ESTUDIO QUÍMICO DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE DEL HONGO MACROMICETO *Lentinula edodes* (Shiitake)

OLGA LUCÍA BENAVIDES CALVACHE

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE POSGRADO EN QUÍMICA
BOGOTÁ
2004

ESTUDIO QUÍMICO DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE DEL HONGO MACROMICETO *Lentinula edodes* (Shiitake)

OLGA LUCÍA BENAVIDES CALVACHE

Ing. Química. Universidad Nacional de Colombia - Sede Manizales, 2001

Tesis como requisito parcial para optar al título de

Magíster en Ciencias - Química

DIRECTOR

Dr. AUGUSTO RIVERA UMAÑA

Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá

ASESOR

Ing. Nelson Rodríguez

Cenicafé

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN QUÍMICA

BOGOTÁ

2004

AGRADECIMIENTOS

A mi **Director Dr. Augusto Rivera Umaña**, por su incondicional apoyo, sus valiosas enseñanzas y gran dedicación, durante el transcurso para la óptima culminación de mis estudios de maestría.

Al profesor **Jaime Alberto Ríos** del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, por su tiempo, sus explicaciones y absoluta colaboración.

A **CENICAFÉ** y al **Ingeniero Nelson Rodríguez** por la asesoría y el suministro de la muestra de *Lentinula edodes* objeto de estudio en esta tesis.

A mi profesor **Dr. Luis Enrique Cuca Suárez** por sus apreciables enseñanzas.

A la **Universidad Nacional de Colombia** por haberme permitido la realización de esta Maestría en la Sede de Manizales.

A la Química Marilú Laverde por la toma de los espectros CG-EM.

A mi familia, por su ayuda, paciencia y completa colaboración.

A mis amigos, por su constante apoyo.

CONTENIDO

		pag
1.	**INTRODUCCIÓN**	12
2.	**MARCO TEÓRICO**	14
3.	**TÉCNICAS GENERALES UTILIZADAS**	33
3.1	**CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA (C.C)**	33
3.2	**CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF)**	33
3.3	**CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA**	33
3.4	**CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)**	33
3.5	**ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDRÓGENO (RMN-^{1}H) Y DE CARBONO 13 (RMN-^{13}C)**	34
3.6	**PUNTO DE FUSIÓN (p.f)**	34
4.	**PARTE EXPERIMENTAL**	35
4.1	**ADQUISICIÓN DE LA MUESTRA**	35
4.1.1	**METODOLOGÍA GENERAL EMPLEADA EN CENICAFÉ PARA EL CULTIVO DE *L. edades***	35
4.1.1.1	**Producción de semilla comercial**	35
4.1.1.2	**Establecimiento de la formulación y preparación del sustrato**	36
4.1.1.3	**Etapa de tratamiento térmico**	36
4.1.1.4	**Etapa de inoculación**	37
4.1.1.5	**Etapa de incubación**	37
4.1.1.6	**Etapa de fructificación, cosecha y postcosecha**	37
4.2	**TRATAMIENTO PRELIMINAR DE LA MUESTRA**	38
4.3	**OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO**	38
4.4	**OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE**	39
4.5	**OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS**	39
4.6	**FRACCIONAMIENTO DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE**	40
4.7	**ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)**	45
4.7.1	**FRACCIÓN INSAPONIFICABLE**	45
4.7.1.1	**FRACCIÓN LE2**	50
4.7.1.1.1	**FRACCIÓN LE2-F1**	50
4.7.1.1.2	**FRACCIÓN LE2-F2**	50
4.7.1.2	**FRACCIÓN LE4**	51

4.7.1.3	**FRACCIÓN LE5**	53
4.7.2	**FRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS**	56
5	**DISCUSIÓN DE RESULTADOS**	58
5.1	**FRACCIÓN LE2**	58
5.1.1	**Ergosterol**	58
5.1.2	**α-dihidroergosterol**	58
5.1.3	**Fungisterol**	49
5.1.4	**ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol**	60
5.1.5	**Neoergosterol**	61
5.2	**FRACCIÓN LE4**	61
5.2.1	**ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	62
5.2.2	**ergosta-7,22-dien-3,5-diol-6-ona**	71
5.3	**FRACCIÓN LE5**	72
5.3.1	**ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona**	72
5.3.2	**Compuesto Z**	72
5.4	**FRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS**	74
5.4.1	**Ácido palmítico**	74
5.4.2	**Ácido linoléico**	75
5.4.3	**Análisis RMN**	75
6.	**CONCLUSIONES**	76
7.	**BIBLIOGRAFÍA**	77
	ANEXOS	80

LISTA DE FIGURAS

		pag
Figura 1.	**Cromatograma de Gases de la Fracción de Ácidos Grasos**	40
Figura 2.	**Cromatograma de Gases de la Fracción LE2**	41
Figura 3.	**Cromatograma de Gases de la Subfracción LE2-F1**	42
Figura 4.	**Ampliación del Cromatograma de Gases de la Subfracción LE2-F2, en t_R 21.13 – 22.04 min**	43
Figura 5.	**Cromatograma de Gases de la Fracción LE4**	43
Figura 6.	**Cromatograma de Gases de la Fracción LE5**	44
Figura 7.	**Espectro de masas de ergosterol**	46
Figura 8.	**Espectro de masas de α-dihidroergosterol**	47
Figura 9.	**Espectro de masas de fungisterol**	48
Figura 10.	**Espectro de masas de ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol**	49
Figura 11.	**Espectro de masas de neoergosterol**	50
Figura 12.	**Espectro de masas de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	51
Figura 13.	**Espectro de masas de ergosta-7,22-dien-3,5-diol-6-ona**	52
Figura 14.	**Espectro de masas de Compuesto Y**	53
Figura 15.	**Espectro de masas de ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona**	54
Figura 16.	**Espectro de masas de Compuesto Z**	55
Figura 17.	**Espectro de masas de Ácido linoléico**	56
Figura 18.	**Espectro de masas de Ácido palmítico**	57
Figura 19.	**Espectro de masas de alta resolución a 70 eV de peróxido de ergosterilo**	66
Figura 20.	**Espectro de masa por ionización química de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	68
Figura 21.	**Espectro de masas de alta resolución por inyección directa de ergosta-5,22-dien-3,5,8-triol.**	69

LISTA DE ESQUEMAS

		pag
Esquema 1.	**Síntesis de lanosterol a partir de escualeno**	16
Esquema 2.	**Ruta biosintética para la producción de ergosterol en los hongos, a partir de lanosterol**	17
Esquema 3.	**Patrón de fragmentación de ergosterol**	59
Esquema 4.	**Ion diagnóstico núcleo Δ^7**	60
Esquema 5.	**Fragmentos diagnósticos para peróxido de ergosterilo**	66
Esquema 6.	**Mecanismo de fragmentación para ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	70
Esquema 7.	**Ion a m/z 251 característico del núcleo ergostano pentainsaturado**	73
Esquema 8.	**Estructuras propuestas para el Compuesto Z**	73
Esquema 9.	**Rearreglo de Mc.Lafferty para ácidos grasos**	74

LISTA DE TABLAS

		pag
Tabla 1.	**Análisis bromatológico de algunos hongos comestibles comunes**	24
Tabla 2.	**Composición de aminoácidos esenciales en algunos hongos comestibles y en huevo de gallina**	25
Tabla 3.	**Desplazamiento químico (δ) para los 28 átomos de carbono de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	63
Tabla 4.	**Asignación de las señales de desplazamientos químicos en RMN-^{1}H y RMN-^{13} C para ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	64
Tabla 5.	**Iones con relación m/z cercanos al ion molecular para peróxido de ergosterilo**	68

LISTA DE ANEXOS

		pag
ANEXO 1.	**Espectro de RMN-^{1}H a 400 MHz de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	81
ANEXO 2.	**Ampliación espectro de RMN-^{1}H a 400 MHz de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	82
ANEXO 3.	**Experimento COSY de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	83
ANEXO 4.	**Ampliación experimento COSY de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	84
ANEXO 5.	**Espectro de RMN-^{13}C a 100 MHz de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	85
ANEXO 6.	**Experimento DEPT 45 de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	86
ANEXO 7.	**Ampliación experimento DEPT 45 de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	87
ANEXO 8.	**Experimento DEPT 90 de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	88
ANEXO 9.	**Experimento DEPT 135 de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	89
ANEXO 10.	**Experimento HMQC de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	90
ANEXO 11.	**Ampliación experimento HMQC de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	91
ANEXO 12.	**Experimento HMBC de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	92
ANEXO 13.	**Ampliación experimento HMBC de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	93
ANEXO 14.	**Ampliación experimento HMBC de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol**	94
ANEXO 15.	**Espectro de RMN-^{1}H de peróxido de ergosterilo**	95
ANEXO 16.	**Espectro de RMN-^{13}C de peróxido de ergosterilo**	96
ANEXO 17.	**Espectro de RMN-^{13}C a 100 MHz de ácido palmítico**	97
ANEXO 18.	**Espectro de RMN-^{1}H a 100 MHz de ácido palmítico**	98

LISTA DE ABREVIATURAS

L. edodes	Hongo macromiceto *Lentinula edodes* (Shiitake)
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
ºC	Grados Celsius
min	Minuto
cm^{-1}	Frecuencia
d	Doblete
s	Singulete
m	Multiplete
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
m/z	Relación masa carga
Hz	Hertz
p.f	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
TMS	Tetrametil silano
u.m.a	Unidades de masa atómica
IDH	Indice de deficiencia de hidrógeno
Me	Metilo
A	Anillo A
B	Anillo B
C	Anillo C
D	Anillo D
Isop	Isopropilo
CL	Cadena lateral
M^+	Ion molecular
δ	Desplazamiento químico
J	Constante de acoplamiento
PM	Peso molecular
eV	Electrón-voltio
AcOEt	Acetato de etilo
RMN^1H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
$RMN^{13}C$	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
DEPT	Distortion less enhancement by polarization transfer
COSY	Correlation spectroscopy
HMBC	Heteronuclear magnetic bond coherence
HMQC	Heteronuclear magnetic quantum coherence

RESUMEN

El hongo macromiceto ***Lentinula edodes*** también conocido como **Shiitake**, pertenece a los basidiomicetos comestibles y es el segundo más cultivado en el mundo después del champiñón debido a sus propiedades nutricionales y medicinales. ***L. edodes*** se cultiva desde hace más de un milenio en China y Japón. En Colombia casi es desconocido, sin embargo su cultivo en subproductos del Café es objeto de estudio en el Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé). Se conoce que las propiedades medicinales de ***L. edodes*** se deben a la generación de metabolitos secundarios que pueden aislarse y evaluarse como potenciales productos farmacológicos.

Del extracto etanólico de una muestra de ***L.edodes*** suministrada por Cenicafé, se obtuvo por partición, el extracto de acetato de etilo, el cual se saponificó. Por partición clorofórmica de la muestra saponificada se obtuvo la fracción insaponificable y la fase acuosa se dejó para el estudio de ácidos grasos. La fracción insaponificable fue sometida a cromatografía en columna, eluyendo con mezclas variables de benceno: acetato de etilo en polaridad creciente, controlando por cromatografía de capa fina y revelando con reactivo de Liebermann-Burchard, obteniéndose así, 5 fracciones denominadas: **LE1, LE2, LE3, LE4** y **LE5**.

La fracción **LE1** por ser la menos polar no se estudió. El resto de fracciones fueron analizadas por CG-EM, y como resultado se reunió la fracción **LE2** y **LE3** en una sola fracción denominada en forma general como **LE2**. Del estudio de los espectros de masas de las diferentes fracciones por comparación con patrones y análisis de fragmentación, se identificaron 8 esteroles tipo ergostano: **ergosterol**, **ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol**, **α-dihidroergosterol**, **fungisterol**, **neoergosterol**, **ergosta-6,22-dien-3β,5α,8α-triol**, **ergosta-7,22-dien-3,5-diol-6-ona**, y **ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona**. El compuesto **ergosta-6,22-dien-3β,5α,8α-triol**, es la primera vez que se aísla de ***L. edodes***, según la literatura consultada empleando SciFinder, además su presencia confirma la variación en la composición de esteroles polihidroxilados cuando ***L. edodes*** ha sido cultivado en desechos del café. No se aisló en ninguna fracción peróxido de ergosterilo. La fracción de ácidos grasos fue analizada por CG-EM y RMN de lo cual se elucidó la estructura de dos ácidos grasos, uno de cadena saturada (**ácido palmítico**) y el segundo insaturado (**ácido linoléico**).

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente el problema de la resistencia de muchos patógenos a los antibióticos comunes (de origen biológico o sintético) y las enfermedades incurables son el principal incentivo para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos. La industria farmacéutica ha sintetizado millones de productos químicos activos farmacológicamente empleando como modelos productos naturales provenientes de plantas y hongos. Con respecto a los últimos, se ha aislado un buen número de metabolitos secundarios con gran interés científico dadas las actividades biológicas y medicinales que han presentado[1].

El hongo macromiceto *Lentinula edodes* que es conocido tradicionalmente en las culturas orientales como nutracéutico debido a sus propiedades nutricionales y medicinales, se utiliza como droga según la farmacopea oriental y varios de los metabolitos que han sido aislados, han presentado actividad biológica aplicable en el campo de la medicina[2]. Más aún, los antiguos miembros de las cortes japonesas lo consideraban como afrodisíaco y los emperadores de China lo consumían para retardar el envejecimiento[3].

Este hongo es casi desconocido en Colombia. Sin embargo, en el Centro de Investigaciones del Café (Cenicafé) se ha estudiado su cultivo en desechos del café, en búsqueda de la diversificación de cultivos para los caficultores, lo que origina empleo, una nueva fuente de alimentos y una alternativa para disminuir la contaminación ambiental[4].

Como se dijo anteriormente, varios metabolitos de *L. edodes* han sido estudiados para aplicaciones médicas, sin embargo hongos de este género contienen metabolitos terpénicos tipo esterólico, que podrían presentar alguna actividad biológica de interés, como es el caso de algunos esteroles aislados de otros macromicetos. Algunos compuestos esterólicos aislados del hongo *L. edodes* son polihidroxilados, lo que en la relación estructura-actividad puede significar de manera previa, que presentan alguna actividad biológica. Surge entonces, la pregunta si varía la composición de esteroles polihidroxilados del hongo

Lentinula edodes, cuando el macromiceto ha sido cultivado en mezcla de aserrín de tallo y borra de café, pues el Shiitake (*L. edodes*) no solo presenta propiedades alimenticias y medicinales comprobadas sino que es tema de investigación de gran interés según las políticas de fomento de cultivos alternativos entre los caficultores del Departamento de Caldas, haciendo de proyectos como éste, un claro ejemplo del papel de la Universidad en la solución de problemas socioeconómicos de una región del país.

2. MARCO TEÓRICO

El Shiitake fue clasificado como *Lentinus edodes*[5] por Singer en 1941 y Pegler en 1975 propuso denominarlo *Lentinula edodes*, nombre que conserva a la fecha tras haber sufrido 15 cambios de su nombre desde que fue descrito como *Agaricus edodes* en 1877 por Berkeley[5]. Muchos taxónomos están de acuerdo con la clasificación de Pegler principalmente debido a la naturaleza de la putrefacción blanca causada por este hongo, aunque también se han generalizado el nombre de *Lentinus edodes* y los nombres comunes "Shiang-gu" originario de China y "Shiitake" de Japón[6]. El término "Shiitake" significa "hongo negro del bosque" debido a sus características físicas y a su crecimiento natural en los árboles de los bosques[7].

L. edodes es el segundo hongo más comercializado en el mundo después del conocido "Champiñón" (*Agaricus bisporus*), y se ha mantenido en el centro de la investigación desde finales de los años sesenta[7]. Es uno de los hongos más extensamente cultivados en China y Japón, desde que fue cultivado por primera vez en China por Wu San Kwung en el condado de Qingyuan durante la dinastía Sung, utilizando la técnica de cultivo sobre troncos de madera[7]. En esta técnica, los troncos de madera se perforan y los huecos formados se inoculan con tapones que contienen esporas o micelio del hongo. Posteriormente los leños se acomodan en pilas y constantemente se irrigan con agua. Tras 6 a 12 meses, se obtienen los primeros cuerpos fructíferos del hongo. Aunque este método de cultivo es muy tardío en presentar los primeros cuerpos fructíferos, según los orientales es un método simple y natural, y no necesita la esterilización del sustrato ni el conocimiento de técnicas de laboratorio[8].

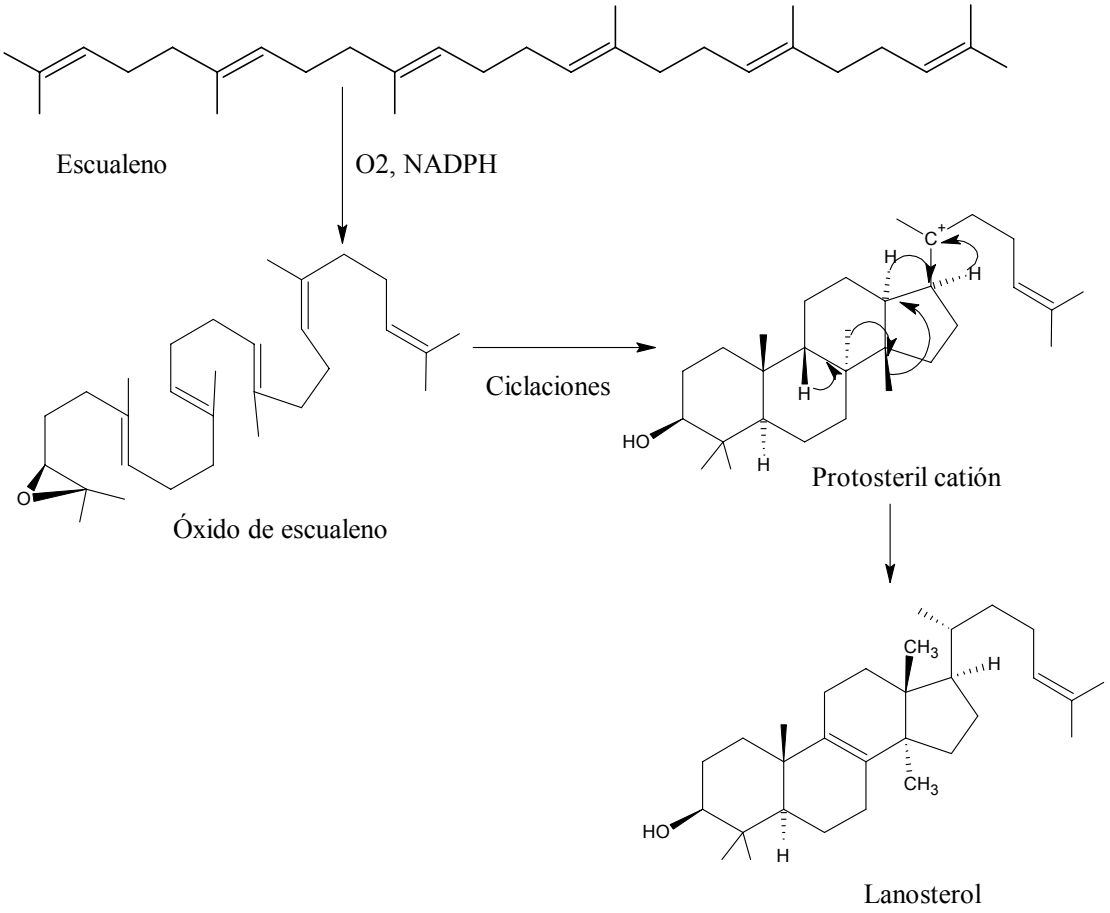
Desde 1987 China se convirtió en el principal productor de *Lentinus edodes*, desplazando a Japón, y desde entonces domina el mercado, así, el condado de Qingyuan presentó una producción de 106.500 toneladas de hongo fresco en 1997[8]. Actualmente, el cultivo en troncos naturales representa el 20% de la producción en el condado de Qingyuan, mientras

que el 80% restante, proviene de cultivos usando el método del aserrín sintético, causando así menos daño ambiental que el ocasionado por el método tradicional. Es tan importante económicamente el hongo *L. edodes*, que el condado de Qingyuan fue nombrado por el gobierno chino, como "la ciudad del hongo *Lentinula*" [7].

En la investigación científica los hongos han sido de gran interés desde el punto de vista del aislamiento, caracterización química y pruebas biológicas de los metabolitos que generan, pues éstos pueden tener aplicación biológica, médica, agrícola e industrial, como es el caso de los antibióticos (penicilina, ácido itacónico, cefalosporina), enzimas (lipasa, pectinasa, celulasa, entre otras), insulina, etanol, ácido cítrico, alcaloides, giberelinas, ergosterol, vitaminas, etc[9].

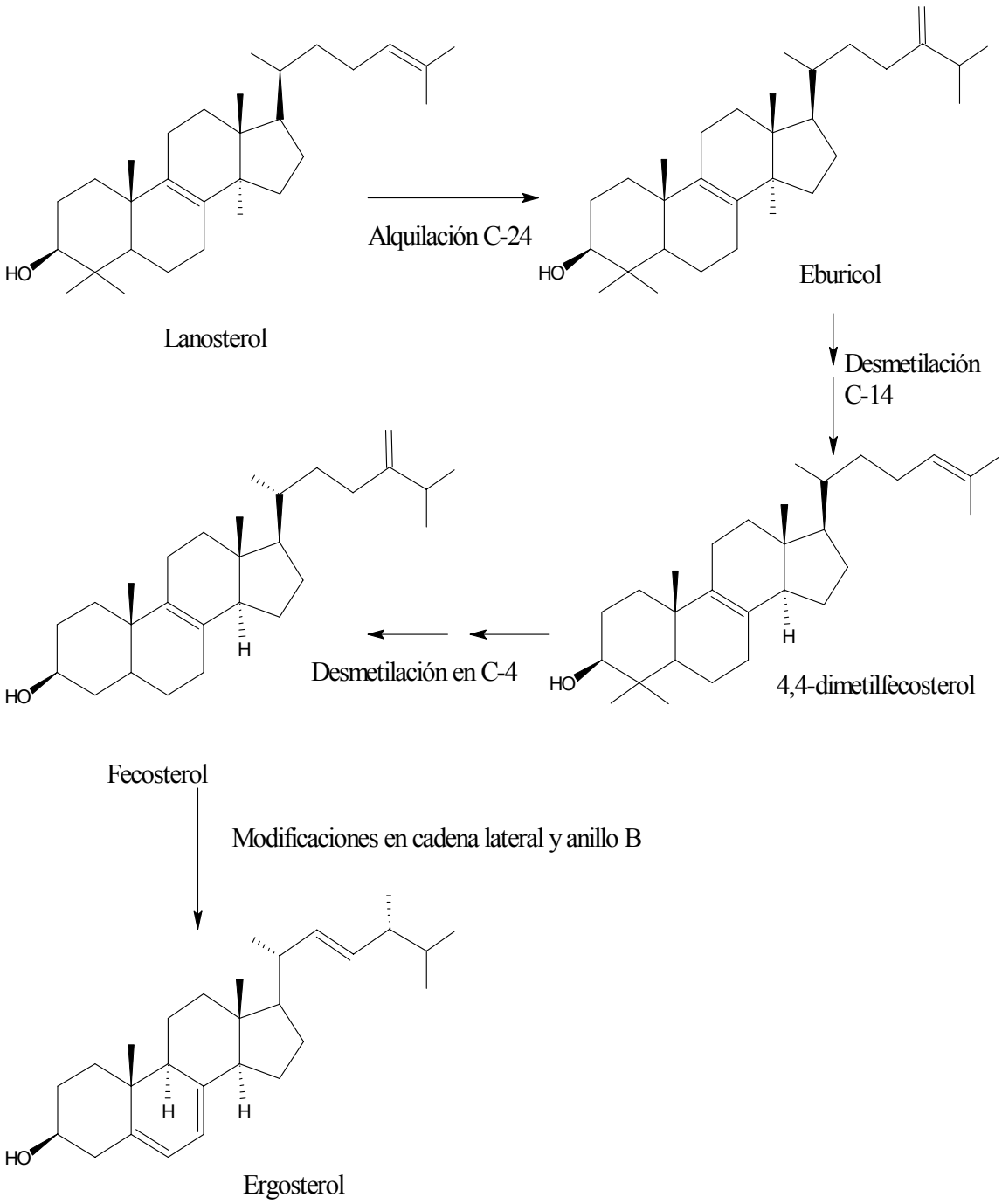
Los compuestos terpénicos son metabolitos característicos de los vegetales. Sin embargo, muchos de ellos están presentes en los hongos y tienen importancia significativa al presentar actividad farmacológica[9]. Los esteroles hacen parte de los esteroides (triterpenos modificados) y se encuentran ampliamente distribuidos en los hongos, entre los más comunes se encuentran el ergosterol (24-metilcolesta-5,7,22-trien-3β-ol) **1,** el cual es un derivado del ergostano que presenta dos grupos metilo en posición β angulares en los carbonos 10 y 13 y posee un grupo hidroxilo en posición β en el tercer carbono, éste último característico para todos los esteroles. Los hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}), y terpenoides superiores pueden describirse de acuerdo al incremento en el número de unidades de isopreno[10]. El isopreno es un compuesto hemiterpénico producido naturalmente en las plantas y hongos, sin embargo, las unidades de isopreno bioquímicamente activas: dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) son las responsables de la formación de muchos terpenoides y esteroides. El triterpeno denominado escualeno es el precursor natural de los esteroides. La ciclación del escualeno requiere la presencia de los cofactores Q_2 y NADPH, para dar origen al intermediario 2,3-óxido de escualeno. La protonación del grupo epóxido origina la apertura del anillo y se genera el carbocatión terciario, el cual, después de sufrir una nueva adición electrofílica

genera el prosteril catión terciario (Esquema 1). Este catión sufre luego una serie de intercambios 1,2 de tipo Wagner-Meerwein, inicialmente migrando a hídrido y generándose así un nuevo catión, a partir del cual hay una nueva migración hacia el metilo hasta que se presenta la pérdida de un protón, originándose el doble enlace característico del lanosterol.



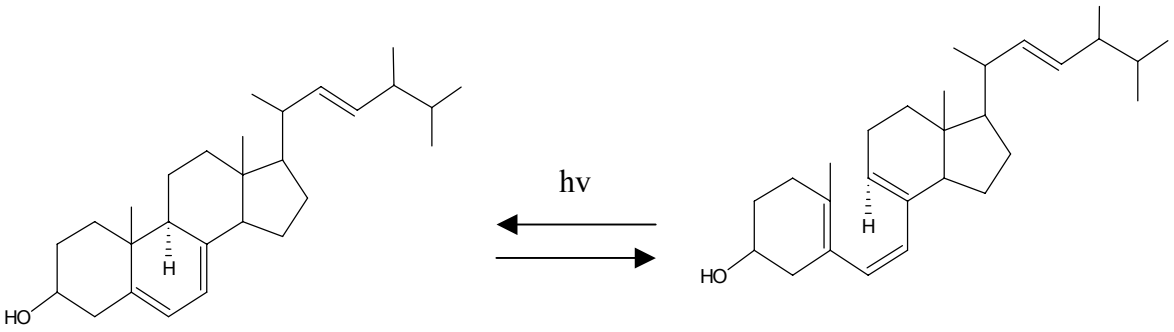
Esquema 1. Síntesis de lanosterol a partir de escualeno[10].

El lanosterol es un triterpeno muy común, y es el precursor del colesterol y otros esteroles en animales y hongos. En el Esquema 2 se presenta la ruta biosintética para la producción de ergosterol en los hongos, a partir de lanosterol[10].



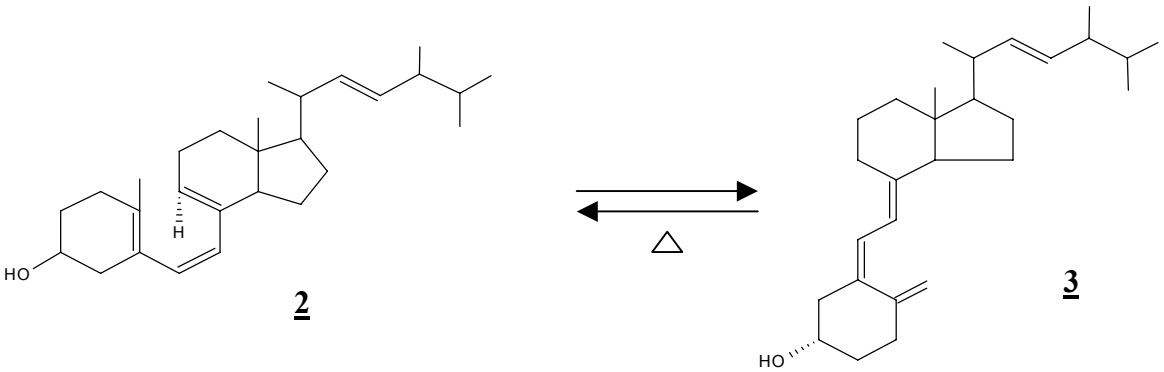
Esquema 2. Ruta biosintética para la producción de ergosterol en los hongos, a partir de lanosterol[10].

La irradiación de ergosterol con luz ultravioleta produce pre-ergocalciferol **2**[9].



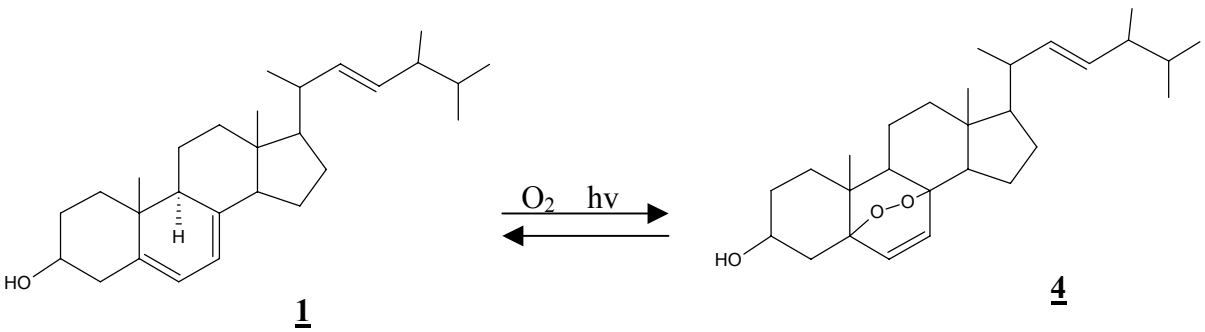
1 **2**

Mediante una reacción sigmatrópica térmica, el pre-ergocalciferol **2** se convierte en vitamina D_2 (ergocalciferol) **3**[9].



2 **3**

El ergosterol **1**, puede transformarse en peróxido de ergosterilo **4** por la acción del oxígeno y la irradiación ultravioleta[9].



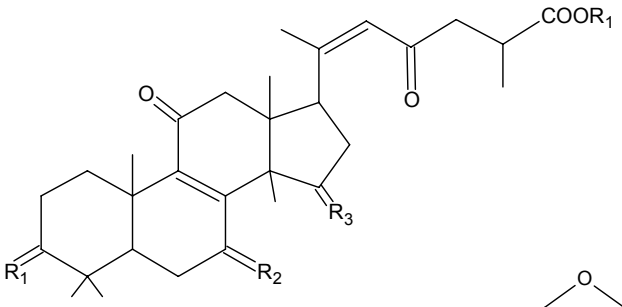
1 **4**

Tanto el ergosterol como el peróxido de ergosterilo presentan acción antiviral y antitumoral, además de una fuerte actividad anticomplementaria[11]. Además, el peróxido de

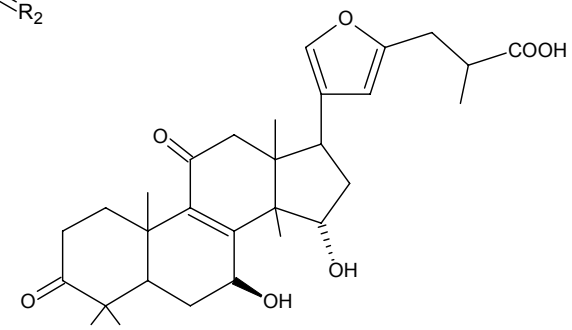
ergosterilo ha presentado valores de concentraciones IC_{50} en humanos contra células tumorales gástricas (SNU-1), células de hematoma (SNU-354), células de tumor colorectal (SNU-C4) y sarcoma-180 de 18.7, 158.2, 84.6 y 74.1 μM respectivamente[12].

A continuación se presentan algunos metabolitos terpenoides aislados de algunos basidiomicetos y que exhiben una comprobada actividad biológica:

Algunos lanostanoides aislados del hongo *Ganoderma applanatum*, entre los que se encuentran los ácidos ganodéricos A **5**, F **6**, G **7**, H **8**, I **9** y el ácido furanoganodérico **10**, han presentado actividad contra células cancerosas en ratones[13].

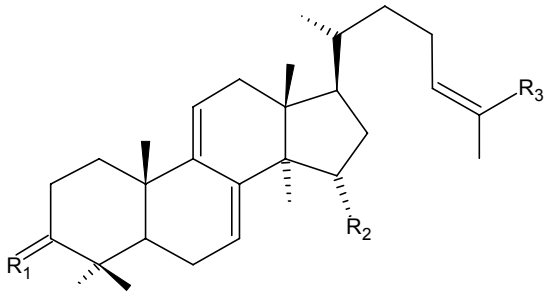


	R_1	R_2	R_3	R_4
5	O	β OH	α OH	H
6	O	O	O	H
7	O	O	α OH	H
8	β OH	O	O	Me
9	β OH	O	α OH	Me

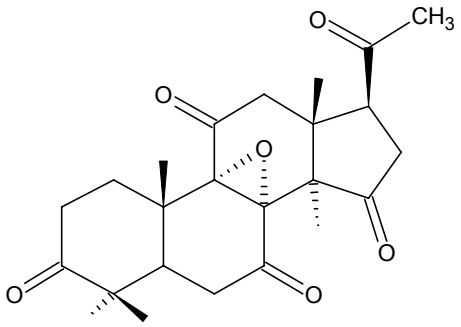


10

Los lanostanoides 5α-lanosta-7,9(11),24-trieno-3β-hidroxi-26-al **11**, 5α-lanosta-7,9(11),24-trieno-15α-26-dihidroxi-3-ona **12**, 8α,9α,epoxi-4,4,14α-trimetil-3,7,11,15,20-pentaoxo-5α-pregnano **13** se aislaron del macromiceto *Ganoderma concinna*. Estos compuestos inducen apoptosis en las células HL-60 de leucemia promielocítica humana, como lo indicaron las características morfológicas de las células y la detección en la fragmentación de ADN[14].

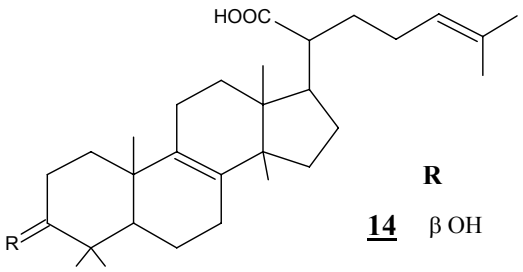


11	R_1 = β OH,H	R_2 = H	R_3 = CHO
12	R_1 = O	R_2 = α OH	R_3 = CH_2OH



13

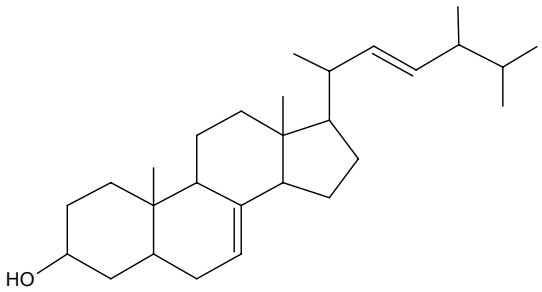
Los compuestos como ácido 3β-hidroxi-5α-lanosta-8,24-dien-21-oico **14**, ácido 3-oxo-5α-lanosta-8,24-dien-21-oico **15**, ergosta-7,22-dien-3β-ol **16** y los ácidos tsugárico A **17** y tsugárico B **18**, fueron aislados de *G. tsugae*, los cuales en combinación con 2β, 3α, 9α-trihidroxi-ergosta-7,22-dieno **19** aislado de *G. amboinense* y aldehído ganodérico A **20** aislado de *G. lucidum*, presentan inhibición *in vitro* de células KB y de células PCL/PRF/5 de humanos[15].



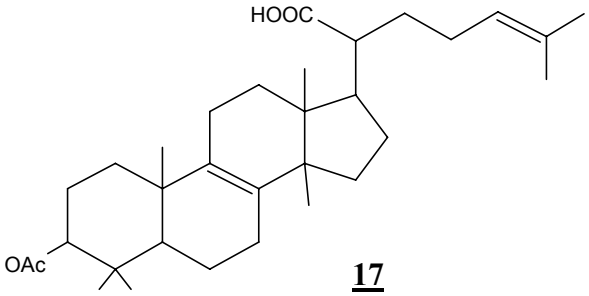
R

14 β OH

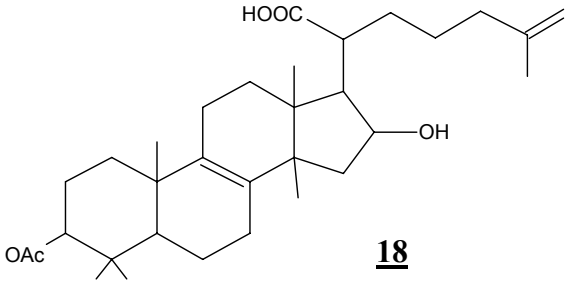
15 O



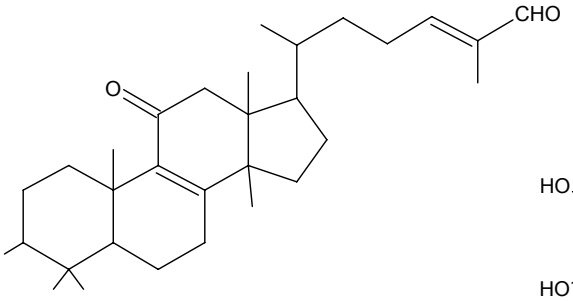
16



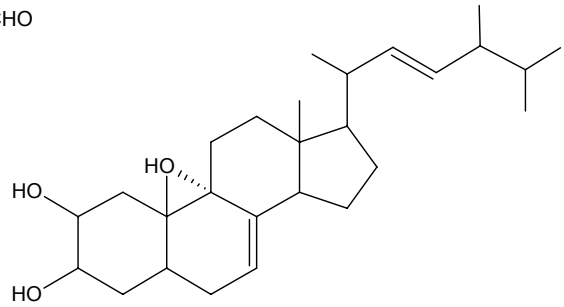
17



18

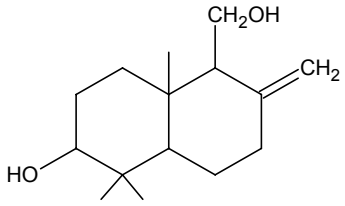


19



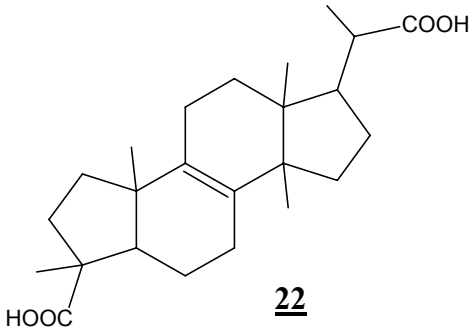
20

Estructuras nor-sesquiterpénicas de tipo drimanos, caracterizadas por su acción antibiótica, antifúngica y antimicrobial, se han encontrado como metabolitos secundarios de los hongos *Marasmius oreades, Alternaria brassicae y Lactarius noidus.* El compuesto 5-(hidroxi-metil)-1,1,4α-trimetil-6-metilendecahydronaftalen-2-ol **21**, aislado del hongo *Polyporus auricularius* es un intermediario en la biosíntesis de sesquiterpenos y presenta actividad antimicrobiana[16].

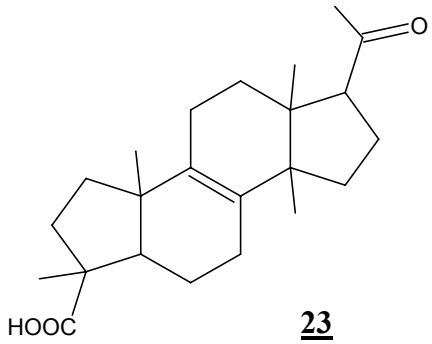


21

Dos ácidos triterpénicos tetracíclicos como son: ácido 4β, 14α-dimetil-3-nor-5α-pregn-8-en-4α, 20α-dicarboxílico **22**, conocido como ácido javeróico y el ácido 4β, 14α-dimetil-20-oxo-3-nor-5α-pregn-8-eno-4α-carboxílico **23**, también denominado ácido phellínico, fueron aislados del hongo *Phellinus pomaceus*[17].



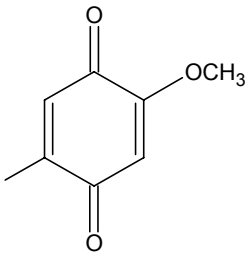
22



23

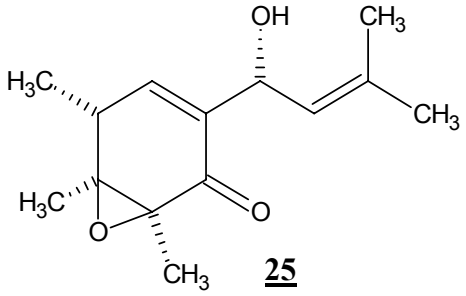
En lo que respecta a compuestos aislados de hongos del género *Lentinus* seleccionados debido a que presentan actividad biológica, se pueden mencionar:

Del medio de cultivo del hongo *Lentinus adhaerens* se aisló el compuesto 2-metoxi-5-metil-1,4-benzoquinona **24**, el cual presenta inhibición sobre la agregación plaquetaria[1].



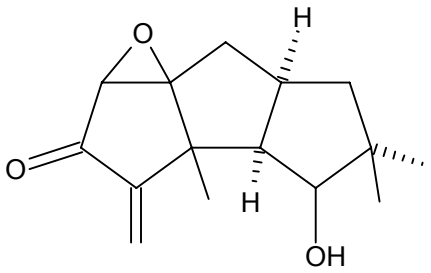
24

El compuesto panepoxidona **25**, se extrajo en el proceso de fermentación del hongo *Lentinus critinus*. Este compuesto es altamente oxigenado y exhibe efectos tóxicos en ratones a una concentración LD_{50} de 23 mg/kg[1].

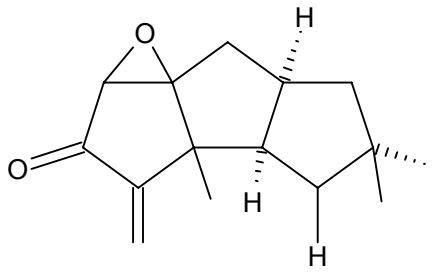


25

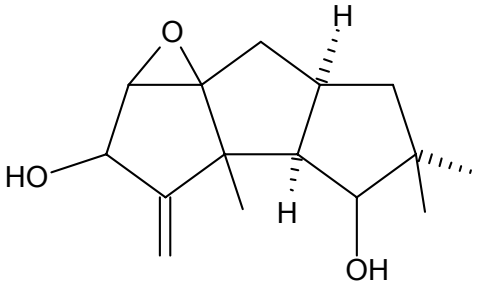
Del medio de fermentación de *L. crinitus* se aislaron compuestos como: hipnophilina **26**, 1-desoxihipnophilina **27** y sus correspondientes alcoholes hipnophilol **28** y 1-desoxihipnophilol **29**, los cuales presentan actividad antimicrobiana[1].



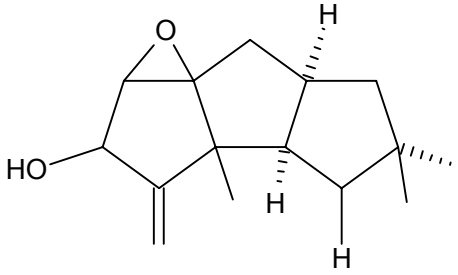
26



27



28



29

Se cree comúnmente que los hongos no tienen valor calorífico, que son insignificantes nutricionalmente o en el peor de los casos se consideran inertes o inútiles. Estas creencias son erróneas, ya que los hongos contienen cantidades razonables de proteína y carbohidratos, así como un porcentaje menor de otros nutrientes importantes y en el esquema de valor nutritivo, están sobre las verduras y legumbres, pero están por debajo de la proteína de primera clase referida a carne, pescado y pollo[18].

El análisis bromatológico de algunas especies entre las que se encuentra el hongo *L. edodes* puede observarse en la **Tabla 1**.

Tabla 1.

Análisis bromatológico de algunos hongos comestibles comunes[18].

Especie	Agua	Proteína	Grasa	CHO total	CHO N-libre	Fibra	Cenizas	Energía (Kcal)
Agaricus bisporus	89	27	2	60	51	9	10	350
Auricularia species	90	5	8	90	75	9	6	360
Boletus edulis	87	30	3	60	52	8	7.5	360
Cantharellus cibarius	91	22	5	65	54	11	8.5	350
Coprinus comatus	92	25	3	59	51	7	12.5	345
Lentinus edodes	90	17	8	75	70	7	3	390
Morchella esculenta	90	20	4	63	54	8	10	350
Tuber melanosporum	77	23	2	66	38	28	8	270

Valores expresados como g/100 g de peso seco, excepto el contenido de agua expresada como g/100g de peso húmedo.

En la **Tabla 2** se presenta la composición de aminoácidos esenciales en algunos hongos comestibles, entre los que se encuentra el hongo *L. edodes*, así como la composición de aminoácidos esenciales en el huevo de gallina[18].

Tabla 2.

Composición de aminoácidos esenciales en algunos hongos comestibles y en huevo de gallina[18].

Aminoácido	***Agaricus bisporus***	***Lentinus edodes***	***Pleurotus florida***	***Pleurotus ostreatus***	***Pleurotus sajor-caju***	***Volvariella diplasia***	***Volvariella volvacea***	**Huevo gallina**[a]
Leucina	7.5	7.9	7.5	6.8	7.0	5.0	4.5	8.8
Isoleucina	4.5	4.9	5.2	4.2	4.4	7.8	3.4	6.6
Valina	2.5	3.7	6.9	5.1	5.3	9.7	5.4	7.3
Triptófano	2.0	nd	1.1	1.3	1.2	1.5	1.5	1.6
Lisina	9.1	3.9	9.9	4.5	5.7	6.1	7.1	6.4
Treonina	5.5	5.9	6.1	4.6	5.0	6.0	3.5	5.1
Fenilalanina	4.2	5.9	3.5	3.7	5.0	7.0	2.6	5.8
Metionina	0.9	1.9	3.0	1.5	1.8	1.2	1.1	3.1
Histidina	2.7	1.9	2.8	1.7	2.2	4.2	3.8	2.4
Total [b]	38.9	36.0	46.0	33.4	37.6	48.5	32.9	47.1

Datos presentados como g de aminoácido / 100 g de proteína cruda. nd: no determinado. a: por comparación. b: excluyendo arginina y cistina.

Los datos del contenido nutricional y composición de aminoácidos esenciales de *L. edodes,* corroboran que este hongo puede ser consumido por humanos y por animales como fuente de proteína, carbohidratos y grasas.

Las sustancias químicas que contienen los hongos, pueden denominarse adaptógenos, cuando cumplen una acción específica, e inmunoestimulantes o inmunopotenciadores, cuando son modificadores de la respuesta biológica de un organismo (MRB) debido a la estimulación del sistema inmunológico, lo que puede generar diferentes efectos terapéuticos [3].

Se conoce que *L. edodes* presenta propiedades medicinales que son debidas a la generación de metabolitos secundarios, varios de los cuales han sido aislados y evaluados como compuestos con actividad farmacológica tales como actividad antitumoral, antiviral, antibacterial, antitrombótica, antiparasitaria, etc [9,3].

Entre las drogas de comprobada acción medicinal, obtenidas de *L. edodes* están:

- **Lentinán**

Es un polisacárido β-D-glucano obtenido del extracto acuoso del cuerpo fructífero de *Lentinula edodes*, el cual no presenta toxicidad para las células tumorales, pero inhibe su crecimiento mediante un efecto carcinostático, debido a la estimulación que realiza sobre el sistema inmunológico, específicamente sobre un tipo de células blancas de la sangre llamadas linfocitos T. Este compuesto incrementa la resistencia biológica a las enfermedades infecciosas, incluido el SIDA [3].

La actividad antitumoral del lentinán es significativamente más fuerte que la de otros polisacáridos obtenidos de otros hongos, líquenes o plantas superiores. En un caso de sarcoma 180 inducido a 10 micos, el lentinán presentó inhibición completa del tumor en 6 de ellos, en dosis de 0,2 mg/kg durante 10 días y al utilizar dosis de 1 mg/kg de lentinán durante 10 días se inhibió completamente el crecimiento tumoral en los 10 micos [3,19].

- **KS2**

El compuesto KS2 es un α-manan-péptido que contiene aminoácidos como serina, treonina, alanina y prolina, cuya extracción puede hacerse con agua caliente seguida de una precipitación con etanol. Este compuesto resultó ser efectivo contra el sarcoma 180 y el carcinoma de Ehrlich en micos, presentando un valor LD_{50} superior a 12500 mg/kg cuando se administra oralmente. En experimentos realizados *in vitro* con células de ratón, la actividad antitumoral fue mayor. El compuesto KS2 presenta actividad antitumoral cuando se incuba *in vitro* con interferón [3].

- **Eritadenina**

Es un compuesto denominado también lentinacina o lenticina. Tiene la capacidad de reducir el colesterol en el suero de la sangre y lípidos en animales. Su modo de acción no inhibe la biosíntesis del colesterol, sino que acelera la excreción del colesterol consumido y

además acelera su descomposición metabólica. Chivata[3] en 1969, adicionó 0.005% de eritadenina en el alimento para ratas, observando una disminución del 25% del colesterol total, en tan sólo una semana. Rokujo y colaboradores[3], en 1969 concluyeron que la actividad de la eritadenina es mayor si se tiene una dieta alta en grasas. Kimoto y colaboradores[3] en 1976, así como Kabir y Kimura[3] en 1989, llegaron a la conclusión que una dieta alimenticia con Shiitake reduce el colesterol libre en el plasma sanguíneo, reduce la presión arterial y remueve los lípidos del sistema circulatorio.

- **Extractos LEM y LAP**

LEM es el extracto del micelio pulverizado del hongo y LAP es el precipitado obtenido de una solución alcohólica de LEM. Los compuestos LEM y LAP son glicoproteínas que contienen glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa, manosa y fructosa. El compuesto LEM también puede contener derivados de los ácidos nucléicos, vitamina B1, vitamina B2 y ergosterol. Estos extractos han presentado una fuerte actividad antitumoral en animales y humanos, así como la disminución del nivel de infección causado por hepatitis B crónica. Su mecanismo de acción es la activación del sistema inmunológico[3].

En 1990 Susuki y colaboradores[3], obtuvieron la sustancia inmunoactiva EP_3 por fraccionamiento de LEM. El compuesto EP_3 contiene aproximadamente 80% de lignina, 10% de carbohidratos y 10% de proteína [3].

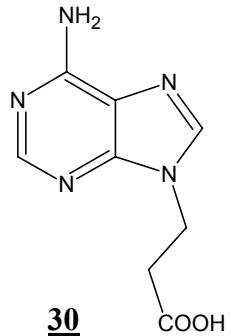
- **Compuestos de ácidos nucléicos**

Pueden presentar una fuerte actividad antitrombótica, debido a que inhiben la aglutinación de las plaquetas [3].

Otros metabolitos aislados de *L.edodes* son:

- **Bases nitrogenadas**

ácido 4-(6-amino-9H-purin-9-il) propiónico[20], **30**.

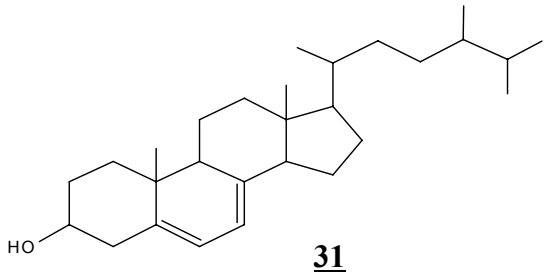


30

- **Esteroles**

Estos compuestos han sido objeto de estudio continuo en muchas especies de hongos, debido a sus perspectivas de utilidad biológica o industrial, por ejemplo, el ergosterol y peróxido de ergosterilo, como agentes antivirales y antitumorales[11], así como esteroles derivados del ergosterol como es el caso de los ergostadientrioles, los cuales presentan una fuerte actividad anticolesterolémica y antioxidante[21]. De los estudios realizados por Yokokawa H. y Mitsuhashi T.[22], a diez hongos entre los que se encuentra *Lentinus edodes*, se elucidaron dos esteroles mayoritarios de este hongo, cuyos nombres y estructuras se indican a continuación:

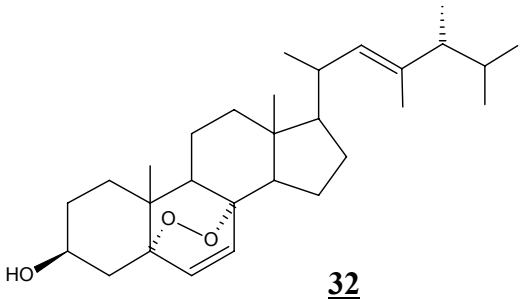
ergosterol[22], **1** y **ergosta-5,7-dien-3β-ol**[22], **31**



31

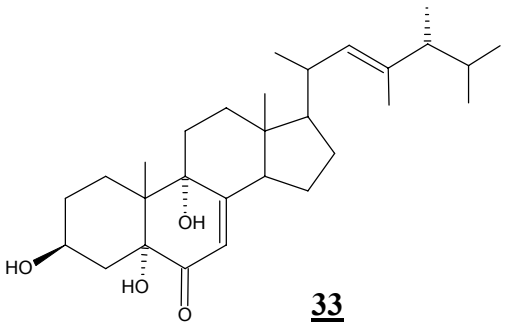
Igualmente, de cinco hongos comestibles: *Lentinula edodes, Pholiota nameko, Flammulina velutipes, Hypsizigus marmoreus y Pleurotus ostreatus*[23], se aislaron varios esteroles polioxigenados, entre los que figuran:

5α,8α-epidioxy-(22E,24R)-23-metilergosta-6,22-dien-3β-ol [23]**, 32**



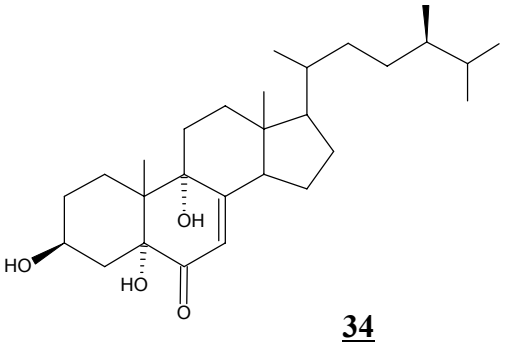
32

3β,5α,9α-trihidroxi-(22E,24R)-23-metilergosta-7,22-dien-6-ona [23]**, 33**



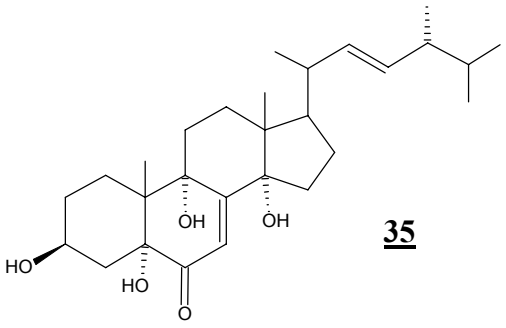
33

3β,5α,9α-trihidroxi-(24S)-ergosta-7-en-6-ona [23]**, 34**



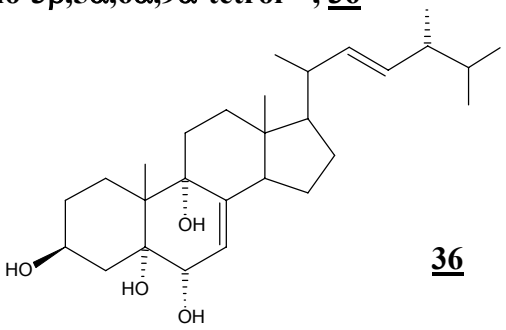
34

3β,5α,9α,14α-tretrahidroxi-(22E,24R)-ergosta-7,22-dien-6-ona [23], 35



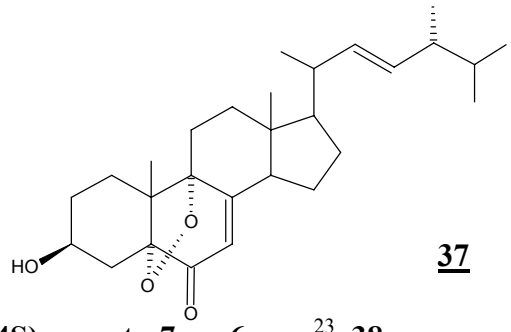
35

(22E,24R)-ergosta-7,22-dieno-3β,5α,6α,9α-tetrol [23], 36



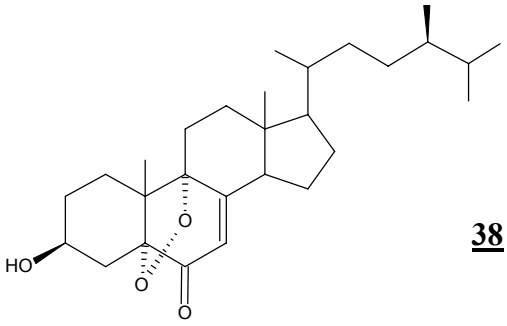
36

5α,9α-epidioxi-3β-hidroxi-(22E,24R)-ergosta-7,22-dien-6-ona [23], 37



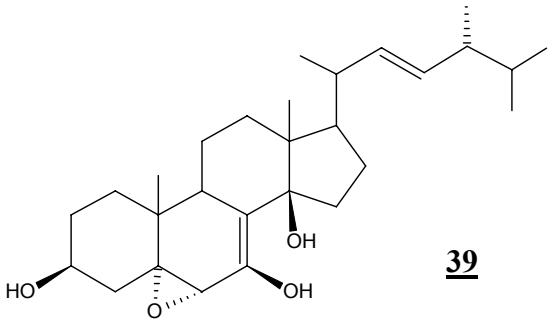
37

5α,9α-epidioxi-3β-hidroxi-(24S)-ergosta-7-en-6-ona [23], 38



38

5α,6α-epoxi-(22E,24S)-ergosta-7,22-dieno-3β,7β,14α-triol [23], **<u>39</u>**

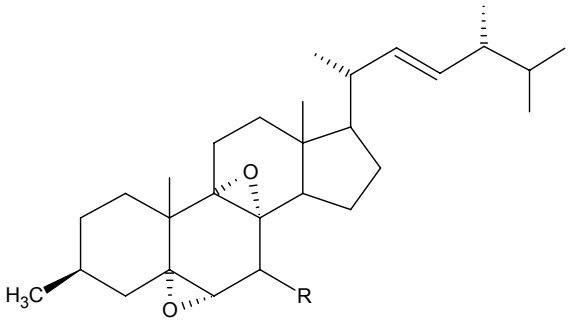


<u>39</u>

Los seis esteroles que se presentan a continuación fueron aislados de los hongos: *Amanita pantherina*, *Amanita virginoides*, *Lactarius piperatus*, *Lyophyllum shimeji*, *Tricholoma portentosum*, *Hypsizigus marmoreus* y *Lentinula edodes* [24].

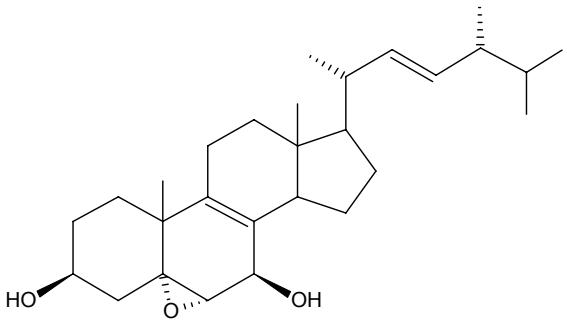
5α,6α; 8α,9α-diepoxi-(22E,24R)-ergosta-22-eno-3β,7α-diol [24], **<u>40</u>**

5α,6α; 8α,9α-diepoxi-(22E,24R)-ergosta-22-eno-3β,7β-diol [24], **<u>41</u>**



	R
<u>40</u>	α-OH
<u>41</u>	β-OH

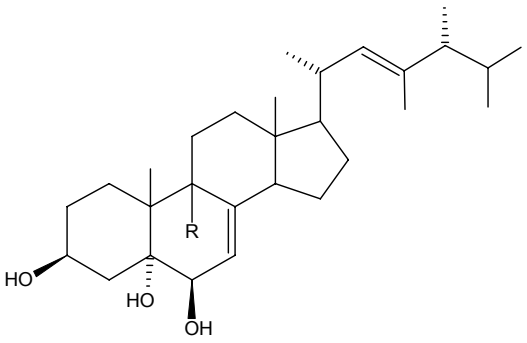
5α,6α-epoxi-(22E,24R)-ergosta-8,22-dieno-3β,7β-diol [24], **<u>42</u>**



<u>42</u>

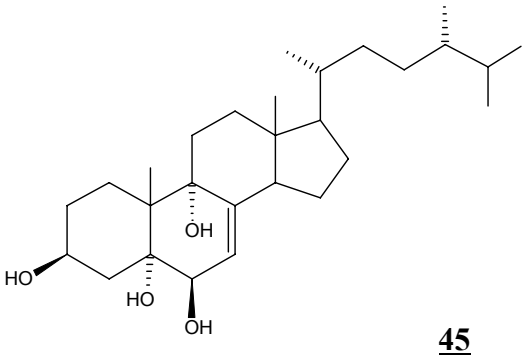
(22E,24R)-23-metilergosta-7,22-dieno-3β,5α,6β-triol [24], **43**

(22E,24R)-23-metilergosta-7,22-dieno-3β,5α,6β,9α-tetrol [24], **44**



	R
43	H
44	α-OH

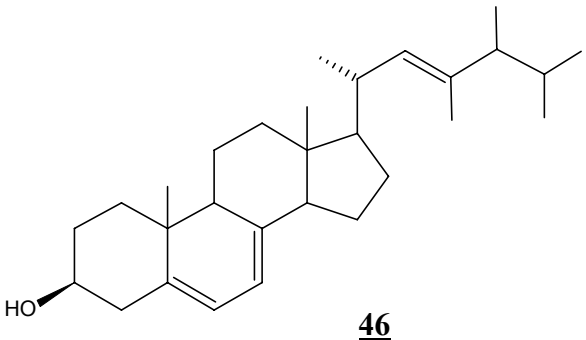
(24S)-ergosta-7-eno-3β,5α,6β,9α-tetrol [24], **45**



45

El siguiente esterol fue aislado del hongo comestible *Lentinula edodes* [25].

(22E)-23-metilergosta-5,7,22-trien-3beta-ol [25], **46**



46

3. TÉCNICAS GENERALES UTILIZADAS

3.1 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA (C.C)

Las columnas fueron empacadas con sílica gel 60 Merck (Diámetro 0.063 – 0.200 mm), siguiendo la técnica seca. Se empleó la relación sílica: muestra de 50:1. Como solventes de elución se utilizaron benceno y mezclas benceno – acetato de etilo en diferentes proporciones, tal como se indica en Parte Experimental.

3.2 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF)

Se usaron cromatoplacas de sílica gel 60 F_{254} de la casa Merck (Diámetro 0.02 mm, espesor 0.2 mm) de 20 x 20 cm. Como reveladores se emplearon vapores de yodo y el reactivo de Liebermann-Burchard modificado. Igualmente, se observaron los cromatogramas en luz UV después de ser revelados.

3.3 CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA

Se emplearon cromatoplacas de 20 x 20 cm de sílica gel 60 F_{254} (Espesor 1 mm) de la casa Merck. Los solventes de elución se especifican en cada caso.

3.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)

Los análisis por la técnica combinada (CG-EM) se realizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett- Packard 6890 acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5973. Para los análisis, se utilizó una columna capilar HP-5MS, 30 m x (250 micrómetros d.c. x 0.25 micrómetros d.i.), empleando el siguiente programa: temperatura inicial del horno 270ºC por 5 min, con una velocidad de calentamiento de 5ºC/min hasta 310ºC durante 10 min,

manteniendo el detector a 320ºC y el detector a 280ºC. Como gas de arrastre se usó helio con un flujo de 1 ml/min y presión de 8.8 psi. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto electrónico a 70 eV.

3.5 ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDRÓGENO (RMN-^{1}H) Y DE CARBONO 13 (RMN-^{13}C)

Los espectros de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C se obtuvieron utilizando un aparato BRUKER Modelo AMX-500. La frecuencia del equipo para el núcleo de hidrógeno fue de 400 MHz y para el núcleo de carbono fue de 100 MHz. Se empleó cloroformo deuterado $CDCl_3$ como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como estándar interno.

3.6 PUNTO DE FUSIÓN (p.f)

Los puntos de fusión se determinaros en un Fusiómetro Ernst Leintz GMBH Wetzlar. Se expresan sin corrección.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 ADQUISICIÓN DE LA MUESTRA

Los carpóforos del hongo *Lentinula edodes* fueron aportados por el Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé, los cuales se cosecharon del cultivo realizado por el Ingeniero Nelson Rodríguez, en la estación experimental La granja, Cenicafé, Chinchiná (Caldas). Lugar ubicado a 5º 00" de latitud norte y 75º 36" de longitud oeste, a una altitud de 1310 m.s.n.m. y el cual presenta temperatura promedio anual de 21.4°C, humedad relativa media de 81.0%, precipitación anual de 2399.9 mm con 240 días lluviosos en el año y brillo solar de 1825.4 horas anuales[26, 27].

4.1.1 METODOLOGÍA GENERAL EMPLEADA EN CENICAFÉ PARA EL CULTIVO DE *L. edodes* [26,27]:

4.1.1.1 Producción de semilla comercial[26, 27]

A partir del micelio de una cepa coreana de *L. edodes* codificada como L4055 se realizó la transferencia a tubos de ensayo con los medios de cultivo: agar extracto de malta (EMA) y agar papa dextrosa (PDA). Del micelio crecido en los tubos de ensayo se tomaron fragmentos de agar/micelio y se resembraron en cajas petri y botellas planas con los mismos medios de cultivo, incubados en el laboratorio de Biodigestión anaerobia de Cenicafé. Cuando el micelio invadió el 90% del medio, éste se refrigeró a 4ºC hasta el momento de su utilización. En frascos de vidrio se agregaron 200g de trigo (lavado e hidratado, hasta una humedad final entre 40 y 45%), los cuales fueron esterilizados en autoclave. Cuando alcanzaron la temperatura ambiente fueron sembrados en cámara de flujo laminar con fragmentos de agar/micelio crecidos en cajas petri o botellas planas. Los frascos con trigo se llevaron a incubación durante el tiempo necesario para que el micelio

invadiera el grano, para luego ser utilizado como inóculo en la elaboración de la semilla comercial.

La producción de semilla comercial se realizó adicionando 500g de trigo (lavado e hidratado, a una humedad final entre 40 y 45%) en bolsas de polipropileno de 9 x 18 cm calibre 1.5, a las cuales se les implementó un aro de PVC y un tapón de algodón en la parte superior, posteriormente se esterilizaron en autoclave a 121ºC durante 20 minutos, y cuando el material alcanzó la temperatura ambiente se inocularon a una tasa del 3% con la semilla obtenida en los frascos. Seguidamente fueron llevadas a incubación hasta que alcanzaran una completa invasión micelial.

4.1.1.2 Establecimiento de la formulación y preparación del sustrato[26, 27]

La formulación del sustrato se estableció teniendo en cuenta la composición química de las materias primas y las necesidades nutricionales del hongo (relación C/N entre 40 y 60):

- Aserrín de tallo de café (40%)
- Borra de café (44%)
- Salvado de trigo (13%)
- Carbonato de calcio (1%)
- Yeso (1%)
- Azúcar (1%)

Después de pesadas y mezcladas las materias primas, se empacó 1 Kg de sustrato en bolsas de polipropileno perforadas con un orificio de 2 cm de diámetro, el cual tenia como filtro un cuadro de tela interlón, para la inoculación.

4.1.1.3 Etapa de tratamiento térmico[26, 27]

Las bolsas con sustrato fueron llevadas a un tratamiento térmico al vapor empleando un sistema común de esterilización a la temperatura de ebullición del agua. El tiempo de tratamiento térmico fue de 6 horas.

4.1.1.4 Etapa de inoculación[26, 27]

El material expuesto al tratamiento térmico (bloques), se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y luego se llevó al laboratorio de Biodigestión anaerobia donde se realizó la siembra con semilla comercial, a una tasa de inoculación del 3%, luego las bolsas de sustratos fueron selladas al calor y amarradas con fibra plástica.

4.1.1.5 Etapa de incubación[26, 27]

Esta etapa se realizó a 85% de humedad relativa y finalizó después de 60 días cuando el micelio cubrió completamente el sustrato presentándose un cambio de coloración de blanco a café rojizo. Ésta es una de las etapas más largas e importantes dentro del cultivo ya que es aquí donde se presenta la asimilación del sustrato, produciéndose altas cantidades de metabolitos fungales, y enzimas activas que rompen complejos sustratos (celulosa, hemicelulosa y lignina) en pequeñas moléculas, las cuales pueden ser absorbidas por el micelio como nutrientes adecuados para su crecimiento.

4.1.1.6 Etapa de fructificación, cosecha y postcosecha[26, 27]

En el momento en que el abrigo micelial se tornó blando y los primordios empezaron a aparecer en algunos bloques, se realizó una estimulación para la aparición de los hongos en los otros bloques y al mismo tiempo hacer que la producción fuera más homogénea, la cual es denominada choque térmico.

Esta labor (choque térmico) consistió en disminuir aproximadamente en 9ºC la temperatura de los bloques, condición que se efectuó llevándolos en la noche desde el cuarto de incubación a la caseta de fructificación (las temperaturas ambientales disminuyen en la noche).

Para los choques térmicos posteriores (después de que se realiza la primera cosecha) la estimulación para la formación de nuevos primordios se llevó a cabo sumergiendo los bloques en agua durante la noche.

.

En el cuarto de fructificación los bloques son remojados constantemente para ayudar al crecimiento de los hongos. Después de realizada la primera cosecha (aparición y corte de los hongos) los bloques se alejaron del sitio de fructificación en un lugar seco, en una etapa llamada dormitación (descanso de los bloques) durante 8 días y luego se llevaron a un segundo choque térmico, el cual se realizó sumergiéndolos en agua con hipoclorito de sodio al 0.2% durante 24 horas. Cuando los bloques fueron sacados del agua, se colocaron en las estanterías lavadas y secas durante 3 días. Para la tercera y cuarta cosecha se siguió el mismo procedimiento de dormitación y choque térmico.

La cosecha de los hongos se realizó haciendo torsión en la base del pie o cortándolos, teniendo cuidado de no dejar residuos en el bloque ya que estos pueden inducir a la contaminación.

4.2 TRATAMIENTO PRELIMINAR DE LA MUESTRA

Los carpóforos de *L. edodes* se limpiaron y lavaron con agua corriente para retirar cualquier adherencia de material extraño (tierra, insectos, sustrato, etc), se cortaron en pequeños fragmentos y se secaron en una estufa de aire circulante a 60ºC hasta peso constante. Posteriormente, el material seco se llevó a molienda en un molino eléctrico. Se obtuvieron 270 g de material. Este tratamiento preliminar de la muestra se llevó a cabo en el Laboratorio de Biodigestión del Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFÉ.

4.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO

Se empleó el método descrito por Blig y Dyer para el aislamiento de esteroles y triterpenos[28]. El material seco y molido (270 g) de *L. edodes* fue sometido a un proceso de

extracción por maceración en frío con etanol al 96%, protegido de la luz y con renovación periódica (3 días) del disolvente (400 ml) durante 20 días. Cada vez se filtró, y se recuperó el disolvente a presión reducida. Al final, una vez reunidos los diferentes extractos etanólicos tras retirar el alcohol, se obtuvieron 11 g de extracto, de aspecto resinoso y color café oscuro.

4.4 OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE

El extracto etanólico fue sometido a reparto entre agua y acetato de etilo 1:1, se separó la fase orgánica, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida, obteniéndose 3 g de extracto de acetato de etilo, el cual se saponificó en caliente con KOH al 10% en solución etanol-agua (3:2), por un periodo de dos horas[29]. Posteriormente, se realizó una dilución con agua y se extrajo la fracción insaponificable con cloroformo. La fase orgánica se lavó con agua hasta neutralidad, se secó con sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad a presión reducida. La fracción insaponificable seca pesó 0.8 g.

La fase acuosa saponificada se guardó para estudiar los ácidos grasos.

4.5 OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

La fase acuosa saponificada se acidificó con ácido clorhídrico 6N hasta pH ácido al papel indicador universal y se realizó una partición con cloroformo. La fase clorofórmica se lavó con agua hasta neutralidad, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró, se concentró a presión reducida y se obtuvo la fracción de ácidos grasos, la cual pesó 0.7 g y se analizó por CG-EM. Su cromatograma de gases evidencia 2 compuestos mayoritarios (Figura 1).

Posteriormente la fracción de ácidos grasos se analizó por la técnica espectroscópica de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C.

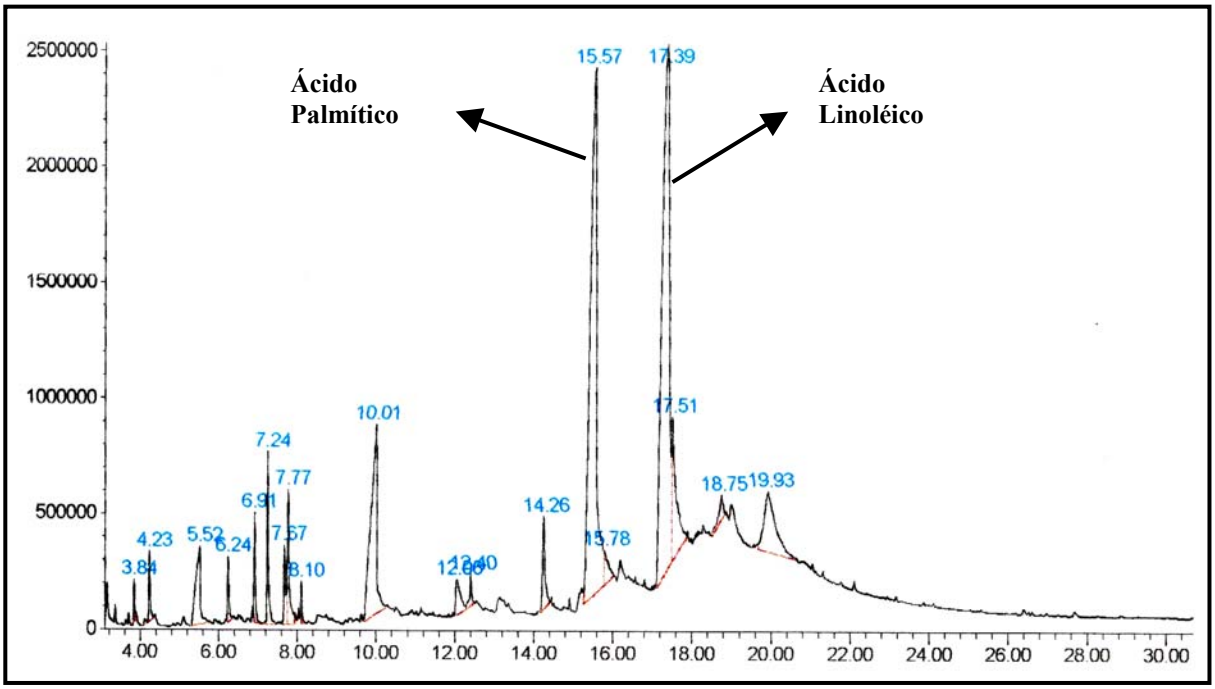


Figura 1. Cromatograma de Gases de la Fracción de Ácidos Grasos

4.6 FRACCIONAMIENTO DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE

La composición aproximada de la fracción insaponificable se estableció por cromatografía de capa fina empleando diferentes solventes o sus mezclas y comparando con patrones conocidos de esteroles. Se concluyó que la mezcla benceno: acetato de etilo 7:3 es la más adecuada, pues dio origen a la aparición del mayor número de manchas cromatográficas. Entonces, la fracción insaponificable se purificó por C.C, iniciando la elución con benceno y finalizando con mezcla benceno: acetato de etilo 70:30. Se recogieron fracciones de 4 ml cada una, que se monitorearon por C.C.F frente a un patrón correspondiente a la muestra aplicada y se reveló con reactivo de Liebermann-Burchard. Se reunieron aquellas fracciones cuyo comportamiento cromatográfico fue similar, con lo cual se obtuvieron 5 fracciones menos complejas enriquecidas en sus componentes, que se denominaron: LE1, LE2, LE3, LE4 y LE5.

FRACCIÓN LE1: Está constituida por compuestos de muy baja polaridad que por no ser de interés en este trabajo, se decidió no estudiarla.

FRACCIÓN LE2: Esta fracción (0.08g), al someterla a análisis por CG-EM mostró la presencia de 5 compuestos mayoritarios, identificados tal como se indica en la Figura 2. La fracción **LE3** (0.02g), ha pesar de exhibir un perfil cromatográfico en CCF diferente a la fracción LE2, con el análisis por CG-EM se puso en evidencia que tenía la misma composición de la fracción LE2, razón por la cual estas dos fracciones fueron unidas en una sola y nombrada en forma general como LE2. Esta fracción se sometió a purificación por cromatografía preparativa, eluyendo con mezcla benceno: acetato de etilo 7:3. Se obtuvieron 3 bandas, correspondientes a las subfracciones LE2-F1 a LE2-F3. Todas estas nuevas fracciones menos complejas, se analizaron por CG-EM, de las cuales, se decidió estudiar las LE2-F1 y LE2-F2, por ser las únicas que exhibieron compuestos mayoritarios, pues la tercera subfracción resultó ser una mezcla de compuestos minoritarios. Los cromatogramas de gases de las subfracciones LE2-F1 y LE2-F2 evidencian cada uno, dos compuestos mayoritarios como puede observarse en las Figuras 3 y 4 respectivamente.

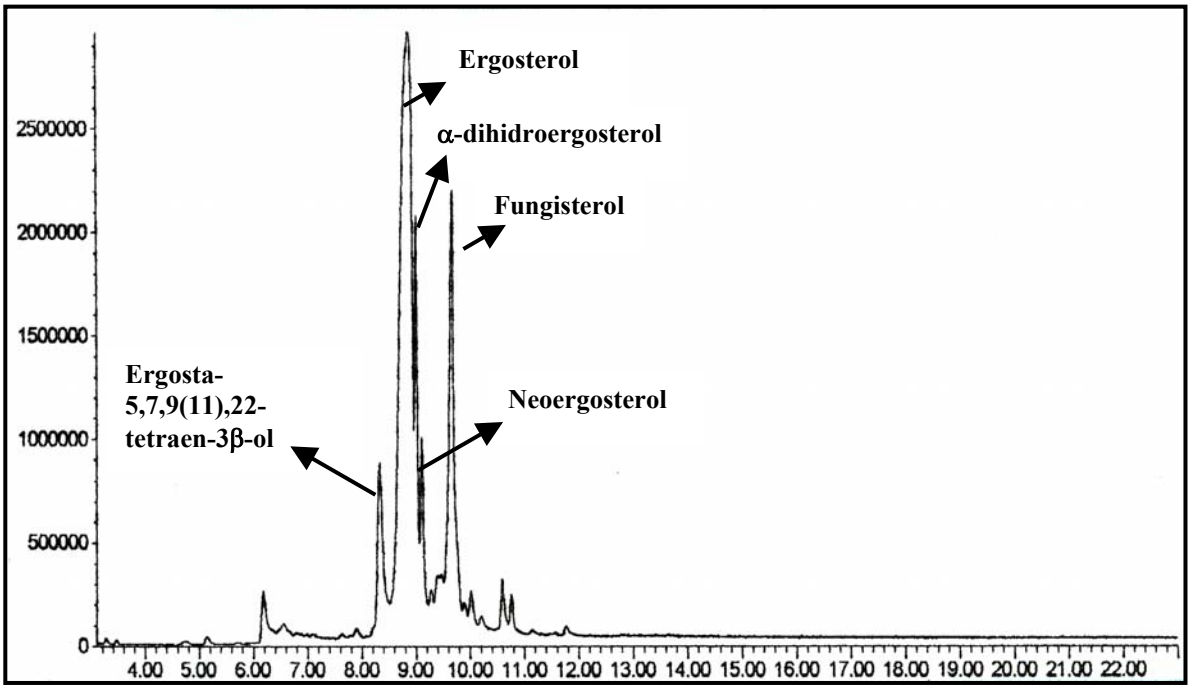


Figura 2. Cromatograma de Gases de la Fracción LE2

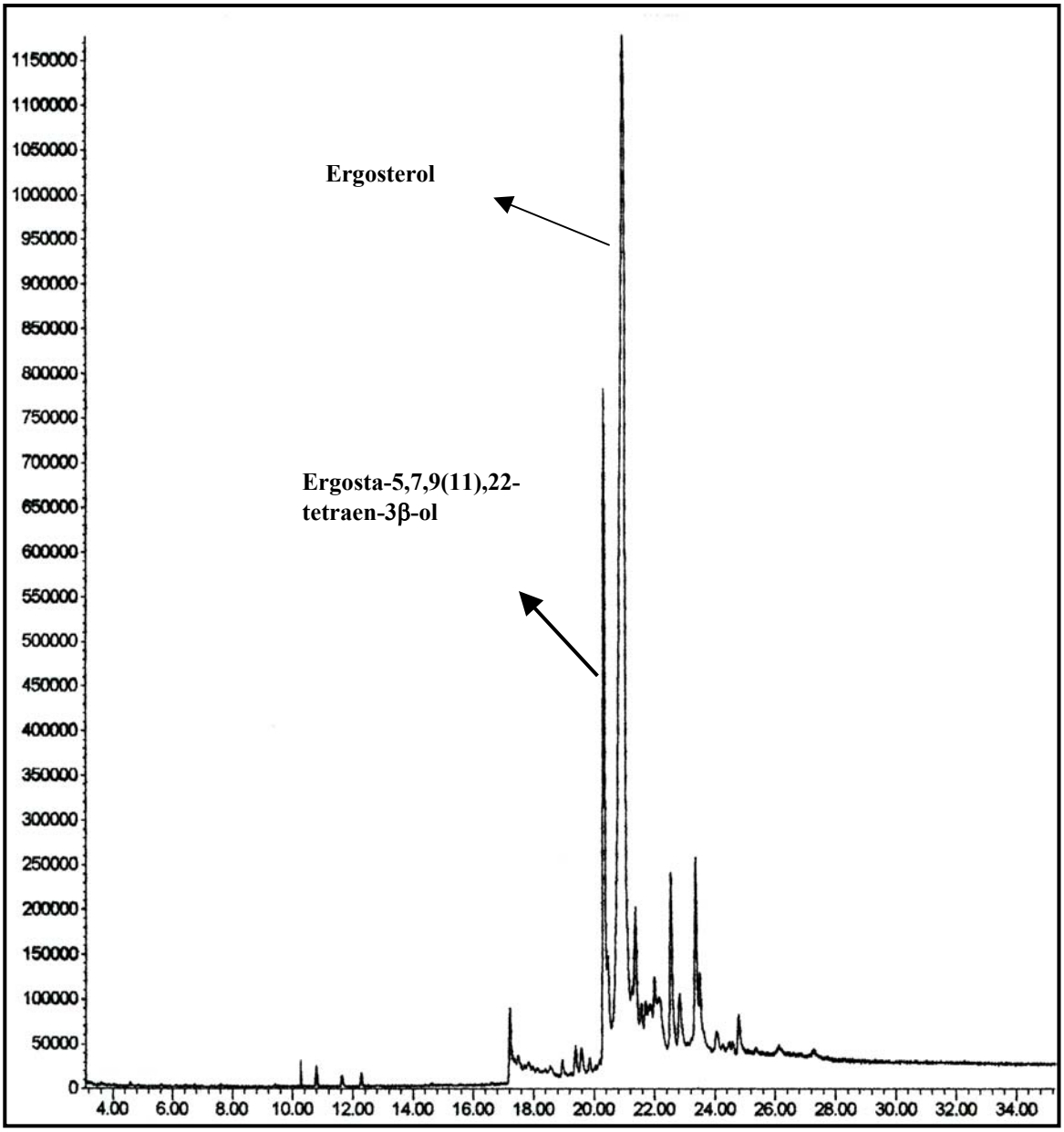


Figura 3. Cromatograma de Gases de la Subfracción LE2-F1

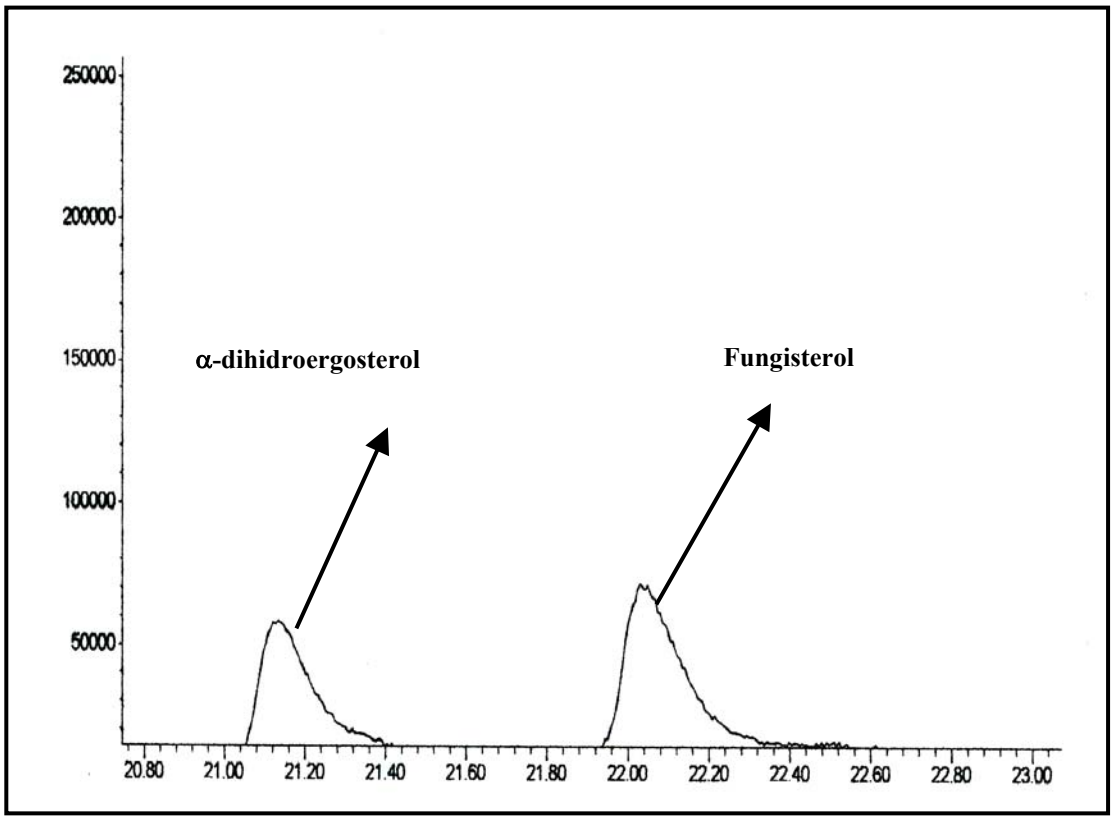


Figura 4. Ampliación del Cromatograma de Gases de la Subfracción LE2-F2, en t_R 21.13 - 22.04

FRACCIÓN LE4: Esta fracción, que al controlar su pureza individual, en CCF se comportó como un compuesto puro, se recristalizó en metanol obteniéndose agujas de color blanco (0.1g) cuyo punto de fusión se encontró en el rango de 178 a 179ºC. Posteriormente se analizó por CG-EM. Su cromatograma de gases exhibió una mezcla de varias sustancias (Figura 5) con un compuesto notoriamente mayoritario. Posteriormente, esta fracción es analizada por RMN.

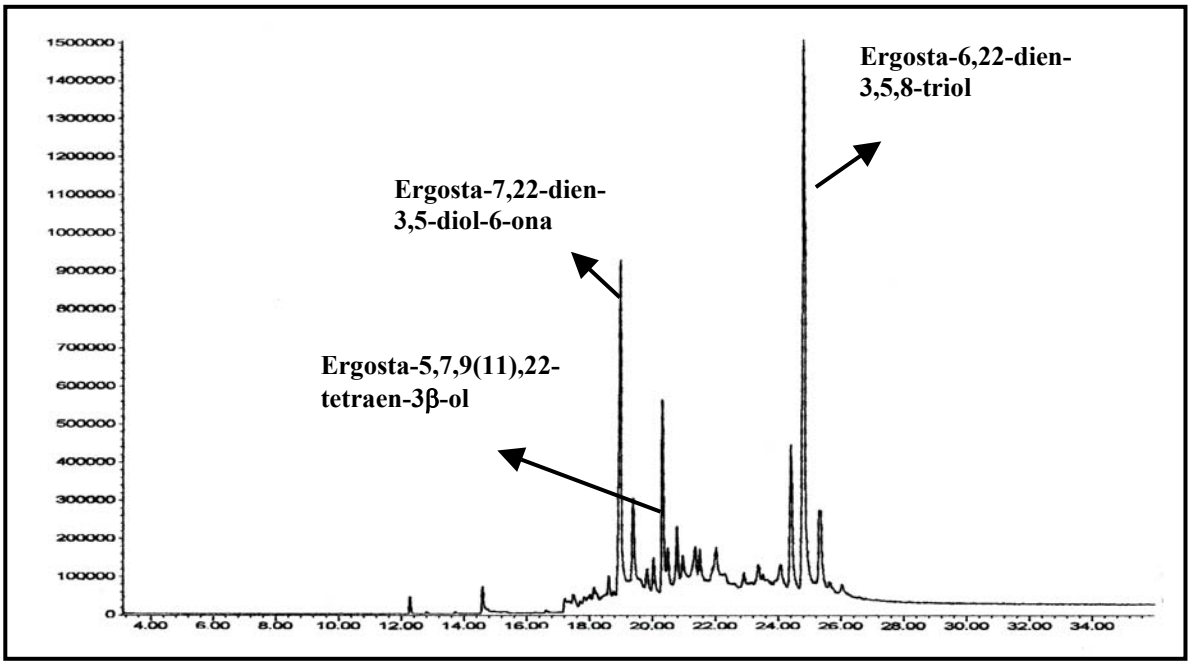


Figura 5. Cromatograma de Gases de la Fracción LE4.

FRACCIÓN LE5: Esta fracción (0.01g) fue sometida a estudio espectroscópico por CG-EM, y se obtuvieron 3 compuestos mayoritarios (Figura 6).

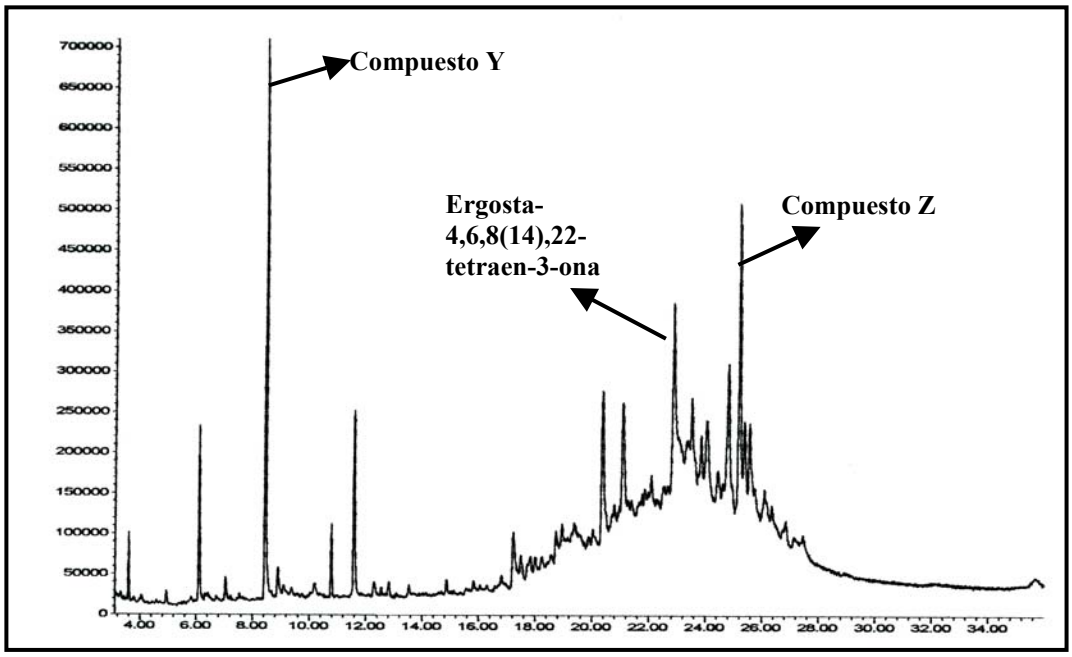


Figura 6. Cromatograma de Gases de la Fracción LE5

4.7 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)

4.7.1 FRACCIÓN INSAPONIFICABLE

Dado las pequeñas cantidades obtenidas de las fracciones LE2, LE4 y LE5, hubo necesidad de analizadas empleando la técnica combinada CG-EM, en la determinación estructural y por tanto, la identificación de los compuestos se realizó mediante el análisis de los espectros de masas, en algunos casos auxiliados de compuestos conocidos, por su comparación con los referenciados en la literatura y además por los tiempos de retención de los correspondientes patrones.

4.7.1.1 FRACCIÓN LE2:

La fracción LE2 contiene cinco compuestos mayoritarios del tipo monohidroxiesterol:

ergosterol, 1

ergosta-5,7,22-trien-3β-ol, $C_{28}H_{44}O$, t_R = 8.868 min (t_r patrón = 9.759 min).
Espectro de masas: iones m/z (%): 396[M^+ (64.64)]; 381 (2.92); 363 (100); 337 (34.88); 271 (5.31); 253 (20.15); 227 (3.51); 211 (15.21); 158 (5.04); 143 (17.29); 128 (6.71). Figura 7

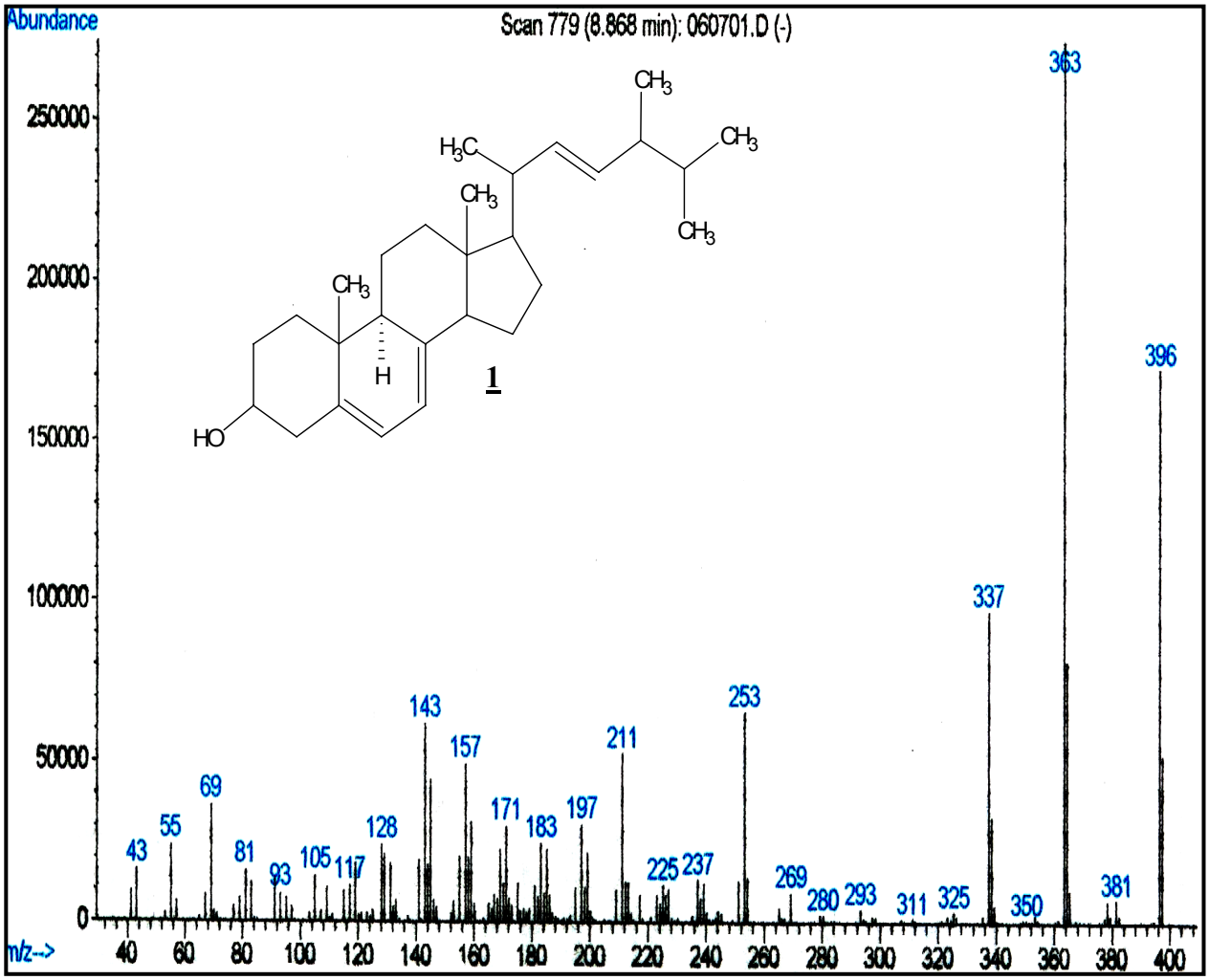


Figura 7. Espectro de masas de ergosterol

α-dihidroergosterol, 47

ergosta-7,22-dien-3β-ol, $C_{28}H_{46}O$, t_R = 9.009 min (t_r patrón = 8.902 min).

Espectro de masas: Iones m/z (%): 398[M^+ (42.30)]; 383 (22.80); 365 (2.00); 300 (20.00); 273 (30.00); 271 (100), 255 (40.00); 253 (12.00); 246 (23.20); 231 (18.00); 229 (20.00); 213 (18.86); 211 (2.00). Figura 8.

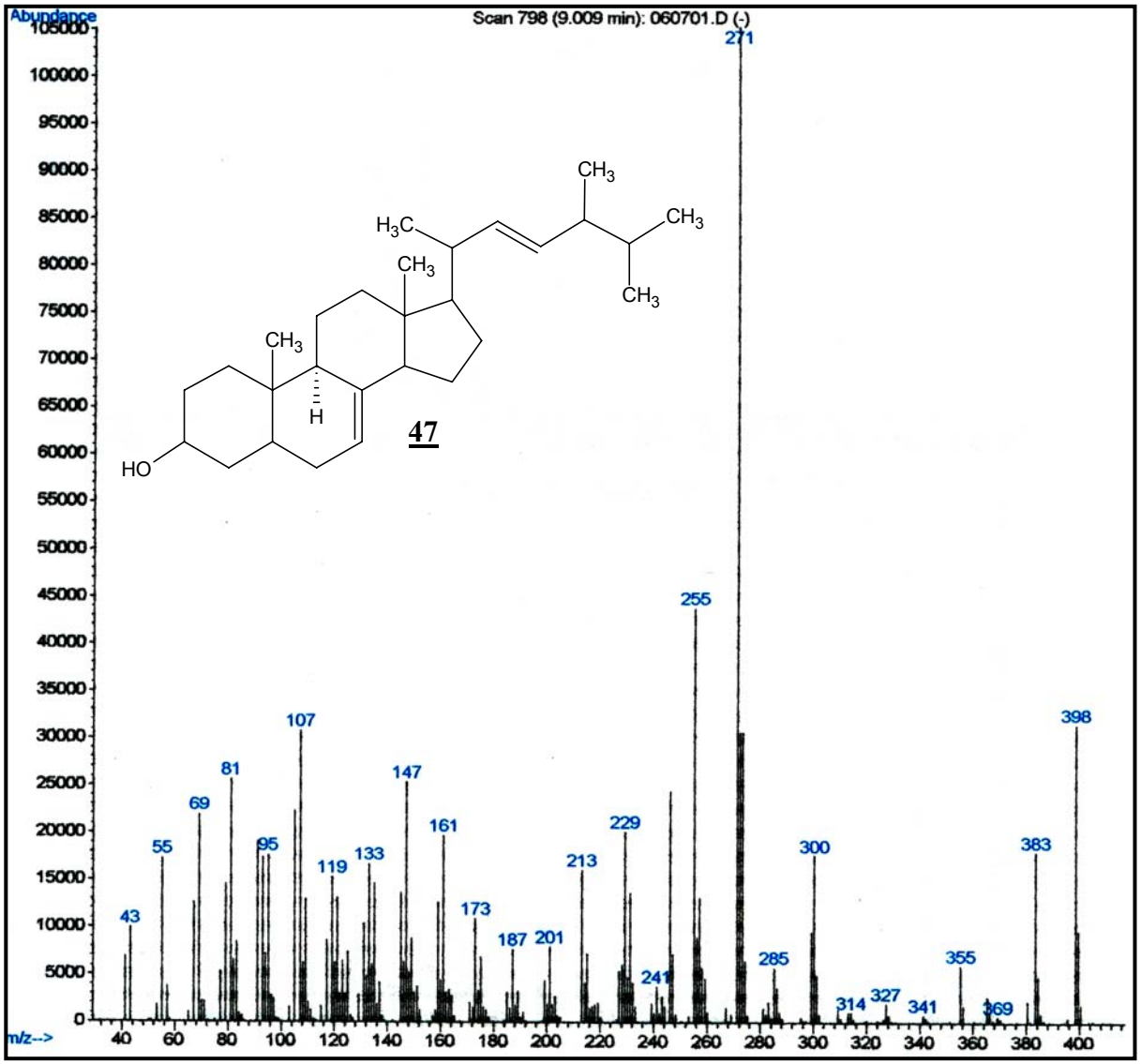


Figura 8. Espectro de masas de α-dihidroergosterol

fungisterol, 48

ergosta-7-en-3β-ol $C_{28}H_{48}O$, t_R = 9.677 min (t_r patrón = 9.430 min).

Espectro de masas: Iones m/z (%): 400[M^+(100)]; 385 (32.85); 382 (1.78); 367 (5.02); 273 (19.43); 255 (74.48); 246 (6.71); 231 (18.75); 213 (21.26). Figura 9

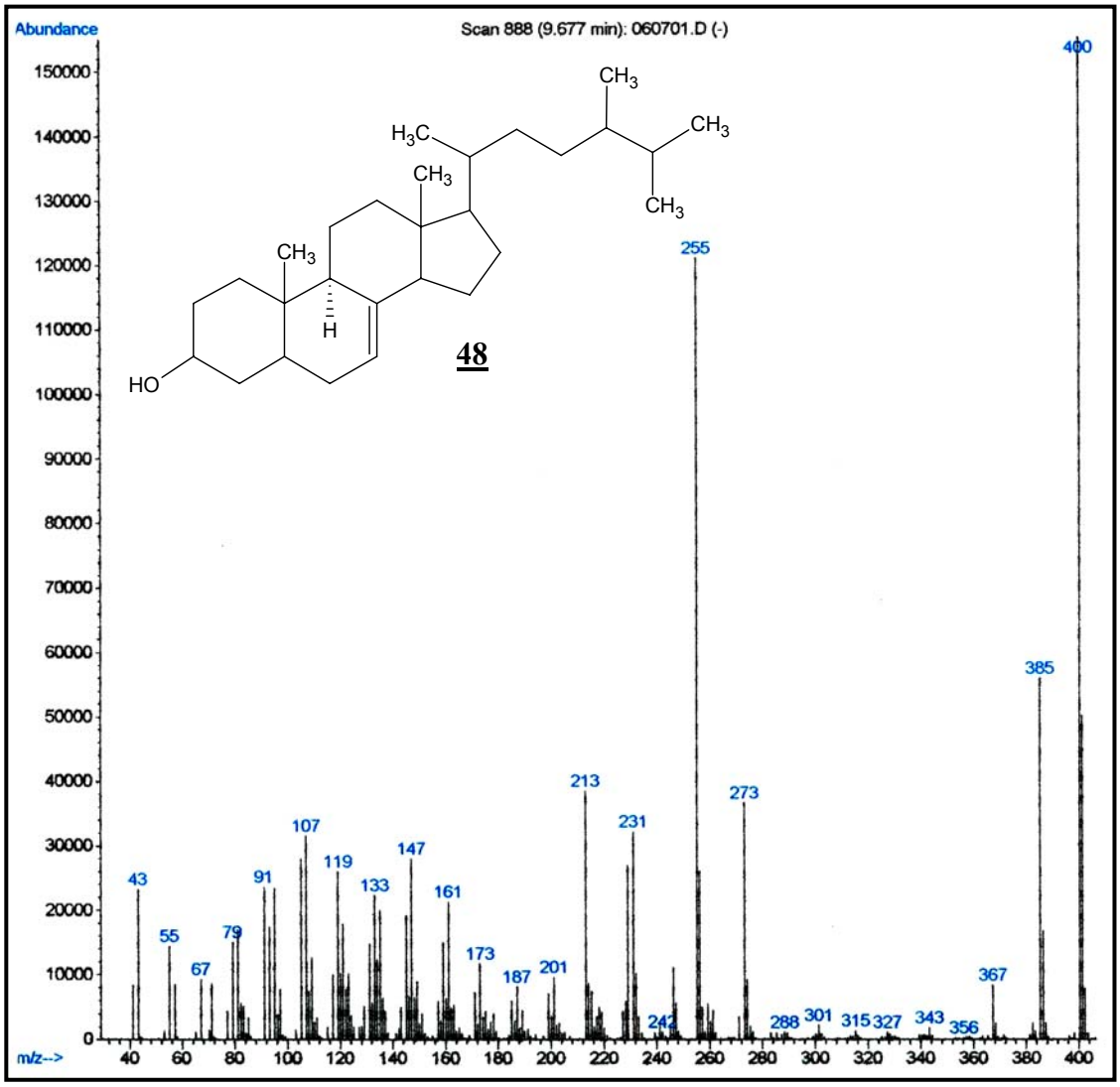


Figura 9. Espectro de masas de fungisterol

ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol, 49

$C_{28}H_{42}O$, t_R = 8.334 min (t_r patrón = 9.301 min).

Espectro de masas: Iones m/z (%): 394[M^+(20.2)]; 376 (23.30); 361 (6.30); 348 (3.70), 333 (5.33), 269 (6.90); 251 (100), 227 (11.00); 209 (25.00); 195 (23.80); 69 (45.00). (Figura 10).

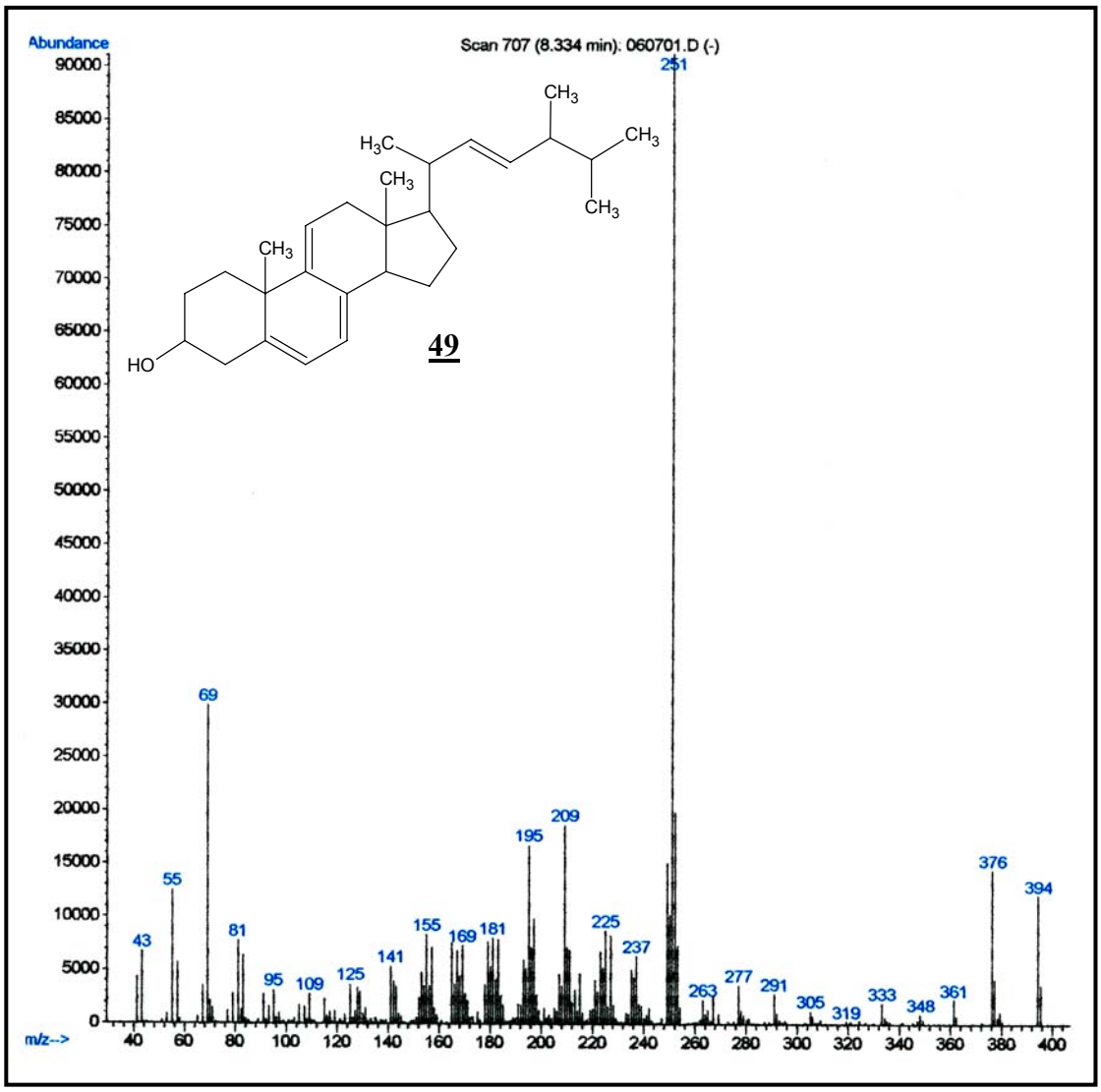


Figura 10. Espectro de masas de ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol

neoergosterol, 50

$C_{27}H_{40}O$, t_R = 9.106 min.

Espectro de masas: Iones m/z (%): 380[M^+ (48.21)]; 362 (9.52); 347 (2.38); 319 (8.33); 255 (9.80); 253 (27.98); 237 (100); 213 (37.50); 195(4.40); 142(9.50); 141 (14.88). Figura 11.

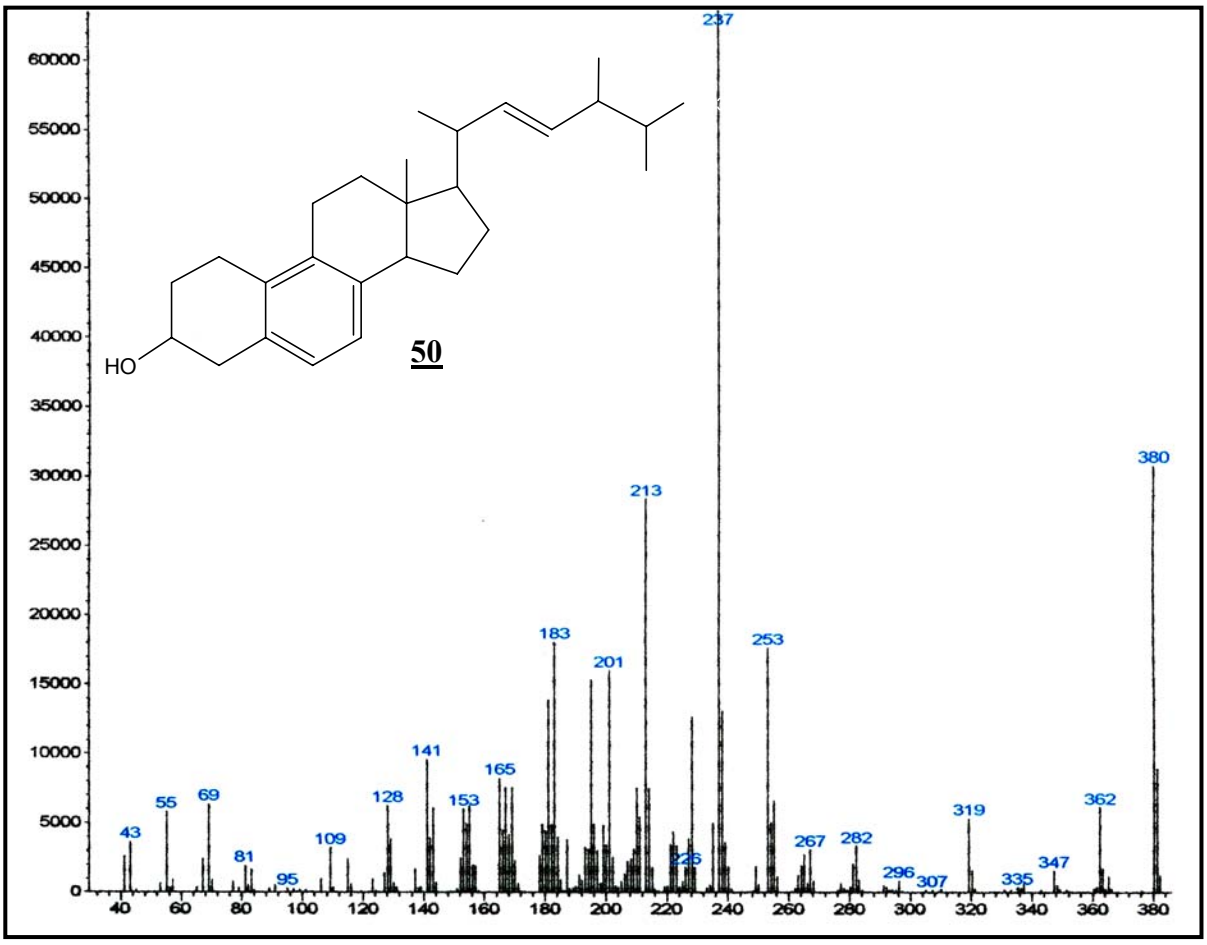


Figura 11. Espectro de masas de neoergosterol

4.7.1.1.1 FRACCIÓN LE2-F1:

Como se indicó con anterioridad esta subfracción proviene de la cromatografía preparativa de la fracción LE2. Se identificaron:

Ergosterol, 1 Espectro de masas: Figura 7

Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol, 49 Espectro de masas: Figura 10

4.7.1.1.2 FRACCIÓN LE2-F2:

De otra banda obtenida de la cromatografía preparativa se aislaron:

Fungisterol, 48 Espectro de masas: Figura 9

α-dihidroergosterol, 47 Espectro de masas: Figura 8

Volviendo a las fracciones iniciales:

4.7.1.2 FRACCIÓN LE4

ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol [51]

$C_{28}H_{46}O_3$, t_R = 24.828 min.

Espectro de masas: Iones m/z (%): 430[M^+(1.57)]; 428 (22.38), 413 (14.53); 385 (17.85); 367 (10.47), 349 (10.52), 330 (45.35), 303 (47.96), 301 (100), 285 (27.91), 267 (39.24), 249 (12.79), 191 (22.38). Figura 12.

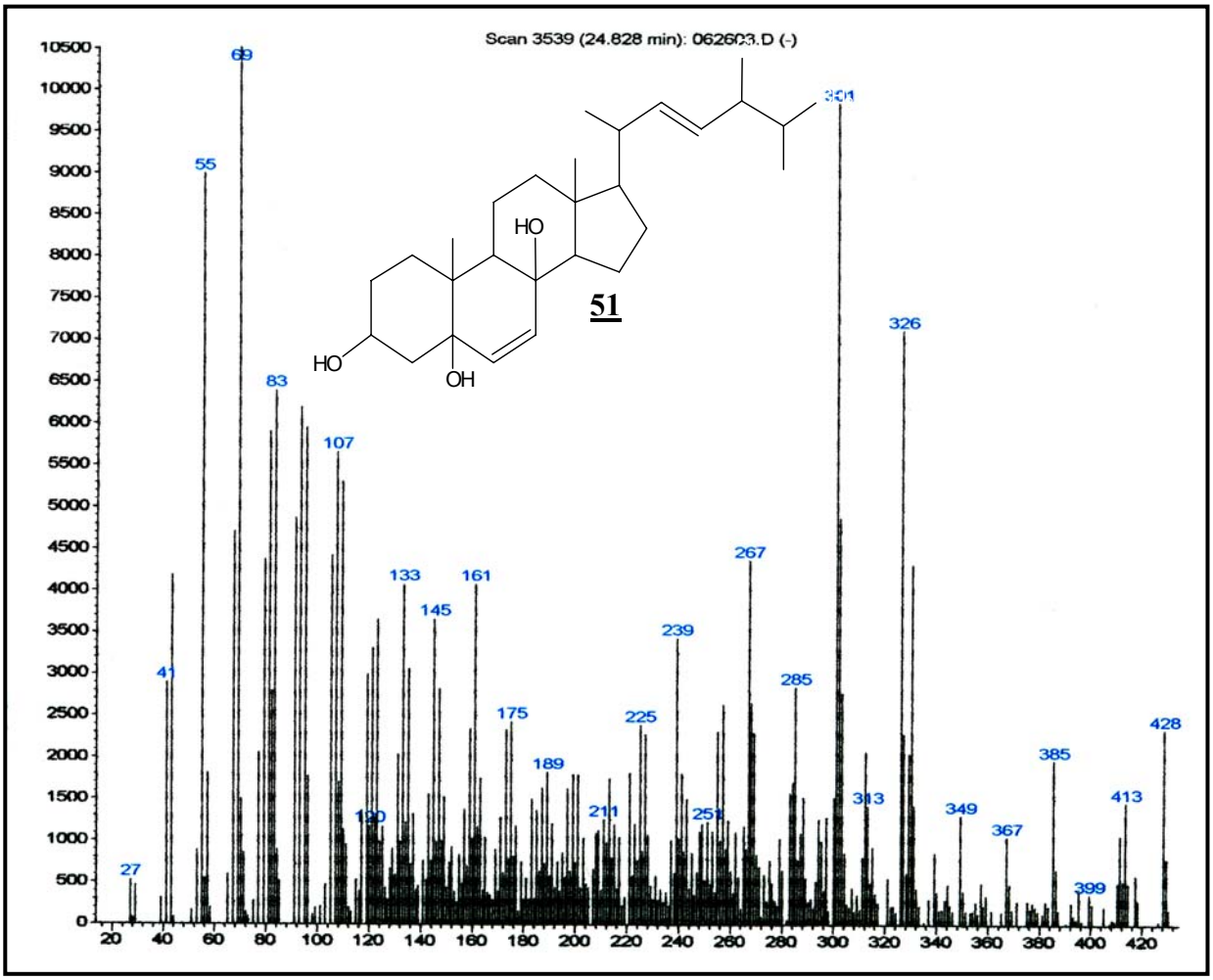


Figura 12. Espectro de masas de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol

ergosta-7,22-dien-3,5-diol-6-ona, <u>52</u>

$C_{28}H_{44}O_3$, t_R = 18.968 min.

Espectro de masas: Iones m/z (%): 428[M^+(3.77)]; 413 (2.32); 400 (0.87); 385 (12.20), 303 (4.65), 285 (4.65), 259 (5.81), 69 (100). Figura 13.

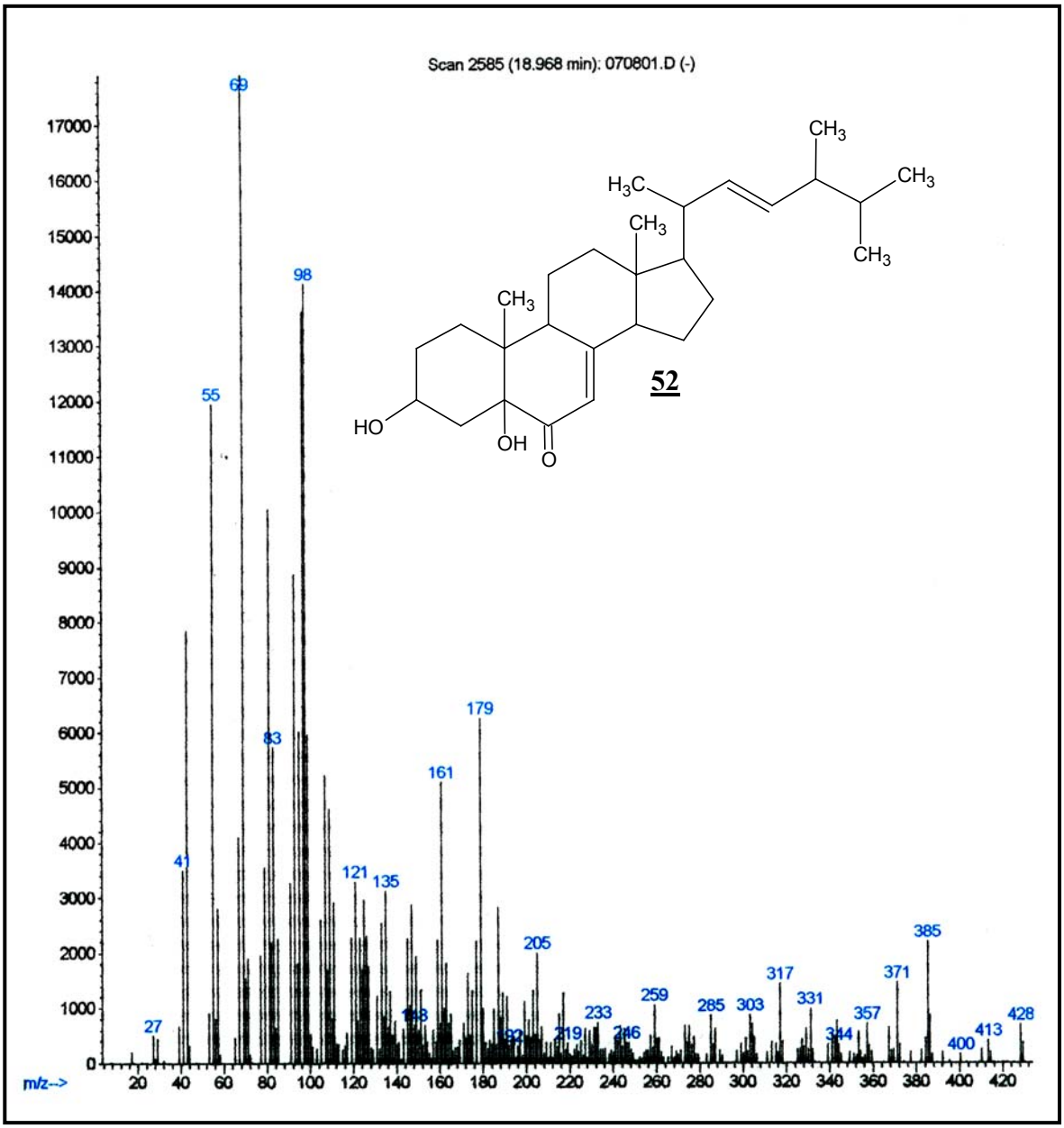


Figura 13. Espectro de masas de ergosta-7,22-dien-3,5-diol-6-ona

ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol, <u>49</u> Espectro de masas: Figura 10

4.7.1.3 FRACCIÓN LE5

Compuesto Y, <u>53</u>

t_R = 18.968 min Espectro de masas: Iones m/z (%): M^+ 293. Figura 14.

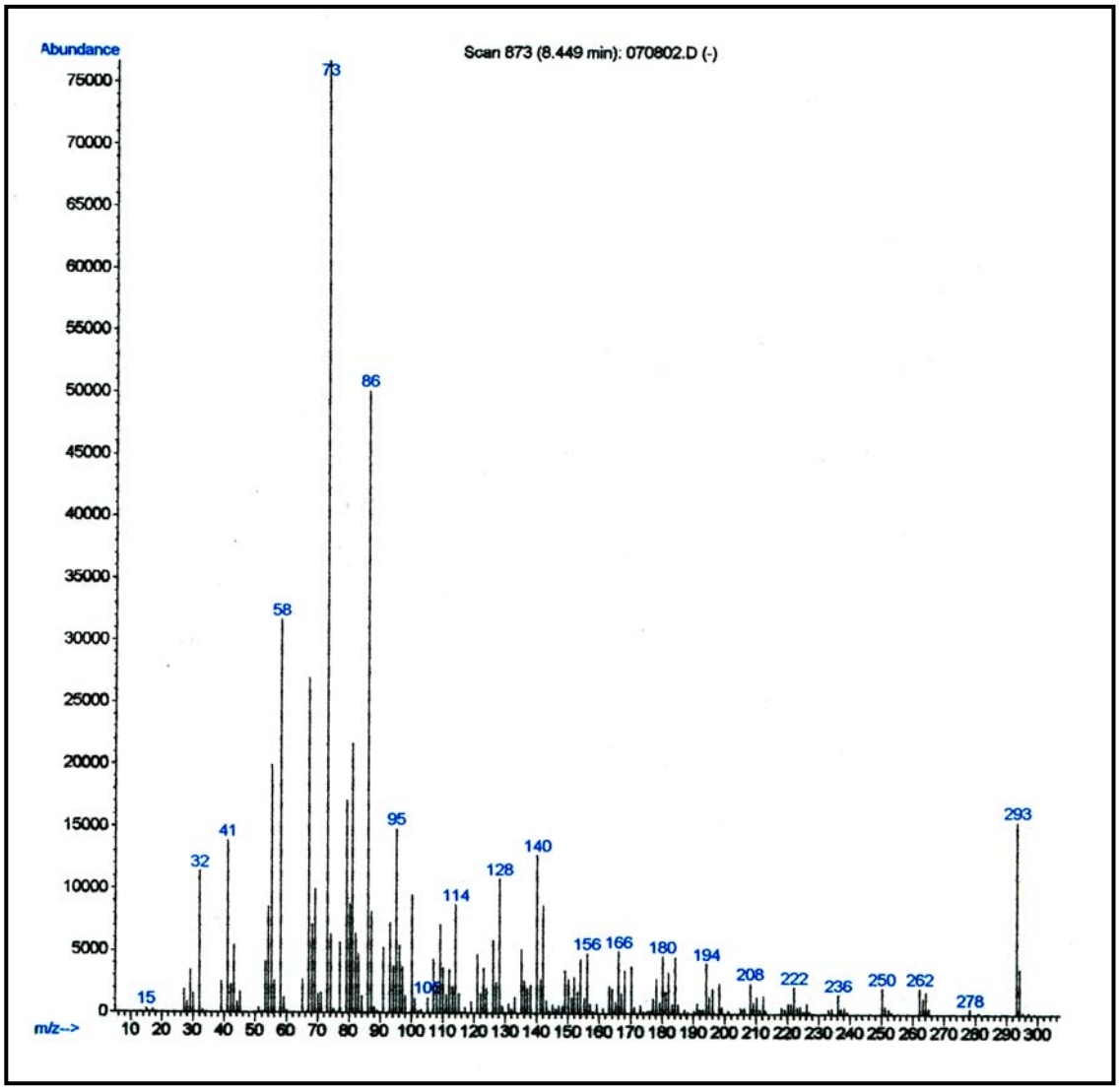


Figura 14. Espectro de masas de Compuesto Y

ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona, <u>54</u>

$C_{28}H_{40}O$, t_R = 22.847 min.

Espectro de masas: Iones (%): M^+ 392 (42.73); 377 (1.45); 359 (2.91); 267 (100), 249 (23.84), 225 (12.80), 207 (28.78). Figura 15.

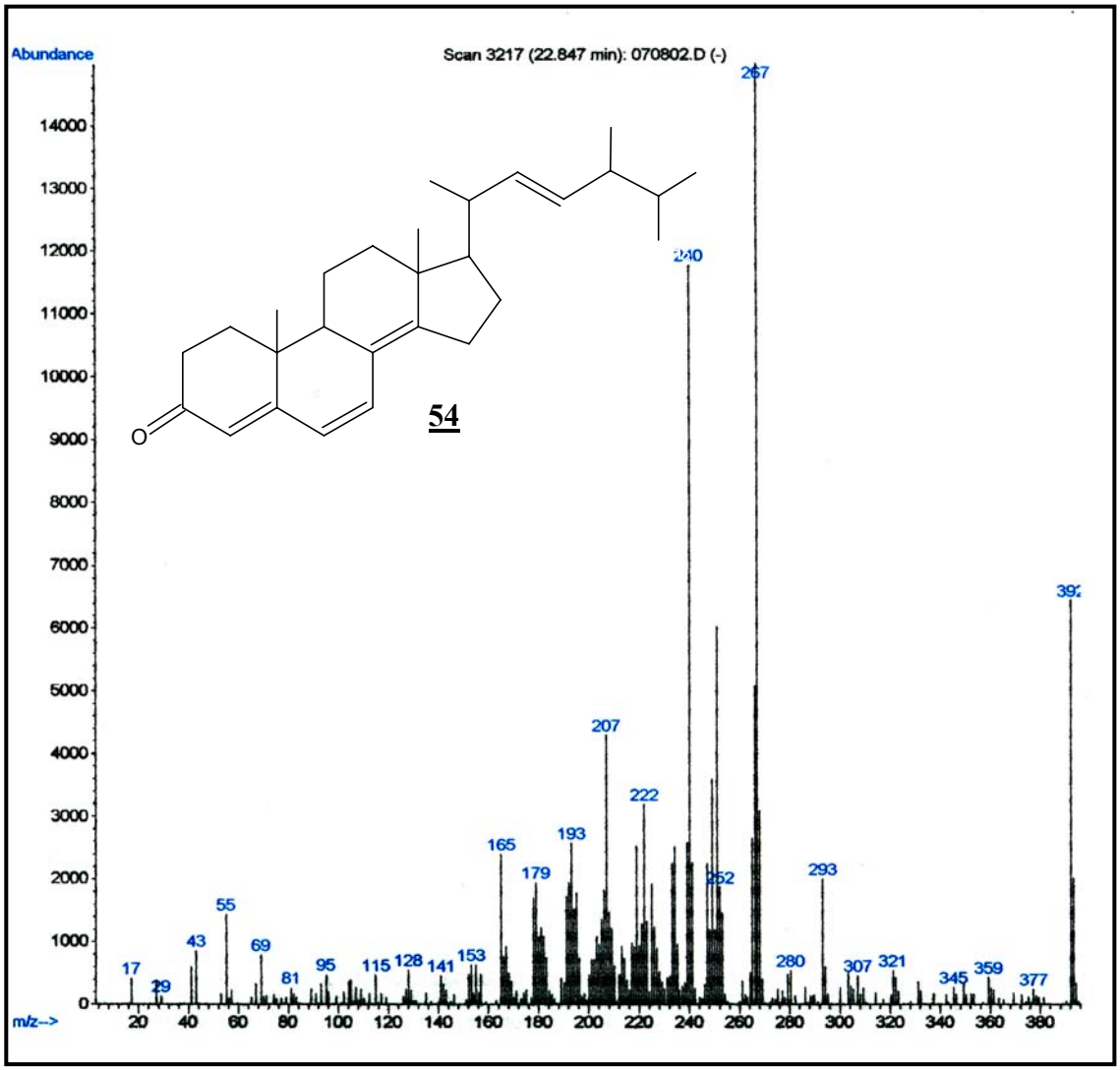


Figura 15. Espectro de masas de ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona

COMPUESTO Z, 55

t_R = 25.174 min.

Espectro de masas: Iones m/z (%): 440[M^+(61.05)]; 425 (28.78); 422 (1.74); 407 (100), 313 (2.91), 271 (5.81), 269 (14.53), 253 (10.46), 171 (8.14). Figura 16.

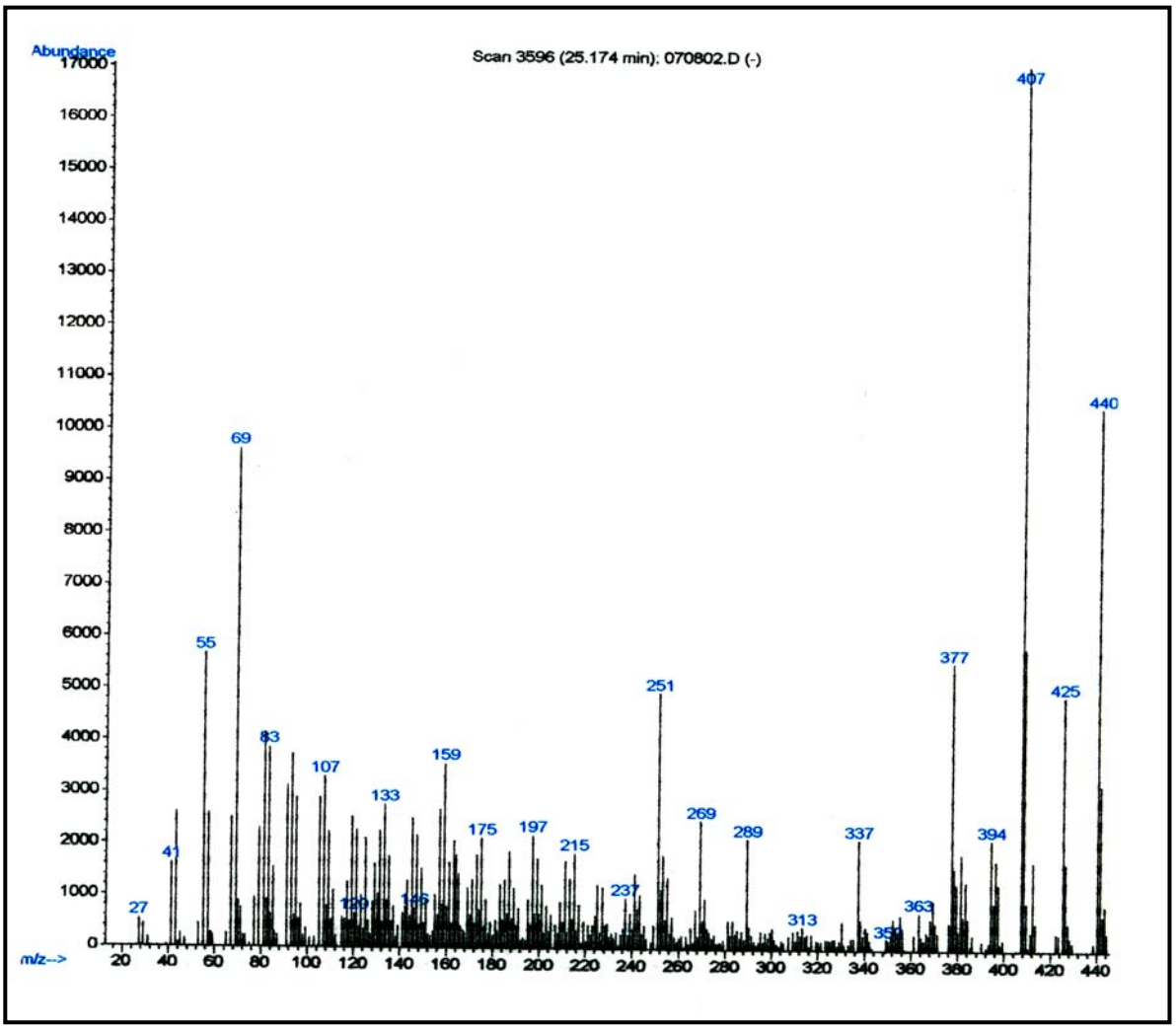


Figura 16. Espectro de masas de Compuesto Z

4.7.2 FRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Ácido linoléico, <u>56</u>

t_R = 17.385 min.

Espectro de masas: Iones m/z (%): 280[M^+(59.17)]; 251 (0.88); 237 (1.18); 220 (2.96), 209 (2.37), 122 (15.38), 123 (3.6), 109 (44.38), 95 (80.18), 81 (100), 67 (95.56), 55 (42.61), 41 (27.22). Figura 17.

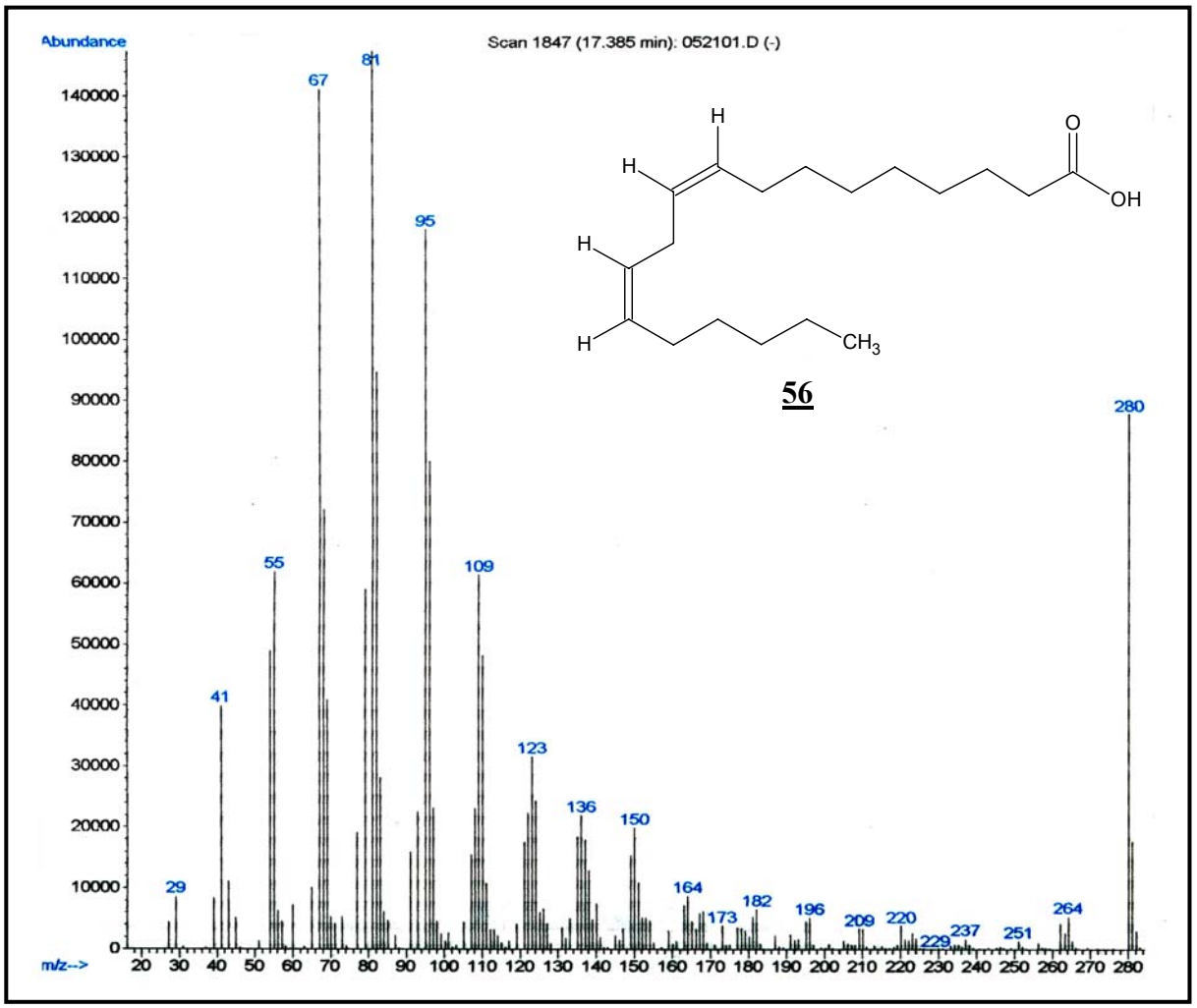


Figura 17. Espectro de masas de Ácido linoléico

Ácido palmítico, 57

t_R = 15.566 min.

Espectro de masas: Iones m/z (%): 256[M^+ (100)]; 227 (20); 213 (76.3); 199 (18.82), 185 (39.41), 171 (37.06), 157 (37.06), 143 (15.29), 129 (78.82), 115 (26.47), 97 (32.94), 83 (32.94), 73 (89.20), 60 (64.70), 43 (43.53) . Figura 18.

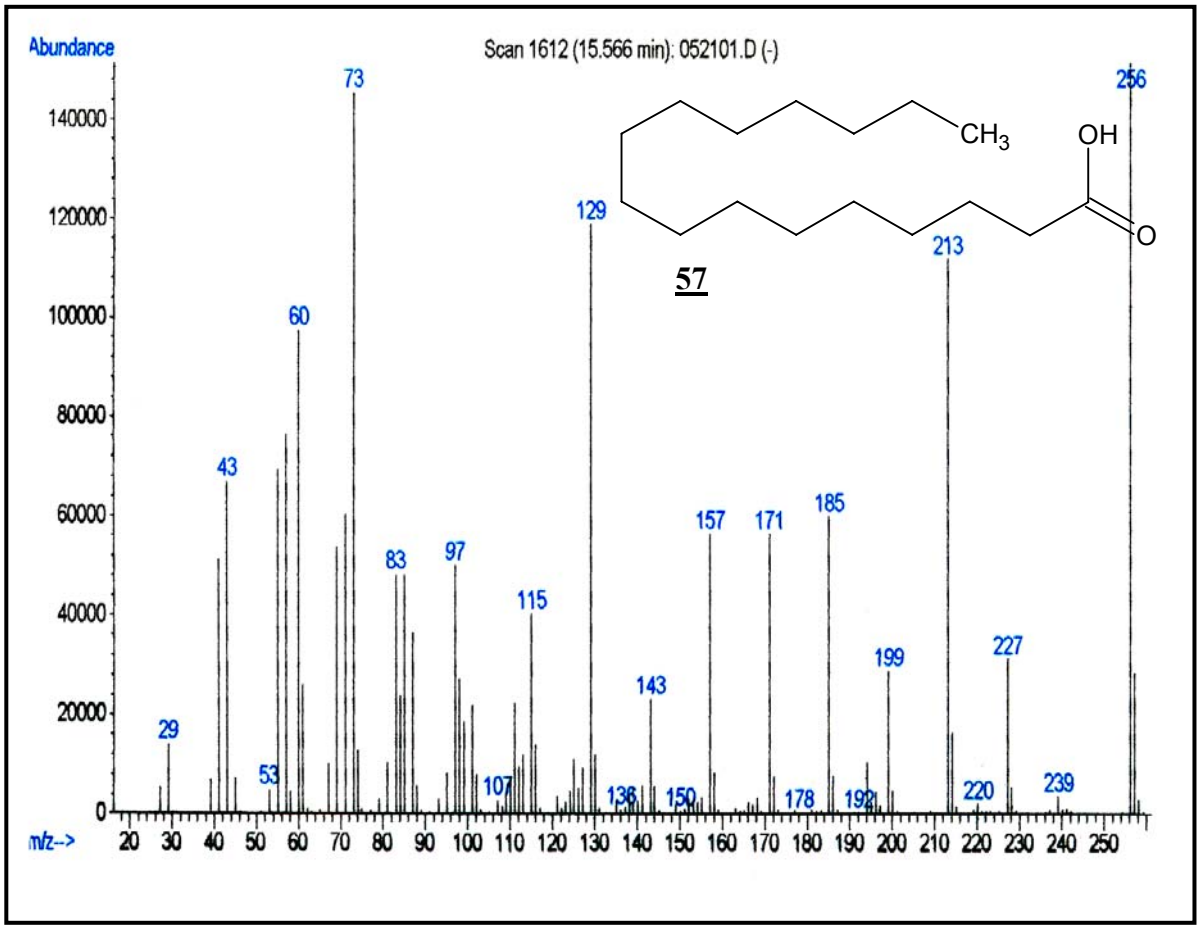


Figura 18. Espectro de masas de Ácido palmítico

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

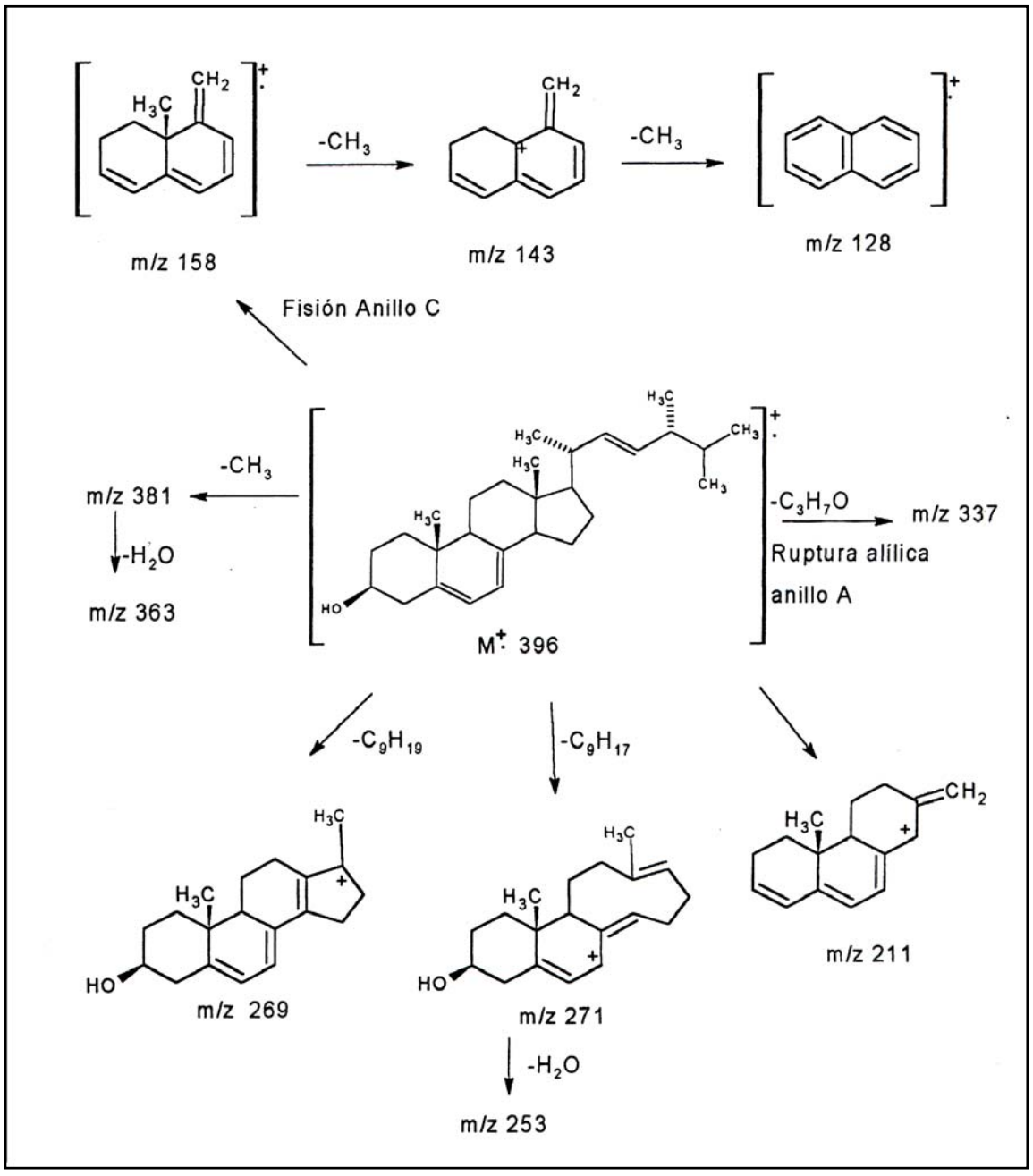
5.1 FRACCIÓN LE2

5.1.1 ergosterol, 1

El compuesto **1** se identificó como ergosterol, uno de los esteroles de mayor abundancia en los macromicetos[30]. Su espectro de masas (Figura 7) indica el ion molecular a m/z 396 que es consistente con la fórmula molecular $C_{28}H_{44}O$, así como los iones característicos de los esteroles hidroxilados en C3. Presenta picos a m/z 381 [M^+ - Me] y m/z 363 [M^+ - Me - H_2O]. La pérdida de la cadena lateral insaturada en C22 está determinada por una diferencia de 125 u.m.a entre el ion molecular y el ion a m/z 271. Los iones a m/z 271 [M^+ - CL], m/z 253 [M^+ - CL - H_2O] y m/z 211 [M^+- CL - D - H - H_2O] revelan la presencia de un esqueleto esteroidal tipo ergostano[31,32] con dos insaturaciones en el núcleo, las cuales se localizan en C5 y C7, ya que la ruptura alílica del anillo A y los iones generados por la fisión del anillo C y la perdida consecutiva de uno y dos grupos metilo (m/z 158, m/z 143, y m/z 128), así lo demuestran. En el Esquema 3 se presenta el patrón de fragmentación del ergosterol[34], que soporta la investigación.

5.1.2 α-dihidroergosterol, 47

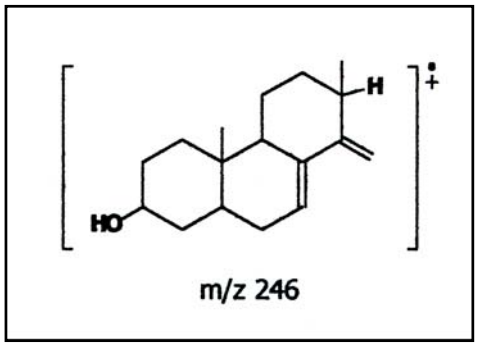
En el espectro de masas de este compuesto (Figura 8) se tiene el ion molecular a m/z 398 que corresponde a la fórmula molécular $C_{28}H_{46}O$, así como un conjunto de iones típicos para esteroles del tipo 3-hidroxiergostano insaturado[29,30] (m/z 383 [M^+- Me], m/z 355 [M^+ - isoprop], m/z 271 [M^+- CL-2H], m/z 255 [M^+-CL-H_2O], m/z 231 [M^+-CL-D-H] y m/z 213 [M^+-CL-D-H-H_2O]). La insaturación se presenta en C7 debido a la presencia del ion a m/z 246, el cual es diagnóstico del núcleo Δ^7



Esquema 3. Patrón de fragmentación de ergosterol

(Esquema 4), y la ausencia de los fragmentos a m/z 313 [M^+-85] y m/z 287 [M^+-111] confirma que la insaturación no se encuentra en C5. Los iones a m/z 273 [M^+-CL] y m/z 271 [M^+-CL-2H] originados en la pérdida de 125 y 127 uma respectivamente, indican la

presencia de una insaturación en la cadena lateral, ciertamente en C22 ya que está presente el fragmento de m/z 300 [M^+- C_7H_{14}], resultado de la fragmentación vinílica de la cadena lateral[32,33].



Esquema 4. Ion diagnóstico núcleo Δ^7

5.1.3 fungisterol, 48

Este compuesto se identificó como ergosta-7-en-3β-ol. El análisis de su fragmentación indica un ion molecular a m/z 400 el cual es consistente con la fórmula molecular $C_{28}H_{48}O$, y algunos iones característicos de esteroles hidroxilados en C3 (m/z 385 [M^+-Me], m/z 367 [M^+-Me-H_2O], m/z 255 [M^+-CL-H_2O] y m/z 213 [M^+-CL-D-H-H_2O]. Está presente el pico a m/z 246, el cual es diagnóstico de núcleo Δ^7 (Esquema 2), y la diferencia de 127 uma (C_9H_{19}) entre el ion molecular y el ion a m/z 273 que es originado por la pérdida de la cadena lateral, implica que la cadena lateral está saturada.

5.1.4 ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol, 49

El espectro de masas de este compuesto (Figura 10) muestra un ion molecular a m/z 394 que es consistente con la fórmula molecular $C_{28}H_{42}O$, para la cual se tiene un IDH de 8. La presencia de los iones a m/z 376 [M^+-H_2O] y m/z 361 [M^+-H_2O-Me] permiten inferir que es un esterol tetracíclico tipo ergostano, hidroxilado en C3 y por lo tanto el cierre de los anillos disminuye a 4 el número de insaturaciones del compuesto. La existencia de los picos a m/z: 251 [M^+-CL-H_2O], 227 [M^+-CL-D], 225[M^+-CL-D-2H] y 209 [M^+-CL-D-H_2O], indica que el núcleo básico contiene 3 insaturaciones y por consiguiente, la cuarta

insaturación debe encontrarse en la cadena lateral, probablemente en C22, corroborándose por la presencia, del ión de baja intensidad a m/z 267 [M^+-CL-2H], ocasionado por la pérdida de 127 uma.

5.1.5 neoergosterol, 50

El análisis de la fragmentación de este compuesto indica un ion molecular a m/z 380 el cual es consistente con la fórmula molecular $C_{27}H_{40}O$. Están presentes algunos iones característicos de esteroles hidroxilados en C3 (m/z 362 [M^+-H_2O], m/z 347 [M^+-Me-H_2O], así como el ion a m/z 319 [M^+-ISOP-H_2O], el cual, además es confirmatorio de la insaturación de la cadena lateral en C-22, por lo tanto, los picos a m/z 255 [M^+-CL], m/z 253 [M^+-CL-2H] y m/z 237 [M^+-CL-H_2O] implican una cadena lateral insaturada en C22. La fragmentación es parecida a la de los esteroles $\Delta^{5,7,9(11)}$, sin embargo el compuesto no contiene este tipo de núcleo ergostano pues la pérdida de la cadena lateral y una molécula de agua genera un ion a m/z 237 uma, 14 uma menor que el fragmento a m/z 251 indicando así, la ausencia de uno de los metilos del núcleo ergosta-5,7,9,-trieno. La similitud de los espectros a m/z correspondientes a los fragmentos de fisión del anillo D, fisión del anillo C (209 y 156), así como la presencia en ambos espectros del fragmento a m/z 141 indica que el metilo faltante es C-19 y no C-18, por lo cual se identifica este compuesto como neoergosterol.

5.2 FRACCIÓN LE4

El perfil cromatográfico para esta fracción (Figura 5) muestra una composición de un esterol mayoritario a un t_R 24,828 min y dos esteroles minoritarios a t_R iguales a 18,968 y 20,350 min. Los espectros de masas de estos tres compuestos presentan iones moleculares a m/z = 430, 428 y 394 respectivamente. Este último esterol corresponde al ergosta-5,7,9,(11),22-tetraen-3β-ol. Los otros dos compuestos presentan un aspecto en su distribución de señales que recuerdan al patrón de fragmentación del peróxido de ergosterilo **4**, un metabolito común en esta clase de hongos, pero, tras un análisis detallado,

se pudo verificar que el ion molecular no es 428 uma sino 430 uma y que algunos fragmentos típicos del peróxido de ergosterilo **4** no están presentes. La muestra fue recristalizada en MeOH obteniendo un compuesto cuya espectroscopia de resonancia magnética nuclear se presenta en los anexos, puesto que la cantidad obtenida permitió realizar una mejor caracterización.

5.2.1 ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol, 51

El análisis de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear: RMN-^{1}H, RMN-^{13}C; experimentos: DEPT, COSY, HMBC y HMQC indicaban un anillo ergostano con desplazamientos químicos en la espectroscopia de RMN-^{1}H como en la de ^{13}C similares a la del peroxido de ergosterilo, creando una confusión dado que en masas se descartaba la presencia de este peróxido.

El espectro de ^{13}C y los experimento DEPT indicaron la presencia de veintiocho (28) átomos de carbono; cuatro de ellos con desplazamientos químicos a campo bajo (130 ppm o superiores), correspondientes a carbonos con hibridación sp^2 (135,42; 135,25; 132,31 y 130,75 ppm). El experimento DEPT-90 puso en evidencia que se trata de carbonos vinílicos u olefínicos, permitiendo deducir que no se trata de carbonos en sistema olefínico Terminal, tetrasustituido o exocíclico. Adicionalmente, este mismo experimento presentó en la región de los carbonos alifáticos otros siete metinos (66,46; 56,19; 51,68; 51, 08; 42,77; 39,74 y 33,07). El carbono a δ 66,46 ppm indica la presencia de un heteroátomo sobre este átomo de carbono. Los experimentos DEPT45, DEPT 90 y DEPT 135 permitieron establecer los desplazamientos químicos para átomos de carbono (Tabla 3).

Los carbonos presentes a δ 82,18 y 79,44 son de especial interés dado que indican que estos carbonos cuaternarios se hallan unidos a heteroátomos o presentan un efecto electroatractor muy fuerte. Cabe anotar que en la literatura química estos desplazamientos corresponden a los C-5 y C-8 del peróxido de ergosterilo **4** o compuestos con el grupo 5α,8α-epidioxy[34-37]. Nuevamente, este hecho experimental crea una confusión, ya que no están acordes con los

datos obtenidos en la espectrometría de masas, pues en dicho espectro no se observa el pico ocasionado por la pérdida de 32 uma, típicas de los ergostaperóxidos. Dada esta discrepancia, se realizó un análisis exhaustivo de la resonancia magnética nuclear del sólido aislado y se encontró un espectro de RMN-^{1}H y de RMN-^{13}C casi idéntico al espectro del peróxido de ergosterilo **4** (Ver Anexos). Al comparar los espectros del compuesto aislado con los de un patrón de peroxido de ergosterilo **4**, se crea la confusión dada la similitud tan fuerte que presentan los espectros de estos dos compuestos. Indicando que el esqueleto de los dos esteroles en comparación son sino idénticos muy similares.

Desplazamiento químico (ppm)	**DEPT**	**Desplazamiento químico (ppm)**	**DEPT**
135,42	CH	36,97	C- cuaternario
135,20	CH	36,92	CH2
132,31	CH	34,70	CH2
130,75	CH	33,07	CH
82,18	C- cuaternario	30,10	CH2
79,44	C- cuaternario	28,65	CH2
66,47	CH	23,40	CH2
56,20	CH	20,88	CH3
51,69	CH	20,63	CH2
51,09	CH	19,95	CH3
44,57	C- cuaternario	19,64	CH3
42,78	CH	18,18	CH3
39,74	CH	17,57	CH3
39,34	CH2	12,88	CH3

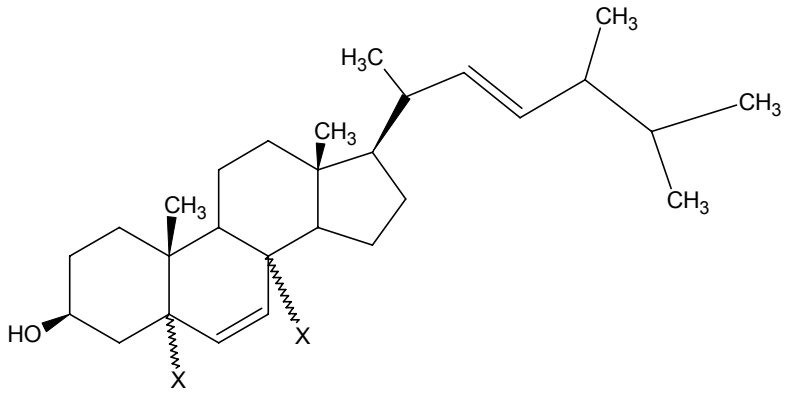
Tabla 3. Desplazamiento químico (δ) para los 28 átomos de carbono de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol

Haciendo uso de los experimentos COSY, HMQC y HMBC y comparando con los datos encontrados en la literatura se realizó la asignación inequívoca para la estructura del policiclo tipo ergostano. Los datos de esta asignación se encuentran en la Tabla 4.

No	^{13}C	^{1}H	DEPT	COSY	HMBC
1	34.69	1.96 m Hα; 1.69 m Hβ	CH_2		CH_3-19
2	39.31	1.99 m β; 1.24 t α	CH_2		
3	66.47	3.97 m	CH		
4	36.91	2.11 ddd 14 Hz, 1.92 t 14 Hz	CH_2		
5	82.17	---	---	---	CH_3-19; H-4; H-5; H-6
6	135.42	6.33 d J 8.5 Hz	H-6	H 6-7	H-4
7	130.75	6.60 d J 8.5 Hz	H-7	H 7-6	
8	79.44	---	---	---	H-5; H-6
9	51.68	1.59 m	CH		
10	36.97	---	---		CH_3-19
11	20,63	1,62 m	CH_2		
12	30,10	1,82 m; 1,55 m	CH_2		
13	44.56	---	---		
14	5.19	1.19 m	CH		
15	23,40	1,22 m	CH_2		
16	28,65	1,33 m	CH_2		
17	33.07	m	CH		CH_3-21; CH_3-18
18	12.87	0.82 s	CH_3		
19	18.18	0.89 s	CH_3		
20	42.70	1.82 m	CH	CH_3–21; H-22	CH_3-18
21	17.57	0.92 d	CH_3		
22	132.30	5.18 dd	H-22	H-23; H-21	CH_3-21
23	135.20	5.22 dd	H-23	H-22; H24	CH_3-25
24	39.74	2.02 m	CH	CH_3-28; H-23	
25	51.09	1.48 m	CH	CH_3-27; CH_3-28	
26	19.95	0.85 d	CH_3		
27	19.64	0.82 d	CH_3		
28	20.88	1.01 d	CH_3		

Tabla 4. Asignación de las señales de desplazamientos químicos en RMN-^{1}H y RMN-^{13}C para ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol

Esta asignación permite establecer un núcleo ergostano con dos instauraciones en C6 y C22, adicionalmente la presencia de heteroátomos en los carbonos C-5 y C-8, dado el desplazamiento químico de estos átomos de carbono a campo bajo. La estructura parcial propuesta **51(a),** se presenta a continuación:



51(a)

El núcleo esteroidal presenta una fórmula condensada $C_{28}H_{44}O$ y 396 uma. La cuál contiene treinta y dos unidades de masa menos que el posible ión molecular presente en el espectro de masas, lo que indicaría erróneamente que el compuesto corresponde al peróxido de ergosterilo **4**.

De acuerdo a la literatura química[34-37] y al espectro de masas de alta resolución de un patrón de peróxido de ergosterilo **4** (Figura 19), se puede observar que en los núcleos tipo ergosta-5α-8α-epidioxi se caracterizan por presentar fragmentaciones muy específicas para este tipo de compuestos. De gran interés es la perdida de 32 uma correspondiente a la eliminación del grupo peroxido, generando el ión a m/z 396, adicionalmente se generan los iones a m/z 337 producto de la escisión del anillo A y los iones a 253 y 251; fragmentos característicos de núcleos $\Delta^{5,7}$ generados a partir de la pérdida de la cadena lateral y una molécula de agua y pérdida de la cadena lateral, agua y 2 H. (Esquema 5).

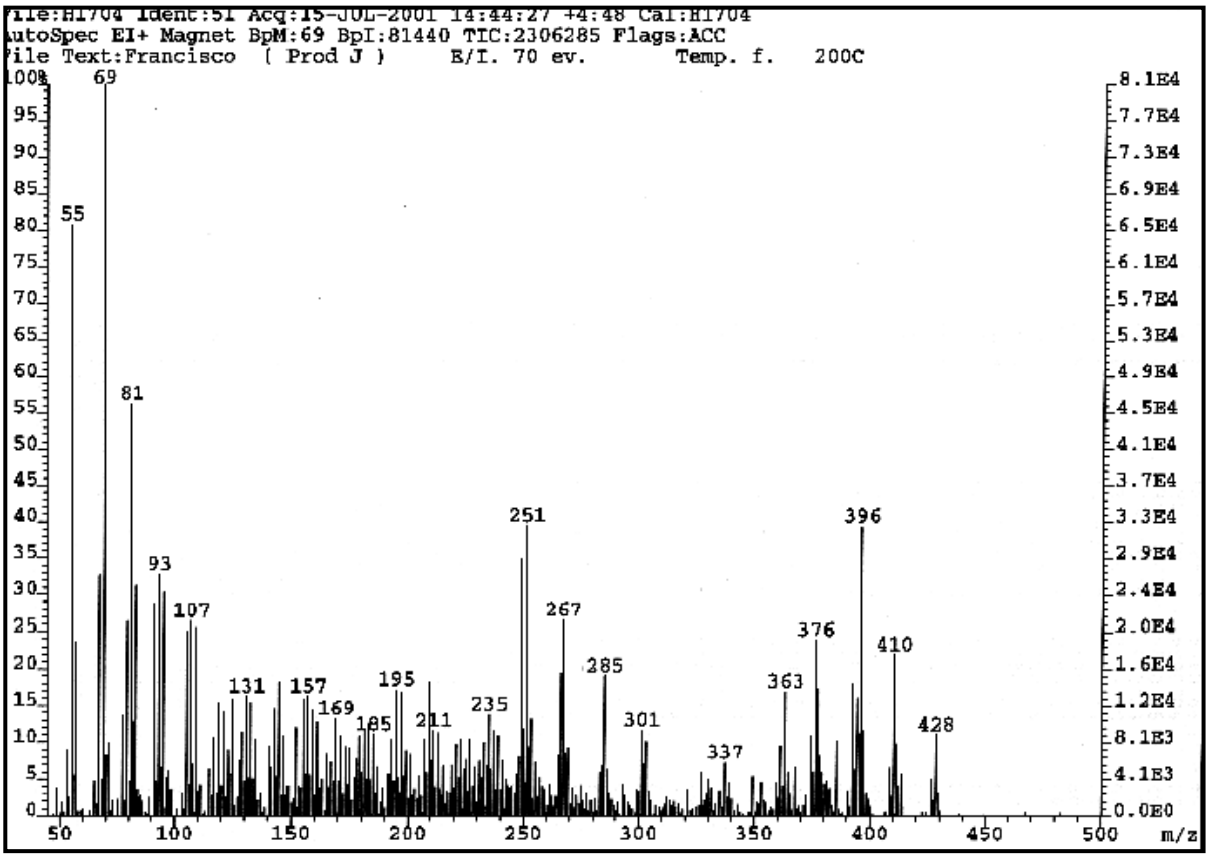
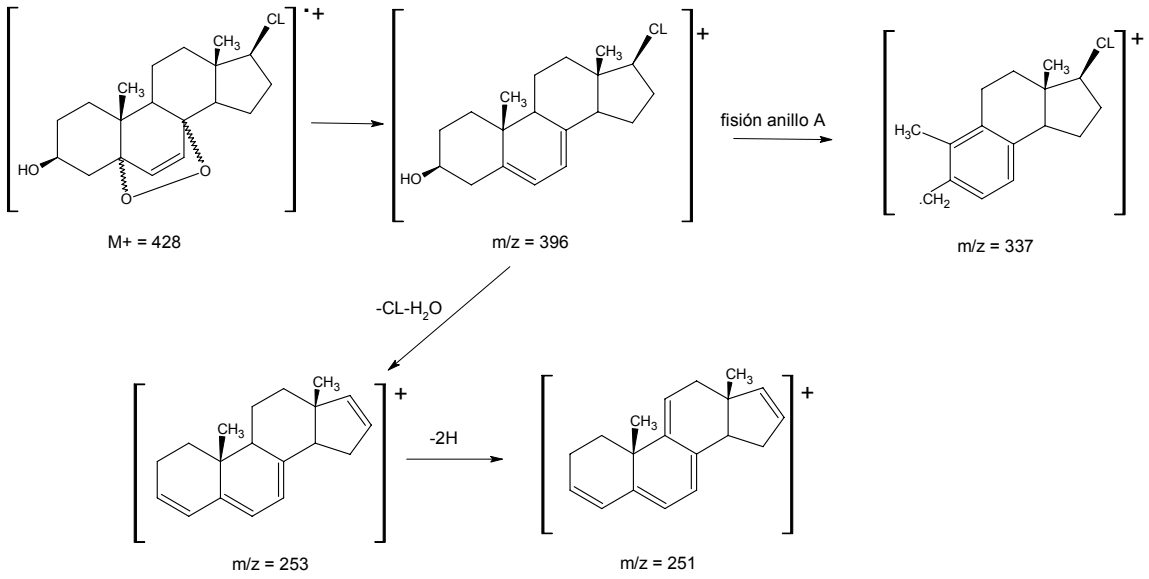


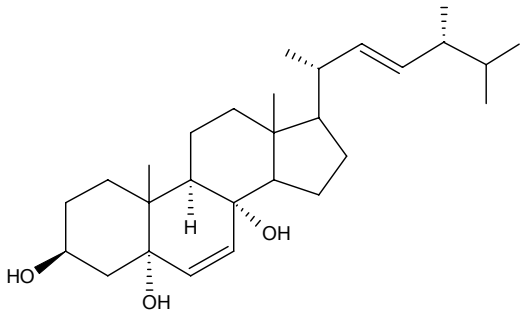
Figura 19. Espectro de masas de alta resolución a 70 eV de peróxido de ergosterilo **4**.



Esquema 5. Fragmentos diagnósticos para peróxido de ergosterilo **4.**

La ausencia de los iones a 396 (M^+-32) y 337 (escinción anillo A) en el espectro del compuesto aislado descarta la posibilidad de la presencia del peróxido de ergosterilo **4** en la fracción estudiada. Esto conllevó a que se realizara un análisis más detallado del espectro de masas de este compuesto, anotando como hecho de gran relevancia haber encontrado fragmentos generados por pérdidas sucesivas de tres moléculas de agua (385 a 367 y 367 a 349; 285 a 267 y 267 a 239). De otra parte, 428 uma no corresponde al peso molecular, pues no exhibe fragmentaciones lógicas según el patrón de fragmentación de este tipo de compuestos.

Con base en la asignación inequívoca de las señales presentes en los espectros de RMN-^{1}H y de ^{13}C y la similitud de estos espectros con los del peróxido de ergosterilo **4**, la estructura propuesta para el compuesto en cuestión debe ser: **ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol,** que no ha sido aislado de *L. edodes* como se demostró con la literatura consultada utilizando SciFinder, además su presencia confirma la variación en la composición de esteroles polihidroxilados cuando ***L. edodes*** ha sido cultivado en desechos del café, conjetura que se considera como el criterio de partida para el desarrollo de esta tesis.



ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol, 51(b)

La estructura propuesta para esta sustancia tiene peso molecular de 430 uma y es el ion molecular en el espectro de masas pero con una baja abundancia relativa, lo que indicaría que el fragmento a m/z 428 corresponde al M^+-2H, pérdida de común ocurrencia en espectros de sustancias de esta clase, lo que se corrobora fácilmente con la presencia de este mismo ión M^+-2, en el espectro de masas de alta resolución tomado a una muestra auténtica de peróxido de ergosterilo (Tabla 5).

File:H1704 Ident:29 Acq:15-JUL-2001 14:44:27 +2:46 Cal:H1704
AutoSpec EI+ Magnet BpM:69 BpI:177472 TIC:3766822 Flags:ACC
File Text:Francisco (Prod J) E/I. 70 ev. Temp. f. 200C
Heteroatom Max: 20 Ion: Both Even and Odd
Limits:

350.000	0.5					-0.5	0	0	0
500.000	100.0	M^++1		10.0		20.0	50	70	7
Mass	**%RA**	**Pks**	**Std**	**PPM**	**mDa**	**Calc. Mass**	**DBE**	**C**	**H**	**O**
429.333801	1.1		M^+	7.1	3.1	429.336871	6.5	28	45	3
428.328934	3.7			0.3	0.1	428.329046	7.0	28	44	3
426.311836	1.7			3.7	1.6	426.313396	8.0	28	42	3
413.302429	1.1		M^+-2	7.6	3.1	413.305571	7.5	27	41	3
412.332504	0.9			3.9	1.6	412.334131	7.0	28	44	2
411.314140	2.6			-7.5	-3.1	411.311050	3.5	24	43	5
				-21.8	-9.0	411.305177	12.5	31	39	

Tabla 5. Iones con relación m/z cercanas al ión molecular para peróxido de ergosterilo **4**.

Para establecer inequívocamente el ion molecular de esta sustancia, se realizó un espectro de masas por ionización química con metanol, generando efectivamente un ión molecular a m/z 430, como se observa en la Figura 20

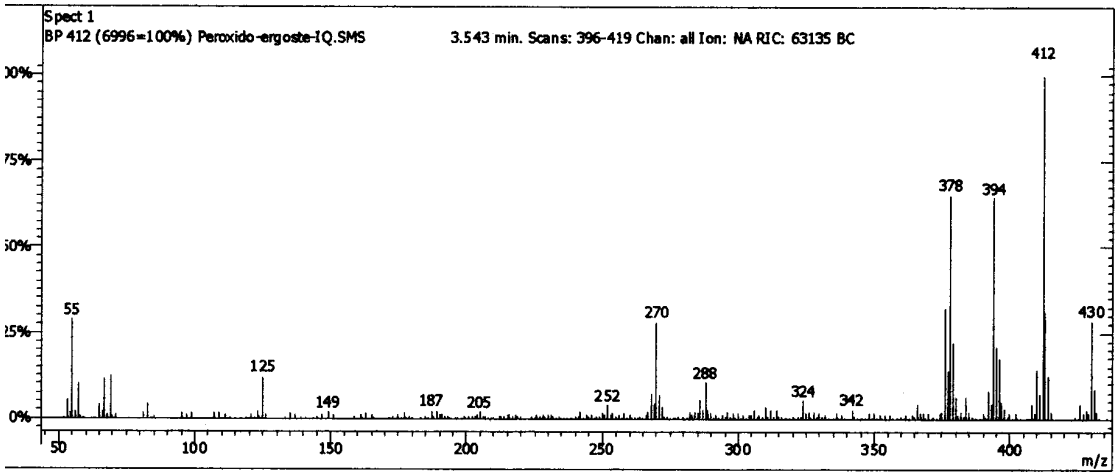


Figura 20. Espectro de masa por ionización química de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol

En la Figura 21 se presenta el espectro de masas de alta resolución obtenido por impacto electrónico a 70eV por inyección directa. A diferencia del espectro de masas tomado por CG-EM, en este espectro, aunque no se observa la presencia clara del ión a m/z 430, si son evidentes las pérdida consecutiva de 3 moléculas de agua.

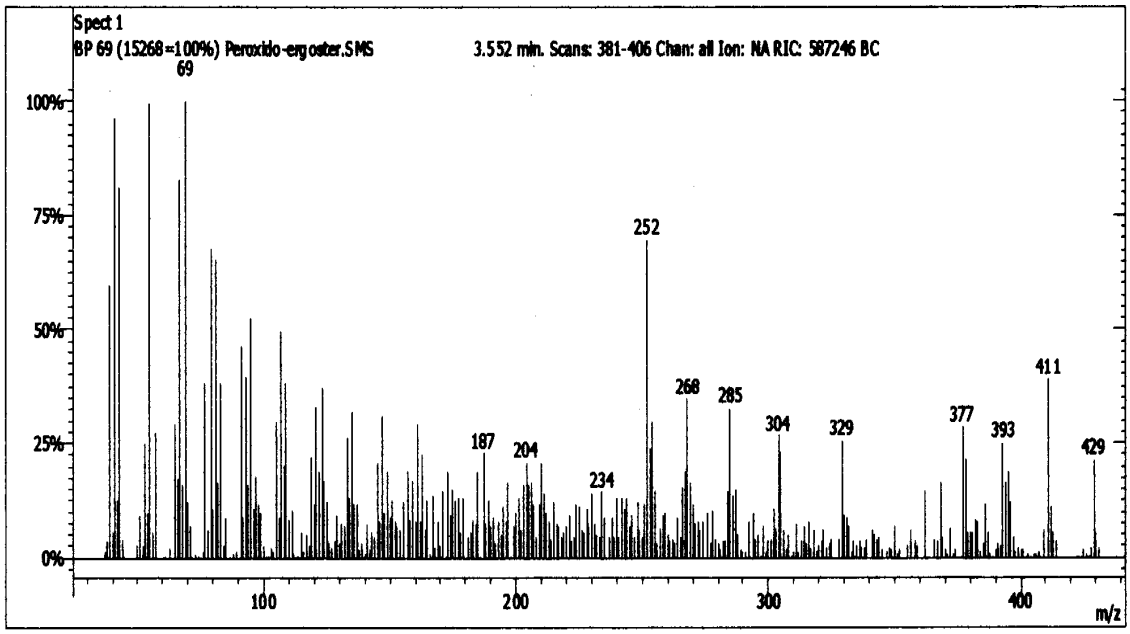
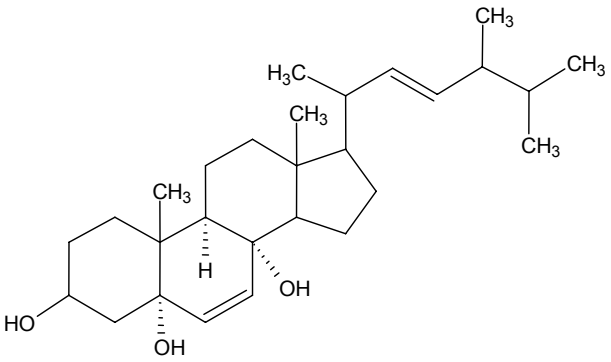


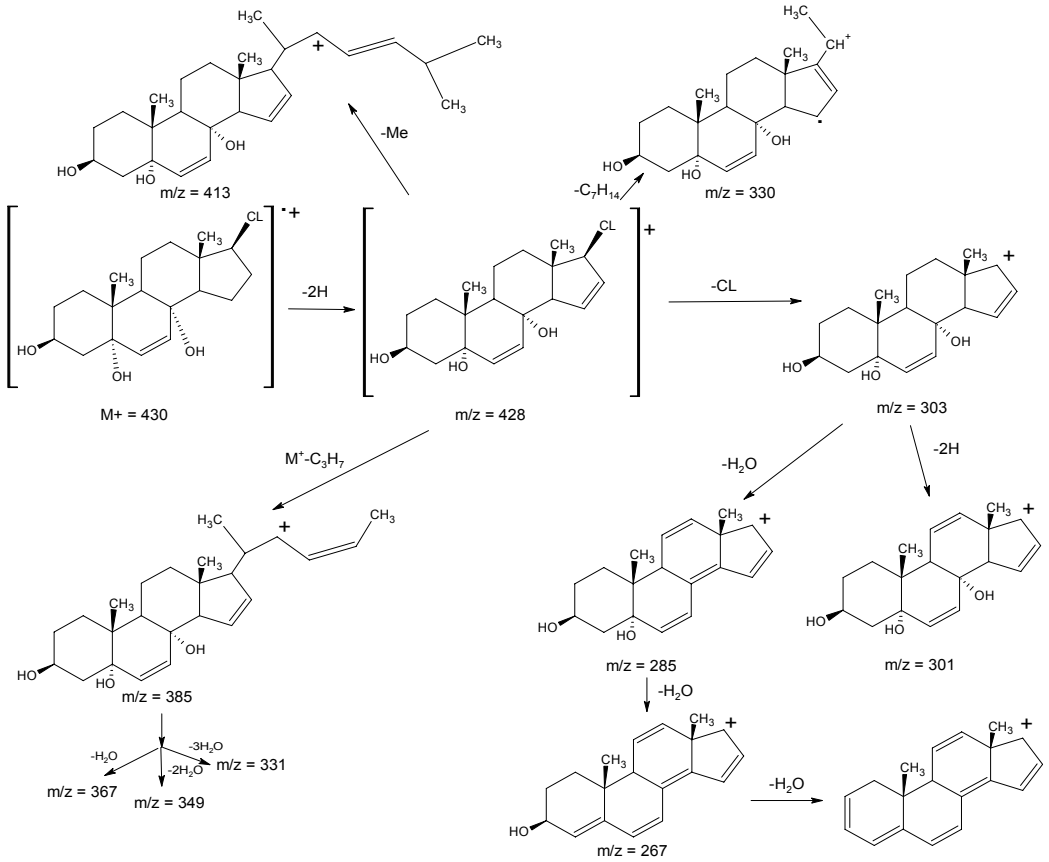
Figura 21. Espectro de masas de alta resolución por inyección directa de ergosta-5,22-dien-3,5,8-triol.

La configuración absoluta de los hidroxilos en C-5 y C.8 fue establecida por comparación con la asignación hecha al Me-19 y los hallados en la literatura para este mismo metilo en otras estructuras[23]. Por ejemplo para el (22E,24R)-23-metilergosta-7,22-dien-3β,5α,6β-triol **43**, el desplazamiento químico del Me-19 es asignado a la señal a δ 1,09 ppm, a campo más bajo que el asignado para el compuesto en discusión. Lo que indica que los hidroxilos presentes en C-5 y C-8 se ubican en posiciones axiales, por lo tanto el compuesto aislado corresponde al **ergosta-6,22-dien-3β,5α,8α-triol 51(c)**.



ergosta-6,22-dien-3β,5α,8α-triol **51(c)**

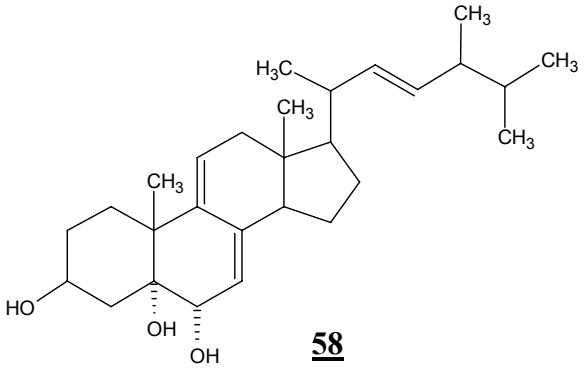
Teniendo en cuenta este análisis y la necesidad de establecer una estructura polihidroxilada para el compuesto en mención, en el Esquema 6, se presenta un mecanismo de fragmentación que explica los iones más representativos presentes en el espectro de masas de este compuesto:



Esquema 6. Mecanismo de fragmentación para ergosta-6,22-dien-3β,5α,8α-triol

5.2.2 ergosta-7,22-dien-3,5-diol-6-ona, 52

La fragmentación de este compuesto revela un ión molecular a m/z 428 el cual es consistente con la fórmula molecular $C_{28}H_{44}O_3$. Están presentes algunos iones característicos de esteroles hidroxilados en C3, tales como: m/z 413 [M^+-Me] y m/z 285 [M^+-CL-H_2O]. Los picos a m/z 303 [M^+-CL], m/z 285 [M^+-CL-H_2O] involucran una cadena lateral insaturada posiblemente en C22, insaturación que se confirma por el pico que aunque de baja intensidad, se presenta a m/z 300. El ion m/z 400 resulta de la pérdida de 28 uma a partir del ion molecular, lo que puede significar que la molécula tenga un grupo carbonílico, así también está presente el ion m/z 385 el cual revela la pérdida de CO y Me a partir del ion molecular, lo cual reafirma lo anterior expuesto. El análisis anterior, adicional a que el peso molecular del compuesto implicaría la fórmula molecular $C_{28}H_{44}O_3$, con un índice de deficiencia de hidrógeno igual a siete; cuatro de ellas producto del sistema poli cíclico, una a la insaturación en C-22 otra al grupo carbonilo, quedando una sola insaturación por asignar. Esta deficiencia de hidrógeno corresponde a un segundo doble enlace. De la revisión bibliográfica se conoce la estructura de un compuesto cetónico que ha sido aislado en siete hongos, entre ellos *L. edodes*,[24] la cual se propone como el compuesto correspondiente a la fragmentación de masas arriba descrita, y que se denomina ergosta-7,22-dien-3,5-diol-6-ona, **52**. Otra estructura que puede proponerse para este compuesto de la Fracción LE4 es:



58

Sin embargo se escogió la estructura correspondiente a ergosta-7,22-dien-3,5-diol-6-ona debido a que en el espectro de masas se evidencia la pérdida de CO.

5.3 FRACCION LE5

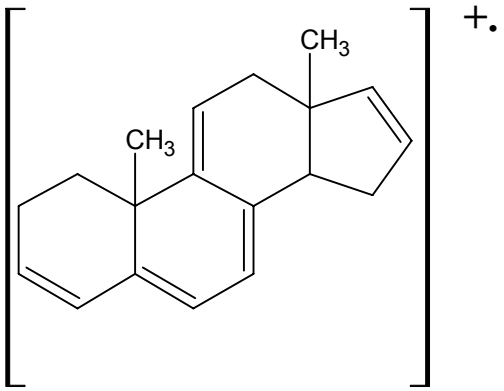
En esta fracción se identificó el esterol ergosta-4,6,8,(14),22-tetraen-3-ona **54**, por comparación con los datos espectrales de masa obtenidos a partir de la literatura y para el compuesto Z se proponen varias estructuras según su patrón de fragmentación. Un tercer compuesto (Y) **53,** no fue identificado dado que este compuesto no presenta patrones de fragmentación característico de esteroles, y podría corresponder a un artefacto o contaminación de la muestra.

5.3.1 ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona, 54

En el espectro de masas de este compuesto (Figura 15) se tiene un ion molecular a m/z 392, el cual corresponde a la fórmula molecular $C_{28}H_{40}O$ con un IDH de 9. Se presenta una fragmentación típica para un esqueleto tetracíclico tipo ergostano (m/z 377 [M^+-Me], 267 [M^+-CL], 225 [M^+-CL-D]), cuya formación implica cuatro puntos de insaturación. Los cinco restantes puntos de insaturación corresponden a cuatro dobles enlaces carbono-carbono y uno carbono-oxígeno, como puede corroborarse de la información de espectrometría de masas obtenida de la literatura para el compuesto ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona[38].

5.3.2 Compuesto Z, 55

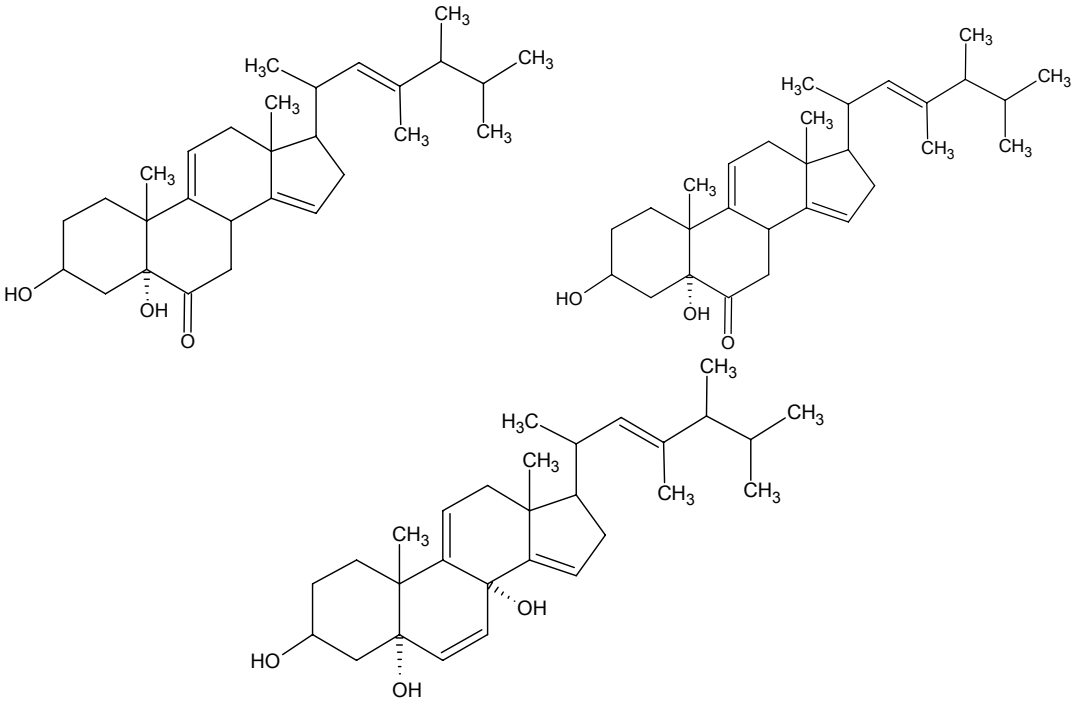
En el espectro de masas de este compuesto (Figura 16) se tiene un ion molecular a m/z 440. Se presenta una fragmentación típica para un esqueleto tetracíclico tipo ergostano (m/z 425 [M^+-Me], 301 [M^+-CL],) donde la cadena lateral pesaría 139 uma y por lo tanto, según la biogénesis[23,25] de los hongos presentaría un metilo en posición C-23. Se presenta el ion m/z 251 típico de un núcleo ergostano pentainsaturado:



m/z 251

Esquema 7. Ion a m/z 251 característico del núcleo ergostano pentainsaturado

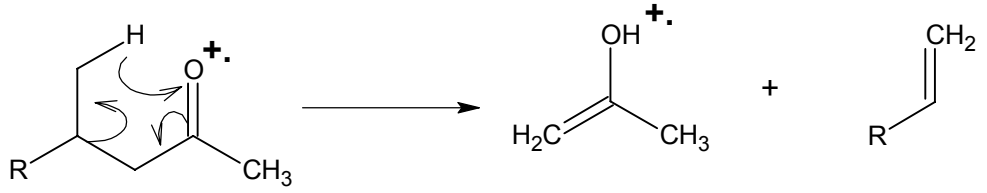
De lo anterior pueden ser propuestas varias estructuras para el compuesto Z, como son:



Esquema 8. Estructuras propuestas para el Compuesto Z.

5.4 FRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos se caracterizan por presentar en su fragmentación de masas la pérdida consecutiva de 14 uma, la cual es ocasionada por fragmentaciones del tipo A_1 (Escisión C-C) y tipo A_3 (ruptura alílica), también se presenta la fragmentación tipo H (rearreglo de McLafferty)[39], la cual representa una señal diagnóstico en los espectros de masas de ácido grasos debido a que involucra al grupo carboxílico, como se observa en el Esquema 9.



Esquema 9. Rearreglo de Mc.Lafferty para ácidos grasos.

Esta transposición de McLafferty corresponde al pico a m/z 60, el cual es característico de los ácidos alifáticos α-metilénicos no sustituidos.
El cromatograma de gases de la fracción de ácidos grasos (figura 1) indica dos compuestos mayoritarios correspondientes al ácido palmítico (t_R= 15.66) y ácido linoléico (t_R=17.385)

5.4.1 Acido palmítico, 57

El peso molecular de este compuesto es de 256 uma, lo que representa una fórmula molecular $C_{16}H_{32}O_2$, obtenida a partir de la aplicación de la regla del 13. También se deduce un IDH de 1, lo cual permite plantear estructuras que tengan presentes dobles enlaces carbono-carbono, carbono-oxígeno o un ciclo. Los dos átomos de oxígeno de la fórmula molecular pueden ser indicativo de la existencia de funciones alcohol, éter, ácido carboxílico, éster, entre otras. Debido a la alta intensidad del ion molecular (100%), se deduce que el espectro de masas (Figura 18) corresponde a un ácido graso de cadena larga

o un éster de ácido graso[40]. La función éster se descarta debido a la ausencia del fragmento proveniente del arreglo de McLafferty que contiene al grupo alcoxicarbonil[40], el cual debería encontrarse a múltiplos de 14 uma por encima del que corresponde al ácido graso (m/z 60), último que sí hace parte del espectro de masas. Los iones de mayor estabilidad corresponden a los fragmentos oxigenados, los cuales además presentan una periodicidad consecuente con la fragmentación de la cadena debido a la eliminación de grupos metilenos, como es el caso de los picos a m/z 213, 129 y 73, los que indican una pérdida de 4, 10 y 14 metilenos respectivamente. Del anterior análisis se concluye que el compuesto es saturado y corresponde al ácido palmítico.

5.4.2 Ácido linoléico, 56

Este compuesto presenta la fragmentación característica de los ácidos grasos como se observa en el espectro de masas (Figura 17). Los iones del espectro a campo bajo presentan una sucesiva pérdida de cadena alifática que comienza con la salida del grupo etilo. La posición de los dobles enlaces en los ácidos grasos insaturados es difícil de diagnosticar por CG-EM, por lo cual se realizó la comparación n espectral con patrones de ácidos grasos, concluyendo que el compuesto se trata de ácido linoléico.

5.4.3 Análisis RMN

Los espectro de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C (Anexos) indican la presencia de una mezcla de dos ácidos, uno saturado (ácido palmítico) y otro insaturado (ácido linoléico). La presencia de la mezcla de estos dos ácidos fue evidente al observar la relación entre las integrales de los hidrógenos vinílicos con los metilenos alifáticos. De esta relación puede deducirse que el compuesto en mayor proporción corresponde al palmítico, y las señales del ácido linoléico podrían ser analizadas como contaminaciones.

6. CONCLUSIONES

Se realizó el estudio de la fracción insaponificable de una muestra de hongo ***L. edodes***, suministrada por Cenicafé, aislando mediante métodos cromatográficos e identificando por técnicas espectroscópicas 8 estructuras de esteroles tetracíclicos tipo ergostano: ergosterol, ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol, α-dihidroergosterol, fungisterol, neoergosterol, ergosta-6,22-dien-3β,5α,8α-triol, ergosta-7,22-dien-3,5-diol-6-ona, y ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona.

Los esteroles presentes en ***L. edodes*** se caracterizan principalmente por contener instauraciones en las posiciones C5, C7, C8 (14), C9 (11), y C22 en combinación con grupos hidroxilo en el C3, C5 y C8, así como con grupos cetónicos en C6.

Del análisis cromatográfico y espectroscópico realizado a la fracción de ácidos grasos obtenida de ***L. edodes***, se elucidó la estructura de dos ácidos grasos, uno de cadena saturada (ácido palmítico) y el segundo insaturado (ácido linoléico).

Se aisló por vez primera en ***L. edodes*** el compuesto **ergosta-6,22-dien-3β,5α,8α-triol**, **51(c)**. que no es común en los hongos.

La presencia de **ergosta-6,22-dien-3β,5α,8α-triol**, **51(c)**, en ***L. edodes*** confirmó que hay variación en la composición de esteroles polihidroxilados cuando el hongo ha sido cultivado en desechos del café.

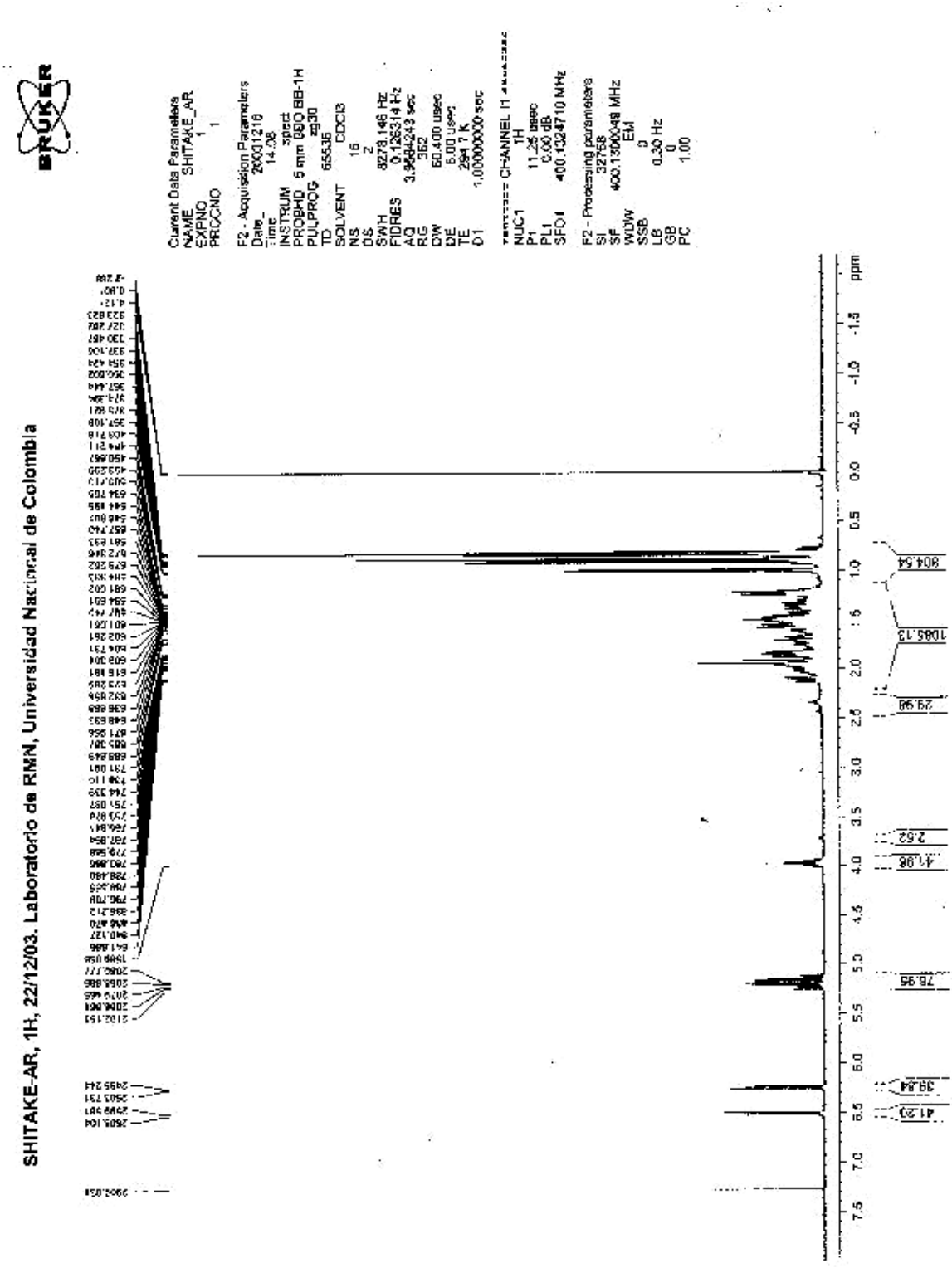
7. BIBLIOGRAFÍA

1. Lorenzen, K.; Anke, T. (1998). *Current Organic Chemistry*. **2**, 329p.
2. Jones, K. (1995) "Shiitake. The healing mushroom". Vermont. Healing Arts Press Rochester. 130p.
3. Wasser, P. S.; Weis, L. A. (1999). *Critical Reviews in Immunology*. **19**, 65p.
4. Jaramillo, C.; Rodríguez, N. (2001). Cultivo de Shiitake en subproductos del café. En: "Avances Técnicos Cenicafé". Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. (287)1p.
5. Przybylowicz, P.; Donoghue, J. (1990). "Shiitake Growers Handbook. The art and science of mushroom cultivation". United States of America. Ed. Kendall/Hunt Publishing Company. 3p.
6. Quimio, T. H.; Chang, S. T.; Royse, D. J. (1990). Technical guidelines for mushroom growing in the tropics. Roma. Food and Agriculture Organization of the Unites Nations FAO. (106) 70p.
7. Miles, P.; Chang, S. (1999). "Biología de las setas". Hong Kong. Ed. World Scientific. 4p.
8. Stamets, P. (2000). "Growing gourmet and medicinal mushrooms". Canadá. McGraw-Hill. 25p.
9. Trigos, A. (1998). Química de los Hongos. En "Producción de vitamina D_2 a partir de hongos macromicetos: Aspectos científicos, técnicos y económicos". Bogotá. Editor: Dr. Augusto Rivera Umaña. Editorial Guadalupe. 19p.
10. Dewick, P.(2002)."Medicinal Natural Products"New York. John Wiley and Sons. 167p.
11. Kim, D.; Baek, N.; Ryang, S.; Jung, K.; Lee, I.; Kim, J.; Lee, H. (1997). *Arch. Pharm. Res.* **20** (3). 201p.
12. Nam, K.; Jo, Y.; Kim, Y.; Hyun, J, Kim, H. (2001). *Life Sciences*. 69. 229p.
13. Nishitoba, T.; Goto, S.; Sato, H.; Sakamura, S. (1989). *Phytochemistry.* **28** (1). 193p.
14. González, A.; León, F.; Rivera, A.; Padrón, J.; González-Plata, J.; Zuluaga, J.; Quintana, J.; Estévez, F.; Bermejo, J. (1999). *J. Nat. Prod*. **62**, 1700p.

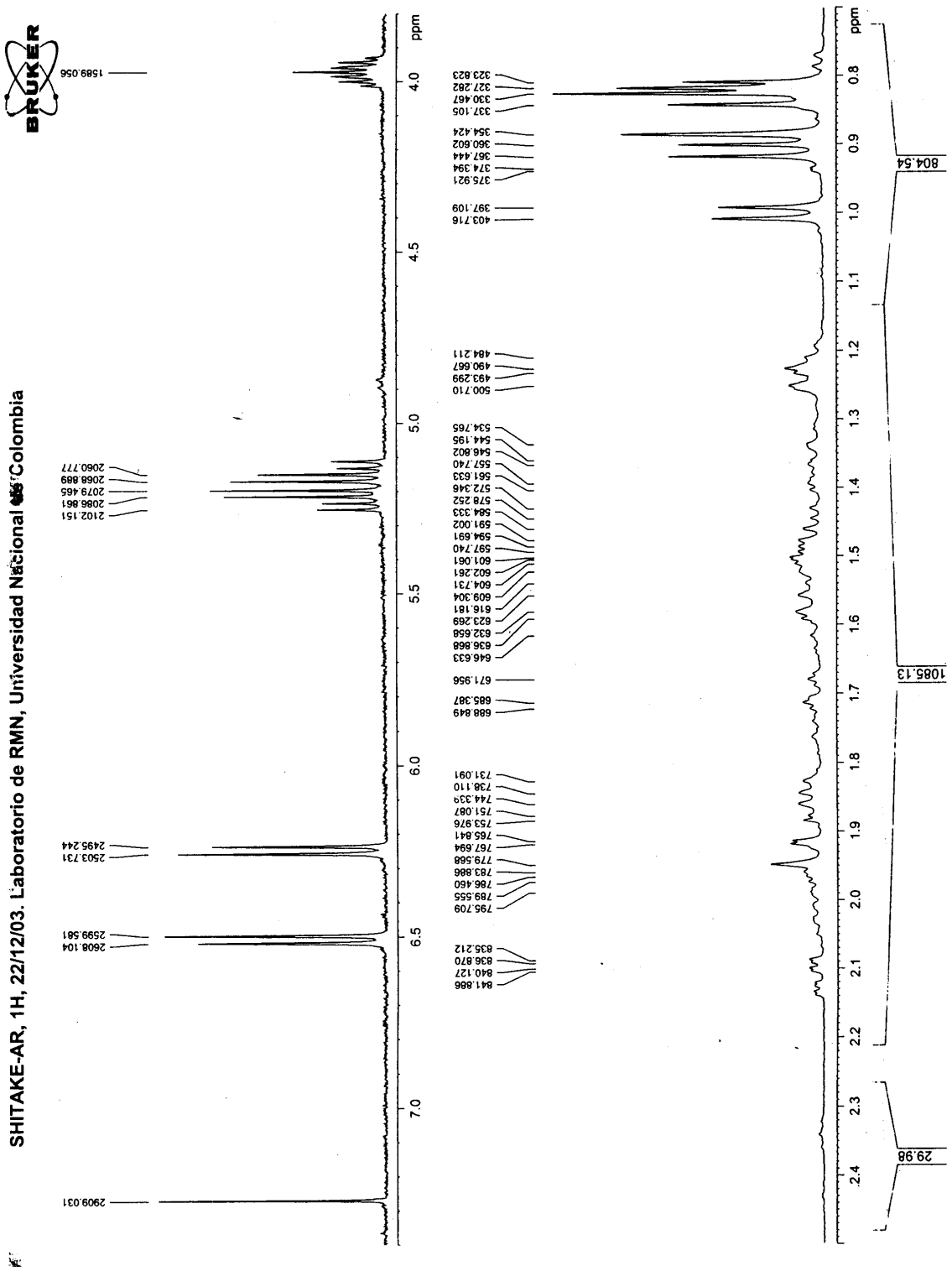
15. Lin, C.; Fann, Y.; Chung, M. (1997). *Phytochemistry*. **46** (6). 1143p.
16. Fleck, W.; Schlegel, B.; Hoffmann, P.; Ritzau, M.; Heinze, S.; Grafe, U. (1996). *J. Nat. Prod*. **59**, 780p.
17. Gonzáles, A.; Bermejo, J.; Mediavilla, M.; Toledo, F. (1986). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. 551p.
18. Denis, R. B. (1995). "Mushrooms, poisons and panaceas. A handbook for naturalists, mycologists and physicians". New York. Ed. W.H. Freeman and Company. 62p.
19. Chihara, G.; Hamuro, J.; Maeda, Y.; Arai, Y.; Fukuoka, F. (1970). *Nature*. **225**, 943p.
20. Uribe, J. (1998). Aspectos generales sobre biología de los hongos. En: "Producción de vitamina D_2 a partir de hongos macromicetos: Aspectos científicos, técnicos y económicos". Bogotá. Editor: Dr. Augusto Rivera Umaña. Editorial Guadalupe. 2p.
21. Zilliken, Fritz. (1980). PATENTE US 4234577. Z-L Ltd., USA. 1p.
22. Yokokawa, H.; Mitsuhashi, T. (1981). *Phytochemistry*. **20** (6). 1349p.
23. Yasunori, Y.; Keiko, A.; Hiroyuki, O.; Katsuyuki, F.; Akihiro, M. (1998). *Chem. Pharm. Bull*. **46** (6). 944p.
24. Yasunori, Y.; Makiko, E.; Yoshino, T.; Kaori, M.; Keiko, A. (1999). *Chem. Pharm. Bull*. **47** (6). 847p.
25. Yasunori, Y.; Kaori, M.; Ohnuma, N.; Keiko, A.; Kikuchi, M. (2000). *Chem. Pharm. Bull*. **48** (5). 749p.
26. Rodríguez, N. (2003). "Investigación básica sobre el cultivo de hongos tropicales en residuos agroindustriales de la zona cafetera colombiana" Informe final. Chinchiná (Colombia). Cenicafé. Disciplina de Química Industrial. 220p.
27. Varón, M. (2003). "Cultivo de hongos tropicales agroindustriales del Departamento del Tolima" Tesis. Universidad del Tolima. Facultad de Ciencias Básicas. Programa de Biología. Dir. Ing. Nelson Rodríguez. 114p.
28. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. (1959). *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911p.
29. MERCK, E. (1980). "Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y papel". Alemania. 16p.
30. Gonzáles, K.; Silverio, T.; Toledo, F. (1994). *Phytochemistry.* **35**, 1523p.
31. Wyllie, S. G.; Djerassi, C. (1968). *J. Org. Chem.* **33** (1). 305p.

32. Tokes, G.; Djerassi, C. (1968). *J Chem. Soc.* **90** (20). 5465p.
33. Kac, D.; Barbieri, G.; Falco, M. R.; Seldes, A.M.; and Gros, E. G. (1984). *Phytochemistry*. **23** (11). 2686p.
34. Sheu, J.H.; Chang, K.; Yth, C. (2000). *Journal of Natural Products.* **63**(1). 149p.
35. Valisolalao, J.; Luu, B.; Ourisson, G. (1983). *Tetrahedron* . **39** (17). 2779p.
36. Gunatilaka, L.; Gopichand, Y.; Schmitz, F.; Djerassi, C.(1981) *J. Org. Chem*. **46,** 3860p
37. Toume, K.; Ishibashi, M. (2002). *Phytochemistry.* **61,** 359p.
38. Chobot, V.; Opletal, L.; Jahodar, L.; Patel, A.V.;Dacke, C. G.; Blunden, G.(1997) *Phytochemistry.* **45** (8). 1669p.
39. McLafferty, F.;Turecek, F. (1993). "Interpretation of Mass Spectra." California: University Science Books. 259p.
40. Biemann, K. "Mass Spectrometry Organic Chemical Applications". New York: McGraw-Hill. 338p.

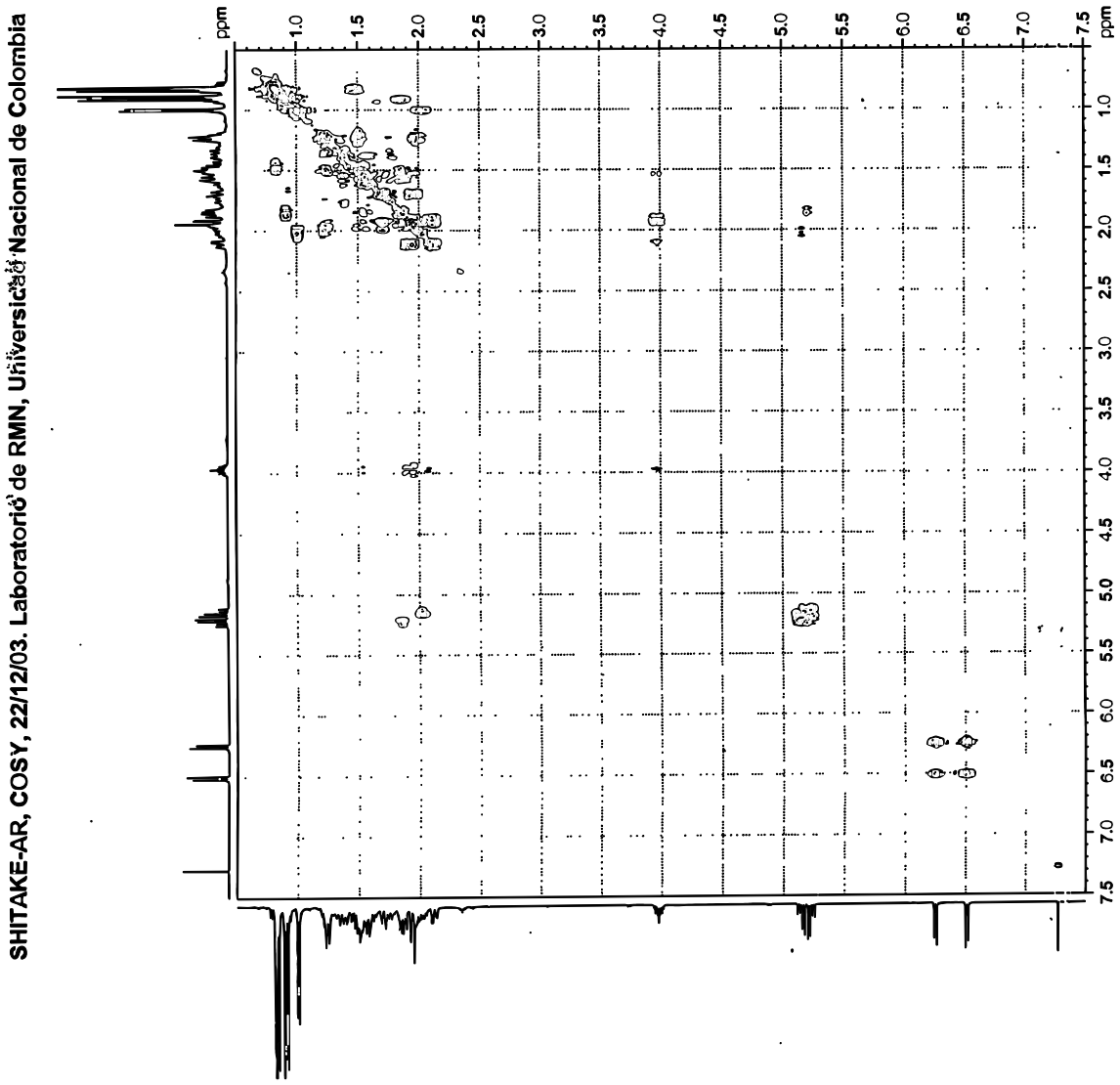
ANEXOS



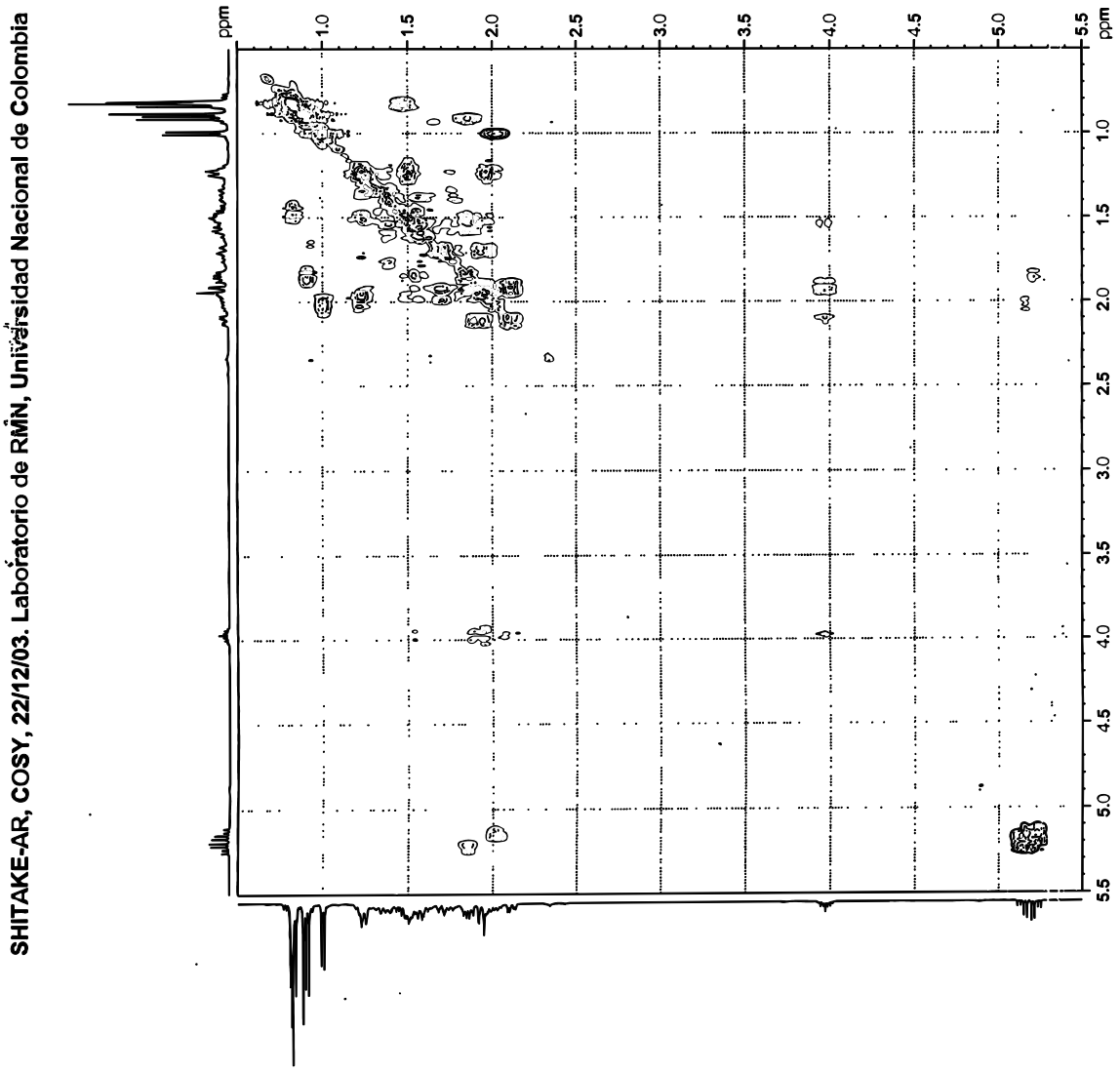
ANEXO 1. Espectro de RMN-^{1}H a 400 MHz de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol



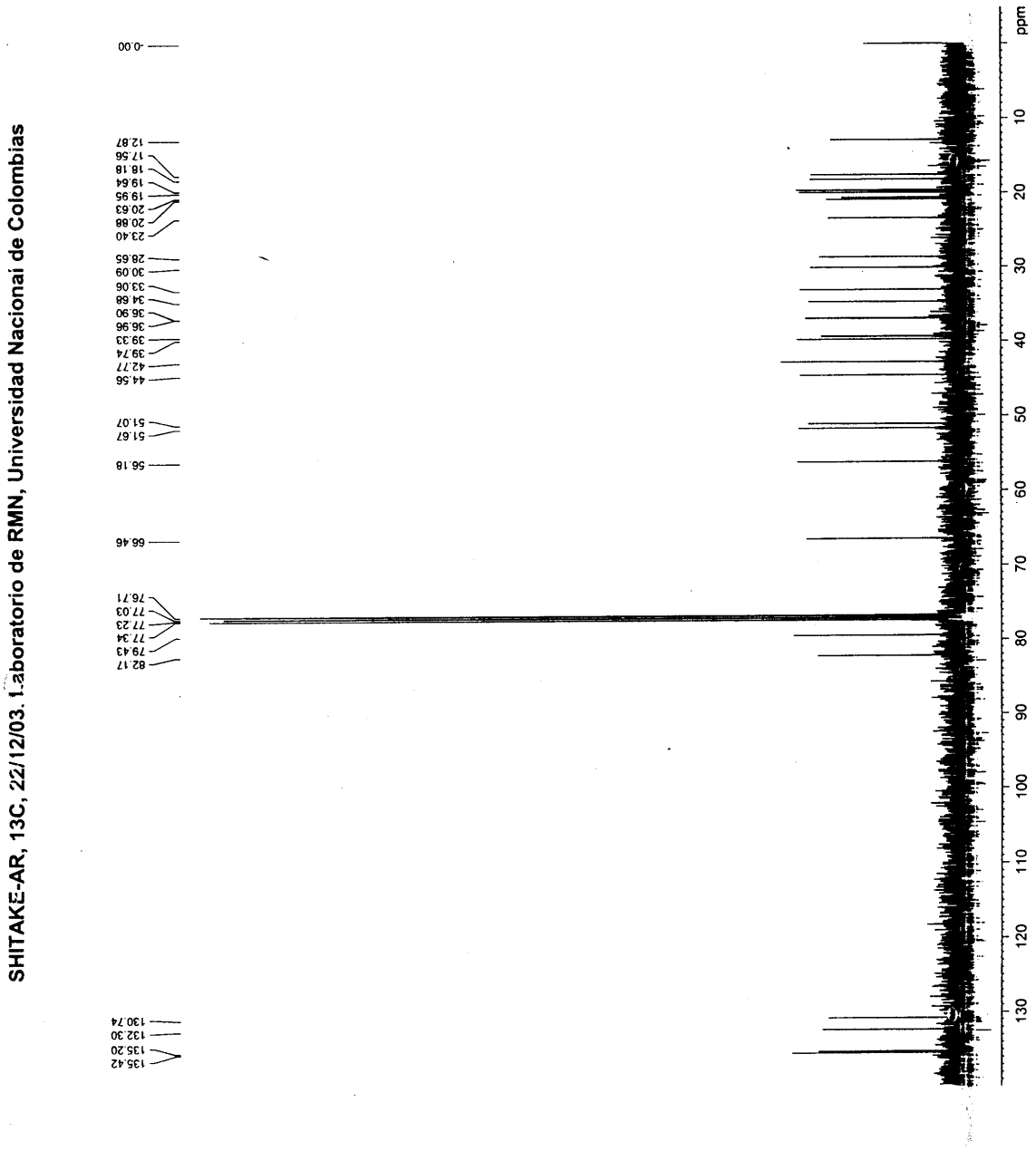
ANEXO 2. Ampliación espectro de RMN-^{1}H a 400 MHz de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol



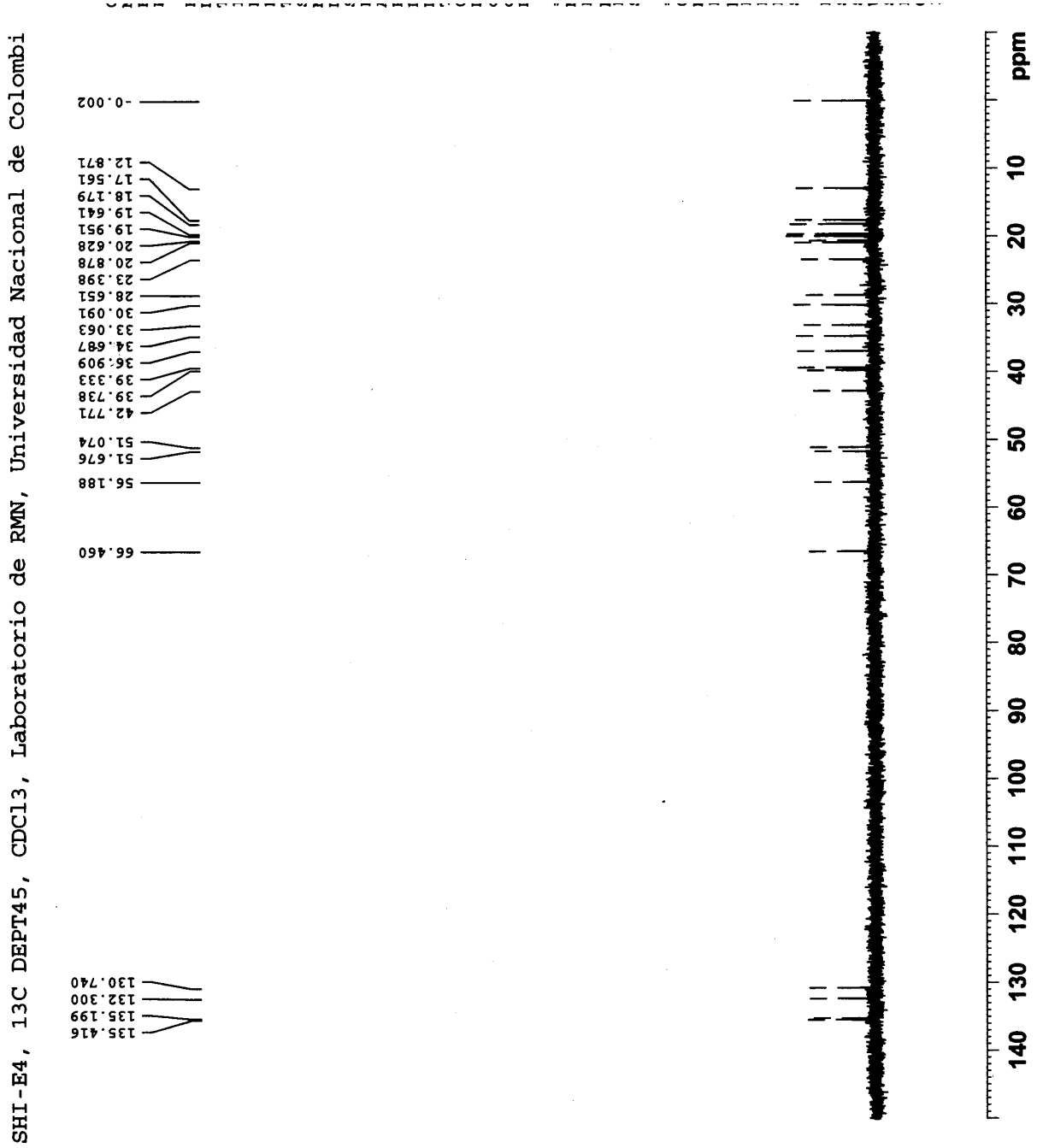
ANEXO 3. Experimento COSY de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol



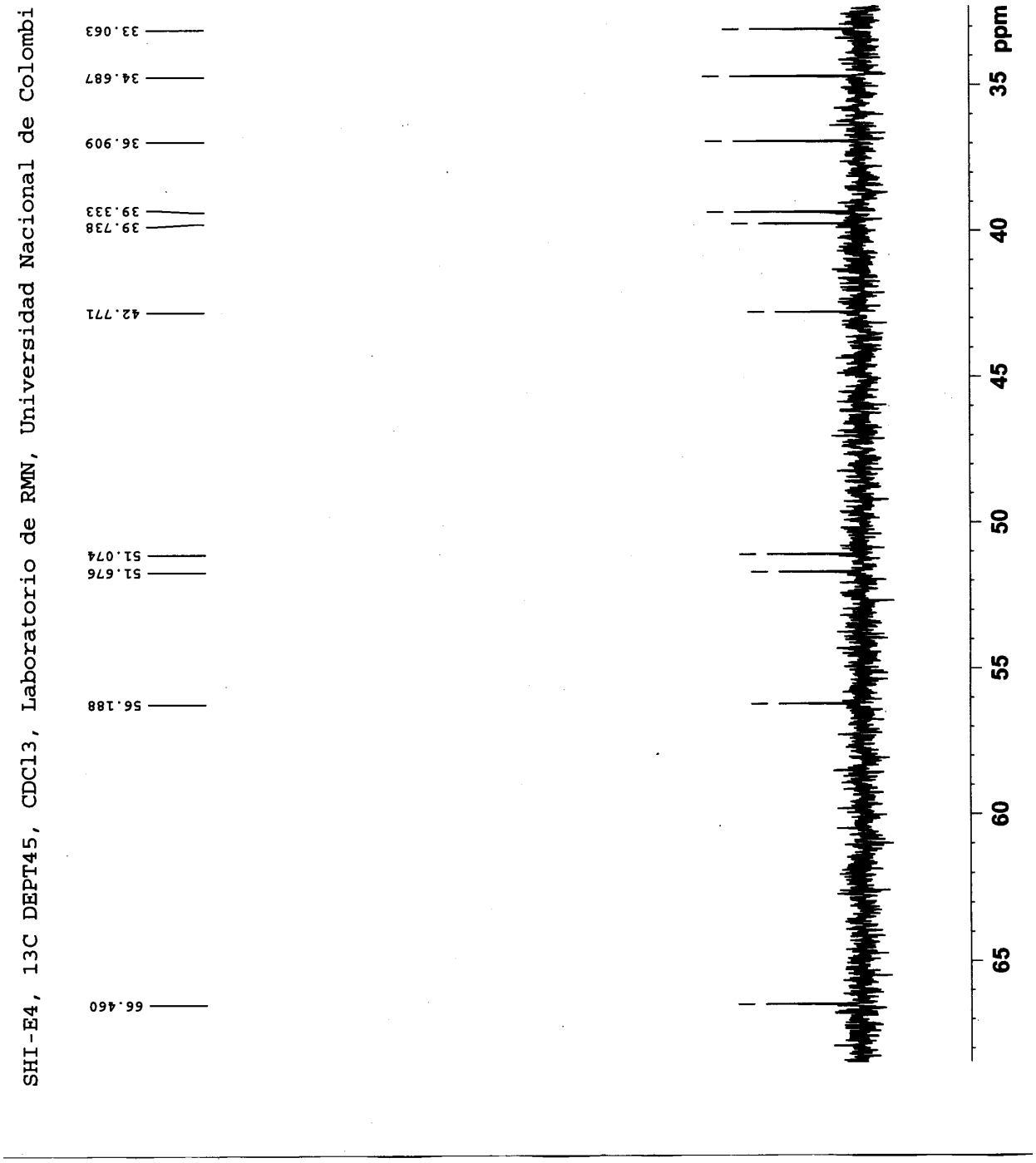
ANEXO 4. Ampliación experimento COSY de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol



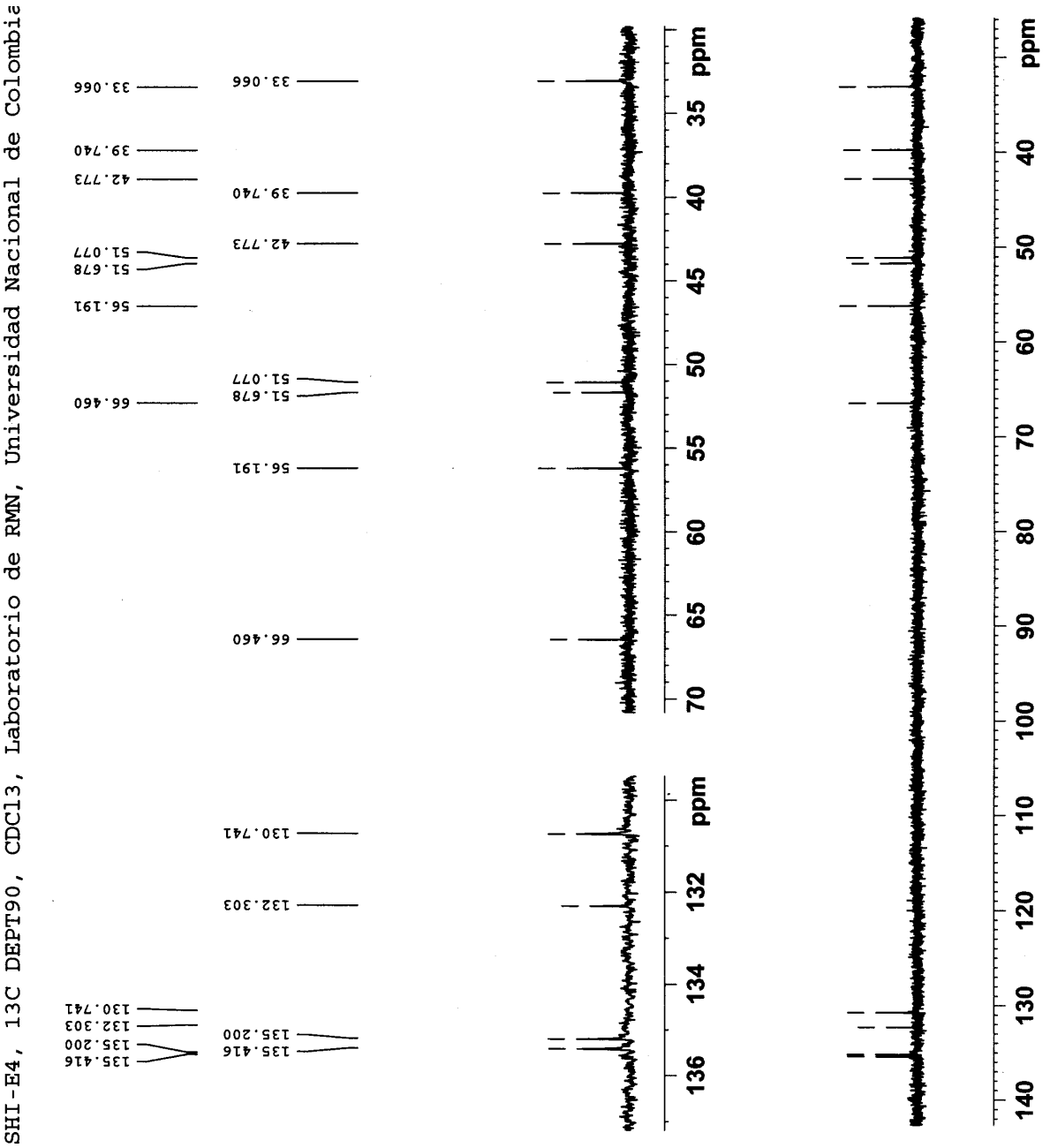
ANEXO 5. Espectro de RMN-^{13}C a 100 MHz de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol



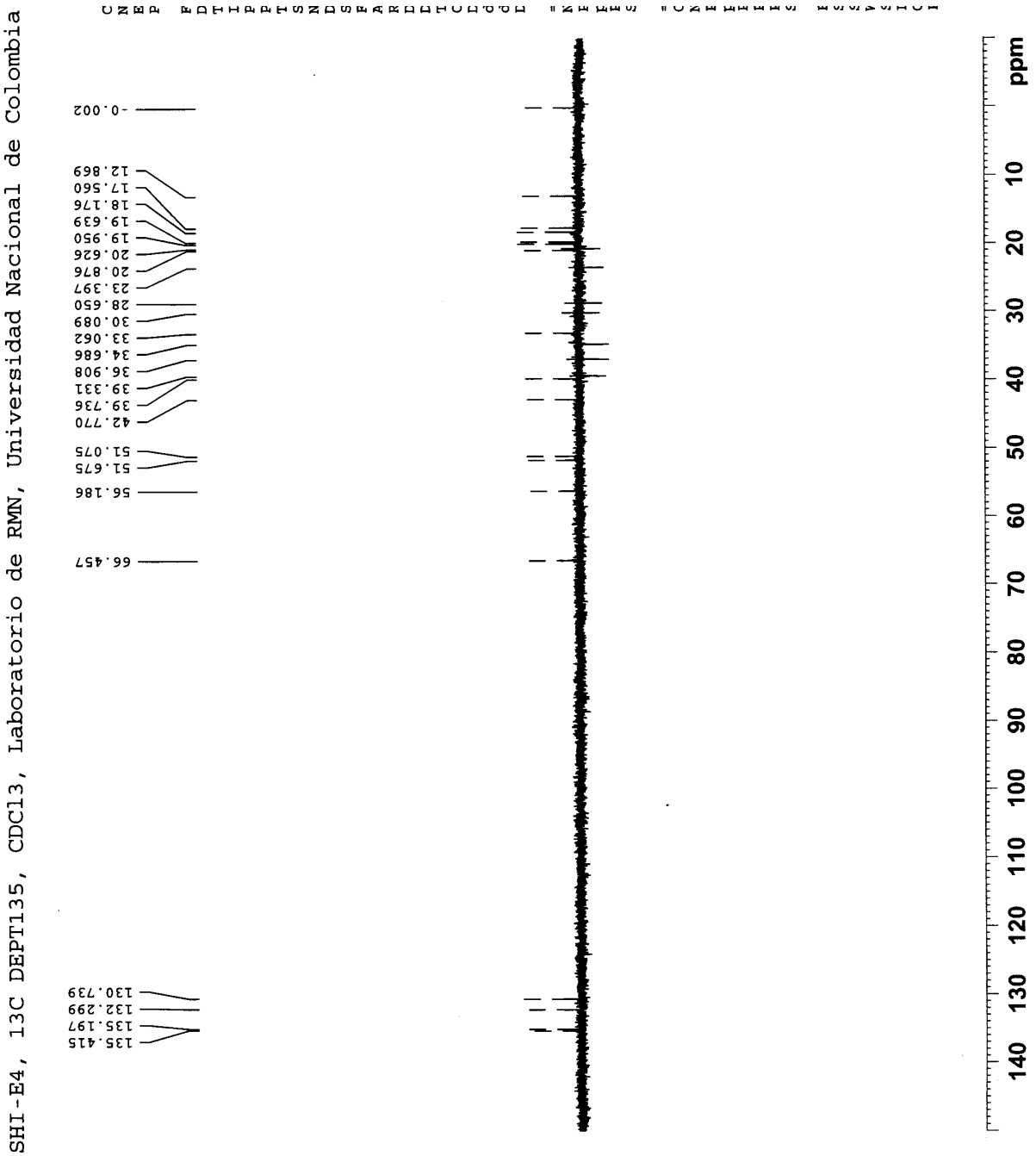
ANEXO 6. Experimento DEPT 45 de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol



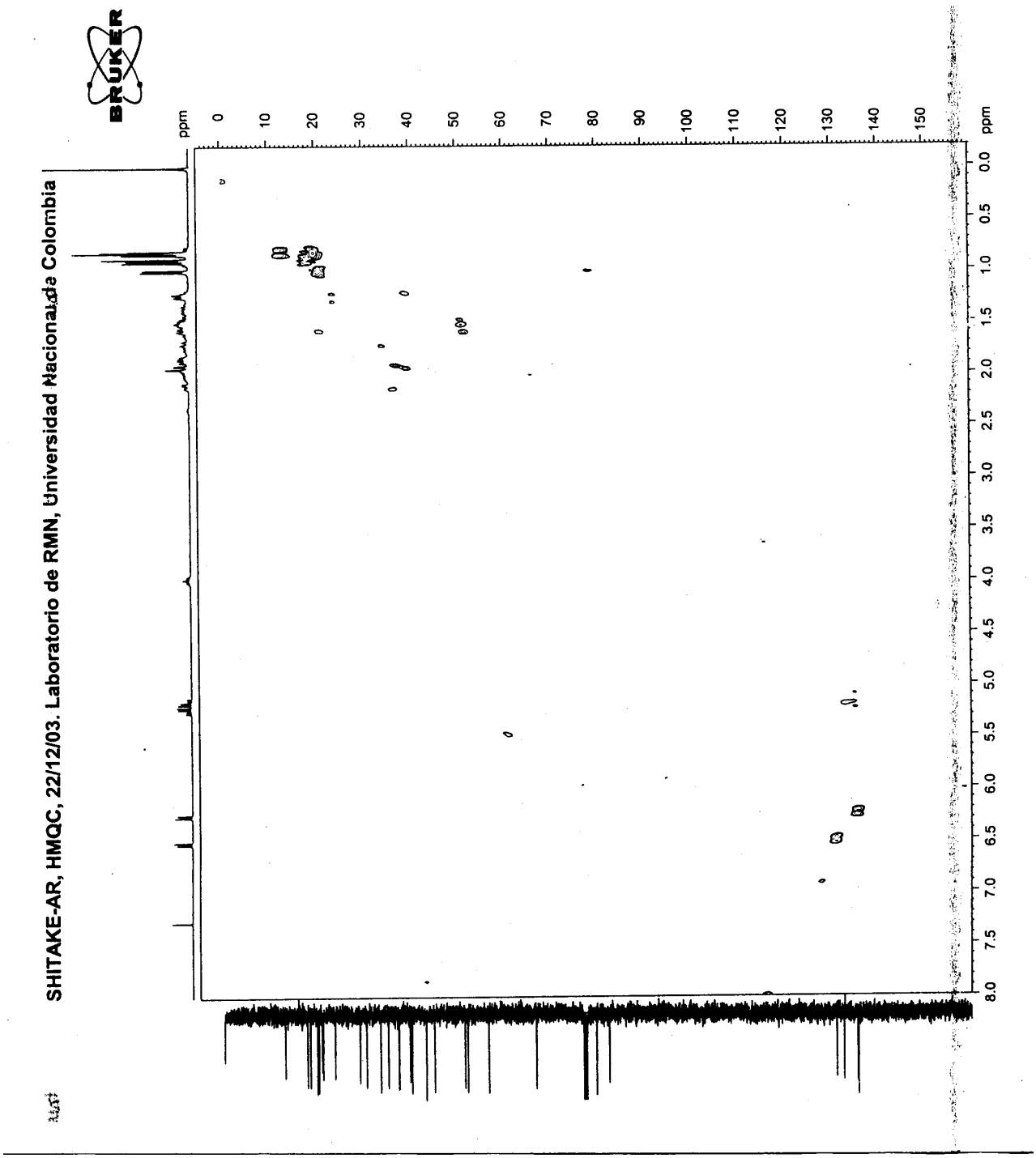
ANEXO 7. Ampliación experimento DEPT 45 de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol



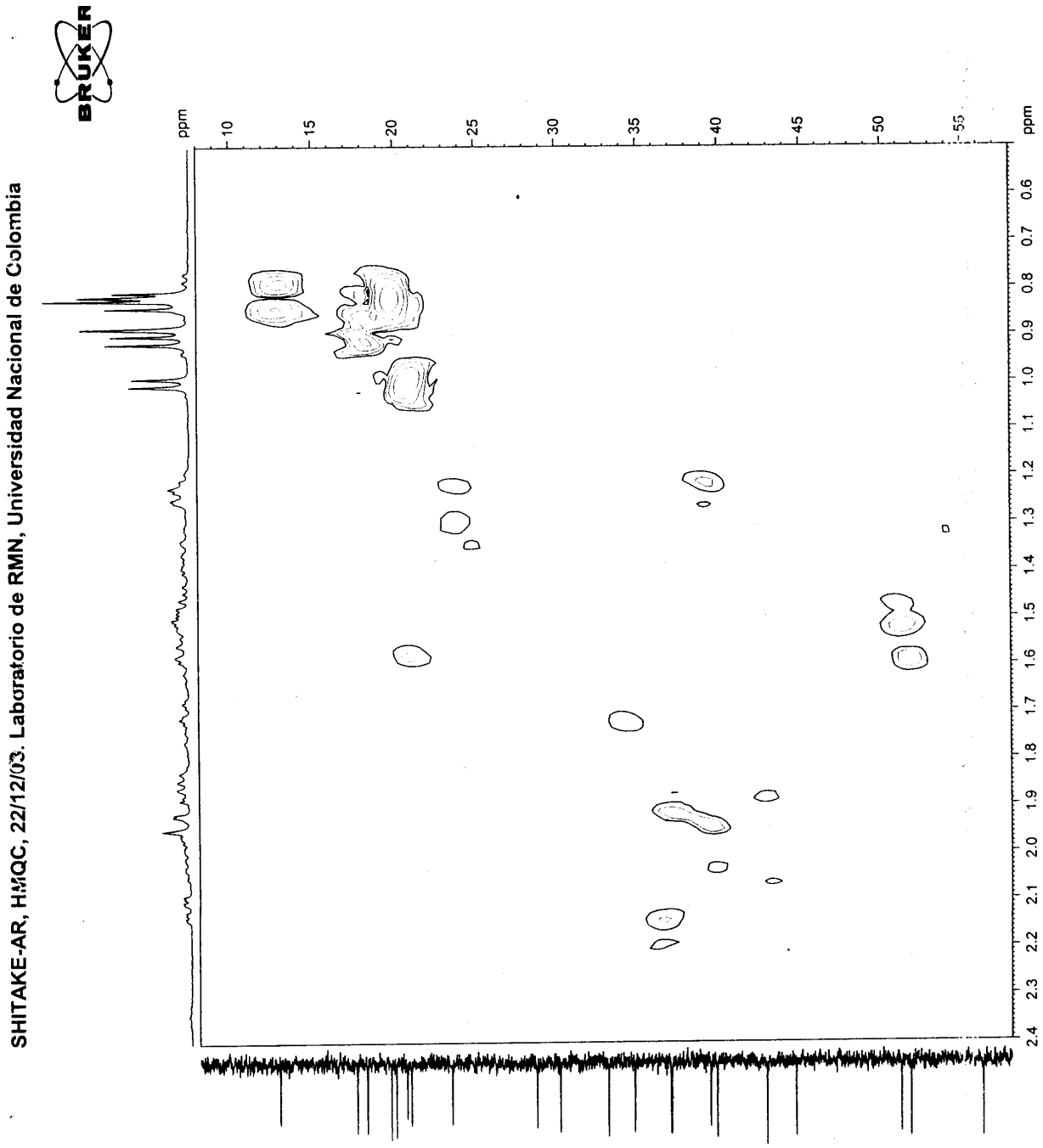
ANEXO 8. Experimento DEPT 90 de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol



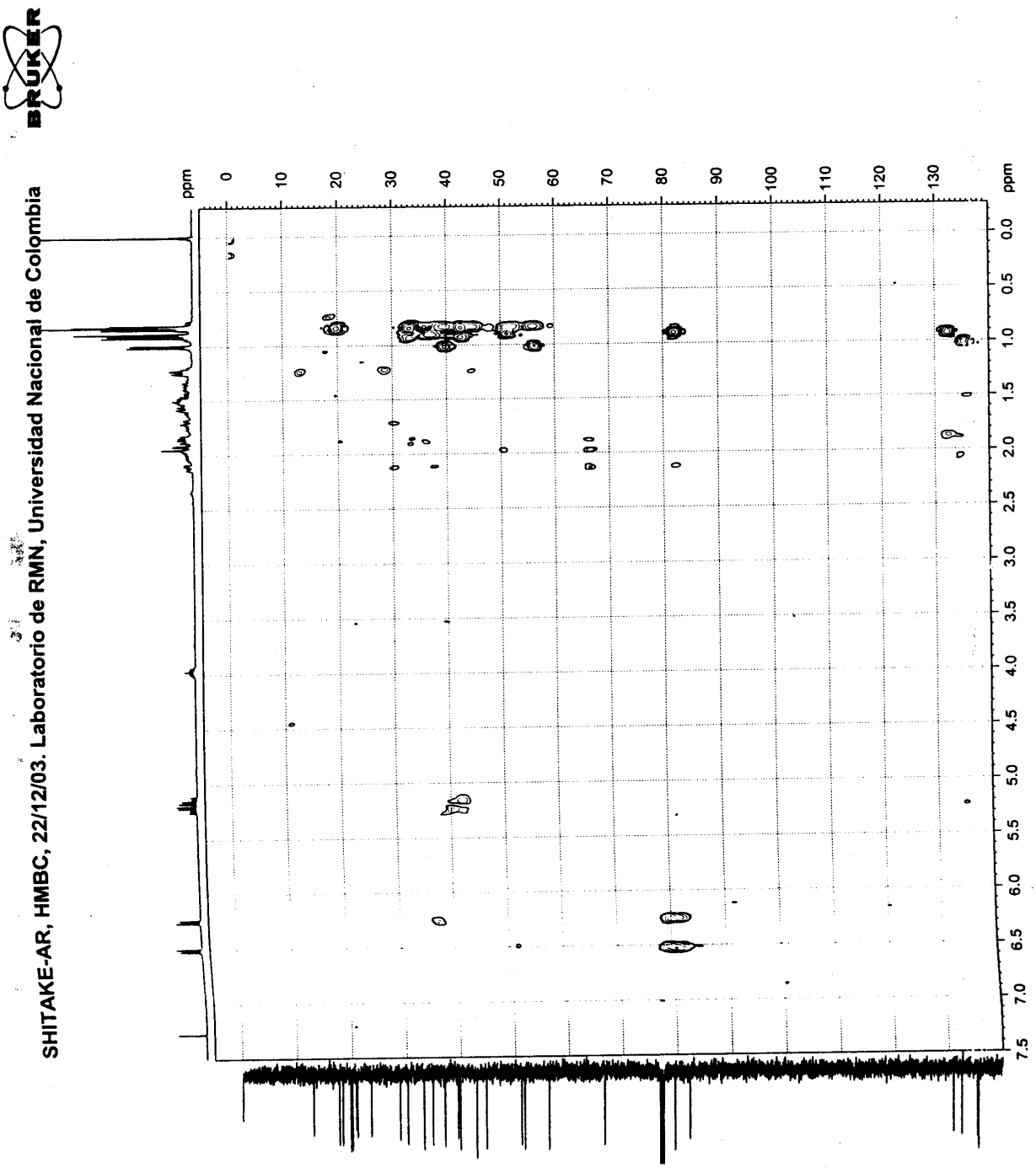
ANEXO 9. Experimento DEPT 135 de Ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol



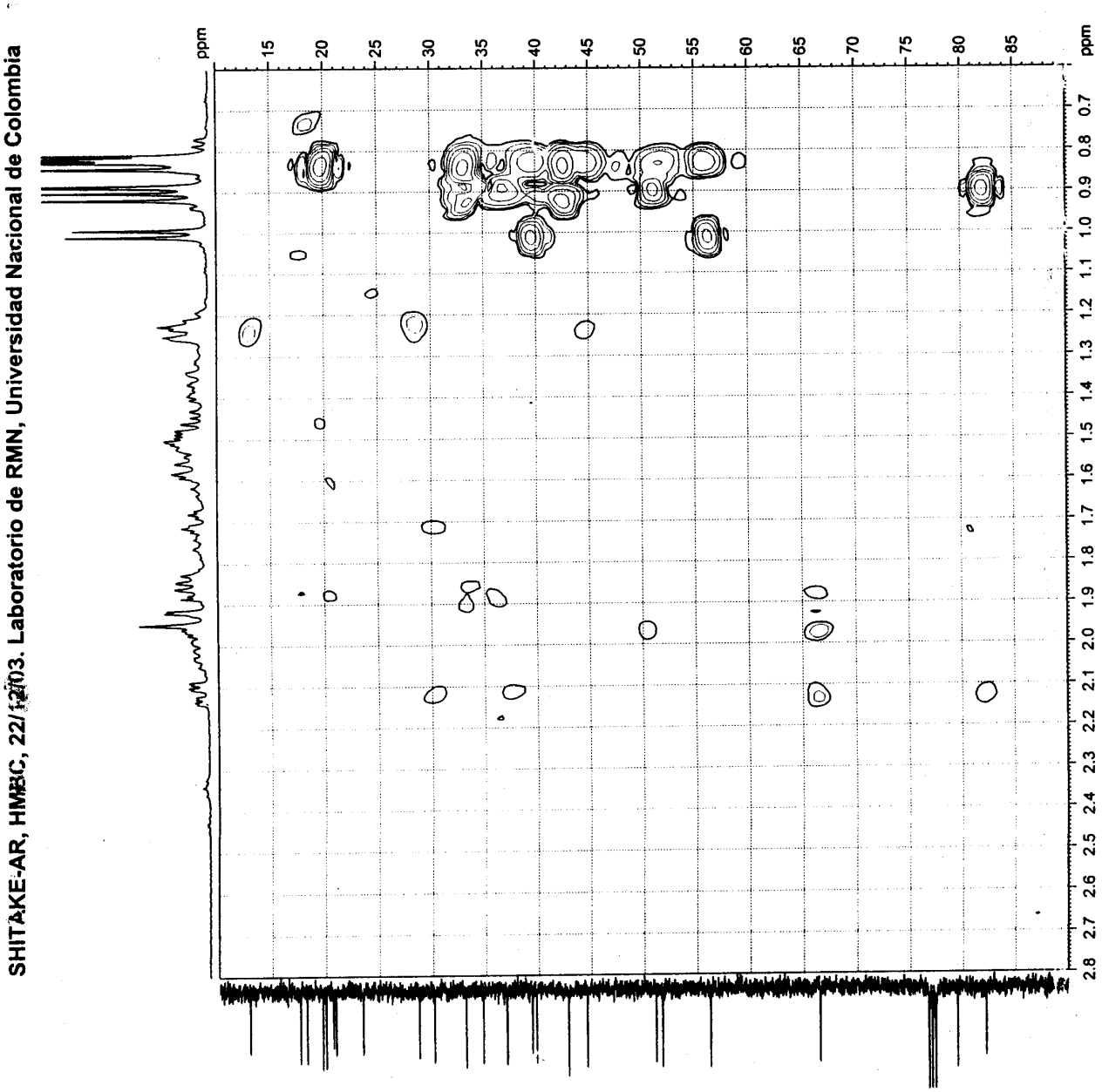
ANEXO 10. Experimento HMQC de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol



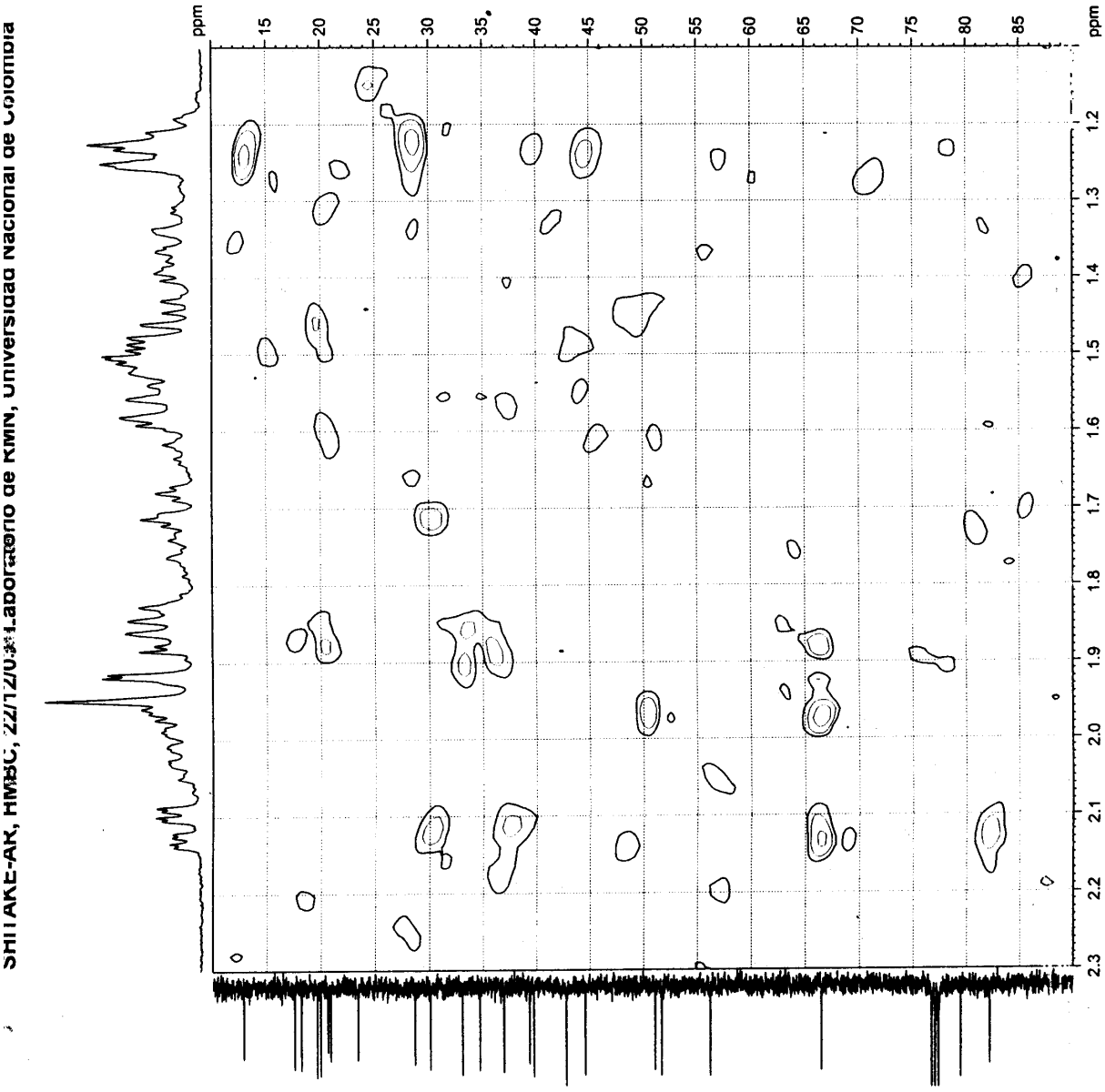
ANEXO 11. Ampliación experimento HMQC de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol



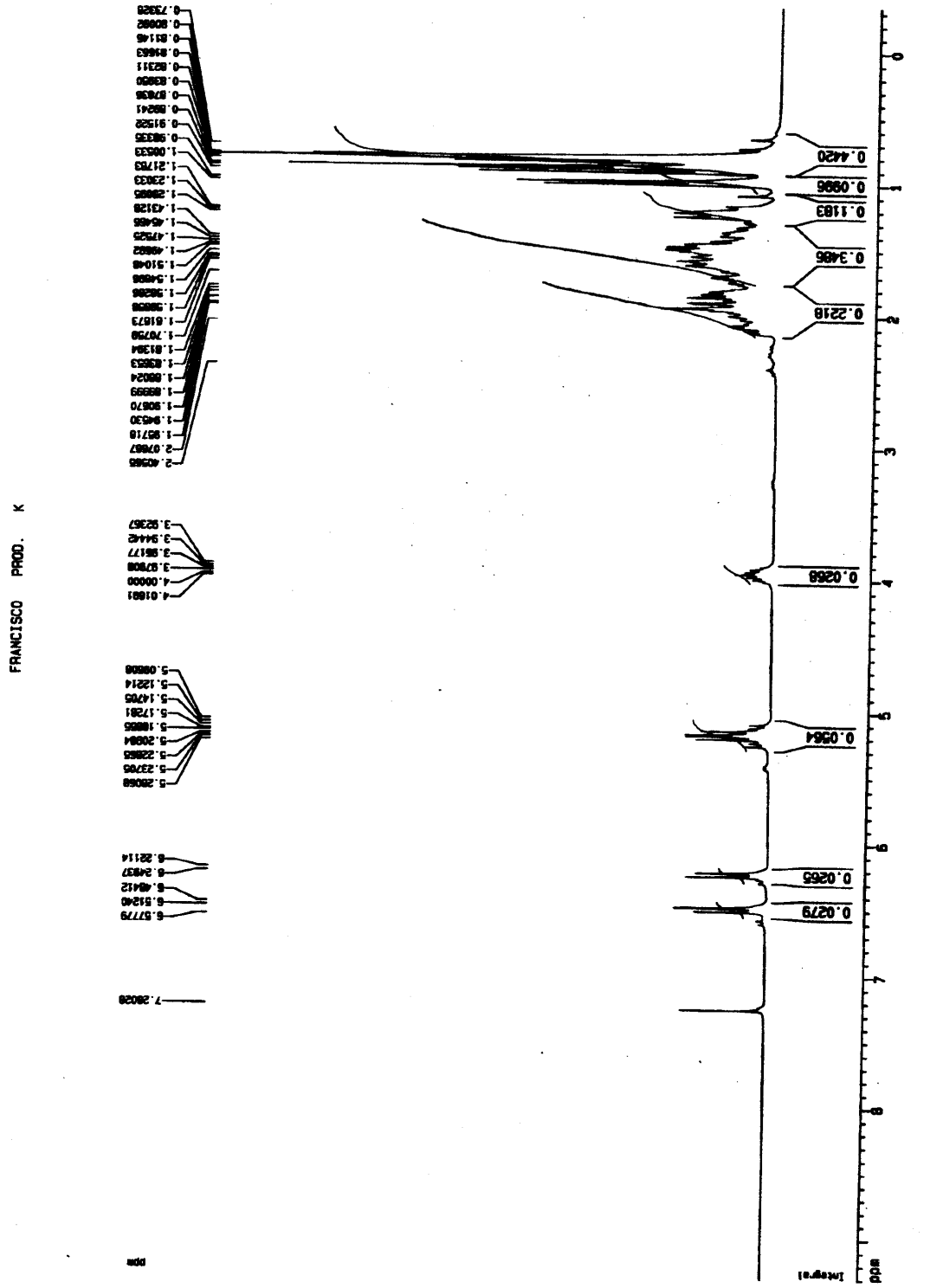
ANEXO 12. Experimento HMBC de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol



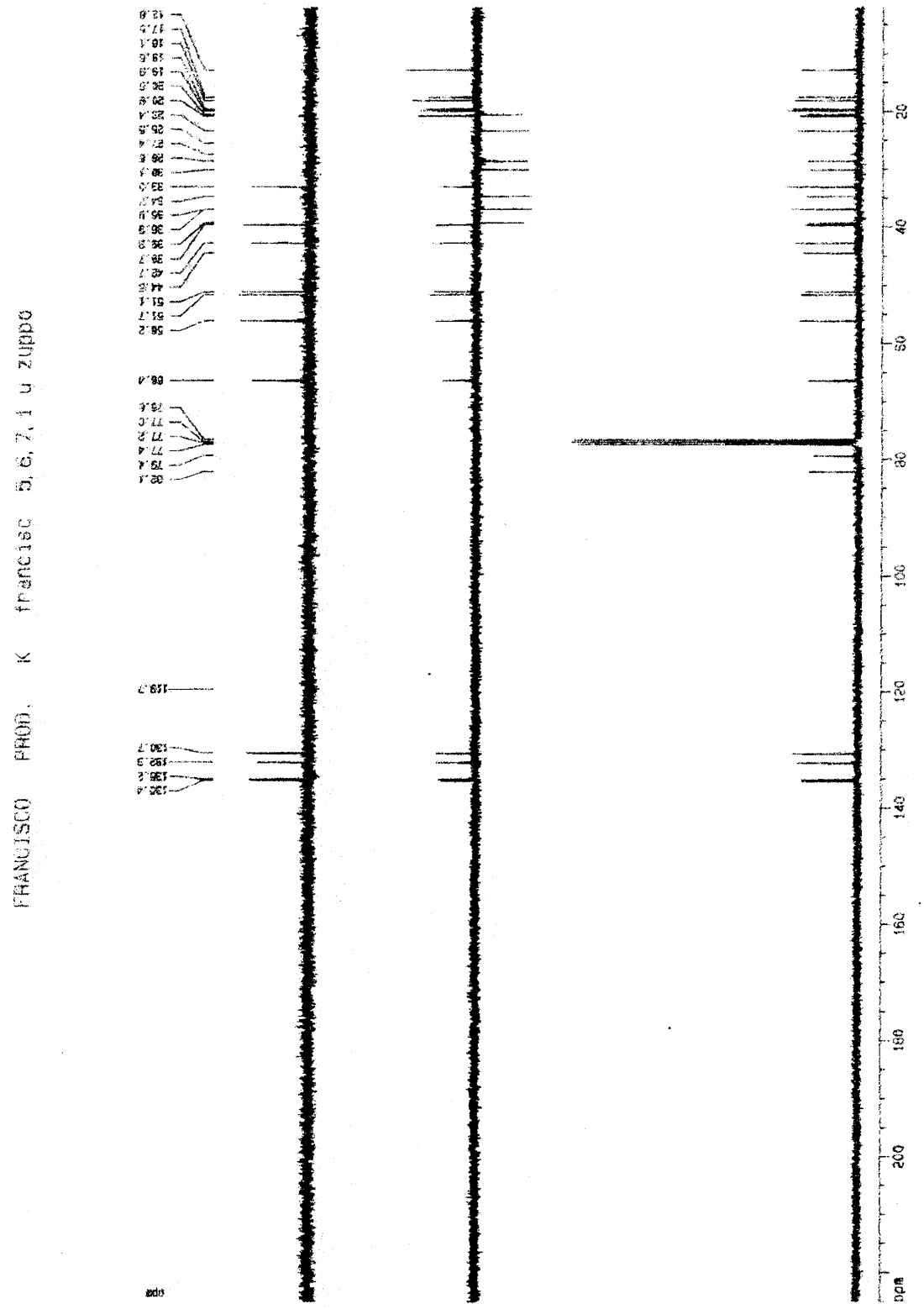
ANEXO 13. Ampliación experimento HMBC de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol



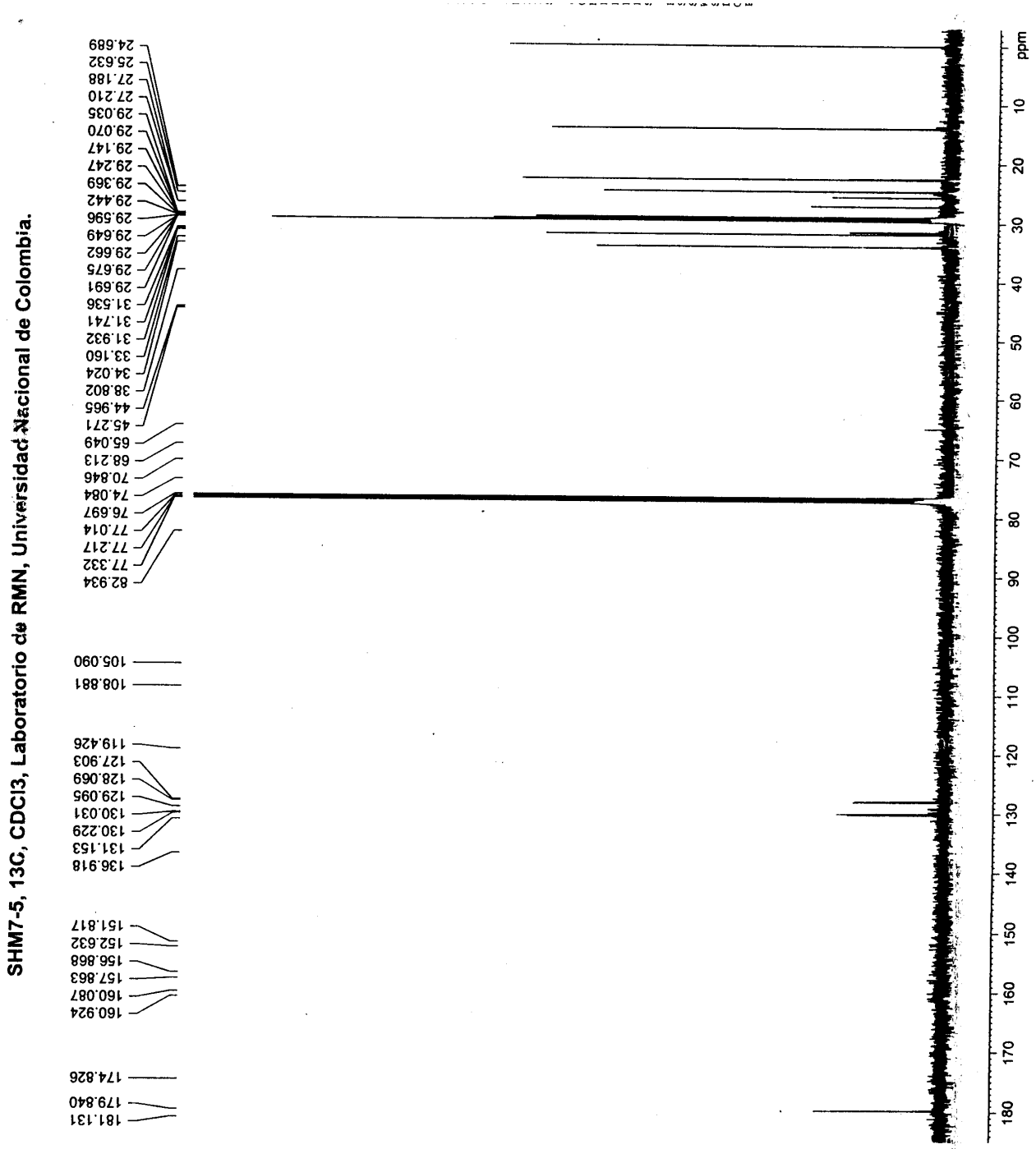
ANEXO 14. Ampliación experimento HMBC de ergosta-6,22-dien-3,5,8-triol



ANEXO 15. Espectro de RMN-^{1}H de peróxido de ergosterilo



ANEXO 16. Espectro de RMN-^{13}C de peróxido de ergosterilo



ANEXO 17. Espectro de RMN-^{13}C a 100 MHz de Ácido palmítico

ANEXO 18. Espectro de RMN-^{1}H a 400 MHz de Ácido Palmítico