

COMPOSICIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LA FRACCIÓN ESTERÓLICA DE ONCE HONGOS COLOMBIANOS

Augusto Rivera*, Ivonne J. Nieto*, Meiser A. Valencia

Recibido: 04/11/02 Aceptado: 18/12/02

Palabras clave: esteroides, hongos macromicetos, ergosterol.

Key words: macromicetal fungi, sterols, ergosterol

RESUMEN

La composición de la fracción esterólica de los hongos *Ganoderma australe*, *Ganoderma lucidum*, *Amanita rubescens*, *Licoperdon perlatum*, *Lentinula edodes*, *Coltricia hammata*, *Laccaria laccata*, *Suillus luteus*, *Panus panoides*, *Macrolepiota colombiana* y *Agaricus bisporus* se estableció mediante la técnica combinada CG-EM. La cuantificación individual de los esteroides presentes en esta fracción se realizó igualmente por CG-EM usando estigmasterol como estándar interno. Los resultados demostraron que *Agaricus bisporus* solo contiene ergosterol y por ello, adicionalmente, se estudió su fracción esterólica a diferentes etapas de desarrollo del hongo.

ABSTRACT

A study of sterolic fraction from collected Colombian fungi: *Ganoderma*

australe, *Ganoderma lucidum*, *Amanita rubescens*, *Licoperdon perlatum*, *Lentinula edodes*, *Coltricia hammata*, *Laccaria laccata*, *Suillus luteus*, *Panus panoides*, *Macrolepiota colombiana* and *Agaricus bisporus* was made, using GC-EM.

It was found that *Agaricus bisporus* showed only ergosterol. Because of further experiments were carried out in order to establish the ergosterol content accord to different steps of fungus growing (carraphore size). The quantification was evaluated using stigmasterol as internal standard.

INTRODUCCIÓN

El estudio químico de compuestos esteroideos en hongos es de gran importancia ya que ciertos esteroides como ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol (ergosterol) actúan como provitaminas o como sustancias de relevancia farmacológica con acciones comprobadas antitumorales (1), antivirales (2) y actividad anticomplementaria (3). El ergosterol puede ser transformado en peróxido de ergosterilo por procesos de oxidación térmica o fotoquímica, dando como resultado una sustancia con una

* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Bogotá.

gran actividad anticomplementaria (IC_{50} $5,0 \times 10^{-6}$). Además, aunado a lo anterior, existen esteroides de hongos con propiedades antifúngicas que bloquean la biosíntesis de ciertos metabolitos.

El interés por conocer el contenido de ergosterol en los hongos radica en que este esteroide se convierte en vitamina D_2 por reacciones fotoquímicas mediante la irradiación con luz ultravioleta, utilizando la apertura electrocíclica conrotatoria de la unidad ciclohexa-1,3-dieno del ergosterol, formándose así el seco-9,10-ergosta-5(10),6,8-trien-3 β -ol o precalciferol (4). Este último posee un trieno acíclico que puede sufrir una reacción sigmatrópica térmica de hidrógeno [1,7], dando seco-9,10-ergosta-5(6),7,10(18)-trien-3 β -ol o vitamina D_2 , proceso utilizado para producir ergocalciferol a partir de ergosterol aislado de levaduras (5). El ergosterol también es materia prima para la síntesis de biomoléculas de interés agroquímico, como brassinoesteroides (6), ecdisona (7) y esteroides altamente oxigenados funcionalizados en la cadena lateral (8). Continuando con el estudio de hongos macromicetos de interés económico, ecológico o medicinal (9), en este artículo presentamos los resultados de la cuantificación de ergosterol en once especies de hongos comestibles, unos silvestres y otros cultivados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de estudio

Los hongos silvestres *Ganoderma australe*, *Amanita rubescens*, *Licoperdon perlatum*, *Coltricia hammata*, *Laccaria laccata*, *Suillus luteus*, *Panus panoides*, y *Macrolepiota colombiana*

fueron recolectados e identificados por Luis Guillermo Henao (Fundación Inguedé) en diferentes lugares de los departamentos de Cundinamarca, Valle del Cauca y Chocó. Las muestras de herbario reposan en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia. Los hongos cultivados *Lentinula edodes* y *Ganoderma lucidum* provienen de Cenicafé (Centro Nacional de Investigación del Café, Chinchiná, Caldas, provistos por Nelson Rodríguez) en tanto que *Agaricus bisporus* cepa Sylvan Spawn 140 (Hybrid off-white), fue suministrado por la empresa Biología Aplicada Ltda. de Bogotá. Los carpóforos de este hongo, recolectados para la cuantificación de ergosterol, se seleccionaron de acuerdo con su tamaño, eligiendo los siguientes radios: 0,10; 0,44; 1,26; 3,40 y 4,50 cm.

Extracción y separación de la fracción esterólica

Los carpóforos de los respectivos hongos se lavaron con agua, se partieron en pequeños trozos y se secaron en horno a temperaturas entre 50 °C y 60 °C durante 5 horas. Una vez secos, se redujeron a polvo fino en un molino mecánico.

Cada una de las muestras de los hongos secos (entre 2,00 g y 5,00 g) se sometió a maceración con cloroformo (6 x 10mL). Se reunieron los diferentes extractos y se concentraron a presión reducida obteniéndose de esta manera el extracto clorofórmico (EC) (entre 20,0 mg y 50,0 mg.). Acto seguido, el EC se mezcló con 0,5120 mg de estándar interno (estigmasterol). La fracción esterólica se separó por C.C. usando como fase estacionaria sílica gel y

como fase móvil un gradiente de éter de petróleo (EP): acetato de etilo desde EP = 100 hasta EP = 70. Se recogieron entre 17 y 22 fracciones que fueron analizadas por CG-EM

Equipos, métodos y análisis

Cromatógrafo de gases (*Hewlett Packard* 6890), usando una columna HP5-MS (30 m de largo y 0,33 mm de diámetro interno). Se empleó el siguiente método: la velocidad de flujo de gas de arrastre (He) fue 1 ml min⁻¹. Una muestra de 1 µL de la fracción esterólica se inyectó con división (1:20). El programa de temperatura fue mantenido a 1 min en 90 °C, con una tasa de 10 °C/min hasta 300 °C, durante 10 min. En el inyector, la temperatura fue 280 °C y el tiempo total de análisis fue 22,67 min. Las condiciones para el detector (*Hewlett Packard* 5973) fueron: 70 eV, impacto electrónico, rango de masas entre 33-550 m/z; EM voltaje (A-tune 200V), frecuencia de barrido 20 Hz y temperatura 230 °C. Patrón: estigmasterol con tiempo de retención promedio de 17,30 min. La forma de cuantificación se realizó por comparación y usando el método de áreas normalizadas de acuerdo a la respuesta del patrón.

Los compuestos (I-IV) fueron identificados con base en el análisis de sus espectros de masas y correlacionando con la base de datos de la biblioteca Wiley Registry of Mass Spectral Data (10) así como por comparación con muestras auténticas

La pureza fue registrada por el programa HPCHEM y el área de cada uno de los picos fue autointegrada por el mismo. El área registrada de los picos en los cromato-

gramas se relacionó con el área del estándar interno, con lo que se logró la cuantificación de cada uno de los compuestos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se encontraron cuatro compuestos (I-IV) de tipo esterólico con núcleo ergostánico en la fracción esterólica de los once hongos sometidos a estudio.

Compuesto I. Presenta un ion molecular a 396 uma, consecuente con la fórmula C₂₈H₄₄O. En su espectro de masas, se observan iones a m/z 381 [M⁺ - CH₃], 378 [M⁺ - H₂O], 271 [M⁺ - cadena lateral], 253 [M⁺ - cadena lateral - H₂O], 211 [fisión del anillo D - H₂O], y el ión 337 [M⁺ - 59], típico de esteroides Δ^{5,7} 3-OH. Con base en lo anterior y con el buen porcentaje de correlación que presentó con el espectro existente en la biblioteca de espectros (10), se ratificó la estructura como ergosta-5,7,22-trien-3β-ol.

Compuesto II. Presentó el ion molecular a m/z 398 que concuerda con la fórmula molecular C₂₈H₄₆O. Exhibió iones característicos para esteroides Δ⁷, como aquellos a m/z 383 [M⁺ - CH₃], 380 [M⁺ - H₂O], 273 [M⁺ - C₉H₁₇], 255 [M⁺ - C₉H₁₇ - H₂O] y 213 [fisión del anillo D - H₂O]. Está también presente el ion a m/z 246 típico de esteroides Δ⁷ (11). La ausencia de los iones 313 [M⁺ - 85] y 287 [M⁺ - 111] una ratifica que el compuesto II no es un esteroide Δ⁵. Con lo anterior se establece que II es de tipo esteroide con un grupo OH y metilos angulares en C-10 y C-13. Con base en este análisis, y en la comparación con una muestra auténtica, se determinó que corresponde a ergosta-7,22-dien-3β-ol.

Compuesto III. El EM indicó que tiene un peso molecular de 400 uma para el cual se calculó la fórmula $C_{28}H_{48}O$. La presencia en el espectro de masas de este compuesto, al igual que en el anterior, de los iones provenientes de las escisiones $M^+ - CH_3$ a m/z 385; $M^+ - H_2O$ a m/z 382; $M^+ - C_9H_{19}$ (cadena lateral C.L.) a m/z 275; $M^+ - C_9H_{19} - H_2O$ a m/z 257 y la fisión del anillo D - H_2O a m/z 215, así como el ion de 255 uma (pico base) junto con el ion 146, típico de los esteroides Δ^7 (7), así como la ausencia de los iones a m/z 315 y 289 [$M^+ - 85$] y [$M^+ - 111$], respectivamente, permitieron establecer que el compuesto es ergosta-7-en-3 β -ol.

Compuesto IV. Se calculó la fórmula molecular $C_{28}H_{42}O$ congruente con el peso del ion molecular de 394 uma. Su EM presenta los iones característicos de esteroides provenientes de las pérdidas de agua a m/z 376 [$M^+ - H_2O$], metilo y agua m/z 361 [$M^+ - H_2O - CH_3$], cadena lateral (m/z 125), pérdida de la cadena lateral 269 [M^+

- C_9H_{17}], el pico base a m/z 251 correspondiente a la pérdida de la cadena lateral y agua [$M^+ - C_9H_{17} - H_2O$], fisión del anillo D m/z 227 [$M^+ - C_{12}H_{23}$], fisión del anillo D y agua 209 [$M^+ - C_{12}H_{23} - H_2O$]. También está presente el ion a m/z 125 que comprueba que la cadena lateral posee un doble enlace. Con base en lo anterior y con la similitud del existente en la biblioteca de espectros (10), se identificó como ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol.

En la tabla 1, se presentan los esteroides hallados en el extracto clorofórmico para cada uno de los hongos micromicetos analizados, así como la cantidad, expresada en porcentaje peso a peso (% p/p) de los mismos, según se concluyó. De notable interés resultó el hecho de que ningún hongo contiene los cuatro esteroides identificados y solamente *L. laccata* y *A. rubescens* tienen tres de ellos. Sólo conforman esta fracción los esteroides de tipo ergostánico, identificados como ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol (I)

Tabla 1. Composición esteróica en hongos micromicetos (g/100 g extracto $CHCl_3$)

| Hongo | I | II | III | IV |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Ganoderma australe</i> | 5,75 | 1,95 | - | - |
| <i>Coltricia hammata</i> | - | $2,40 \times 10^{-1}$ | $2,30 \times 10^{-1}$ | - |
| <i>Laccaria laccata</i> | 2,09 | 1,41 | 1,66 | - |
| <i>Suillus luteus</i> | $1,75 \times 10^{-1}$ | - | $5,24 \times 10^{-2}$ | $3,02 \times 10^{-2}$ |
| <i>Panus panoides</i> | 2,70 | - | $2,84 \times 10^{-2}$ | - |
| <i>Agaricus bisporus</i> | 29,5 | - | - | - |
| <i>Ganoderma lucidum</i> | - | 1,06 | $2,88 \times 10^{-1}$ | - |
| <i>Amanita rubescens</i> | 7,56 | $8,63 \times 10^{-1}$ | $1,58 \times 10^{-1}$ | - |
| <i>Licoperdon perlatum</i> | - | 7,69 | - | - |
| <i>Lentinula edodes</i> | 16,38 | 3,43 | - | - |
| <i>Macrolepiota colombiana</i> | 8,21 | 1,77 | - | - |

Tabla 2. Iones característicos para los compuestos I a IV

| Esterol \ Iones m/z | M ⁺ -H ₂ O | M ⁺ -CH ₃ | M ⁺ -CH ₃ -H ₂ O | M ⁺ -CL | M ⁺ -CL-H ₂ O | Fisión Anillo D | Fisión Anillo D-H ₂ O |
|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---|--------------------|-------------------------------------|-----------------|----------------------------------|
| (I) Δ ^{5,7Δ} | 378 | 381 | | 271 | 253 | | 211 |
| (II) Δ ⁷ | 380 | 383 | | 273 | 255 | | 213 |
| (III) Δ ⁷ | 382 | 385 | | 275 | 257 | | 215 |
| (IV) Δ ^{5,7,9(11)} | 376 | | 361 | 269 | 251 | 227 | 209 |

I-Ergosta-5,7,22-trien-3β-ol (ergosterol); II-Ergosta-7,22-dien-3β-ol; III-ergosta-7-en-3β-ol y IV- ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol

(ergosterol), ergosta-7,22-dien-3β-ol (II) (dihidroergosterol), ergosta-7-en-3β-ol (III) y ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol (IV).

Se sabe que el ergosterol es el esteroil más encontrado en los hongos, pero nuestros estudios demostraron que *C. hammata*, *L. perlatum* y *G. lucidum* no lo contienen. Este resultado es una novedad en lo que se refiere al último, toda vez, que hasta donde llega nuestro conocimiento de estudios realizados a hongos silvestres de esta especie, siempre se ha informado que contiene ergosterol. En estos momentos, nuestro grupo de investigación realiza experimentos tendientes a verificar si el medio de cultivo tuvo alguna incidencia.

Los hongos *A. rubescens*, *L. edodes* y *M. colombiana* presentaron, por el contrario, ergosterol en buena cantidad, como se indica en la figura 1. El primero de ellos, aunque comestible, no tiene buena palatabilidad, por ello es

poco recomendable para ser consumido. Tampoco son muy útiles para uso industrial pues acompañando al ergosterol estaría el dihidroergosterol (II) en apreciable cantidad, sustancia químicamente similar al ergosterol y muy difícil de separar por métodos convencionales.

Lo anterior también se cumple para los hongos *G. australe*, no cultivado hasta el momento por ser perenne y no comestible por su dureza, y *L. laccata* que, a pesar de ser un hongo comestible, tampoco ha sido cultivado con miras a su comercialización.

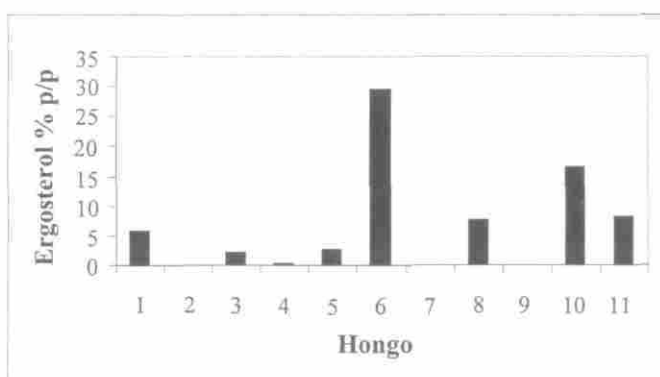


Figura 1. Ergosterol presente en hongos macromicetos.

1: *Ganoderma australe*, 2: *Coltricia hammata*, 3: *Laccaria laccata*, 4: *Suillus luteus*, 5: *Panus panoides*, 6: *Agaricus bisporus*, 7: *Ganoderma lucidum*, 8: *Amanita rubescens*, 9: *Licoperdon perlatum*, 10: *lentulina edodes*, 11: *Macrolepiota Colombiana*.

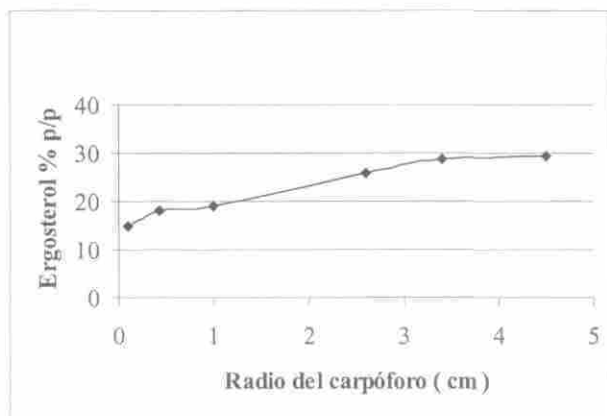


Figura 2. Contenido de ergosterol de *Agaricus bisporus* según su crecimiento.

El hongo *L. edodes* presentó ergosterol común al estudio realizado por Yokokawa y col. (12) pero, contrario a nuestros resultados, ellos obtuvieron además de ergosterol, ergosta-5,7-dien-3 β -ol. Este último es un esteroide que, por un lado, no es común en la especie cultivada colombiana, y, por el otro, no se encontró en ninguno de los hongos escogidos para este estudio. Por el contrario, dicho esteroide —con cadena lateral saturada— se presentó en alta cantidad en especies como *Hygrocybe punicea*, *Russula foetens*, *Amanita caesarea* y *Flammulina velutipes* (12).

En este último hongo, *F. velutipes*, Yokokawa encontró un isómero del ergosterol: ergosta-5,8,22-trien-3 β -ol (licosterol). Esta sustancia presenta en el espectro de masas fraccionamientos similares al ergosterol, dando como resultado iones comunes para estos dos compuestos. La presencia de este compuesto se descartó en nuestro estudio teniendo en cuenta el tiempo de retención relativo al compararlo con una muestra auténtica de ergosterol. Sin

embargo, el licosterol es un esteroide que ha sido hallado en cepas mutantes de *N. crassa* y *S. cerevisial*, pero no en hongos silvestres. Cabe anotar que el licosterol no es una sustancia que sirva como fuente de vitamina D₂, ni de sustancias bioactivas comprobadas.

El estudio de estos once hongos colombianos demuestra que el único esteroide con cadena lateral saturada es el ergosta-7-en-3 β -ol (III), el cual se encuentra —aunque en pequeña proporción— en los

hongos *S. luteus* y *P. panoides*. Esta característica la comparten los hongos *L. laccata*, *C. hammata*, *G. lucidum* y *A. rubescens*. En contraposición, Yokokawa (12) revela que sólo una de las diez especies de hongos analizadas en su estudio *Russula senecis*, presenta el compuesto III.

Además de los esteroides mencionados con anterioridad, con nuestro estudio pusimos en evidencia que el compuesto ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol (IV) sólo está presente en el hongo *S. luteus*, descartándolo como una posible fuente de ergosterol.

En oposición, *A. bisporus* exhibió no sólo un alto contenido de ergosterol —lo que lo convierte en una fuente promisoría de esta sustancia como materia prima para sintetizar vitamina D₂ o como un complemento recomendable alimenticio— sino que este esteroide fue la única sustancia esteroide presentada.

Por lo anterior se eligió este hongo como fuente promisoría de ergosterol y se

decidió cultivar dicho hongo y establecer el contenido de ergosterol durante las diferentes fases de crecimiento.

Los resultados del contenido de ergosterol en función del tamaño del carpóforo para *A. bisporus* se presentan en la figura 2. De ésta se puede inferir que la cantidad de ergosterol producida por el hongo aumenta con el crecimiento del mismo, por lo que se puede optimizar el tamaño del hongo requerido para un máximo de contenido en ergosterol. Así, el tamaño óptimo del hongo *A. bisporus*, según la figura 2, corresponde al radio del carpóforo: 4.5 cm.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia; al Subprograma IV del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED); a COLCIENCIAS; a la Fundación Inguedé y a la empresa Biología Aplicada Ltda. por el apoyo y colaboración recibidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kahlos, K.; Kangas, L.; Hiltunen, R. (1989). Ergosterol peroxide: An active compound from *Innonotus radiatus*. *Planta Medica*, 55, 389.
2. Kindesquist, U.; Lesnaus, A.; Teuscher, E.; Pilmgrim, H. (1989). The antiviral action of ergosterol peroxide. *Pharmazie*, 44, 570.
3. Kim, D.S.; Baek N-I.; Oh, S.R.; Jung, Y. K.; Lee, S.I.; Kim, H.J.; Lee K-H. (1997). Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma Fasciculare* and reassignment of NMR data. *Arch. Pharm. Res.* 20(3) 201.
4. Rauter, A. P.; Prata, C.; Bermejo, J. (1998). Transformaciones fotoquímicas del ergosterol, En: (Rivera, A., Ed.), Producción de vitamina D₂ a partir de hongos macromicetos: Aspectos científicos y económicos. Bogotá Guadalupe Ltda., (Ed Rivera, A.) pp. 97-133.
5. Patterson, G. W., and Nes, W.D. (1991). Physiology and Biochemistry of sterols, American oil chemists Society: Washington, D.C., p. 158.
6. McMorris, T. C., and Patil, P. A. (1993). Improved synthesis of 24-epibrasinolide from ergosterol. *J. Org. Chem.* 58 2338.
7. Haag, T., and Luu, B. (1988). Synthesis of putative precursors of ecdysone. Part 3. Synthesis of 3,4,25-trihydroxi-5 cholest-7-en-6-one. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* 1 2353.
8. Morris D. S.; Williams, D. H.; Norris A. F. (1988). Structure and synthesis of 25-hydroxi-cholecalciferol-26,23-lactone, a metabolite of vitamin D₃. *J. Chem Soc. Chem. Commun.* 424.
9. González, A.G.; León, F.; Rivera, A.; Bermejo, J.; Muñoz, C. (1999). Lanostanoids triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *J. Nat prod.* 62, 1700.
10. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. (1944). Wiley: New York.

11. Itoh, D., Djerassi. (1983). Minor and rare sterols in marine invertebrate. 31. isolation and structure elucidation of 23H-isocalysterol, and naturally occurring cyclopropene. Some comparative observation of the course of the ring opening of steroidal cyclopropenes. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I* 147.
12. Yokokawa, H., and Mitsuhashi, T. (1981). The sterol composition of mushrooms. *Phytochem.* 20(6), 1349-1351.
13. Denis R. B. (1995). Mushrooms. Poisons and panaceas. W.H Freeman and Company: New York, p. 175.