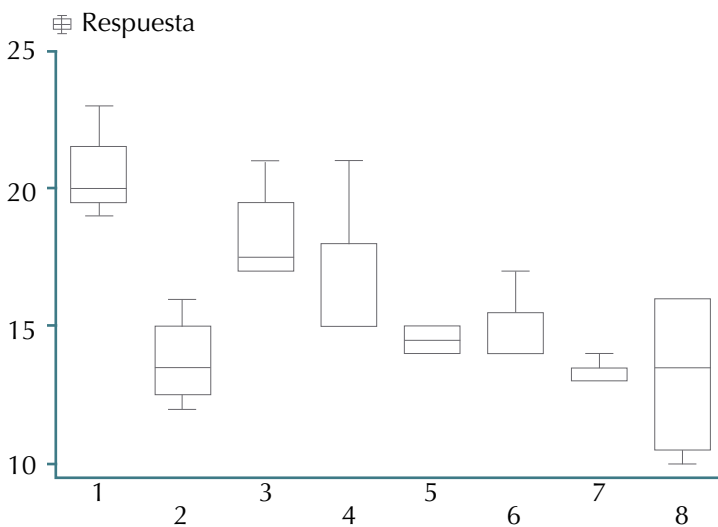


Fig. 1. Gráfico de la prueba de Tukey en base a las respuestas obtenidas de los diferentes tratamientos (para comparar los resultados de los hongos y el fármaco de referencia contra el control negativo).

1= control N., 2= control P., 3= vehículo, 4= *C. cyathiformis*, 5= *B. edulis*, 6= *G. applanatum*, 7= *P. tinctorius*, 8= *L. perlatum*.

$D = \text{Dunnet} = 3.95$. Para que exista diferencia estadísticamente significativa, cualquier valor con respecto al control negativo debe ser mayor de 3.95 a un $P < 0.05$.

EVALUACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀):

Ninguno de los hongos bajo estudio causó anomalías visibles en los animales.

EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN CITOTÓXICA CONTRA *Artemia salina*,

TABLA 2. Citotoxicidad (CL₅₀) en los extractos al 0.1% y 0.05% de los hongos evaluados.

Especie	Concentración %	No. de nauplios muertos	No. total de nauplios	% de nauplios muertos
<i>Boletus edulis</i>	0.1	12	34	35.3
<i>Pisolithus tinctorius</i>	0.1	23	32	71.9
	0.05	8	32	25
<i>Calvatia cyathiformis</i>	0.1	12	37	32.4
<i>Ganoderma applanatum</i>	0.1	10	31	32.3
<i>Lycoperdon perlatum</i>	0.1	11	30	36.7

La tabla 2 muestra que tanto los hongos *Boletus edulis*, *Calvatia cyathiformis*, *Ganoderma applanatum* y *Lycoperdon perlatum* presentan un porcentaje de nauplios muertos inferiores al 50% (35.3%, 32.4%, 32.3% y 36.7%, respectivamente). Por lo tanto la concentración letal media es mayor de 0.1% (1 mg/mL).

Debido a que el porcentaje de camarones muertos del hongo *Pisolithus tinctorius* a concentración de 0.1% (1 mg/mL) fue de 71.9% (mayor del 50%), se realizó una dilución a 0.05%

(0.5 mg/mL). En estas condiciones el porcentaje de nauplios muertos fue de 25% (menor del 50%), por lo que la concentración letal media es mayor o igual de 0.05% (0.05 mg/mL). Esto muestra la baja citotoxicidad de los hongos, lo cual es una prueba útil aunque no selectiva para ninguna molécula química. El ensayo solamente permite dirigir el fraccionamiento bioguiado en forma rápida y simple, permitiendo preliminarmente inferir la actividad citotóxica de las especies.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTILEVADURA DE LOS EXTRACTOS (1.0 MG/ML) DE LOS CINCO HONGOS POR MÉTODO DE DILUCIÓN:

TABLA 3. Tamizaje de la actividad antibacteriana y antilevadura:

Especie	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>B. edulis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>P. tinctorius</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. cyathiformis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>G. applanatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. perlatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) = Actividad a concentración de 1 mg/mL. (-) = Ausencia de actividad a concentración de 1 mg/mL Microorganismos ensayados: **A.** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. **B.** *Salmonella typhi* ATCC 14028, **C.** *Micobacterium smegmatis* ATCC 607. **D.** *Bacillus subtilis*. **E.** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. **F.** *Candida albicans*. **G.** *Cryptococcus neoformans* C13. **H.** *Escherichia coli* ATCC 25922.

Mediante el tamizaje de la actividad antibacteriana y antilevadura fue posible determinar la actividad inhibitoria, el creci-

miento exponencial de bacterias y levaduras bioactivas diluidas en el medio de agar, la potencia de sustancias y extractos y susceptibilidad de los microorganismos y el espectro de inhibición presentado por los extractos de los hongos evaluados, a una concentración de 1.0 mg/mL por el método de dilución, resultando con actividad en el tamizaje solamente tres de ellos: *Boletus edulis*, *Pisolithus tinctorius* y *Calvatia cyathiformis* los cuales mostraron actividad inhibitoria contra *Cryptococcus neoformans* C13. Por lo que se determinó que la concentración mínima inhibitoria fue de 0.5 mg/ml. Lo cual demuestra una actividad antimicrobiana moderada.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS DE LOS HONGOS CON RESULTADO POSITIVO CONTRA *Cryptococcus neoformans* C13

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de los extractos de los hongos *Boletus edulis*, *Pisolithus tinctorius* y *Calvatia cyathiformis* contra el microorganismo *Cryptococcus neoformans* C 13, evaluando concentraciones de 0.125 a 1mg/mL, obteniéndose para todos los extractos una CIM de 1mg/mL.

TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Se caracterizaron los metabolitos secundarios en los hongos: *Pisolithus tinctorius*, *Ganoderma applanatum* y *Lycoperdon perlatum* presentaron cumarinas. Dichos resultados fueron obtenidos en base a la prueba preliminar del ensayo de fluorescencia bajo luz ultravioleta, y confirmado mediante cromatografía en capa fina. Cuatro de los hongos (*Pisolithus tinctorius*, *Ganoderma applanatum*, *Lycoperdon perlatum* y *Boletus edulis*) presentan saponinas, ya que tanto en los ensayos macro y semimicro (prueba de espuma) y el de la cromatografía en capa fina se detectó la presencia de saponinas. Lo cual de acuerdo a lo reportado en la literatura se confirma la presencia de compuestos esteroidales y triterpénicos reportados principalmente para *G. applanatum*, *P. tinctorius*. Si bien la literatura reporta compuestos esteroidales en *C. cyathiformis* en los ensayos cualitativos realizados no

fue posible detectarlos, ya que la presencia de los metabolitos secundarios se ve influenciada por factores ambientales, ontogénicos, fenológicos, época de colecta, métodos de extracción que pudieron afectar en su determinación. Dos de los hongos (*Boletus edulis* y *Pisolithus tinctorius*) presentaron sesquiterpen-lactonas, que fueron confirmadas mediante el ensayo cualitativo en capa fina. No se detectaron alcaloides mediante CCF, aunque si dieron resultados positivos en las pruebas macro y semimicro para *B. edulis* y *L. perlatum*, lo cual puede ser indicativo de proteínas u otros compuestos primarios, no se detectaron flavonoides para tres de los hongos, únicamente en las pruebas macro y semimicro se indica la posible presencia de flavonoides y antocianinas en *Pisolithus tinctorius* y *Calvatia cyathiformes*.

CONCLUSIONES

Ninguno de los hongos evaluados, *Calvatia cyathiformis*, *Boletus edulis*, *Ganoderma applanatum*, *Pisolithus tinctorius* y *Lycoperdon perlatum* indujeron signos de irritación o causaron sensibilidad in vivo en ratas albinas de la raza Wistar, al aplicarse diariamente las infusiones de los mismos en el área dorso-lumbar depilada de los animales. Tampoco indujeron efecto tóxico observable luego de administrar dosis de 1 a 5 Kg de peso por vía oral a ratones albinos. Todos los ungüentos de los hongos evaluados (*Calvatia cyathiformis*, *Boletus edulis*, *Ganoderma applanatum*, *Pisolithus tinctorius* y *Lycoperdon perlatum*) mostraron acción cicatrizante in vivo en ratas albinas de la raza Wistar, en comparación con el control negativo y el vehículo del fármaco de referencia (Pasta Granúgena).

Todos los hongos mostraron actividad citotóxica contra *Artemia salina*. Cuatro de los extractos de los hongos (*Boletus edulis*, *Calvatia cyathiformis*, *Ganoderma applanatum* y *Lycoperdon perlatum*) causaron la muerte de menos del 50 % de los camarones. La concentración letal media para cada uno de ellos es mayor de 0.1% (1mg/mL). *Pisolithus tinctorius* es aún más citotóxico, pues su concentración letal media es más baja (mayor de 0.05%, es decir 0.05 mg/mL). Tres de los hongos (*Boletus edulis*, *Pisolithus tinctorius* y *Calvatia cyathiformis*) poseen actividad antimicrobiana contra *Cryptococcus neoformans* C13, hasta una concentración de 1 mg/mL.

Todos los hongos (*Boletus edulis*, *Pisolithus tinctorius*, *Lycoperdon perlatum* y *Ganoderma applanatum*), excepto *Calvatia cyathiformis*, contienen metabolitos secundarios. *Boletus edulis* contiene saponinas; *Pisolithus tinctorius*, cumarinas, saponinas y sesquiterpen-lactonas; tanto *Ganoderma applanatum*, como *Lycoperdon perlatum* presentan saponinas.

Fuentes:

- 1 Giraldez, A. 1999. Centro de Investigaciones Abelló. Departamento de Farmacología. España.
- 2 Ordóñez, S. 2003. Evaluación del efecto cicatrizante de las hojas y raíces de *Rauwolfia tetraphylla* en heridas producidas a ratas albinas. Tesis químico farmacéutico. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 25 P.
- 3 Ranero, V. 2002. Determinación de la actividad cicatrizante de las hojas de *Litsea guatemalensis* (laurel) en heridas producidas a ratas albinas. Tesis químico farmacéutico. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 38 P.
- 4 Saravia, A. 2005. Manual de ensayos toxicológicos y farmacológicos *in vivo* e *in vitro*. Editorial Universitaria. Guatemala.
- 5 Michael, A. et al. 1956. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. Science, 123:464.
- 6 Meyer, B.N. et al. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med. 45:31-34.
- 7 Solís, P.N. et al. 2005. Manual de caracterización y análisis de drogas vegetales y productos fitoterapéuticos. Proyecto de Desarrollo de Tecnología de Cultivo de Plantas Medicinales y Producción de Fitoterapéuticos (OEA/AICD/AE089/03).
- 8 Mitscher, L. A., Leu R. P., Bathala, M.S., W. N. Beal, J. L. 1971. Antibiotic agents from higher plants I. Introduction rationale and methodology. Lloydia. 35(2):157-66.
- 9 Wagner, H. et al. 1984. Plant Drug Analysis. Springer-Verlag. Berlin. 320 P.
- 10 Medinilla, B. 2006. Manual de laboratorio de fitoquímica. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. 32 P.
- 11 Santa Cruz, L. 2002. Manual sobre Selección Fitoquímica, Guía práctica para los laboratorios de Química de Productos Naturales y Fitoquímica. Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. 38 P.

