



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

**DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS METABOLITOS  
SECUNDARIOS TRITERPENOIDALES EN BÚSQUEDA DE  
ANTIMICROBIANOS DE UN HONGO SILVESTRE  
APHYLLOPHORAL COLOMBIANO**

**MIGUEL ANTONIO MORA CORREA**

**Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química  
Bogotá D.C., Colombia  
2010**

**DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS METABOLITOS  
SECUNDARIOS TRITERPENOIDALES EN BÚSQUEDA DE  
ANTIMICROBIANOS DE UN HONGO SILVESTRE  
APHYLLOPHORAL COLOMBIANO**

**MIGUEL ANTONIO MORA CORREA**

Tesis presentada como requisito parcial para optar el título de:  
**Magister en Ciencias - Química**

**DIRECTORA**  
**Dr. Sci. IVONNE JEANNETE NIETO RAMÍREZ.**

**Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química  
Bogotá D.C., Colombia  
2010**

## **Dedicatoria**

*A mis padres..... quienes me apoyaron en esta  
aventura*

*Y a ti Diana ..... por ser quien me acompaña en  
todo momento*





## Resumen

Se realizó el estudio químico del extracto crudo metanólico y de la partición en diclorometano del mismo, del cuerpo fructífero del hongo Basidiomiceto silvestre Colombiano *Fomitopsis sp.*, en busca de compuestos triterpenoidales con posible acción antimicrobiana. Los resultados arrojaron como componentes grasos no esterólicos ésteres metílicos de ácidos grasos saturados e insaturados, así como también la presencia de ácidos grasos C16:0 y C18:1  $\Delta^9$  e hidrocarburos alifáticos saturados C16, C18 y C20. En cuanto a compuestos triterpenoidales éstos corresponden a núcleos lanostánicos, colestánicos y ergostánicos. Todos los compuestos identificados se reportan por primera vez para el hongo objeto de estudio. Tanto el extracto crudo metanólico como el extracto obtenido de la partición en diclorometano se sometieron a evaluación de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, encontrándose una respuesta leve frente a *Staphylococcus aureus* (Gram positiva).

**Palabras Clave:** *Fomitopsis sp.*, ácidos grasos, esteroides, triterpenoides, actividad antimicrobiana

## Abstract

The chemical study from methanolic extract and the fraction derived from a dichloromethane soluble partition of a methanol extract of the fruiting body of the Colombian wild fungus *Fomitopsis sp.* was made in search of triterpenoids with possible antimicrobial activity. The results showed that are methyl esters of saturated and unsaturated fatty acids as major fatty components, as well as the presence of fatty acids C16:0 y C18:1  $\Delta^9$ , and hydrocarbons C16, C18 and C20. As triterpenoids compounds, these correspond to Lanostanic, Colestanic and Ergostanic skeletons, all first reported for the mushrooms under study. As the methanolic extract as the fraction derived from a dichloromethane soluble partition of a methanol extract were submitted to antimicrobial biological evaluation against Gram positive and Gram negative bacterias, found a mild response against *Staphylococcus aureus* (Gram positive).

**Key words:** *Fomitopsis sp.*, fatty acids, sterols, triterpenoids, antimicrobial activity.





# Contenido

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE DIAGRAMAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....</b>	<b>XV</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.    Consideraciones y aspectos biológicos</b>	<b>5</b>
<b>1.2.    Valor Nutricional y Medicinal de los Hongos</b>	<b>6</b>
Valor nutricional de los Macrohongos	6
Valor medicinal de los Macrohongos	6
<b>1.2.1    Estudios Químicos en Hongos Basidiomicetos</b>	<b>7</b>
Terpenoides	7
<b>1.3    Farmacología de los Hongos</b>	<b>14</b>
<b>1.4    Orden Aphyllophoral</b>	<b>17</b>
El género <i>Fomitopsis</i>	17
<b>1.5    Los Antibióticos</b>	<b>20</b>
1.5.1.    Potencia de los Antibióticos	20
1.5.2.    Infecciones bacterianas y Productos Naturales	21

	<b>Pág</b>
<b>2. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1    Técnicas generales</b>	<b>23</b>
2.1.1    Extracción asistida por ultrasonido	23
2.1.2    Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	23
2.1.3    Cromatografía en columna (CC)	23
2.1.4    Cromatografía en capa delgada (C.C.D) y cromatografía en capa delgada preparativa (C.C.D.P)	24
2.1.5    Reveladores	24
<b>2.2    Material fúngico</b>	<b>24</b>
<b>2.3    Selección del método y disolvente de extracción</b>	<b>25</b>
<b>2.4    Extracción, separación y purificación de los compuestos triterpenoidales.</b>	<b>25</b>
2.4.1    Extracto metanólico crudo	25
2.4.2    Extracto en diclorometano	26
<b>2.5    Actividad antimicrobiana</b>	<b>26</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.    Comparación de métodos de extracción</b>	<b>37</b>
<b>3.2.    Determinación estructural de los constituyentes del cuerpo fructífero del hongo <i>Fomitopsis sp.</i></b>	<b>37</b>
3.2.1.    Extracto metanólico crudo	37
3.2.2.    Compuestos grasos no esterólicos presentes en el cuerpo fructífero del hongo <i>Fomitopsis sp.</i>	39
▪    FRACCIÓN F <sub>EC1</sub>	39
Compuesto F <sub>EC1</sub> (I)	39
Compuesto F <sub>EC1</sub> (II)	40
Compuesto F <sub>EC1</sub> (III)	41
Compuesto F <sub>EC1</sub> (IV)	42
▪    FRACCIÓN F <sub>EC4</sub>	42
Compuesto F <sub>EC4</sub> (I)	43
Compuesto F <sub>EC4</sub> (II)	44
Compuesto F <sub>EC4</sub> (III)	44
Compuesto F <sub>EC4</sub> (IV)	44
Compuesto F <sub>EC4</sub> (V)	46
Compuesto F <sub>EC4</sub> (VI)	46
<b>3.2.3.    Compuestos esterólicos presentes en el cuerpo fructífero del hongo <i>Fomitopsis sp.</i></b>	<b>49</b>
▪    FRACCIÓN F <sub>ED1</sub>	51
Compuestos grasos no esterólicos	51
Compuestos triterpenoidales	52
Compuesto F <sub>ED1</sub> (IV)	53
Compuesto F <sub>ED1</sub> (V)	55
Compuesto F <sub>ED1</sub> (VI)	57

	<b>Pág</b>
Compuesto F <sub>ED1</sub> (VII)	58
Compuesto F <sub>ED1</sub> (VIII)	60
▪ FRACCIÓN F <sub>ED2</sub>	62
▪ FRACCIÓN F <sub>ED3</sub>	63
Compuesto F <sub>ED3</sub> (I)	64
Compuesto F <sub>ED3</sub> (II)	65
Compuesto F <sub>ED3</sub> (III)	65
Compuesto F <sub>ED3</sub> (IV)	67
Compuesto F <sub>ED3</sub> (V)	69
▪ FRACCIÓN F <sub>ED4</sub>	71
Compuesto F <sub>ED4</sub> (I)	72
Compuesto F <sub>ED4</sub> (II)	73
▪ FRACCIÓN F <sub>ED5</sub>	74
▪ FRACCIÓN F <sub>ED6</sub>	75
Compuesto F <sub>ED6</sub> (II)	76
▪ FRACCIÓN F <sub>ED7</sub>	77
Compuesto F <sub>ED7</sub> (I)	78
Compuesto F <sub>ED7</sub> (II)	79
Compuesto F <sub>ED7</sub> (III)	80
<b>3.3 Ensayos de actividad antimicrobiana</b>	<b>83</b>
<b>4.CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>95</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>97</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1:</b> Esqueletos básicos de algunos fungimetabolitos de carácter triterpenoidal.....	8
<b>Figura 2-1:</b> <i>Fomitopsis sp.</i> .....	24
<b>Figura 3-1:</b> Cromatograma de Extracto metanólico del cuerpo fructífero del hongo .....	38
<b>Figura 3-2:</b> Cromatograma de la Fracción F <sub>EC1</sub> .....	39
<b>Figura 3-3:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>EC1</sub> (I) .....	40
<b>Figura 3-4:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>EC1</sub> (II).....	41
<b>Figura 3-5:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>EC1</sub> (III).....	41
<b>Figura 3-6:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>EC1</sub> (IV) .....	42
<b>Figura 3-7:</b> Cromatograma de la Fracción F <sub>EC4</sub> .....	43
<b>Figura 3-8:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>EC4</sub> (I) .....	43
<b>Figura 3-9:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>EC4</sub> (II).....	44
<b>Figura 3-10:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>EC4</sub> (III).....	45
<b>Figura 3-11:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>EC4</sub> (IV) .....	45
<b>Figura 3-12:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>EC4</sub> (VI) .....	46
<b>Figura 3-13:</b> Perfil cromatográfico del extracto proveniente de la partición en CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> del extracto crudo metanólico obtenido del cuerpo fructífero del hongo <i>Fomitopsis sp.</i> .....	50
<b>Figura 3-14:</b> Comparación de perfiles cromatográficos de extractos obtenidos del cuerpo fructífero del hongo <i>Fomitopsis sp.</i> .....	50
<b>Figura 3-15:</b> Cromatograma Fracción F <sub>ED1</sub> .....	51
<b>Figura 3-16:</b> Ampliación de cromatograma zona grasas (18 – 28 min.) Fracción F <sub>ED1</sub> .....	52

	<b>Pág</b>
<b>Figura 3-17:</b> Ampliación de cromatograma zona triterpenoidal Fracción F <sub>ED1</sub> .....	52
<b>Figura 3-18:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>ED1</sub> (IV).....	53
<b>Figura 3-19:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>ED1</sub> (V).....	55
<b>Figura 3-20:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>ED1</sub> (VI).....	57
<b>Figura 3-21:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>ED1</sub> (VII).....	59
<b>Figura 3-22:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>ED1</sub> (VIII).....	61
<b>Figura 3-23:</b> Cromatograma Fracción F <sub>ED2</sub> .....	63
<b>Figura 3-24:</b> Cromatograma Fracción F <sub>ED3</sub> .....	63
<b>Figura 3-25:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>ED3</sub> (I).....	64
<b>Figura 3-26:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>ED3</sub> (III).....	66
<b>Figura 3-27:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>ED3</sub> (IV).....	68
<b>Figura 3-28:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>ED3</sub> (V).....	70
<b>Figura 3-29:</b> Cromatograma Fracción F <sub>ED4</sub> .....	72
<b>Figura 3-30:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>ED4</sub> (I).....	72
<b>Figura 3-31:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>ED4</sub> (II).....	73
<b>Figura 3-32:</b> Cromatograma Fracción F <sub>ED5</sub> .....	74
<b>Figura 3-33:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>ED5</sub> (I).....	75
<b>Figura 3-34:</b> Cromatograma Fracción F <sub>ED6</sub> .....	76
<b>Figura 3-35:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>ED6</sub> (I).....	77
<b>Figura 3-36:</b> Cromatograma Fracción F <sub>ED7</sub> .....	78
<b>Figura 3-37:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>ED7</sub> (I).....	79
<b>Figura 3-38:</b> Espectro de masas compuesto F <sub>ED7</sub> (II).....	80
<b>Figura 3-39:</b> Comparación de estructuras de compuestos con núcleos Colesta, Ergosta 4-sustituídos y Lanosta.....	88

## Lista de diagramas

	<b>Pág.</b>
<b>Diagrama 2-1:</b> Recolección de material fúngico y Proceso de extracción	27
<b>Diagrama 2-2:</b> Protocolo general para la separación, aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico crudo obtenido de cuerpo fructífero del Hongo <i>Fomitopsis sp.</i>	28
<b>Diagrama 2-3:</b> Protocolo general para la separación, aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios presentes en el extracto proveniente de partición en diclorometano.	29
<b>Diagrama 2-4:</b> Protocolo general para ensayo de actividad biológica Antimicrobiana	30
<b>Diagrama 3-1:</b> Fragmentación propuesta para el compuesto F <sub>ED1</sub> (IV)	54
<b>Diagrama 3-2:</b> Fragmentación propuesta para el compuesto F <sub>ED1</sub> (V)	56
<b>Diagrama 3-3:</b> Fragmentación propuesta para el compuesto F <sub>ED1</sub> (VI)	58
<b>Diagrama 3-4:</b> Fragmentación propuesta para el compuesto F <sub>ED1</sub> (VII)	60
<b>Diagrama 3-5:</b> Fragmentación propuesta para el compuesto F <sub>ED1</sub> (IX)	62
<b>Diagrama 3-6:</b> Fragmentación propuesta para el compuesto F <sub>ED3</sub> (I)	65
<b>Diagrama 3-7:</b> Fragmentación propuesta para el compuesto F <sub>ED3</sub> (III)	67
<b>Diagrama 3-8:</b> Fragmentación propuesta para el compuesto F <sub>ED3</sub> (IV)	69
<b>Diagrama 3-9:</b> Fragmentación propuesta para el compuesto F <sub>ED3</sub> (V)	71

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1-1:</b> Metabolitos secundarios aislados de algunas especies de hongos Macromicetos	9
<b>Tabla 1-2:</b> Metabolitos encontrados en Hongos Basidiomicetos estudiados en el grupo de QHM (Universidad Nacional de Colombia-sede Bogotá).....	12
<b>Tabla 1-3:</b> Algunas Taxas de Hongos Basidiomicetos y sus Propiedades Medicinales.....	15
<b>Tabla 1-4:</b> Actividades biológicas demostradas de extractos y compuestos derivados de Hongos. ....	16
<b>Tabla 1-5:</b> Triterpenoides lanostánicos aislados de especies del género <i>Fomitopsis</i> y sus actividades biológicas reportadas. ....	19
<b>Tabla 1-6:</b> Actividades biológicas reportadas para extractos crudos de especies del género <i>Fomitopsis</i> . ....	19
<b>Tabla 1-7:</b> Actividades antimicrobianas demostradas de extractos crudos de la especie <i>Ganoderma lucidum</i> obtenida mediante FEL.....	22
<b>Tabla 3-1:</b> Métodos de Extracción empleados en el estudio del cuerpo fructífero del hongo <i>Fomitopsis sp.</i> .....	37
<b>Tabla 3-2:</b> Componentes grasos no esterólicos mayoritarios del hongo silvestre Colombiano <i>Fomitopsis sp.</i> .....	47
<b>Tabla 3-3:</b> Metabolitos triterpenoidales presentes en el extracto de la partición en diclorometano del extracto metanólico obtenido del cuerpo fructífero del hongo basidiomiceto colombiano <i>Fomitopsis sp.</i> .....	81
<b>Tabla 3-4:</b> Actividad antimicrobiana del extracto metanólico obtenidos a partir del cuerpo fructífero del hongo Colombiano <i>Fomitopsis sp.</i> .....	84
<b>Tabla 3-5:</b> Actividad antimicrobiana del extracto obtenido por partición en diclorometano del extracto metanólico del cuerpo fructífero del hongo Colombiano <i>Fomitopsis sp.</i> .....	84

---

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 3-6:</b> Actividades antimicrobianas reportadas para hongos Basidiomicetos .....	85
<b>Tabla 3-7:</b> Comparación entre los metabolitos triterpenoidales aislados de de los hongos <i>Ganoderma lucidum</i> y <i>Fomitopsis sp.</i> .....	87
<b>Tabla 3-8:</b> Compuestos con actividad antimicrobiana demostrada de hongos <i>Fomitopsis</i> ..	89

## Lista de símbolos y abreviaturas

<b>AcOEt:</b>	Acetato de etilo
<b>CC:</b>	Cromatografía en columna
<b>C.C.D:</b>	Cromatografía en capa delgada
<b>C.C.D.P:</b>	Cromatografía en capa delgada preparativa
<b>CG:</b>	Cromatografía de gases
<b>CG-EM:</b>	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:</b>	diclorometano
<b>CL:</b>	Cadena lateral
<b>CZ:</b>	ZnCl <sub>2</sub> en metanol al 30%. Revelador específico para esteroides
<b>LB:</b>	Liebermann-Burchard. Reactivo de coloración específico para esteroides
<b>EM:</b>	Espectro de masa
<b>Isop:</b>	Isopropilo
<b>M<sup>+</sup>:</b>	Pico del ión molecular
<b>m/z:</b>	Relación masa/carga
<b>MeOH:</b>	Metanol
<b>Min.:</b>	minutos
<b>P.M:</b>	Peso molecular
<b>tr:</b>	Tiempo de retención en minutos para CG
<b>u.m.a:</b>	Unidades de masa atómica



# Introducción

Desde el descubrimiento y exploración de agentes antibióticos en el siglo XX, la toxicidad selectiva contra los blancos de dichos agentes ha asegurado la gran efectividad en su uso para combatir infecciones. Sin embargo, el empleo durante tanto tiempo de los antibióticos paradójicamente ha resultado en una diseminación de patógenos multiresistentes a estas drogas y que es ya considerada por la OMS y algunos autores como la mayor emergencia y el problema de salud pública más importante en la actualidad (Hearst *et al.*, 2008).

Es así como en “Las Recomendaciones de Copenhagen: reporte de la conferencia EU para la amenaza microbial” se resalta la necesidad en el desarrollo de nuevos principios para el tratamiento o prevención de infecciones en humanos y animales. En este orden de ideas una excelente alternativa puede ser por lo tanto, examinar las propiedades antimicrobiales de hongos “exóticos”, como nuevas fuentes de tales agentes, así como también la determinación estructural de los compuestos responsables de la acción los cuales podrían constituirse en agentes microbianos promisorios lo que conllevaría a su posterior empleo y así, disminuir el uso de antibióticos convencionales en el tratamiento de enfermedades; contribuyendo de esta forma, a minimizar el desarrollo de resistencia a los agentes microbiales (Hearst *et al.*, 2008).

El reino Fungi, el cual consiste en un estimado de 1.5 millones de especies, es de gran interés desde el punto de vista de la farmacoterapia dado que desde tiempos inmemoriales las setas se han empleado en la medicina oriental para la prevención y tratamiento de muchas enfermedades (Lindequist *et al.*, 2005). En países como China y Japón el empleo de los hongos ha sido una costumbre milenaria y se ha basado en su función como alimento, pero tal vez con mayor énfasis en el papel que ellos desempeñan en el campo de la medicina tradicional, con la aplicación de extractos o infusiones en el tratamiento de enfermedades o afecciones.

Es esta la utilización y la demanda de nuevos compuestos con actividades biológicas, aunado a la gran cantidad de especies de basidiomicetos que existen en la naturaleza y que constituyen fuentes naturales potenciales de bioactivos lo que ha motivado en las últimas décadas el interés en estudiar estos organismos (Brizuela *et al.*, 1998), ya que el conocimiento de los diferentes metabolitos de origen fúngico posibilita el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad farmacológica.

Dentro de los fungimetabolitos se encuentran desde compuestos apreciados por su valor nutricional (proteínas, aminoácidos esenciales, etc) hasta aquellos con excelentes acciones biológicas (triterpenoides, esteroides, ácidos triterpenoidales, etc) (Huie; Wi 2004).

El Grupo de Química de Hongos Macromicetos Colombianos de la Universidad Nacional de Colombia viene realizando estudios sobre los macrohongos del país, dado que Colombia presenta una gran variedad totalmente inexplorada. Las investigaciones se han centrado principalmente en el aislamiento y determinación estructural de los compuestos de tipo triterpenoidal, así como en la determinación de su actividad biológica, en búsqueda de metabolitos que presenten buena acción. Dichas investigaciones han arrojado como resultado que extractos de hongos obtenidos biotecnológicamente y que están constituidos por esteroides, cetoesteroides y triterpenos presentan una buena acción antimicrobiana (Jaramillo 2009).

En este orden de ideas, en el presente trabajo se realizó el estudio químico de los metabolitos secundarios de carácter triterpenoidal presentes en un hongo macromiceto sivistre de la región del Huila *Fomitopsis sp.*, perteneciente al orden Aphyllophoral y determinar, con base en la comparación con compuestos triterpenoidales antimicrobianos previamente aislados del hongo *Ganoderma lucidum*, su potencial antibiótico.

Dado que los hongos Aphyllophorales forman parte de los Basidiomicetos, setas terrestres que han presentado actividades antimicrobiales para casi el 75 % de los hongos cuyos extractos han sido evaluados (Zjawiony 2004), y teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto en cuanto a la actividad antimicrobiana encontrada para los compuestos triterpenoidales aislados del hongo *Ganoderma lucidum*, se plantea la hipótesis de que es probable que el hongo objeto del presente estudio posea compuestos de este tipo o de estructuras íntimamente relacionadas y que los mismos le confieran actividad antimicrobiana, lo que de ser así lo posicionaría como un hongo promisorio para futuros estudios de bioprospección, ya que es innegable que las necesidades ecológicas del hongo por producir metabolitos secundarios bioactivos, conlleva a asumir el gran potencial que poseen los organismos fúngicos en esta área (Lindequist *et al.* 2005).

Para cumplir con lo propuesto se toma como línea de trabajo la siguiente:

- Determinar las mejores condiciones de extracción de los compuestos de tipo triterpenoidal presentes en el hongo *Fomitopsis sp.* empleando las técnicas de extracción por maceración y extracción asistida por ultrasonido.
- Separar y purificar empleando técnicas cromatográficas los compuestos mayoritarios de tipo triterpenoidal con promisoria actividad antimicrobiana con base en un estudio comparativo con los antimicrobianos de *Ganoderma lucidum* y su respuesta al ensayo de actividad.
- Realizar la elucidación estructural de los compuestos antimicrobianos de interés empleando técnicas espectroscópicas como cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Determinar la actividad antimicrobiana del extracto crudo, fracciones y/o compuestos aislados del hongo *Fomitopsis sp.*
- Comparar la actividad antimicrobiana de los extractos, fracciones y/o compuestos aislados frente a la presentada por los triterpenoides antimicrobianos aislados de *Ganoderma lucidum*.

- Con los resultados obtenidos y los previos arrojados sobre la actividad antimicrobiana en *Ganoderma lucidum* continuar con los estudios con miras a aportar más datos en lo referente a la relación estructura-actividad de los metabolitos identificados en dichos hongos hasta el presente.

Así mismo, los resultados del presente estudio contribuirán al conocimiento de la riqueza fúngica inexplorada y poco estudiada en nuestro país, al desarrollar un estudio químico en especies nativas de la región del Huila, algunas de ellas en proceso de clasificación, lo que permitirá no sólo ampliar los reportes acerca de los constituyentes químicos de los macrohongos sino también la presencia de especies fúngicas nativas en el territorio Colombiano y su potencial como productores de antimicrobianos.







# 1. ANTECEDENTES

## 1.1. Consideraciones y aspectos biológicos

Si bien antiguamente los hongos se consideraban pertenecientes al reino vegetal, en la actualidad se consideran separadamente de los vegetales y de los animales y constituyen un reino aparte. Los hongos, a diferencia de las plantas superiores, no poseen tallo, hojas ni raíces. Además, el carecer de la clorofila que permite a las plantas sintetizar la materia orgánica que necesitan para vivir, están obligados a nutrirse de la materia orgánica ya presente en el medio ambiente, al igual que los animales (Polese 2005).

No es muy bien conocido el número real de especies de hongos, sin embargo algunos expertos calculan que en la tierra existen 1.5 y 2 millones de especies. De esta cantidad, menos del 10 % de las especies son comestibles y una igual proporción se considera que son venenosos (Mattila *et al.*, 2000). Así mismo, de la totalidad calculada de especies, tan sólo se ha descrito una mínima parte, así que muchos hongos están en espera de ser descubiertos y otros tantos que potencialmente podrían ser comestibles en espera de ser cultivados.

Los hongos se clasifican en inferiores y superiores. Los inferiores son los que no se pueden ver a simple vista, teniendo que utilizar el microscopio para su observación, de ahí también que se llamen hongos microscópicos. Los superiores o macroscópicos, son las populares “Setas” que según la definición de Miles y Chang corresponde a “aquellos macrohongos con un órgano productor de esporas distinguido, que puede encontrarse, bien sobre la tierra (epigeo) o bajo tierra (hipogeo), y el cual puede ser observado a simple vista” (Miles; Chang 1999).

La mayoría de los macrohongos se encuentra en el filo Basidiomycota; sin embargo, muchos del grupo Ascomycota que son llamativos por su tamaño, forma o color también se consideran macrohongos. El filo Basidiomycota contiene cerca de 30000 especies descritas, y si bien la mayoría son macrohongos, también existen microhongos, especialmente levaduras, muchas de las cuales son patógenos importantes de plantas y algunas lo son para el género humano (Deacon 2005). A nivel microscópico su característica principal es la presencia de estructuras reproductoras especializadas o basidios, las cuales dan origen a las esporas pero en forma externa, generalmente en grupos de cuatro, aunque en algunas especies pueden encontrarse dos y seis esporas por basidio. Las esporas se conocen como basidiósporas.

## 1.2. Valor Nutricional y Medicinal de los Hongos

Por milenios, los hongos han sido valorados como provisiones comestibles y medicas para la humanidad. Actualmente, el cultivo y producción industrial de hongos continúa incrementándose, estimándose que se producen cerca de 10 millones de toneladas métricas de hongos comestibles y medicinales anualmente (Fan *et al.*, 2006). Algunos hongos tienen un alto valor nutricional, otros tienen valor medicinal como suplemento alimenticio y existen macrohongos que presentan ambas cualidades.

### Valor nutricional de los Macrohongos

Los macrohongos se han considerado como un muy buen alimento debido a los beneficios nutricionales que presentan. Entre ellos se encuentran (Miles; Chang 1999):

- Su contenido de proteína es relativamente alto y contienen todos los aminoácidos esenciales. Son ricos en lisina y leucina, que la mayoría de los alimentos cereales fibrosos contienen en baja o ninguna cantidad.
- Su contenido en grasa total es relativamente bajo, y contienen un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados, esenciales en la dieta diaria.
- Contienen cantidades relativamente altas de carbohidratos, y la mayoría de las especies poseen cantidades de fibras nutricionalmente valiosas.
- Contienen vitaminas solubles en agua (tiamina, riboflavina, niacina y ácido ascórbico), así como de minerales (potasio, sodio, calcio).

### Valor medicinal de los Macrohongos

Los hongos tienen una larga tradición en la farmacoterapia debido a su valor medicinal. Los primeros herboristas se interesaron más por las propiedades medicinales que presentaban que en sus valores nutricionales como fuente de alimento. La humanidad siempre ha buscado nuevas sustancias que tengan efectos biológicos y así poder curar sus enfermedades. Cerca de 3.5 billones de personas en el mundo busca, como fuente primaria de cura a sus enfermedades, medicinas y complementos basados en productos naturales. A este respecto DeFelice en 1979 propone dos términos que hacen referencia a los valores medicinales de los productos naturales, clasificándolos como nutracéuticos y nutraceuticos (Chang 2004).

#### ▪ Nutracéuticos

El término nutracéuticos se refiere a los alimentos funcionales que se consumen como parte de una dieta normal. Las setas, tienen valores nutricionales y beneficiosos para la salud y se puede referir a ellas como nutracéuticos. Los nutracéuticos son alimentos naturales que son de valor en la preservación de la buena salud.

### ▪ Nutricéuticos

Este término hace referencia a una nueva clase de compuestos que han sido extraídos tanto del cuerpo fructífero como del micelio de las especies de setas (Miles; Chang 1999). Los nutricéuticos poseen atribuciones tanto medicinales como nutricionales. Se ha encontrado que los metabolitos de los nutricéuticos pueden exhibir características tales como: antitumorales, moduladores inmunológicos, y propiedades hipocolesterolémicas. En consecuencia, los nutricéuticos de las setas tienen un gran potencial cuando, tomados como suplementos alimenticios, sirven tanto para la prevención como para el tratamiento de enfermedades.

Un nutricéutico de setas es un extracto del micelio o del cuerpo fructífero, que puede haber sido refinado hasta cierto grado antes de ser incorporado en una cápsula o una tableta, la que se consume entonces como un suplemento dietético para propósitos terapéuticos (Miles; Chang 1999).

## 1.2.1 Estudios Químicos en Hongos Basidiomicetos

Además de sus propiedades nutricionales, dadas por algunos de sus metabolitos primarios, los hongos basidiomicetos han despertado un gran interés en científicos de todas las áreas quienes se han dedicado durante las últimas décadas a estudiar sus metabolitos secundarios y acciones biológicas. Los Basidiomicetos producen una amplia gama de productos naturales que abarca desde componentes estructurales con actividad antitumoral e inmunológicamente activos hasta agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, reguladores del crecimiento y aromas (Brizuela *et al.*, 1998).

Dentro de estos metabolitos se encuentran: diterpenos, compuestos fenólicos, polisacáridos, sesquiterpenos, p-terfenilos, fenilacetoxilados, glucanos acetileno, sales de diazonio, terpenoides, alcaloides y compuestos nitrogenados, ácidos fenilglicosídicos sustituidos, quinonas, entre otros (Brizuela *et al.*, 1998).

## Terpenoides

Los terpenoides forman una gran familia estructuralmente diversa de productos naturales derivados a partir de unidades de isopreno  $C_5$  unidos cabeza-cola. La estructura típica contiene un esqueleto carbonado de  $(C_5)_n$ , y se clasifican como hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) y tetraterpenos ( $C_{40}$ ) (Dewick 2002).

Dentro del grupo de los terpenos están los triterpenos, compuestos ampliamente difundidos en el reino vegetal y en el reino fungi y se pueden encontrar como glicósidos, ésteres o en forma libre. Por definición se consideran “productos naturales que tienen esqueleto de 30 átomos de carbono y que derivan del escualeno (6 unidades de isopreno) por ciclaciones y/o modificaciones de este” (Silva *et al.*, 1992).

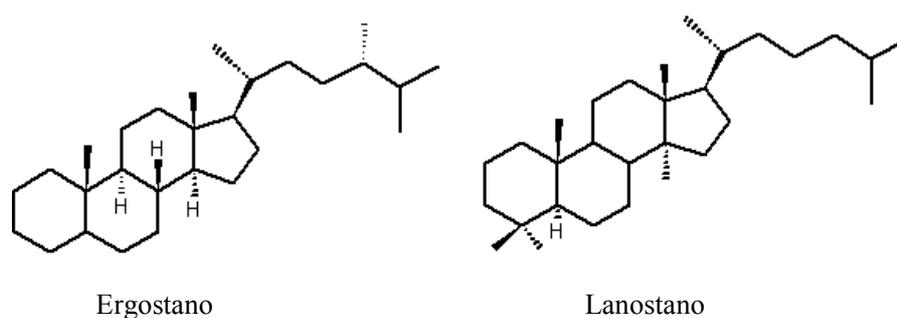
Los compuestos de tipo triterpenoidal de origen fúngico presentan interesantes propiedades biológicas, de las que algunas ya se aplican en la farmacoterapia. Esto metabolitos

secundarios forman parte de los componentes grasos, generalmente derivados del ergosterol, los cuales han recibido considerable atención por los excelentes resultados que han presentado en las pruebas farmacológicas evaluadas (Ko *et al.*, 2008).

En sólo el género *Ganoderma* se ha reportado el aislamiento de más de 130 triterpenoides oxigenados (específicamente lanostanos) obtenidos principalmente de cuerpo fructífero, esporas y biomasa micelial (Huei; Wi 2004).

Algunos terpenoides y sus derivados aislados de hongos Poliporales y Ganodermatales son citotóxicos. Dentro de los compuestos encontrados en cuerpos fructíferos y micelios se incluyen triterpenoides de esqueleto Ergostano y Lanostano (Fig. 1-1) altamente oxidados como ácidos ganodéricos, ácidos ganoderénicos, ácidos ganolucídicos, ácidos lucidénicos, ganoderioles, ganoderales, entre otros (Wasser; Weis 1999), indicando que especies de este tipo de hongos contienen constituyentes antibacteriales (triterpenos) que inhiben bacterias Gram-positivas y/o Gram-negativas (Gao *et al.*, 2005).

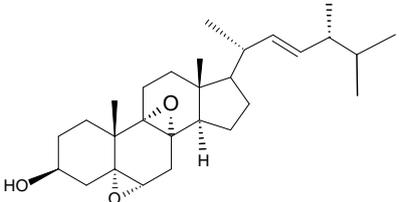
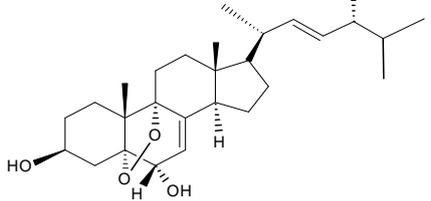
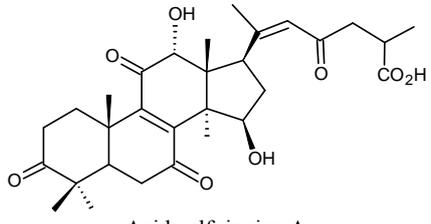
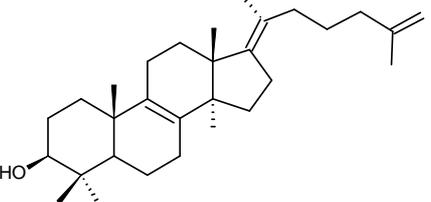
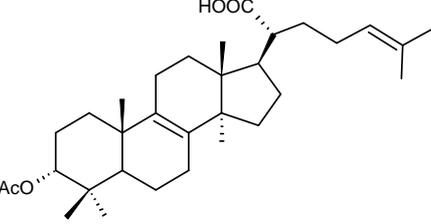
**Figura 1-1: Esqueletos básicos de algunos fungimetabolitos de carácter triterpenoidal**



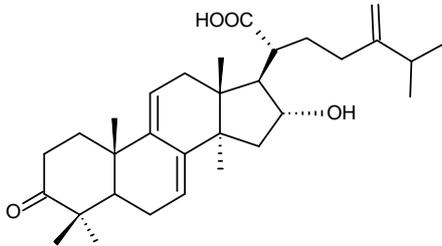
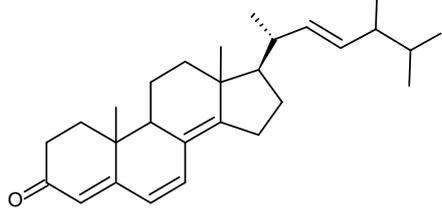
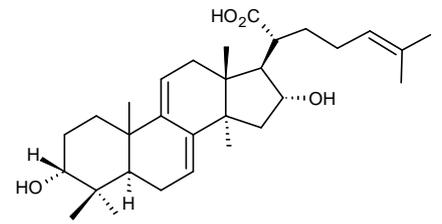
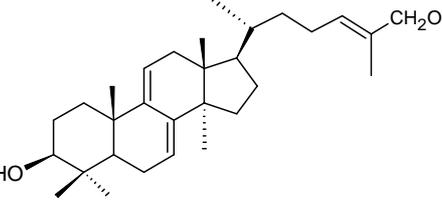
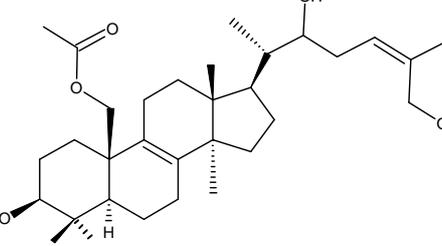
En la Tabla 1-1 se presentan los reportes a nivel internacional de metabolitos aislados en algunas especies de hongos macromicetos, así como su acción biológica cuando la presentan.

El grupo de Química de Hongos Macromicetos (QHM) de la Universidad Nacional de Colombia ha venido realizando el estudio químico en un importante número de especies de hongos recolectados en el territorio nacional, algunas de ellas nativas, y otras especies que han sido cultivadas, encontrando un gran número de compuestos de tipo triterpenoidal, de los cuales algunos ya han presentado actividad citotóxica moderada comprobada (Jaramillo 2009). Entre las especies nativas estudiadas se encuentran *Ganoderma australe*, *Laccaria lacata*, *Paxillus involutus*, *Suillus luteus*, *Ganoderma concinna*, *Ganoderma lucidum*, *Amanita rubescens*, *Laetiporus sulphureus*, *Laccaria laccata*, *Trametes menziesii*, *Trametes versicolor*, *Auricularia auricula-judae* y *Amauroderma spp.* Entre las especies cultivadas figuran *Lentinula edodes*, *Pleurotus sajor-cajú*, *Pleurotus pulmonaris*, *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum*. La tabla 1-2 recoge, a modo de ejemplo, varios de los compuestos identificados.

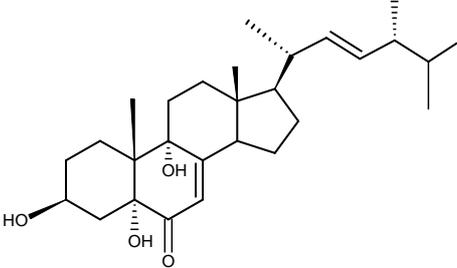
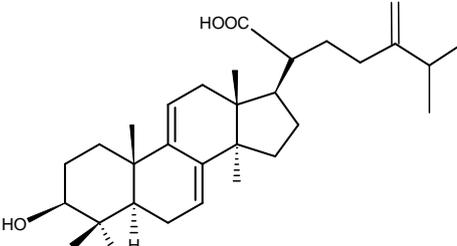
Tabla 1-1: Metabolitos secundarios aislados de algunas especies de hongos Macromicetos

Hongo	Compuesto	Actividad biológica	Referencia
<i>Amanita virgineoides</i>	 <p>5α,6α,8α,9α-diepoxi-(22E,24R)-ergosta-22-eno-3β,7α-diol</p>	No determinada	Yasunori <i>et al.</i> , 1998
<i>Panellus serotinus</i>	 <p>5α,9α-epidioxy-(22E)-ergosta-7,22-dien-3β,6α-diol</p>	No determinada	Yasunori <i>et al.</i> , 1998
<i>Elfvigia applanata</i>	 <p>Acido elfvingico A</p>	Medicina tradicional contra el cáncer	Yoshikawa <i>et al.</i> 2002
<i>Fomes fastuosus</i>	 <p>Lanosta-8,17(20),25-trien-3β-ol</p>	No determinada	Connolly; Hill. 2005
<i>Fomitopsis pinicola</i>	 <p>Acido 3α-acetiloxilanosta-8,24-dien-21-oico</p>	Antibacterial	Keller <i>et al.</i> , 1996

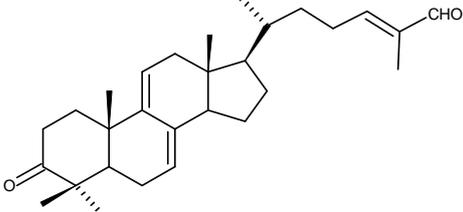
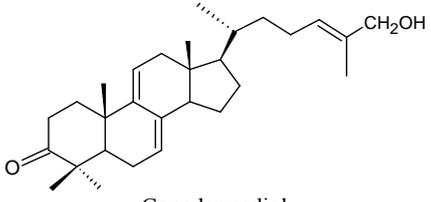
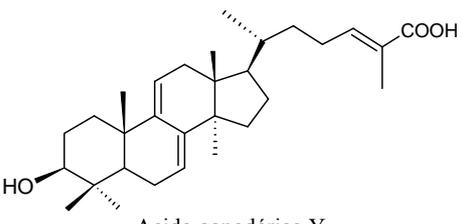
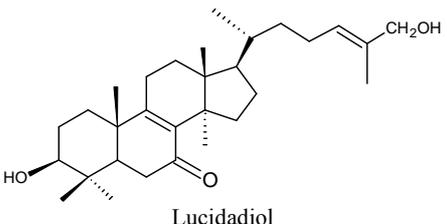
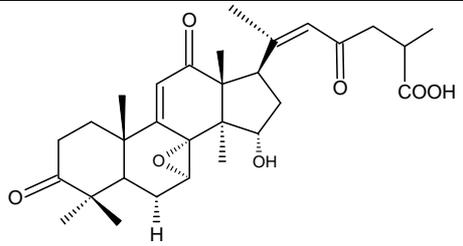
**Tabla 1-1: (Continuación) Metabolitos secundarios aislados de algunas especies de hongos Macromicetos**

Hongo	Compuesto	Actividad biológica	Referencia
<i>Fomitopsis pinicola</i>	 <p>Acido pyloporenico</p>	Antibacterial	Keller <i>et al.</i> , 1996
<i>Ganoderma neojaponicum</i>	 <p>Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona</p>	No determinada	Gan <i>et al.</i> , 1998
<i>Ganoderma applanatum</i>	 <p>Acido 3<math>\alpha</math>,16<math>\alpha</math>-dihidroxisilano-7,9(11),24-trien-21-oico</p>	Inactivo para ensayo con células de leucemia	Dilip de Silva <i>et al.</i> , 2006
<i>Ganoderma pfeifferi</i>	 <p>Ganodermadiol</p>	Antiviral contra Influenza tipo A	Zjawiony 2004
<i>Ganoderma colossum</i>	 <p>Colosolactona A</p>	No determinada	Kleinwächter <i>et al.</i> 2001

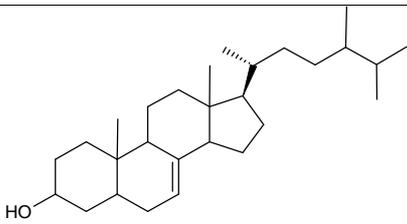
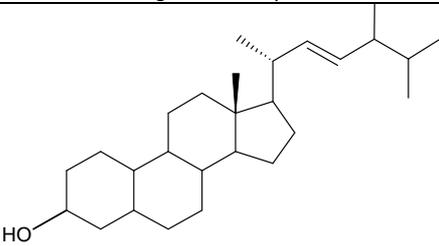
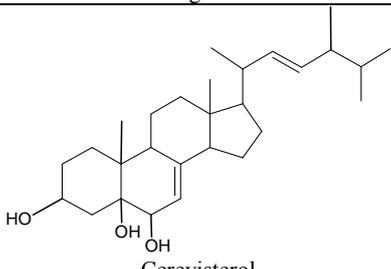
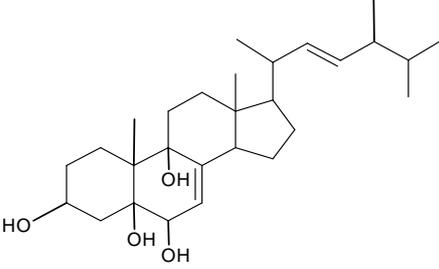
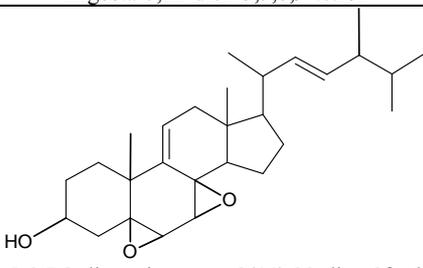
**Tabla 1-1: (Continuación) Metabolitos secundarios aislados de algunas especies de hongos Macromicetos**

Hongo	Compuesto	Actividad biológica	Referencia
<i>Trametes versicolor</i>	 3β,5α,9α-trihydroxiergosta-7,22-dien-6-ona	Citotóxico	Zjawiony 2004
<i>Laetiporus Sulphureus</i>	 Acido Dehidrotrametenólico	Reduce la hiperglicemia en ratones.	Zjawiony 2004

**Tabla 1-2: Metabolitos encontrados en Hongos Basidiomicetos estudiados en el grupo de QHM (Universidad Nacional de Colombia-sede Bogotá)**

Hongo	Compuesto	Referencia
<i>Ganoderma concinna</i>	 <p>Ganoderal A</p>	González <i>et al.</i> 2002 León <i>et al.</i> 2003
	 <p>Ganoderadiol</p>	
	 <p>Acido ganodérico Y</p>	
	 <p>Lucidadiol</p>	
<i>Laetiporus Sulphureus</i>	 <p>Ácido aplanoxídico A</p>	Coy 2003

**Tabla 1-2: (Continuación) Metabolitos encontrados en Hongos Basidiomicetos estudiados en el grupo de QHM (Universidad Nacional de Colombia-sede Bogotá)**

Hongo	Compuesto	Referencia
<i>Siullus luteus</i>	 <p>Ergosta-7-en-3β-ol</p>	Ávila 2007
<i>Pleurotus sajor-cajú</i>	 <p>Neoergosterol</p>	Nieto, I.; Chegwin, C.; 2007
	 <p>Cerevisterol</p>	
<i>Lentinula edodes</i>	 <p>Ergosta-7,22-dien-3,5,6,9-tetrol</p>	Cucaita 2005 y 2007
<i>Laccaria laccata</i>	 <p>5,6-7,8-diepoxi-ergosta-9(11),22-dien-3β-ol</p>	Cucaita 2005 y 2007

### 1.3 Farmacología de los Hongos

Además de sus propiedades alimenticias avaladas, los hongos basidiomicetos son también apreciados por sus propiedades farmacológicas. Se ha reportado que dichos hongos presentan propiedades fisiológicas y efectos farmacológicos significativos, tales como biorregulación, regulación del bioritmo, cura a diversas enfermedades, y en la prevención y mejora de enfermedades de alto riesgo como cáncer, daño cerebral, y enfermedades cardíacas (Wasser; Weis 1999).

Este gran espectro de actividades ha hecho que las investigaciones en hongos hayan aumentado durante las últimas dos décadas, aislando e identificando sustancias promisorias que presentan actividades inmunomoduladoras, antitumorales, cardiovasculares, antivirales, antimicrobianas, antiparasitaria, hepatoprotectora, entre otras (Wasser; Weis 1999). Algunas de las taxas y especies de hongos basidiomicetos con sus respectivas actividades ya reportadas se presentan en la tabla 1-3.

Los antibióticos constituyen un grupo importante de sustancias con aplicación farmacéutica aisladas de los productos naturales. El metabolismo secundario de los basidiomicetos es rico en terpenoides, muchos de los cuales poseen estructuras que hasta ahora sólo han sido detectadas en estos organismos y que han demostrado tener actividad antibiótica, especialmente sesquiterpenos, diterpenos y triterpenoides (Lindequist *et al.*, 2005; Zjawiony 2004).

Algunas actividades antimicrobianas demostradas de extractos y compuestos derivados de hongos se presentan en la tabla 1-4.

**Tabla 1-3: Algunas Taxas de Hongos Basidiomicetos y sus Propiedades Medicinales**

TAXA	PROPIEDADES					
	Antifungico	antiinflamatoria	antitumoral	antiviral	antibacterial antiparasitaria	regulador de la presion sanguinea
<b>Auriculariales</b>						
<i>Auricularia-judae</i>			X			X
<b>Tremellales</b>						
<i>Tremelia fuciformis</i>		X	X			
<i>Tremelia mesenterica</i>						X
<b>Polypolares</b>						
<i>Schizophyllum commune</i>		X	X		X	
<i>Dendropolyporus umbellatus</i>			X			
<i>Grifola frondosa</i>	X		X	X	X	X
<i>Formes fomentarius</i>			X		X	
<i>Fomitopsis pimicola</i>		X	X		X	
<i>Trametes versicolor</i>			X	X	X	
<i>Laetiporus sulphureus</i>	X		X			
<b>Ganodermatales</b>						
<i>Ganoderma lucidum</i>		X	X	X	X	X
<i>Ganoderma applanatum</i>			X	X	X	
<b>Pleurotaceae</b>						
<i>Lentinus edodes</i>		X	X	X	X	X
<i>Pleurotus ostreatus</i>			X	X	X	
<b>Tricholomataceae</b>						
<i>Flammulina velutipes</i>	X	X	X	X		
<i>Marasmius androsaceus</i>		X				
<b>Agaricaceae</b>						
<i>Agaricus blazei</i>			X			
<i>Agaricus bisporus</i>			X			
<b>Pluteaceae</b>						
<i>Volvariella volvacea</i>			X	X	X	

**Tabla 1-4: Actividades biológicas demostradas de extractos y compuestos derivados de Hongos.**

HONGO	ACTIVIDAD	COMPUESTO	REF.
<i>Ganoderma pfeifferi</i>	Antibacterial	Ganomicinas	Lindequist 2005
<i>Ganoderma lucidum</i>	Antimicrobial	Extracto crudo	Wasser; Weis. 1999
	Antiprotozoal	Extracto crudo	Gao <i>et al.</i> , 2005
<i>Ganoderma annulare</i>	Antifúngica	Acido Applanoxidico A	Lindequist 2005
<i>Ganoderma applanatum</i>	Antimicrobiana	5 $\alpha$ -ergosta- 7,22-dien-3 $\beta$ -ol	Lindequist 2005
		5,8-epidioxy-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergosta-6,22- dien-3 $\beta$ -ol	Zjawiony 2004
<i>Lentinula edodes</i>	Antimicrobiana	Acido oxálico	Lindequist 2005
	Antiprotozoal	Extracto etanólico	
<i>Podaxis pistillaris</i>	Antimicrobiana	Epicorazina	Lindequist 2005
<i>Gleophyllum sepiarium</i>	Antifúngica	Oospolactone	Zjawiony 2004
<i>Merulius tremellosus</i>	Antimicrobiana	Acidos merulinicos A, B, and C	Zjawiony 2004
<i>Lentinus crinitus</i>	Antimicrobial	Desoxihipnofilina Hipnofilina 6,7-epoxi-4(15)-hirsuteno-5-ol 6,7-epoxi-4(15)-hirsuteno-1,5-diol	Zjawiony 2004
<i>Coriolus Consors</i>	Antimicrobiana	Coriolina	Zjawiony 2004
<i>Trichaptum biforme</i>	Antimicrobiana	Biformina	Zjawiony 2004
<i>Stereum frustulosum</i>	Antimicrobiana	Frustulosina	Zjawiony 2004
		Frustulosinol	
<i>Trametes versicolor</i>	Antiprotozoal	Extracto crudo	Gao <i>et al.</i> , 2005
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Antiprotozoal	Extracto crudo	Gao <i>et al.</i> , 2005
<i>Schizophyllum commune</i>	Antimicrobiana	Extracto crudo	Wasser; Weis. 1999
<i>Fomes formentarius</i>	Antimicrobiana	Extracto crudo	Wasser; Weis. 1999
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Antimicrobiana	Acido polyporenico C Acido 3 $\alpha$ -acetiloxilano-8,24 dien-21-oico Acido Pinicolico A Acido trametenolico B	Zjawiony 2004
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Antimicrobiana	Extracto crudo	Wasser; Weis. 1999
<i>Vladimiria muliensis</i>	Antimicrobiana	1 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -dioxi-11 $\alpha$ -hidroxiursa-12-en-3-ona. 11 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -epoxy-D-friedoursa- 14-en-3 $\beta$ -ol	Turkoglu <i>et al.</i> , 2007

## 1.4 Orden Aphyllophoral

Los Aphyllophorales son un orden polifilético dentro del Filo Basidiomycota, de acuerdo con la clasificación propuesta por Donk en 1964, en la cual la configuración del himenóforo es uno de los principales caracteres macroscópicos. El orden se agrupa en 22 familias. Se han llevado a cabo aproximaciones para su clasificación filogenética a través del uso de técnicas moleculares (Hibbett *et al.*, 1997), sin embargo, la propuesta de Donk es una de las más usadas ya que resulta práctica, en especial para una rápida clasificación durante el trabajo de campo (Ruiz; Varela 2006).

Los Aphyllophorales reúnen hongos que desarrollan basidiocarpos gimnocárpicos con una gran variedad de formas, tamaños, colores y texturas, siendo generalmente bastante grandes y se les encuentra frecuentemente sobre madera viva o muerta.

La mayoría de las especies poseen complejos enzimáticos que les permiten degradar compuestos químicos recalcitrantes como la lignina y los polifenoles de plantas. Esta facilidad de degradación da origen a la denominada pudrición de los árboles. Existen 2 tipos de pudrición causadas por macrohongos: la pudrición parda, que es la que presenta degradación por parte del hongo de la celulosa, quedando la lignina, de color parda como remanente, y la producida cuando el hongo degrada tanto la lignina como la celulosa, generando un color blanco en la madera, dando origen a la conocida como la pudrición blanca de la madera. Esta característica es la que además convierte a los Aphyllophorales en elementos claves dentro de los ecosistemas forestales, al permitir la liberación y el reciclaje de nutrientes durante el proceso de descomposición de detritos (Ruiz; Varela 2006).

### El género *Fomitopsis*

Los hongos del género *Fomitopsis* se encuentran dentro de la división Basidiomycota y han sido cultivados y estudiados en Japón, así como también empleado en medicina tradicional como fuente de alimentos nutritivos y contra la diabetes (Choi *et al.*, 2007). Este género ha sido poco estudiado en el campo de productos naturales, siendo *Fomitopsis pinicola* y *Fomitopsis rosea* las especies que cuentan con más reportes.

*F. pinicola* crece en árboles y coníferas. Generalmente son hongos parásitos o saprófitos de madera muerta, especialmente de pinos, pero a veces aparecen en tocones de árboles planifolios. También aparece en árboles vivos generalmente enfermos en los que origina una típica podredumbre marrón.

Es usado como un hongo medicinal en Asia, y se ha reportado su valor nutricional y terapéutico debido a sus actividades antimicrobiales, antiinflamatorias y antitumorales (Petrova *et al.*, 2007). Este Basidiomiceto está siendo comercializado en forma de té y como suplemento alimenticio en el mercado Asiático. Entre los compuestos químicos aislados de *F. pinicola* se encuentran esteroides, sesquiterpenos, triterpenoides lanostánicos y glicósidos triterpénicos (Cheng *et al.*, 2008).

Keller y col. reportaron la actividad antimicrobiana de triterpenoides lanostánicos aislados de *F. pinicola* contra *B. subtilis* empleando el método de Bioautografía. Sin embargo, los mismos compuestos fueron ensayados empleando el método clásico de difusión en agar y ninguno de ellos presentó actividad significativa a concentraciones superiores a los 50 µg / mL (Keller *et al.*, 1996).

Con referencia a los compuestos triterpenoidales aislados de *F. pinicola*, Rösecke reporta que la concentración de dichos compuestos varía significativamente en aquellos especímenes maduros que presentan corteza a aquellas especies muy jóvenes que aún no la poseen; en éstos últimos la concentración de triterpenoides es inferior con respecto a la de un hongo maduro (Rösecke; König 2000).

Además de sus actividades antimicrobianas Choi y col. reportaron la actividad antioxidante del extracto metanólico de éste hongo concluyendo que los extractos de *F. pinicola* pueden ser usados como una potencial fuente natural de antioxidantes (Choi *et al.*, 2007).

El hongo *Fomitopsis rosea* se encuentra en la zona boreal de Europa, Asia y Norte América y en las áreas montañosas de la Europa continental. Es una especie característica de los bosques de Abetos pero ha sido afectado negativamente por la silvicultura y ahora se encuentra en la lista roja de especies en peligro en muchos países europeos. Sus metabolitos secundarios están prácticamente inexplorados (Popova *et al.*, 2009). El extracto clorofórmico, así como los triterpenoides lanostánicos aislados del cuerpo fructífero de este Basidiomiceto demostraron tener actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* (Popova *et al.*, 2009).

En las tablas 1-5 y 1-6 se presentan los triterpenoides aislados de especies del género *Fomitopsis* y las actividades biológicas reportadas tanto de compuestos como de los extractos obtenidos de cuerpos fructíferos.

**Tabla 1-5: Triterpenoides lanostánicos aislados de especies del género *Fomitopsis* y sus actividades biológicas reportadas.**

Especie	Compuesto aislado	Actividad	Referencia
<i>F. pinicola</i>	Ácido polyporenico C	Antibacterial contra <i>B. subtilis</i>	Keller <i>et al.</i> , 1996
	Acido pinicolico A		
	Ácido trametenolico B		
	Ácido fomitopsico		
	Ácido 3 $\alpha$ -acetyloxylanosta-8,24-dien-21-oico	----	Petrova <i>et al.</i> , 2007
	Ácido pinicolico E	----	Rösecke; König 2000
	Pinicolol C	----	
	Ácido Fomitopinico A	Antiinflamatoria contra COX-2.	Yoshikawa, <i>et al.</i> , 2005
	Fomitosido E		
Fomitosido F			
<i>F. spraguei</i>	Ácido quercinico C	----	Quang <i>et al</i> 2005
	Fomitopsinas A – C	----	
<i>F. rosea</i>	Ácido 3 $\alpha$ -(3'- Butilcarboxiacetoxi)oxepanoquercinico C	Antibacterial contra <i>S. aureus</i>	Popova <i>et al.</i> , 2009
	Ácido 3 $\alpha$ -Hidroxi-24-metilen-23-oxolanost-8- en-26-carboxilico		
	Ácido 3 $\alpha$ -oxepanoquercinico C		
	Ácido 3 $\alpha$ -carboxiacetoxiquercinico C		
	5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-24( $\xi$ )-metilcolesta-6,22-dien- 3 $\beta$ -ol		

**Tabla 1-6: Actividades biológicas reportadas para extractos crudos de especies del género *Fomitopsis*.**

Especie	Extracto evaluado	Actividad	Referencia
<i>F. pinicola</i>	Extracto clorofórmico	Antibacterial contra <i>S. aureus</i>	Petrova <i>et al.</i> , 2007
	Extracto clorofórmico	Antifúngico contra <i>F. inflexum</i> y <i>F.</i> <i>heterosporium</i>	Guler <i>et al.</i> , 2009
	Extracto butanólico	Antibacterial contra <i>S. aureus</i>	Petrova <i>et al.</i> , 2007
	Extracto etanólico	Antioxidante	Choi <i>et al.</i> , 2007
<i>F. rosea</i>	Extracto clorofórmico	Antibacterial conta <i>S. aureus</i>	Popova <i>et al.</i> , 2009

## 1.5 Los Antibióticos

Los antibióticos son sustancias producidas por diversas especies de microorganismos (bacterias, hongos, ascomicetos) que suprimen la proliferación de otros gérmenes y al final pueden destruirlos. Los antibióticos muestran diferencias notables en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en sus espectros antibacterianos y en sus mecanismos de acción (Goodman & Gilman 1998).

De acuerdo a su modo de acción los agentes antimicrobianos pueden ser bacteriostáticos es decir que tienen la propiedad de inhibir la multiplicación bacteriana, la que se reanuda cuando se retira el medicamento, o bactericidas que es aquel que tiene la propiedad de eliminar a las bacterias. La acción bactericida difiere de la bacteriostática únicamente en que es irreversible; es decir, el microorganismo “muerto” no puede reproducirse más aun cuando sea retirado del contacto del agente (Goodman & Gilman 1998).

Los fármacos antibacterianos se clasifican en: **antibióticos**, **quimioterápicos** o agentes sintéticos y **agentes semisintéticos**, dependiendo de si son:

- Subproductos de organismos (antibióticos)
- Completamente sintetizados en el laboratorio (quimioterápicos)
- Un híbrido de ambos (semisintéticos)

Los antibióticos presentan toxicidad selectiva por que interfieren con las funciones vitales de las bacterias sin afectar a las células del huésped. Por ejemplo, las bacterias poseen pared celular, mientras que las células de los mamíferos no. Por tanto, los fármacos que interfieren en la formación de la pared celular bacteriana son tóxicos para las bacterias, pero inocuos para el huésped. De forma similar, el ribosoma bacteriano (70S) es distinto a los ribosomas eucarióticos (80S), lo que permite que sitios específicos del ribosoma bacteriano sean buenos objetivos para los fármacos antibacterianos (Goodman & Gilman 1998).

### 1.5.1. Potencia de los Antibióticos

Bajo las condiciones adecuadas, la potencia de los antibióticos puede demostrarse por su efecto inhibitorio sobre los microorganismos. Dicha actividad se mide determinado la concentración más pequeña del agente que se necesita para inhibir el crecimiento de un organismo control, valor que se conoce como concentración mínima inhibitoria (MIC). Se utilizan dos métodos generales: la valoración en cilindro-placa o “en placa” y la valoración turbidimétrica o “en tubo”. El primer método se basa en la difusión de la sustancia a evaluar desde un cilindro vertical a través de una capa de agar solidificada en un plato o placa de petri hasta inhibir totalmente el crecimiento del microorganismo añadido, en un área circular o “zona de inhibición” en torno al cilindro que contiene una solución del compuesto a ensayar. El método turbidimétrico se basa en la inhibición del crecimiento de un cultivo microbiano en una solución del compuesto testeado en un medio líquido que promueva su rápido crecimiento en ausencia del antibiótico (Mandigan *et al.*, 2000).

## 1.5.2. Infecciones bacterianas y Productos Naturales

Las infecciones bacterianas son sumamente frecuentes y producen una gran mortalidad y morbilidad. Por ejemplo, la diarrea de origen bacteriano es una de las principales causas de mortalidad infantil en el mundo, y la tuberculosis sigue siendo una causa muy frecuente de muerte. Los fármacos antibacterianos se encuentran entre los descubrimientos más importantes del siglo XX y han cambiado de forma espectacular el curso de muchas enfermedades, reduciendo su mortalidad y morbilidad. Por otro lado, los antibióticos se encuentran entre los fármacos más frecuentemente prescritos, en parte al excelente perfil de seguridad de muchos de ellos. En consecuencia, el uso excesivo de antibióticos es un factor que contribuye en forma significativa al aumento de las resistencias a los antibióticos, un problema de orden mundial (Curtis 1998). Es la aparición de estas cepas resistentes lo que ha determinado el interés de la industria farmacéutica por encontrar nuevos antibióticos de fuentes naturales que presenten una acción igual o mejor que la de los empleados actualmente y con menos efectos secundarios.

Examinando la evolución de la industria farmacéutica en la década pasada, la búsqueda de antibióticos en los productos naturales vegetales ha decaído debido, entre otros factores, a los largos procesos de purificación y a que la estructura de los compuestos es tan compleja que dificulta el empleo de la química combinatoria para la síntesis de nuevos compuestos con posible mejor acción (Peláez 2006).

En contraste con las plantas, los hongos por su requerimiento mínimo de nutrientes y su facilidad de crecer en cualquier sustrato, producen fructificaciones en corto tiempo comparado con los vegetales y sintetizan también compuestos con actividad antimicrobiana, haciéndolos una fuente atractiva a la industria por el corto tiempo de su cultivo tradicional (3-5 meses). Así mismo, el auge que ha presentado últimamente el consumo de los hongos como nutra y nutriceútico ha llevado a implementar métodos de cultivo que permitan optimizar los resultados de los tradicionales, tanto en producción de biomasa como en la obtención de mayor cantidad de metabolitos, forzando esto al cultivo de las setas por medio de procesos de fermentación, en fase sólida y en medio sumergido, los cuales permiten obtener el micelio del hongo no sólo en un menor tiempo (8 – 10 días) sino con calidad superior, esto es que por medio de la manipulación de las variables del proceso biotecnológico se puede incrementar la producción de un tipo de metabolitos en particular, lo que representa un gran atractivo para la industria farmacéutica (Jaramillo 2009).

En el grupo de Química de Hongos Macromicetos (QHM) de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, se determinó la actividad antimicrobiana de extractos crudos de micelio fresco, seco y del medio de cultivo, obtenidos de la especie *Ganoderma lucidum* cultivada mediante la técnica de fermentación en estado líquido (FEL) obteniendo respuesta de moderada a fuerte contra cepas de bacterias gram negativas como *Salmonella enteritidis* y *Pseudomonas aeruginosa* y cepas de bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus* (Jaramillo 2009). Los resultados reportados se muestran en la tabla 1- 7.

Los resultados presentados por el hongo *Ganoderma lucidum* abren la posibilidad de explorar a los hongos macromicetos, tanto silvestres como cultivados bajo técnicas biotecnológicas, como nuevas fuentes promisorias en la búsqueda de compuestos con actividades antimicrobianas y realizar una aproximación a la relación estructura – actividad.

Para iniciar el estudio de antimicrobianos en los hongos silvestres, se toma como punto de partida el perfil cromatográfico de sus extractos frente al perfil cromatográfico de los compuestos triterpenoidales que presentaron dicha acción y que fueron extraídos del hongo cultivado *Ganoderma lucidum*. Aquellos extractos que presenten un perfil similar, serán seleccionados para realizar el estudio químico correspondiente y explorar su potencial como antibiótico.

**Tabla 1-7: Actividades antimicrobianas demostradas de extractos crudos de la especie *Ganoderma lucidum* obtenida mediante FEL.**

Muestras ensayadas	Microorganismos ensayados <sup>a</sup>				
	Bacterias Gram-negativas			Bacterias Gram-positivas	Hongos
	P.a ATCC27853	S.e CA <sup>b</sup>	E.c ATCC 25922	S.a ATCC25923	C.a CA
Micelio fresco	ZD	ZD	-	ZD	-
Micelio seco 40°	ZD	ZD	-	ZD	--
Micelio seco 80°	25	20	-	25	-
Medio de cultivo	20	20	-	20	-

<sup>a</sup>Microorganismos:

P.a: *Pseudomonas aeruginosa*

S.e: *Salmonella enteritidis* sp

E.c: *Escherichia coli*

S.a: *Staphylococcus aureus*

C.a: *Candida albicans*

<sup>b</sup>CA: cepa ambiental

ZD: Zona difusa con bordes no definidos con diámetro entre 19 y 24 mm.





## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1 Técnicas generales**

#### **2.1.1 Extracción asistida por ultrasonido**

Las extracciones asistidas por ultrasonido se realizaron empleando un equipo Elmasonic E 30 H suplido por Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. con las siguientes características: dimensiones internas del baño en mm (240 x 137 x 100), frecuencia del ultrasonido 37 kHz, poder efectivo del ultrasonido 40 W. Las condiciones de tiempo y temperatura utilizadas en las extracciones fueron 30 min y 40 °C respectivamente.

#### **2.1.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)**

Los análisis por CG-EM se realizaron en un cromatógrafo marca Hewlett Packard 6890 con las siguientes características: columna capilar HP5 30m, 0.33mm de diámetro interno y 25 µm de espesor; gas de arrastre Helio 4.5 a 1ml/min; modo split 1:10; temperatura desde 70°C hasta 300 °C a 7.4 °C / min. Este cromatógrafo, está acoplado a un espectrómetro de masas 5973 con una fuente de ionización de 70eV con un rango de detección máximo de 500 u.m.a.

#### **2.1.3 Cromatografía en columna (CC)**

Como fase estacionaria se utilizó Sílica Gel Macherey-Nagel ® (0.063 y 0.200mm de diámetro de partícula) con modos de elución en gradiente y empacadas en suspensión con el disolvente menos polar dependiendo del sistema de elución seleccionado.

### 2.1.4 Cromatografía en capa delgada (C.C.D) y cromatografía en capa delgada preparativa (C.C.D.P)

Fueron realizadas en placas preparadas con Sílica Gel Merck ® (0.040 – 0.060mm de diámetro de partícula), y cromatofolios Al de Sílica gel 60F<sub>254</sub> ALUGRAM (0.020 y 0.060mm de diámetro de partícula).

### 2.1.5 Reveladores

Para la visualización de los esteroides se utilizó una solución de ZnCl<sub>2</sub> al 30% en metanol (CZ) que fue asperjada sobre las placas y por calentamiento posterior se produjeron coloraciones azules y verdes como resultado positivo para esteroides, así como el reactivo de Liebermann-Burchard (LB) específico para  $\Delta^5$ -esteroles o esteroles que contengan dienos conjugados reales o potenciales. El comportamiento cromatográfico de este tipo de compuestos se comparó con un patrón de ergosterol durante todos los monitoreos realizados.

## 2.2 Material fúngico

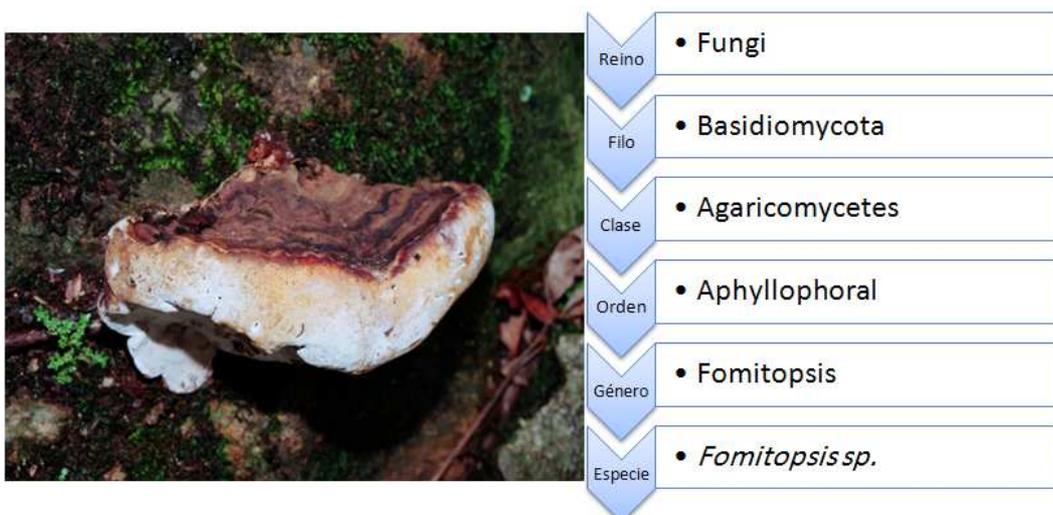


Figura 2-1: *Fomitopsis sp.*

El material fúngico silvestre se recolectó en el Departamento del Huila, municipio de Teruel, vereda La Primavera, Finca José Joaquín Sanabria en 2008. Tanto la recolección como la clasificación se realizaron con la colaboración del Biólogo Wilber Ruiz Roa de la UPTC.

**Carpóforo** 13.5-19.3 cm de diámetro, flabeliforme redondeado a reniforme; superficie rugosa, café a naranja; margen entero.

**Contexto** 2 – 4 cm de grueso, blanco. Olor y sabor a madera.

**Hábito y hábitat:** esparcido, sobre tronco.

Dado que en estudios previos se determinó que la temperatura de secado influía directamente sobre los bioactivos (Nieto *et al.*, 2010), el mismo se realizó a temperatura ambiente.

## 2.3 Selección del método y disolvente de extracción

Se tomaron dos muestras de 10 g cada una del cuerpo fructífero del hongo silvestre, previamente secado y molido, las cuales se sometieron, empleando metanol como disolvente extractante, a maceración con remoción diaria de disolvente; y a extracción asistida por ultrasonido a una temperatura de operación de 40 °C por 30 min respectivamente. Ambos métodos se realizaron hasta agotamiento de los compuestos a estudiar, lo cual se comprobó mediante la realización de la prueba de Lieberman-Burchard. La temperatura aplicada a la extracción asistida por ultrasonido no puede sobrepasar los 40 C. para evitar la transformación de los posibles bioactivos (Nieto *et al.*, 2010).

Los extractos metanólicos obtenidos se concentraron al vacío hasta sequedad en un rotavapor, obteniéndose así los extractos crudos correspondientes, los cuales se monitorearon por CCD. El análisis cromatográfico por capa delgada permitió la selección del método de extracción más adecuado (Diagrama 2-1).

## 2.4 Extracción, separación y purificación de los compuestos triterpenoidales.

Con la finalidad de realizar el estudio químico tanto de los ácidos grasos, sus ésteres como de los compuestos triterpenoidales y dada la interferencia que los dos primeros presentan frente al análisis de los últimos, se realizó una partición del extracto crudo metanólico en diclorometano solvente que, por la metodología previamente establecida dentro del grupo de investigación, permite la extracción más selectiva de los compuestos triterpenoidales. En las siguientes secciones se describe el procedimiento empleado en la obtención de cada uno de los extractos.

### 2.4.1 Extracto metanólico crudo

Una vez seleccionado el mejor sistema para la extracción de los metabolitos de interés, se obtuvo el extracto metanólico crudo tomando 40 g. de hongo seco y molido los cuales se sometieron a extracción asistida por Ultrasonido bajo las condiciones previamente establecidas. El extracto metanólico fue concentrado obteniéndose 0,715 g de un residuo color marrón oscuro. Se reservaron 100 mg para ensayos y pruebas biológicas. De esta manera 550 mg fueron sometidos a separación mediante Cromatografía en Columna con gradiente, empleando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt desde 0 hasta 100% de AcOEt. Se colectaron fracciones de 5 ml cada una, las cuales fueron monitoreadas por CCD y se agruparon según su comportamiento cromatográfico y su similitud con la fracción de los antimicrobianos de *Ganoderma lucidum*. Las fracciones que lo ameritaron fueron recromatografiadas por CC y/o CCDP como se especifica en el diagrama 2-2.

## 2.4.2 Extracto en diclorometano

80 g. de hongo seco y molido se sometieron a extracción asistida por Ultrasonido bajo las condiciones previamente establecidas en el diagrama 2-1. El extracto metanólico fue concentrado obteniéndose 1.47 g de residuo color marrón oscuro. Este extracto se suspendió en H<sub>2</sub>O y se realizó un reparto empleando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> hasta prueba Liebermann-Burchard negativa. La fracción orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y concentrado en rotavapor, obteniéndose de esta manera 0.66 g de extracto en diclorometano el cual fue analizado por CG-EM.

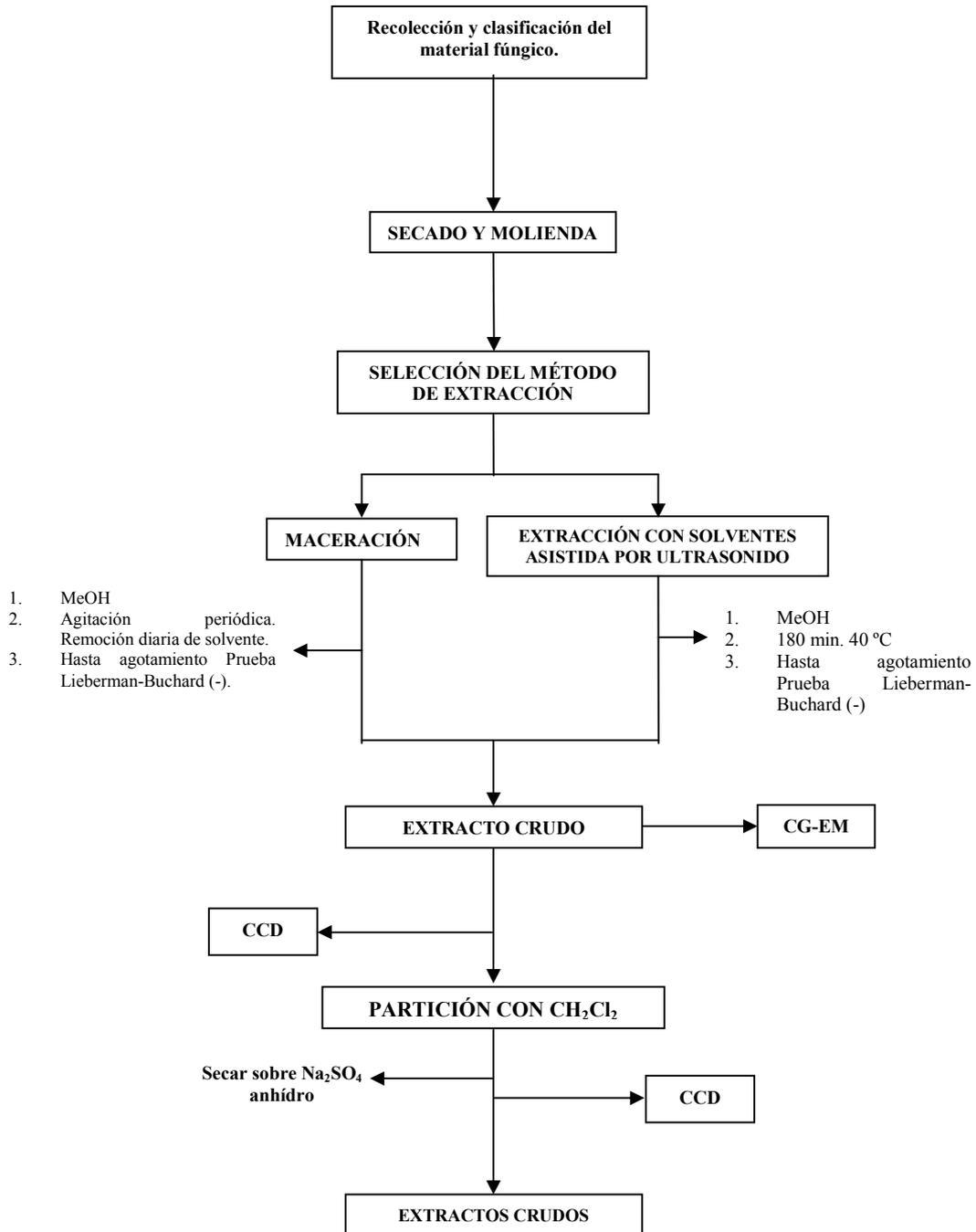
Se reservaron 100 mg de extracto para ensayos preliminares y pruebas biológicas. De esta manera 460 mg del extracto se sometieron a Cromatografía en Columna en gradiente empleando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH desde 0 hasta 10 % de MeOH. Se colectaron fracciones de 5 ml cada una, las cuales fueron monitoreadas por CCD y se agruparon según su comportamiento cromatográfico y su similitud con la fracción de los antimicrobianos de *Ganoderma lucidum*. El procedimiento se especifica en el diagrama 2-3.

## 2.5 Actividad antimicrobiana

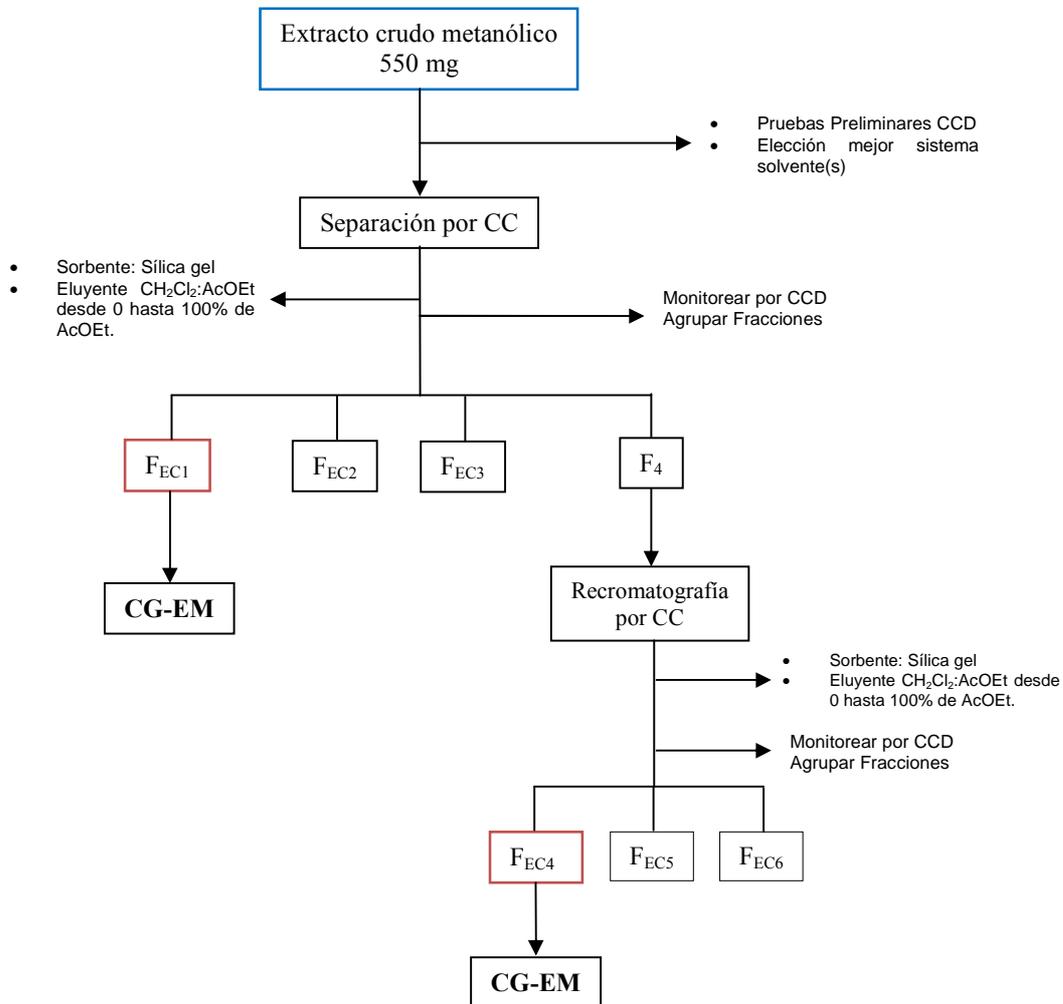
El ensayo de actividad antimicrobiana (Diagrama 2-4) fue realizado por el método estándar de difusión en agar en concordancia con la técnica descrita por Bauer *et al.*, en 1966. En resumen, inicialmente las cepas de cada uno de los microorganismos fueron crecidas en agar CASOY durante 16 horas y dos colonias de aproximadamente 2mm de diámetro fueron transferidas en condiciones asépticas a tubos de caldo Muller Hinton e incubadas por 20 horas a 37°C. La concentración de microorganismo fue ajustada a la dilución 0.5 de la escala de Mc. Farland mediante adición de medio de cultivo a cada uno de los cultivos y lectura en espectrofotómetro a 620nm para obtención de una transmitancia del 90%. Un mililitro de cada una de los cultivos fue adicionado a 2 mL de agar Muller Hinton esterilizado y precalentado a 50°C; el cultivo homogenizado fue vertido en placas de petri de 90mm de diámetro y 20 mm de altura a razón de 20 mL por caja. Una vez gelificado el agar, se procedió a realizar los pozos con la ayuda de un sacabocado estéril N°3. El pozo posee un diámetro de 5mm por 4mm de profundidad. En cada pozo se aplicaron 100 µL del agente antimicrobiano a ensayar.

Los agentes antimicrobianos a ensayar fueron solubilizados en una mezcla de cosolventes (DMSO:Etanol 50:50 v/v) que no posee actividad antimicrobiana. La concentración de los extractos ensayados evaluados se ajustó a 4000, 2000 o 1000 µg / mL por pozo. El ensayo se realizó por duplicado.

**Diagrama 2-1: Recolección de material fúngico y Proceso de extracción.**

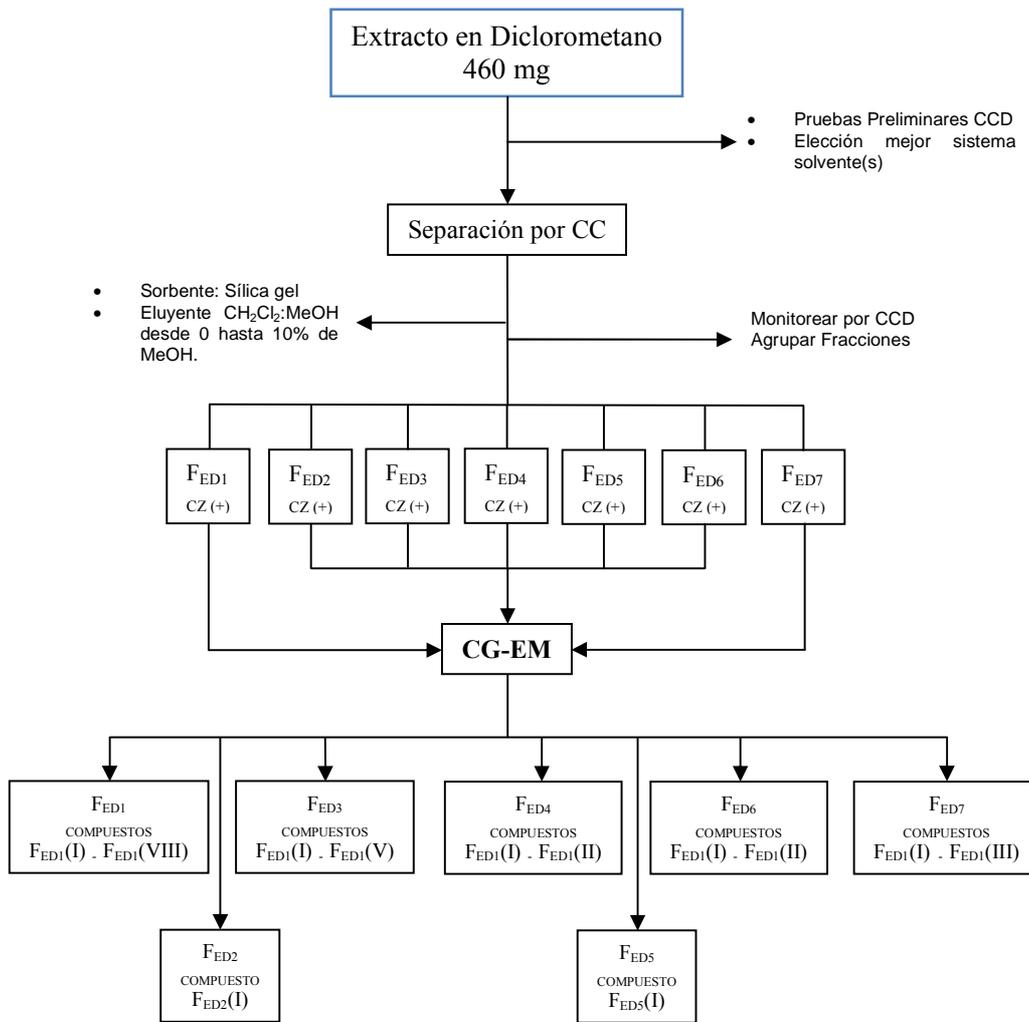


**Diagrama 2-2. Protocolo general para la separación, aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico crudo obtenido de cuerpo fructífero del Hongo *Fomitopsis sp.***



Fracción con actividad antimicrobiana

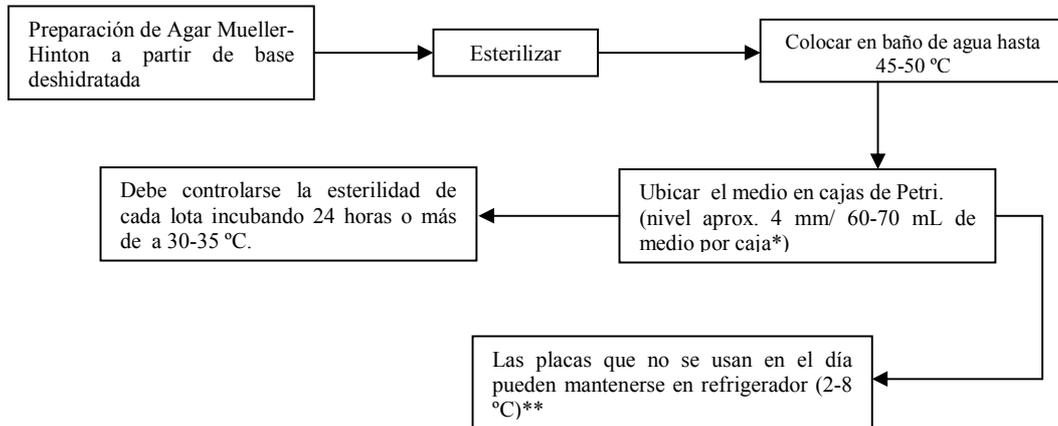
**Diagrama 2-3. Protocolo general para la separación, aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios presentes en el extracto proveniente de partición en diclorometano.**



Fracción con actividad antimicrobiana

**Diagrama 2-4. Protocolo general para ensayo de actividad biológica Antimicrobiana. (Malbran, C. 2001).**

*I. Preparación de medio de cultivo*

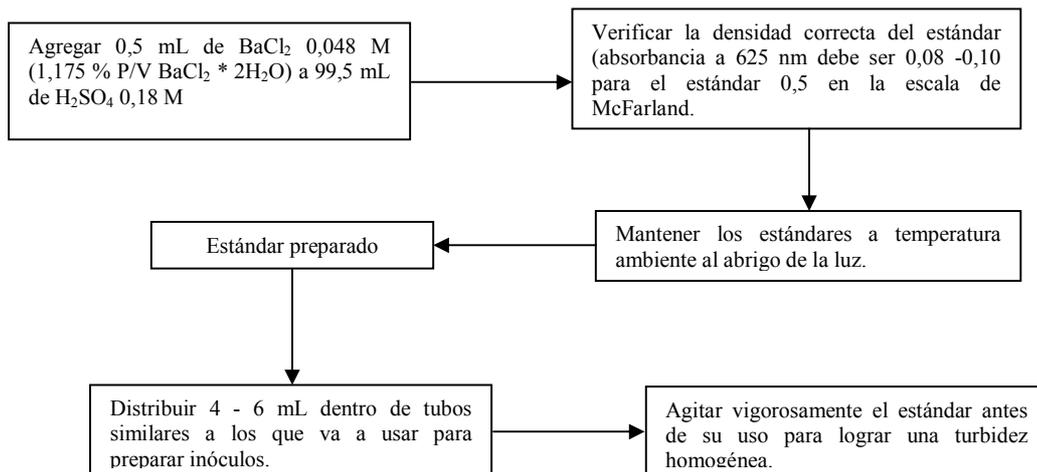


\* Para cajas de 150 mm de diámetro, y 25 a 30 mL.

\*\* Las placas con más de 7 días de preparación no son adecuadas para las pruebas de sensibilidad salvo que sean envueltas en bolsas de plástico para evitar la desecación o de lo contrario deberán controlarse con los microorganismos de referencia.

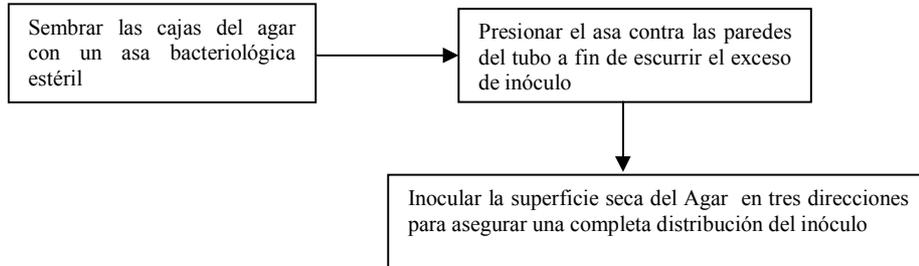
**Nota:** El Agar debe tener un pH 7,2 – 7,4 a temperatura ambiente y debe determinarse después de su solidificación.

*II. Turbidez estándar para la preparación del inóculo*

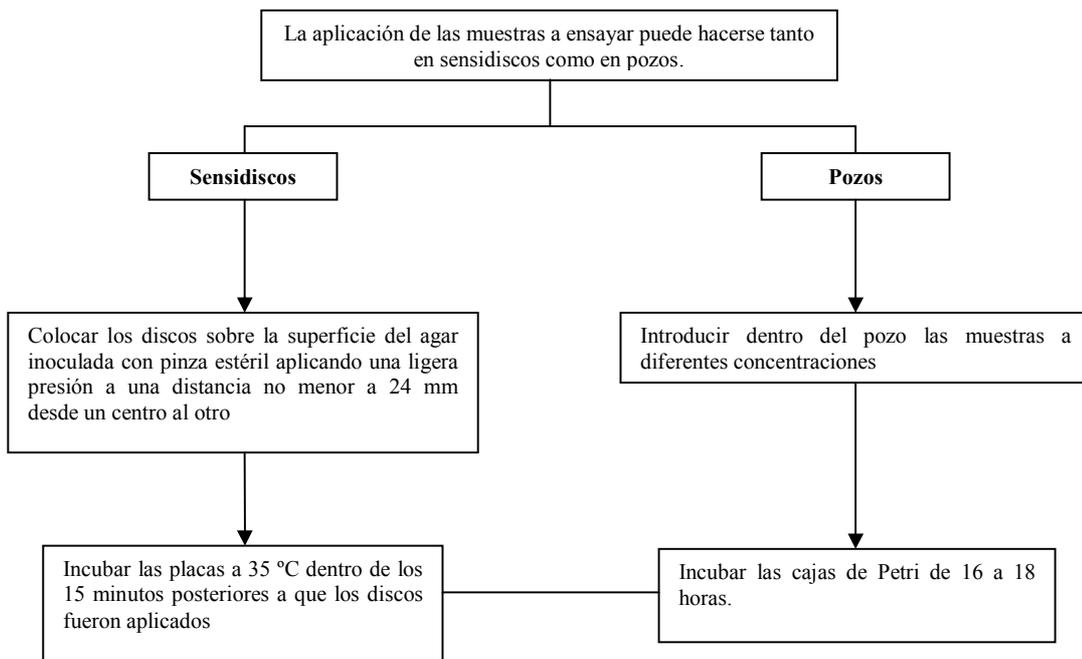


**Diagrama 2-4 (continuación). Protocolo general para ensayo de actividad biológica Antimicrobiana.**

*III. Inoculación de las placas*



*IV. Aplicación de las muestras en las cajas de Petri inoculadas*



Lectura de las placas e interpretación de resultados

Después de 16 a 18 horas de incubación se examina cada placa y se mide los diámetros de las zonas de inhibición. Si las placas fueron satisfactoriamente hisopadas y el inóculo fue el correcto, las zonas de inhibición serán uniformemente circulares y habrá desarrollo.



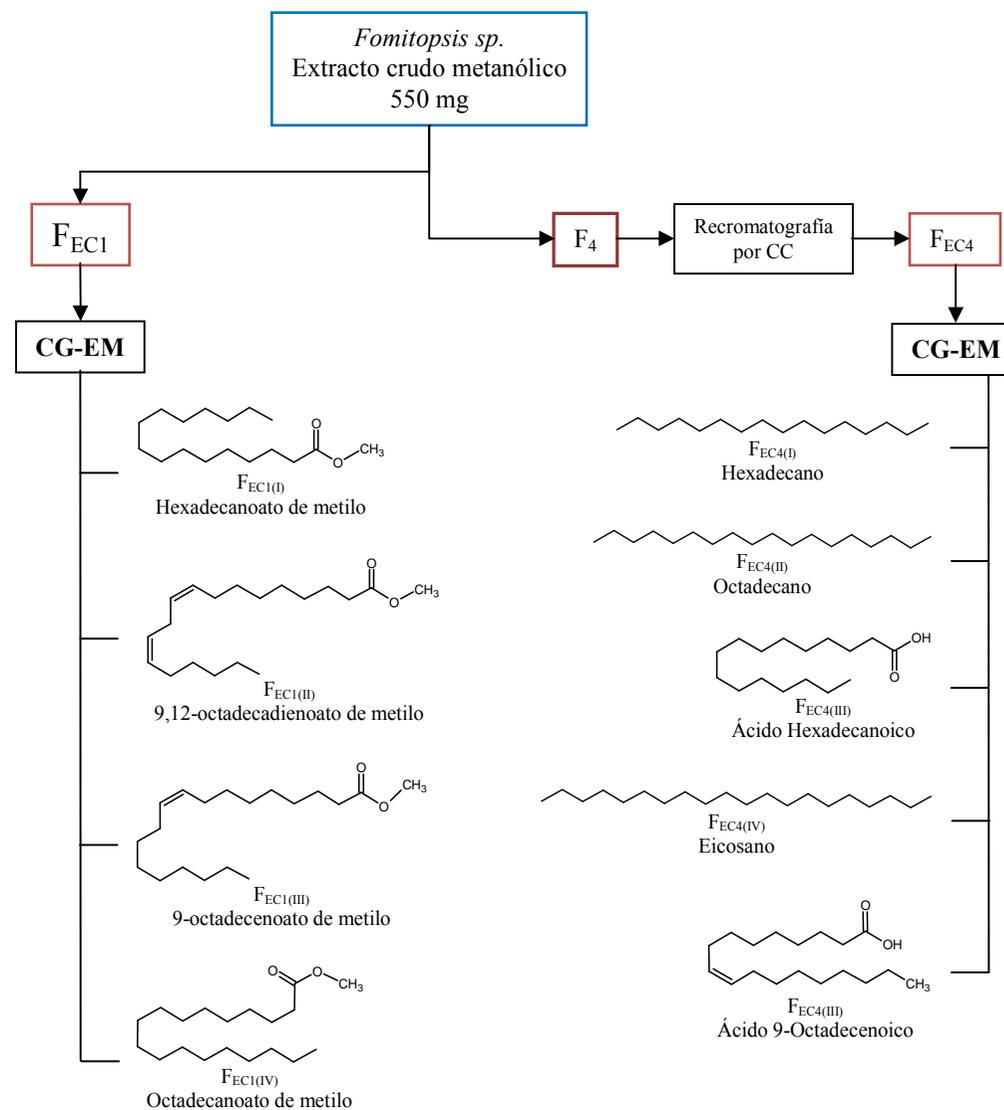




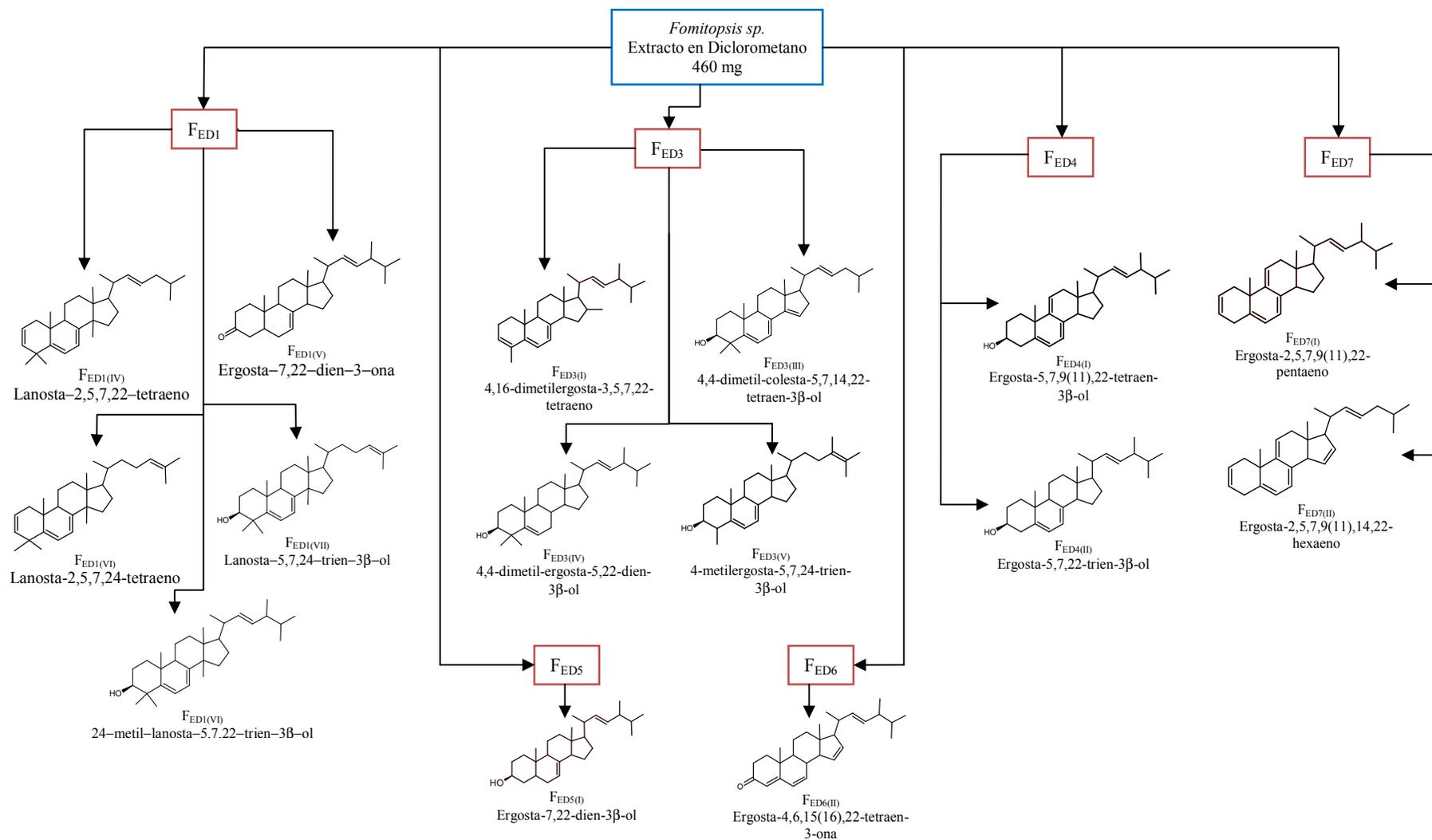
### **3. RESULTADOS Y DISCUSION**



**COMPUESTOS GRASOS NO ESTERÓLICOS IDENTIFICADOS EN EL CUERPO FRUCTÍFERO DEL HONGO SILVESTRE  
COLOMBIANO *Fomitopsis sp.***



**COMPUESTOS GRASOS ESTERÓICOS IDENTIFICADOS EN EL CUERPO FRUCTÍFERO DEL HONGO SILVESTRE  
COLOMBIANO *Fomitopsis sp.***



### 3.1. Comparación de métodos de extracción

Los resultados arrojados por la extracción con los dos métodos (Tabla 3-1), permitieron determinar que el rendimiento de la extracción asistida por ultrasonido es mucho mejor que el presentado por la maceración, tanto en términos de cantidad de extracto como de tiempo de extracción. El análisis de los extractos por CCD demuestra que la composición de metabolitos triterpenoidales es la misma independiente del método de extracción empleado. De esta manera, la extracción asistida por ultrasonido fue seleccionada como el método más adecuado para la obtención del extracto crudo de los metabolitos de interés.

**Tabla 3-1: Métodos de Extracción empleados en el estudio del cuerpo fructífero del hongo *Fomitopsis sp.***

Método de extracción	Tiempo de extracción	Muestra de hongo (g)	Masa extracto crudo (g)	Rendimiento de extracción (%)
<b>Maceración</b>	3 días	10 g	0,063	0,63
<b>Ultrasonido</b>	180 min	10 g	0,202	2,02

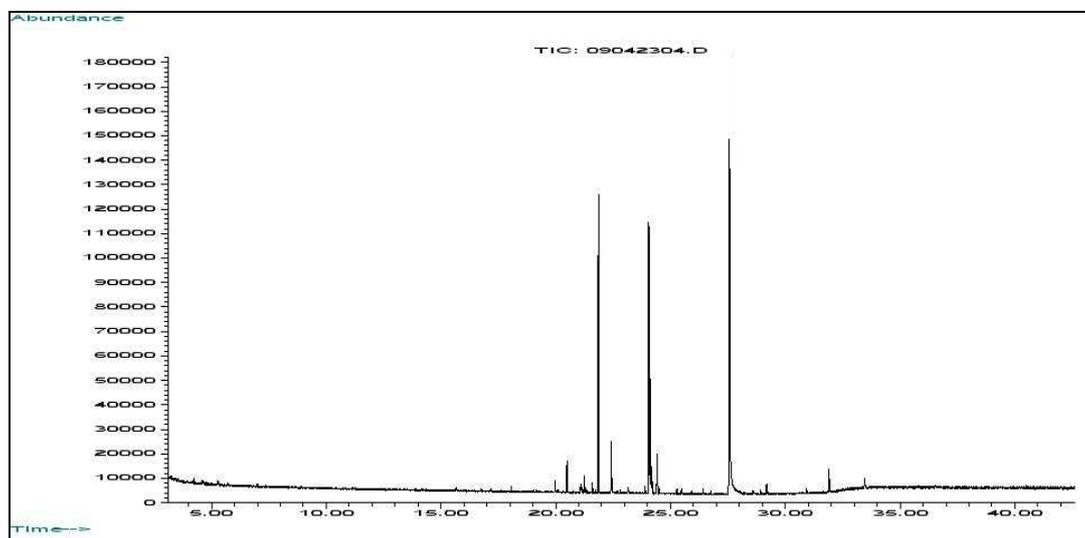
El resultado anterior es concordante con lo reportado en la literatura en lo que respecta a comparaciones de los métodos de extracción para material vegetal en donde se determinó las ventajas de la extracción asistida por ultrasonido para monoterpenos (Vinatoru 2001) y esteroides y triterpenoides (Schinor *et al.*, 2004). Cabe aquí anotar la total ausencia de reportes sobre este aspecto para fructificaciones de hongos macromicetos en general y *Fomitopsis* en particular.

### 3.2. Determinación estructural de los constituyentes del cuerpo fructífero del hongo *Fomitopsis sp.*

#### 3.2.1. Extracto metanólico crudo

Este extracto se analizó por CG-EM (Fig. 3-1). El análisis de los perfiles cromatográficos se centró específicamente en dos zonas: la primera comprendida entre 20 y 26 minutos, correspondientes a la fracción de ácidos grasos y sus ésteres y la segunda entre 30 y 40 minutos propia de los compuestos de tipo triterpenoidal.

**Figura 3-1: Cromatograma de Extracto metanólico del cuerpo fructífero del hongo *Fomitopsis sp.***



Como se observa en el cromatograma anterior, el extracto metanólico presenta una gran cantidad de ácidos grasos. En la zona correspondiente a los compuestos de tipo triterpenoide aparecen pocos picos y con bajas abundancias lo que podría hacer pensar, en primera instancia, que no hay compuestos de este tipo, sin embargo, éstos claramente se observan en los monitoreos por CCD.

Este comportamiento puede ser debido a que la cantidad presente de metabolitos triterpenoidales en el extracto comparada con la proporción de ácidos grasos y sus ésteres es tan pequeña que impide su detección en CG-EM, hecho que ya se había evidenciado en trabajos realizados dentro del grupo de investigación (Cucaita 2007; Jaramillo 2009).

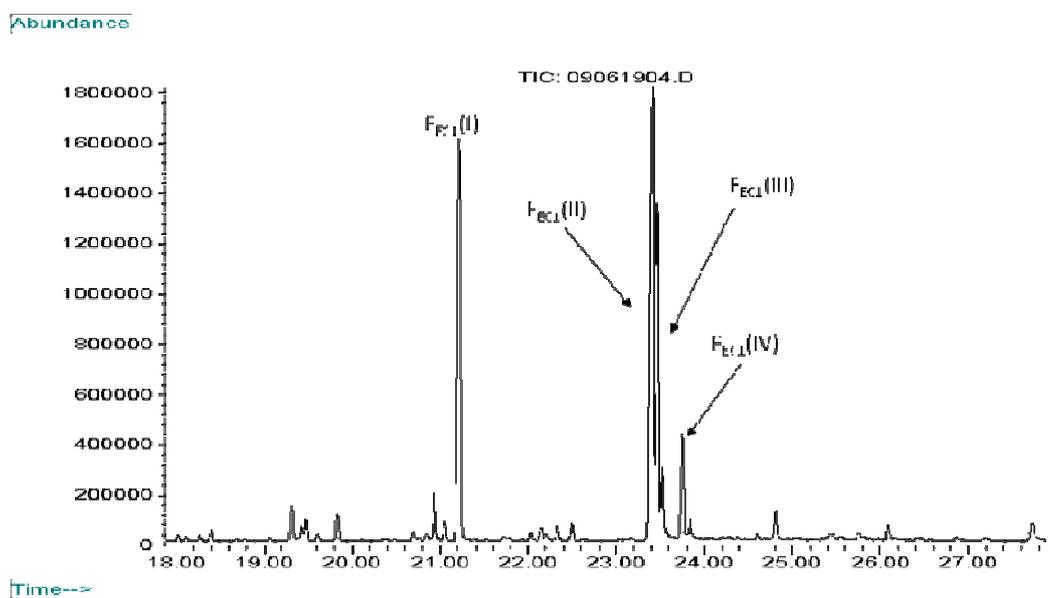
Dado que la presencia de ésteres y ácidos grasos interfieren en la detección de los compuestos de tipo triterpenoidal en Cromatografía de Gases, el extracto crudo fue sometido a Cromatografía de Columna tal como se indicó en el diagrama 2-2 con el fin de determinar los compuestos grasos presentes en el hongo. De esta manera, al agrupar las fracciones de acuerdo con su comportamiento cromatográfico, se obtuvieron seis fracciones de interés renombradas  $F_{EC1}$ ,  $F_{EC2}$ ,  $F_{EC3}$ ,  $F_{EC4}$ ,  $F_{EC5}$  y  $F_{EC6}$  que fueron analizadas por CG-EM. Los análisis espectrales pusieron de manifiesto que las fracciones  $F_{EC1}$  y  $F_{EC4}$  están conformadas principalmente por compuestos grasos no esteróicos analizados a continuación.

### 3.2.2. Compuestos grasos no esterólicos presentes en el cuerpo fructífero del hongo *Fomitopsis sp.*

#### ▪ FRACCIÓN $F_{EC1}$

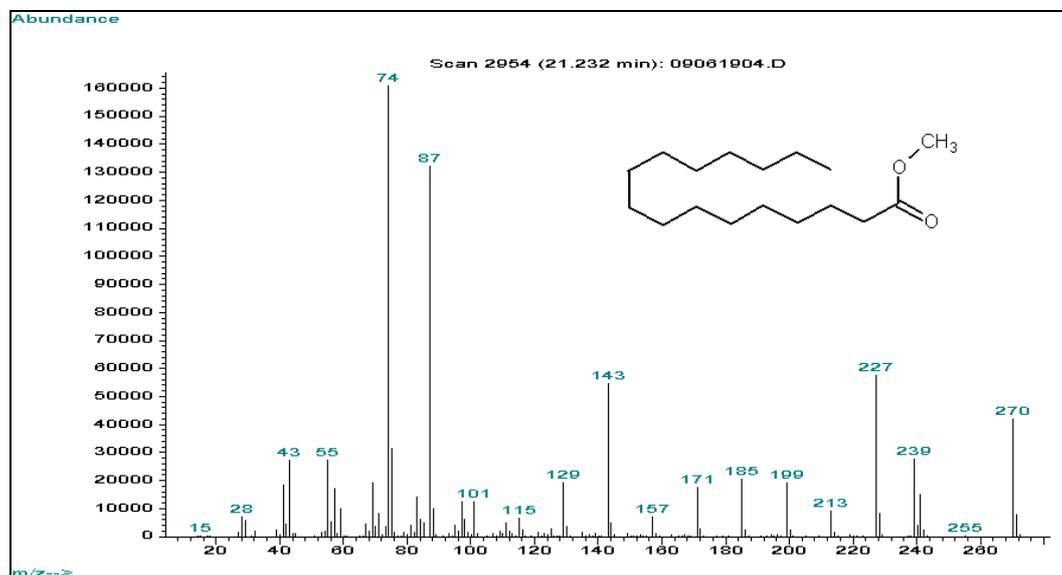
El cromatograma de esta fracción presentado en la figura 3-2, permite determinar la presencia de cuatro compuestos que se denominaron  $F_{EC1}(I)$ ,  $F_{EC1}(II)$ ,  $F_{EC1}(III)$  y  $F_{EC1}(IV)$  respectivamente, donde el compuesto  $F_{EC1}(II)$  es el mayoritario y cuyas fragmentaciones en sus espectros de masas corresponden a ésteres de ácidos grasos.

Figura 3-2: Cromatograma de la Fracción  $F_{EC1}$



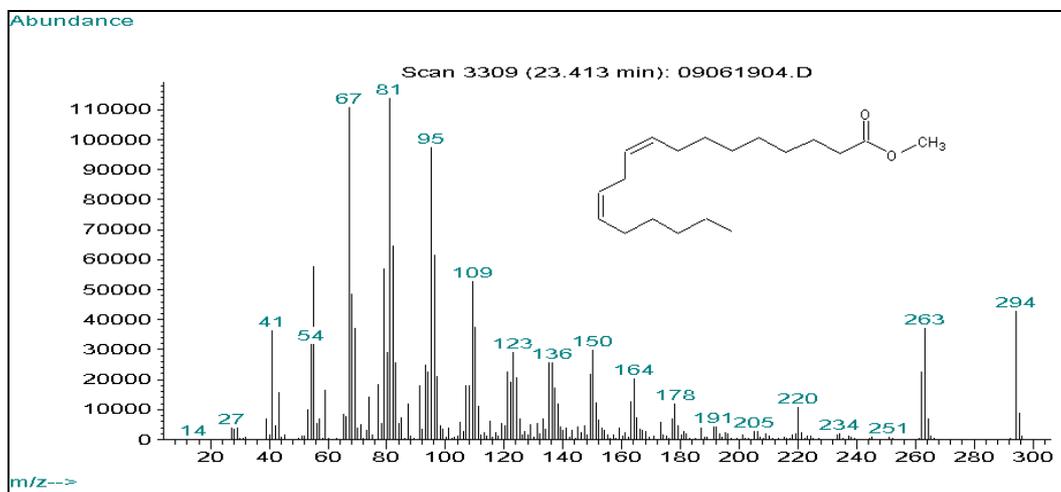
#### Compuesto $F_{EC1}(I)$

El EM de este compuesto (Fig. 3-3) muestra un pico de ion molecular a  $m/z$  270 u.m.a, concordante con una fórmula molecular  $C_{17}H_{34}O_2$  y fragmentaciones características de ésteres de ácidos grasos. Aparece un ion correspondiente al rearrreglo de Mc. Lafferty a  $m/z$  74, así como el pico correspondiente al fragmento ( $M^+ - OMe$ ) a  $m/z$  239 indicativo de ésteres metílicos y pérdidas consecutivas de 14 u.m.a típicas de cadenas alifáticas largas. Del análisis anterior y de la comparación con la literatura (Chegwin 2007; Jaramillo 2009) se identificó el compuesto  $F_{EC1}(I)$  como el Hexadecanoato de metilo.

**Figura 3-3: Espectro de masas compuesto F<sub>EC1</sub>(I)**

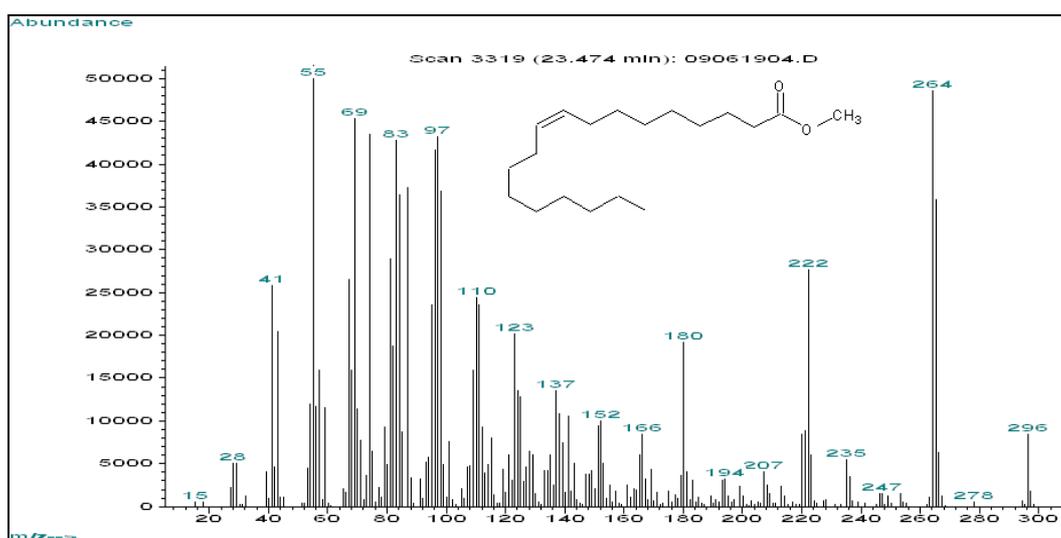
### Compuesto F<sub>EC1</sub>(II)

El EM para el compuesto F<sub>EC1</sub>(II) (Fig. 3-4) presenta un pico de ion molecular a m/z 294 una que concuerda con la fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>. Muestra un pico correspondiente a fragmento (M<sup>+</sup> - OMe) a m/z 263, la presencia de señales correspondientes a fragmentaciones típicas de cadenas doblemente insaturadas, como son los iones de la serie C<sub>n</sub>H<sub>2n-3</sub> (m/z 67, 81, 95, 109, 123) y el fragmento a m/z 88 (rearrreglo de Mc. Lafferty para ésteres de cadena alifática larga). La presencia de estas fragmentaciones y la concordancia con lo reportado (Cucaita 2007; Jaramillo 2009) permitió determinar que el compuesto corresponde al 9,12-octadecadienoato de metilo.

Figura 3-4: Espectro de masas compuesto F<sub>EC1</sub>(II)

### Compuesto F<sub>EC1</sub>(III)

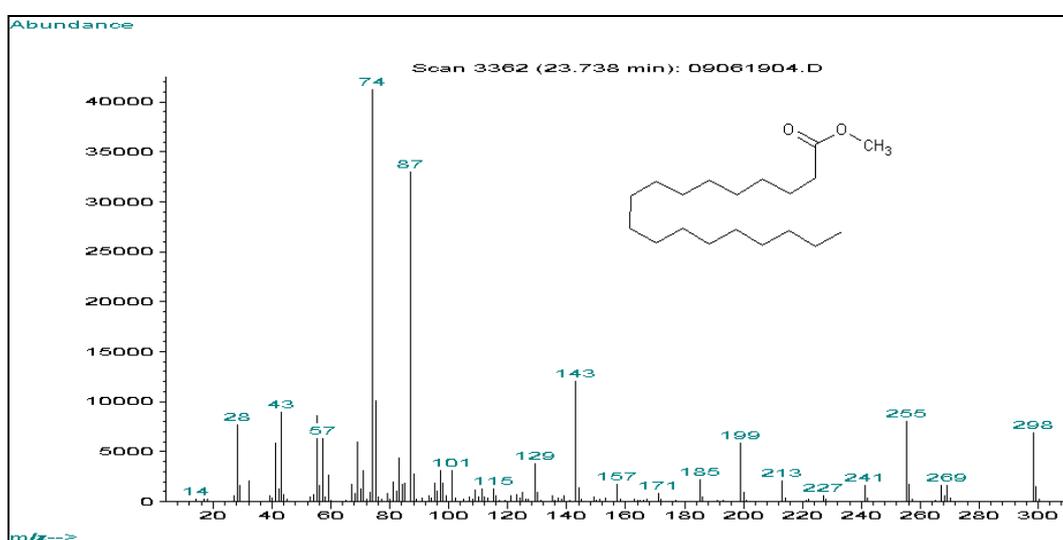
El compuesto F<sub>EC1</sub>(III) presenta en su EM (Fig. 3-5) un ion molecular a m/z 296 u.m.a que corresponde a la fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>. Así mismo, iones característicos de ésteres de cadena alifática larga, como el ion a m/z 74 producido por el rearrreglo de Mc. Lafferty, pérdidas sucesivas de 14 u.m.a y un ion a m/z 265 producido por el fragmento (M<sup>+</sup> - OMe). Del análisis anterior y por comparación con reportes en la literatura (Cucaita 2007), el compuesto se identificó como el 9-octadecenoato de metilo.

Figura 3-5: Espectro de masas compuesto F<sub>EC1</sub>(III)

## Compuesto F<sub>EC1</sub>(IV)

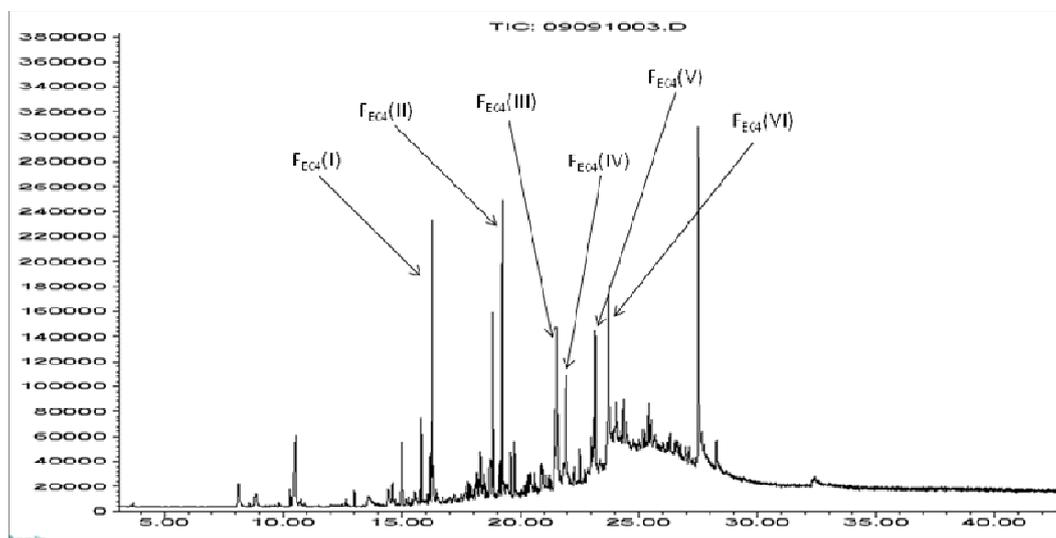
El compuesto F<sub>EC1</sub>(IV) presenta en su EM (Fig. 3-6) un ion molecular a m/z 298 que corresponde a la fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>38</sub>O<sub>2</sub>. Al igual que los anteriores muestra iones característicos de ésteres de cadena alifática larga, como el ion a m/z 74 producido por el rearrreglo de Mc. Lafferty, pérdidas sucesivas de 14 u.m.a y un ion a m/z 267 u.m.a producido por el fragmento (M<sup>+</sup> – OMe). Con base en lo anteriormente analizado y de la comparación con reportes en la literatura (Valencia 2000; Chegwin 2007) el compuesto corresponde al Octadecanoato de metilo.

Figura 3-6: Espectro de masas compuesto F<sub>EC1</sub>(IV)



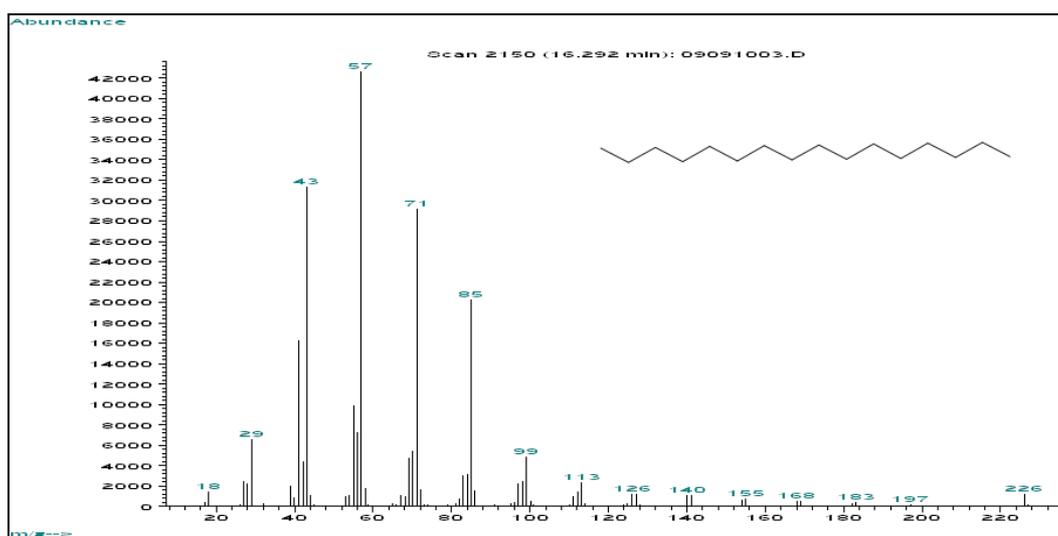
## ▪ FRACCIÓN F<sub>EC4</sub>

El cromatograma de esta fracción (Fig. 3-7) pone en evidencia, con base en los tiempos de retención, la presencia de compuestos posiblemente similares a los de la fracción anterior, como lo indican los espectros de masas de los denominados F<sub>EC4</sub>(I), F<sub>EC4</sub>(II), F<sub>EC4</sub>(III), F<sub>EC4</sub>(IV), F<sub>EC4</sub>(V) y F<sub>EC4</sub>(VI) que presentan fragmentaciones típicas de grasas. De los componentes de la fracción, el F<sub>EC4</sub>(II) es el compuesto mayoritario. Del análisis individual de sus EM se determinó que los constituyentes de F<sub>EC4</sub> corresponden principalmente a hidrocarburos y ácidos grasos como se indica a continuación.

Figura 3-7: Cromatograma de la Fracción  $F_{EC4}$ 

### Compuesto $F_{EC4}(I)$

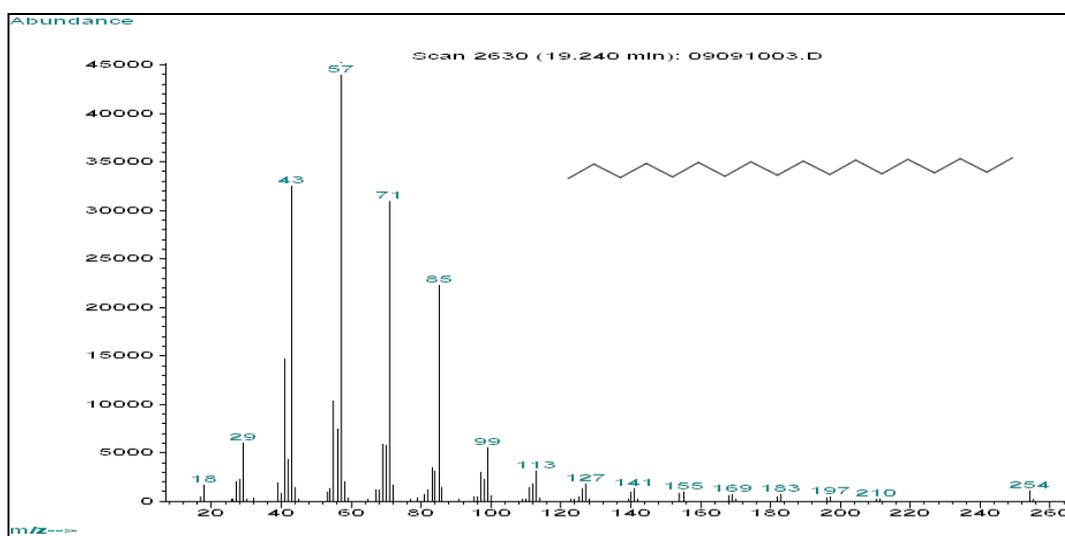
El EM para el compuesto  $F_{EC4}(I)$  (Fig. 3-8) con un tr de 16.292 min. es característico de hidrocarburos alifáticos. Presenta un ion molecular a  $m/z$  226 u.m.a de baja intensidad que corresponde a una fórmula molecular  $C_{16}H_{34}$  y se aprecian pérdidas sucesivas de 14 u.m.a (197, 183, 169, 155, 141, 127, 113, 99). Del análisis anterior y la comparación del espectro con la base de datos SDBS (<http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/menu-e.html>), se deduce que la estructura del compuesto  $F_{EC4}(I)$  es la del Hexadecano.

Figura 3-8: Espectro de masas compuesto  $F_{EC4}(I)$ 

### Compuesto F<sub>EC4</sub>(II)

El EM para el compuesto F<sub>EC4</sub>(II) (Fig. 3-9) con un tr: 19,240 min., presenta un ion molecular a m/z 254 u.m.a de baja intensidad, concordante con la fórmula molecular C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>. El espectro es característico de hidrocarburos alifáticos con picos correspondientes a pérdidas sucesivas de 14 u.m.a (m/z 197, 183, 169, 155, 141, 127, 113, 99). Del análisis del espectro y comparación con la base datos SDBS (<http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/menu-e.html>) la estructura del compuesto F<sub>EC4</sub>(II) pertenece al Octadecano.

Figura 3-9: Espectro de masas compuesto F<sub>EC4</sub>(II)



### Compuesto F<sub>EC4</sub>(III)

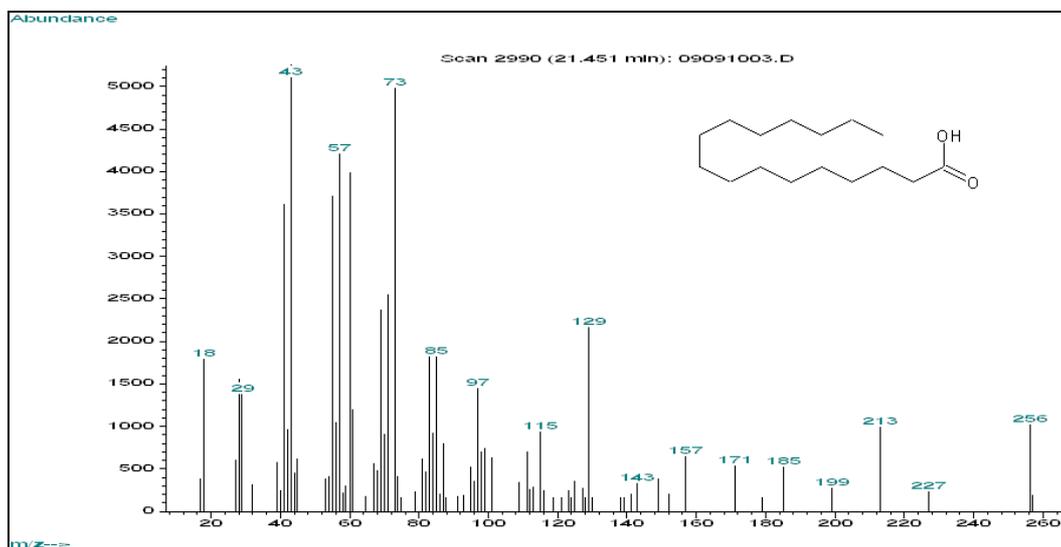
Este compuesto con un tr = 21,451 min., presenta en su EM (Fig. 3-10) un ion molecular a m/z 256 u.m.a, que corresponde a la fórmula molecular C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> y los picos característicos a pérdidas sucesivas de 14 u.m.a (m/z 213, 199, 185, 171, 157), propias de compuestos alifáticos de cadena larga, siendo notorio un pico a m/z 60 que resulta de un rearrreglo de McLafferty propio de ácidos carboxílicos alifáticos. De lo analizado y por comparación con literatura (Chegwin 2007; Jaramillo 2009) F<sub>EC4</sub>(III) pudo ser identificado como el ácido hexadecanóico.

### Compuesto F<sub>EC4</sub>(IV)

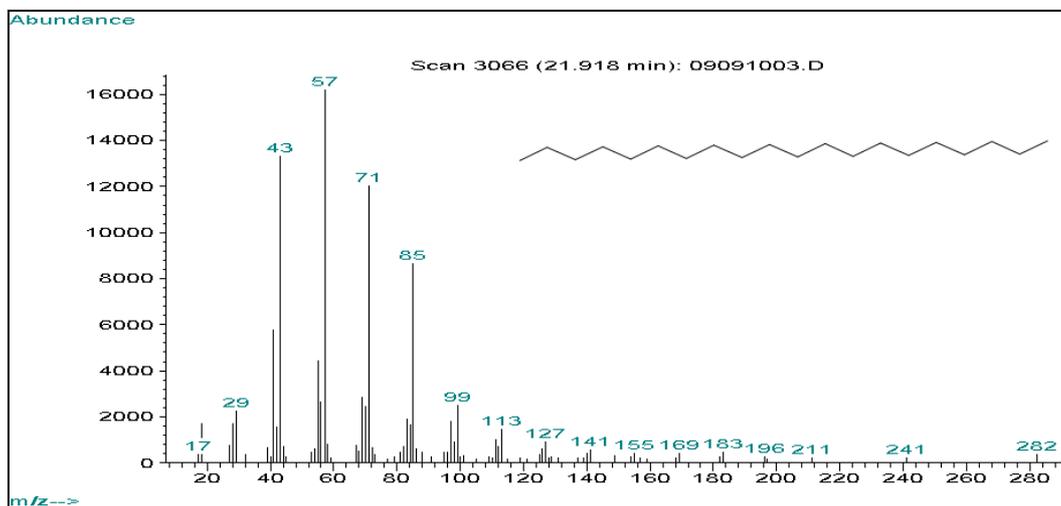
El EM para el compuesto F<sub>EC4</sub>(IV) (Fig. 3-11) que presenta un tr = 21,918 min., exhibe un ion molecular a m/z 282 u.m.a de baja intensidad concordante con la fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>42</sub>. El espectro, al igual que en el caso de los compuestos F<sub>EC4</sub>(I) y F<sub>EC4</sub>(II) es característico de hidrocarburos alifáticos, con picos debidos a pérdidas sucesivas de 14 u.m.a (m/z 211, 197, 183, 169, 155, 141, 127, 113, 99). De la comparación del espectro con

lo reportado en la base datos SDBS (<http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/menu-e.html>) se determinó que la estructura del compuesto  $F_{EC4(IV)}$  corresponde con el Eicosano.

**Figura 3-10: Espectro de masas compuesto  $F_{EC4(III)}$**



**Figura 3-11: Espectro de masas compuesto  $F_{EC4(IV)}$**



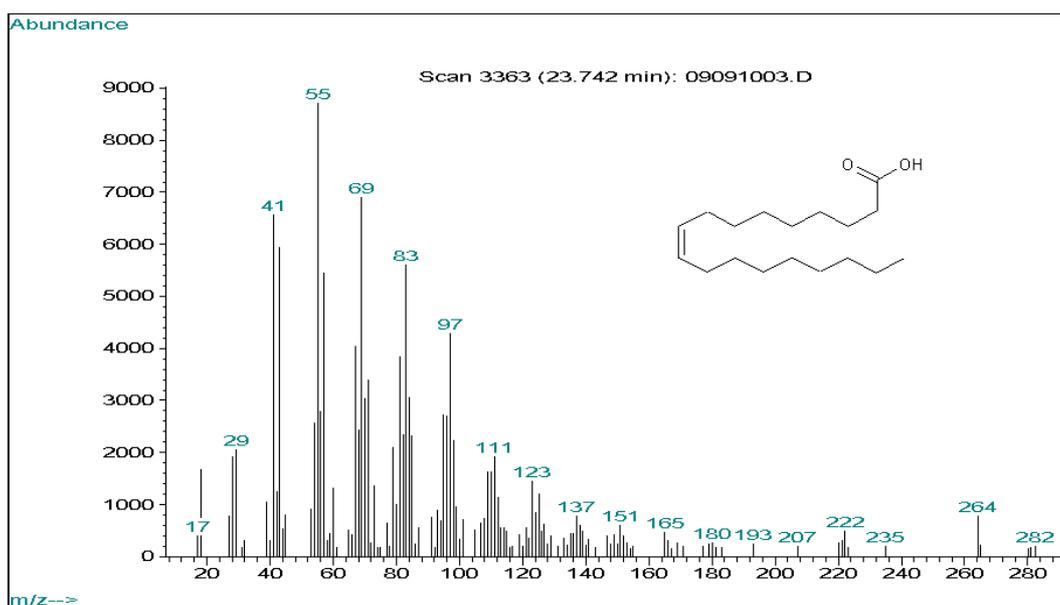
## Compuesto F<sub>EC4</sub>(V)

El compuesto F<sub>EC4</sub>(V) presenta un espectro de masas idéntico al exhibido por el compuesto F<sub>EC1</sub>(II), de esta manera se identifica como el 9,12-octadecadienoato de metilo.

## Compuesto F<sub>EC4</sub>(VI)

El espectro del compuesto F<sub>EC4</sub>(VI) (tr = 23,742 min.) (Fig. 3-12), presenta un pico de ion molecular a m/z 282 u.m.a correspondiente a una fórmula molecular C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>. Además, se observan picos correspondientes a pérdidas sucesivas de 14 u.m.a. las cuales aparecen a m/z 221, 207, 193, 179, y 165 u.m.a respectivamente, características de compuestos alifáticos de cadena larga, resaltando el pico a m/z 60 producto del rearrreglo de McLafferty típico para ácidos carboxílicos alifáticos. Por comparación de las fragmentaciones antes anotadas con las reportadas en literatura (Chegwin 2007; Jaramillo 2009) se identifica el compuesto como el ácido 9-octadecenoico (ácido oléico).

Figura 3-12: Espectro de masas compuesto F<sub>EC4</sub>(VI)



De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla 3-2), los componentes grasos no esteróicos mayoritarios del extracto metanólico del hongo silvestre colombiano *Fomitopsis sp.* son ésteres metílicos de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y diinsaturados, lo cual es totalmente concordante con los estudios realizados sobre basidiomicetos colombianos silvestres o cultivados, así como para los obtenidas biotecnológicamente mediante FEL, los cuales reportan a estos compuestos como los componentes mayoritarios (Cucaita 2007; Chegwin 2007; Jaramillo 2009; Serrano 2009). En cuanto a los ésteres metílicos se puede descartar la formación de artefactos ya que si bien se empleó metanol para la extracción de los metabolitos las condiciones empleadas, previa determinación experimental, aseguran la no alteración de los mismos.

**Tabla 3-2: Componentes grasos no esterólicos mayoritarios del hongo silvestre Colombiano *Fomitopsis sp.***

Compuesto	Tr. (min)	M <sup>+</sup>	IDH	Fragmentos característicos EM (%IR) <sup>†</sup>
Hexadecanoato de metilo	21,232	<b>270</b>	1	270(25,4); 239(16,5); 227(34,8); 213(5,5); 199(11,5); 185(12,3); 171(10,6); 157(4,2); 143(32,9); 129(11,6); 115(3,9); 87(79,5); 74(100)
9,12-octadecadienoato de metilo	23,413	<b>294</b>	3	294(35,7); 263(30,9); 220(9,1); 178(10,1); 164(17); 150(24,9); 136(21,3); 123(24,4); 109(43,9); 95(81,2); 88(10); 81(100); 74(11,8); 67(92,6).
9-octadecenoato de metilo	23,474	<b>296</b>	2	296(16,2); 265(69,6); 264(94,4); 235(10,6); 222(53,6); 207(66); 180(37,3); 166(16,5); 152(19,5); 137(26,1); 123(39); 110(47,3); 97(83,9); 88(6,4); 83(83,1); 74(84,5); 55(100).
Octadecanoato de metilo	23,738	<b>298</b>	1	298(16); 267(7,2); 255(18,9); 213(4,9); 199(13,6); 143(28,2); 88(6,5); 87(77,2); 74(100).
Hexadecano	16,292	<b>226</b>	0	226(2,6); 197(0,4); 183(0,8); 169(1,1); 155(1,6); 141(2,3); 127(2,6); 113(5,3); 99(11); 85(46,4); 71(66,7); 57(100).
Octadecano	19,540	<b>254</b>	0	254(2,5); 210(0,4); 197(1,2); 183(1,4); 169(2); 155(2,7); 141(2,6); 127(3,8); 113(9,1); 99(11,8); 85(47,8); 71(68,1); 57(100).
Acido Hexadecanoico	21,451	<b>256</b>	1	256(20,4); 227(4,1); 213(18,9); 199(5,8); 185(12,1); 171(15,5); 157(9,9); 129(41,8); 73(100); 60(82,4); 43(95).
Eicosano	21,918	<b>282</b>	0	282(2); 241(0,9); 211(1); 197(0,9); 183(1,5); 169(1,8); 155(2,4); 141(3,5); 127(5,6); 113(7,9); 99(13,1); 85(47,5); 71(64,8); 57(100); 43(66,8).
Ácido 9-Octadecenoico	23,742	<b>282</b>	2	282(2,3); 264(10,3); 221(2,6); 207(2,8); 193(1,7); 179(3,4); 165(4,7); 151(6,4); 137(8,6); 123(12,4); 111(23,2); 97(46,7); 83(56,1); 69(74); 60(12,1); 55(100); 41(68,9).

<sup>†</sup>Intensidad Relativa en porcentaje.

No está por demás destacar que la presencia de ácidos grasos insaturados como el ácido oleico se constituyen en una característica nutricional favorable, puesto que los ácidos grasos no saturados son esenciales en una dieta sana (Miles 1999), ya que brindan protección frente a enfermedades cardiovasculares y arterioesclerosis producida por el colesterol (Xiao *et al.*, 2009). Lo anterior permitiría entonces plantear el beneficio que tendría el consumo, como suplemento alimenticio, del hongo colombiano en estudio debido a su carácter nutriceútico.

En cuanto a la presencia de hidrocarburos, los resultados arrojados en este trabajo, se constituyen en una peculiaridad de este hongo, puesto que en los Basidiomicetos silvestres colombianos estudiados hasta el presente no se había encontrado esta clase de compuestos. Esta singularidad presenta una gran relevancia dentro de la química de macrohongos debido

a que no es común la presencia de estos compuestos en las setas. Dentro de los pocos reportes sobre el particular se encuentran el de Xiao *et al.* en 2009, investigadores que encontraron esta clase de hidrocarburos en la fracción volátil de tres especies de hongos pertenecientes al género *Cordyceps* y los de Wu *et al.* en 2005 y de D'armas en 2009, que los reportan como constituyentes del cuerpo fructífero del hongo macromiceto silvestre *Polyporus sulfureus* y en micromiceto marino *Aspergillus ochraceus* aislado de raíces de *Rhizophora mangle*, respectivamente. Así mismo, el hexadecano fue identificado en la fracción volátil del hongo micromiceto endófitico *Gliocladium roseum* (Strobel *et al.*, 2008). Cabe anotar aquí que los hongos antes mencionados se obtuvieron biotecnológicamente (Fermentación en estado líquido FEL) y que los hidrocarburos no se han aislado, hasta el presente, de hongos silvestres. En el caso del *G. roseum*, los autores determinaron que el hongo empleado es genéticamente atípico y que sólo produce los alcanos bajo condiciones limitadas de oxígeno y en determinados medios de cultivo.

La determinación de estos tres hidrocarburos como constituyentes del cuerpo fructífero del hongo estudiado en este trabajo hace pensar en varias hipótesis que permitan explicar su presencia a saber:

- El hongo es productor de estos hidrocarburos y si es así y al tener una aparición tan restringida en los basidiomicetos se podrían convertir en quimiomarcadores, como sucede con algunas cianobacterias del suelo, específicamente *Microcoleus vaginatus*, en la cual estudios recientes indican que produce más de 60 alcanos ramificados y sugieren que los de 17 – 20 átomos de carbono podrían usarse como biomarcadores (Brocks *et al.*, 2003). Así mismo, se ha encontrado que la bacteria *Vibrio furnissii* produce hidrocarburos de C15 – C24, tanto intra como extracelulares, mientras que *Sarcina lutea* produce C20 – C30 (Ladygina *et al.*, 2006), afianzando la hipótesis de Brocks. La presencia tan restringida en macromicetos de hexadecano, octadecano y eicosano permitiría, en primera instancia, considerarlos dentro de esta denominación.

El papel de los hidrocarburos en los microorganismos no está plenamente definido, pero parece ser que la presencia de los mismos en las paredes de las esporas fúngicas asumen funciones protectoras (Ladygina *et al.*, 2006). Así mismo, Ladygina indica que las cantidades de los hidrocarburos varían según se encuentren en el micelio o en las esporas. Es bien conocido que los micromicetos, dado su contenido enzimático, pueden producir hidrocarburos y que la producción de estos compuestos depende de las condiciones de desarrollo, del medio de soporte y de las especies de microorganismos (Sunesson *et al.*, 1995).

En el caso de que el hongo biosintetice los hidrocarburos podría considerarse, si se puede realizar con relativa facilidad su producción biotecnológica, una fuente de lo que varios autores denominan los productores de “Micodiesel” (Ladygina *et al.*, 2006; Strobel *et al.*, 2008).

- El hongo es un biorremediador. Esta acción es bien conocida especialmente para micromicetos o microorganismos en general. La misma es debida a que la diversidad enzimática y metabólica que ellos presentan les proporciona una gran capacidad de biodegradación de compuestos como hidrocarburos, clorobencenos, bifenilos policlorados y otros xenobióticos (Atlas 1981; Fava 1991; citados en Colombo

*et al.*, 1996). Sin embargo, los Macrohongos se han estudiado recientemente por su habilidad de sintetizar un sinnúmero de enzimas envueltas en la degradación de la celulosa y la lignina (peroxidazas y lacasas) que son capaces de degradar hasta los más recalcitrantes compuestos tóxicos. Uno de los primeros trabajos sobre el tema con el empleo tanto de micromicetos como de macromicetos es el de Colombo *et al.* en 1996 quien encontró una eficiencia muy similar. En este orden de ideas, la biorremediación por parte del hongo puede realizarse por bioabsorción, por biodegradación o por bioabsorción – biodegradación (Chen *et al.*, 2010), este último mecanismo lo presentan los biorremediadores ideales.

En el caso particular de la Fomitopsis del Huila, dado que la región de Teruel no es un sitio de yacimientos petrolíferos, se puede descartar el posible proceso de biorremediación del suelo por parte del hongo. Además, la presencia de los hidrocarburos dentro de los fungimetabolitos no parece ser producto de incorporación de los mismos ya que estos organismos toman hidrocarburos como el hexadecano para degradarlos a AcCoA y CO<sub>2</sub> (Dashti *et al.*, 2008; Elshafie *et al.*, 2007), es decir, los toman como fuente de energía para la formación de biomasa. A este respecto se han realizado investigaciones que arrojan como resultado el aumento de la biomasa cuando se emplean sustratos enriquecidos principalmente con n-hexadecano, tanto para micromicetos (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2003) como para macromicetos (Kanaly 2006). Sin embargo, no se sabe si la biodegradación es total ya que en dichos trabajos no se determinó la presencia de los hidrocarburos en la biomasa obtenida.

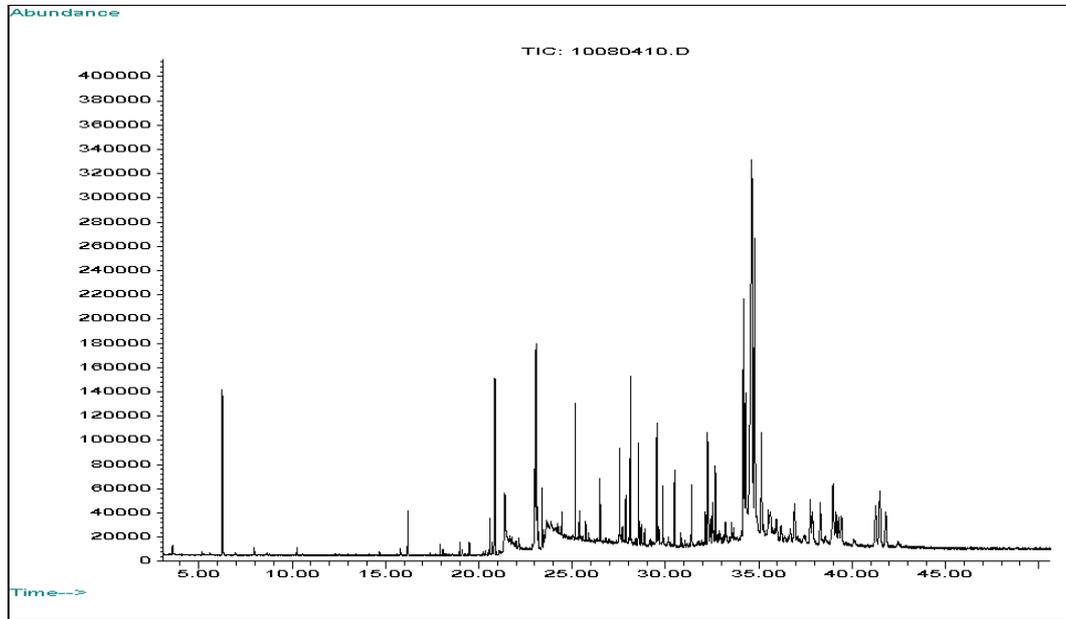
Con base en lo anteriormente expuesto se puede concluir que todo apunta a que los hidrocarburos encontrados en las fructificaciones son biosintetizados por el hongo y que se podría estar frente a nuevos quimiomarcadores.

### **3.2.3. Compuestos esterólicos presentes en el cuerpo fructífero del hongo *Fomitopsis sp.***

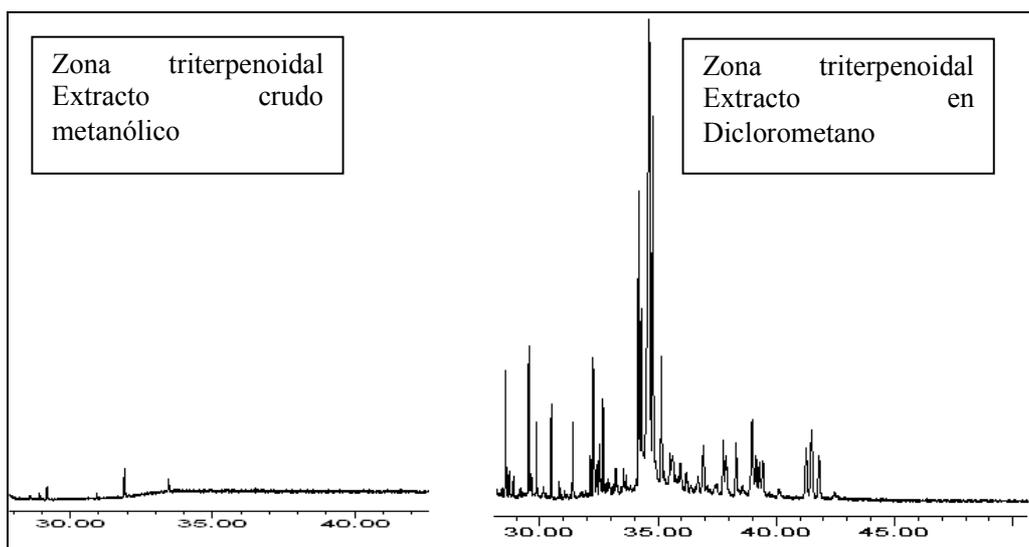
La partición en diclorometano (Fig. 3-13) muestra un perfil, que comparado con el extracto crudo metanólico (Fig. 3-14), evidencia la presencia de los compuestos de tipo triterpenoidal, debido a que la relación existente entre ácidos grasos y sus ésteres y los triterpenoides (Ácidos Grasos/Triterpenoides) disminuye, permitiendo su detección y confirmando así el peculiar comportamiento de los extractos fúngicos.

Se reservaron 100 mg de extracto para ensayos preliminares y pruebas biológicas. De esta manera 460 mg del extracto se sometieron a Cromatografía en Columna tal como se describe en el diagrama 2-3. Las fracciones se monitorearon por CCD y aquellas que presentaron comportamiento similar se agruparon, obteniéndose de esta manera 6 fracciones renombradas como F<sub>ED1</sub>, F<sub>ED2</sub>, F<sub>ED3</sub>, F<sub>ED4</sub>, F<sub>ED5</sub> y F<sub>ED6</sub>.

**Figura 3-13: Perfil cromatográfico del extracto proveniente de la partición en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  del extracto crudo metanólico obtenido del cuerpo fructífero del hongo *Fomitopsis sp.***



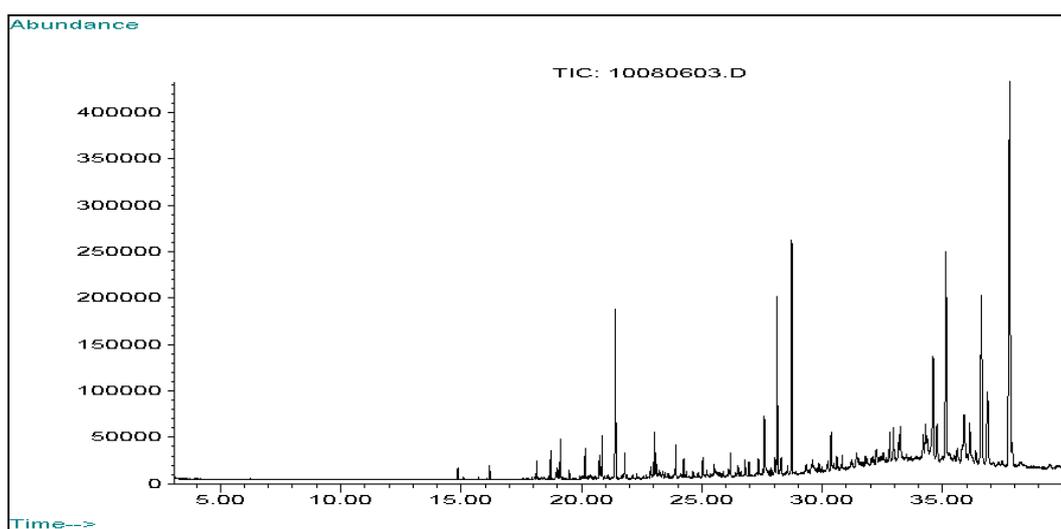
**Figura 3-14: Comparación de perfiles cromatográficos de extractos obtenidos del cuerpo fructífero del hongo *Fomitopsis sp.***



## ▪ FRACCIÓN F<sub>ED1</sub>

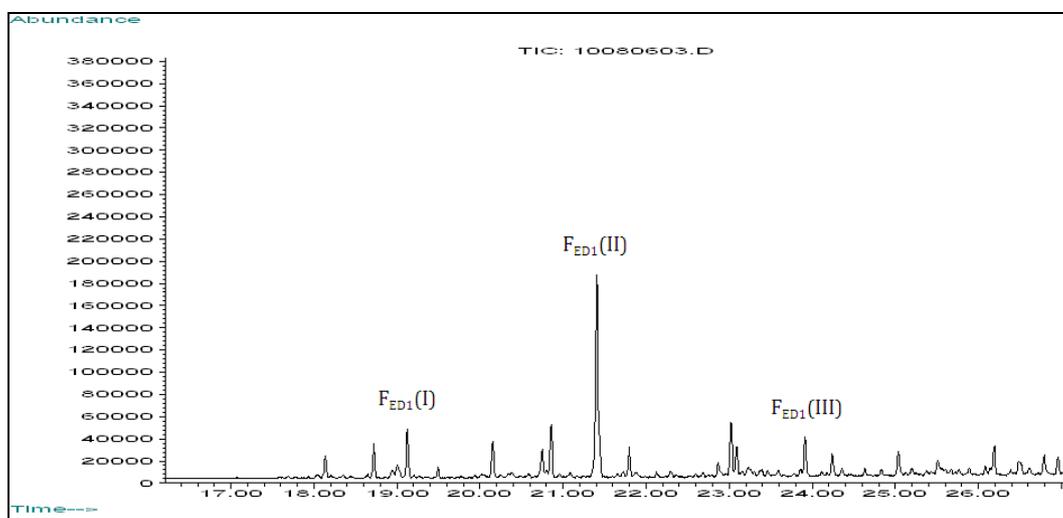
El perfil cromatográfico de esta fracción se muestra en la figura 3-15. Aunque presenta aun señales en la zona de grasas (19 – 27 min), es evidente la presencia de compuestos que de acuerdo a sus tiempos de retención y patrones de fragmentación corresponden a compuestos triterpenoidales (zona 32 – 40 min).

**Figura 3-15: Cromatograma Fracción F<sub>ED1</sub>**



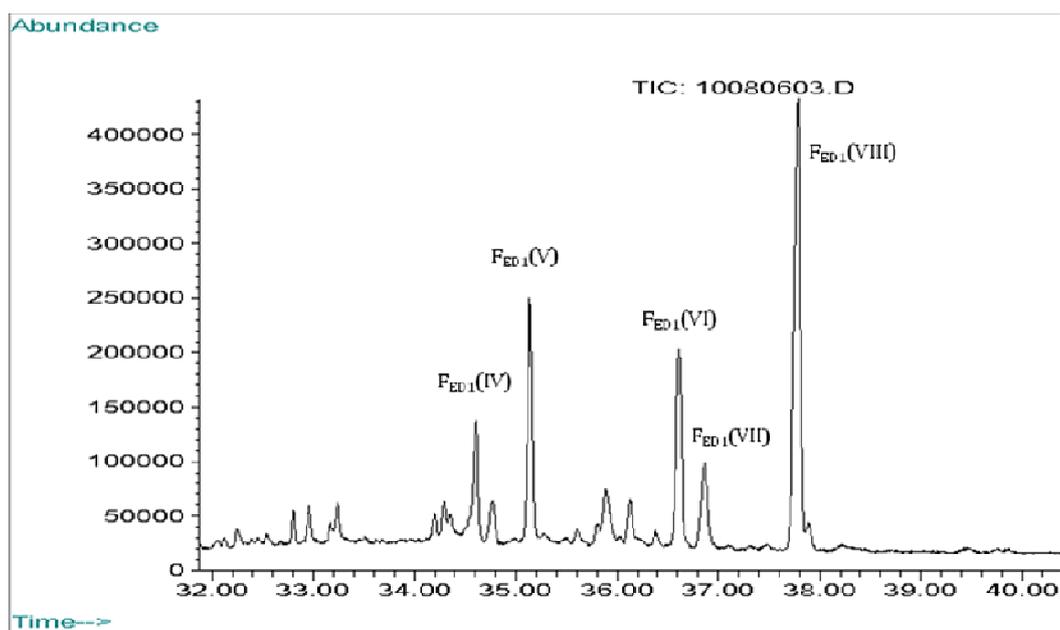
## Compuestos grasos no esterólicos

La ampliación del cromatograma entre los 18 y 27 min (Fig. 3-16) permite identificar tres compuestos denominados F<sub>ED1</sub>(I), F<sub>ED1</sub>(II) y F<sub>ED1</sub>(III), que presentan tiempos de retención y patrones de fragmentación típicos de grasas. Del análisis de sus espectros de masas se determinó que corresponden a Octadecano, Hexadecanoato de metilo y Eicosano respectivamente, los cuales fueron previamente identificados en el extracto metanólico crudo.

**Figura 3-16: Ampliación de cromatograma zona grasas (18 – 28 min.) Fracción F<sub>ED1</sub>**

### Compuestos triterpenoidales

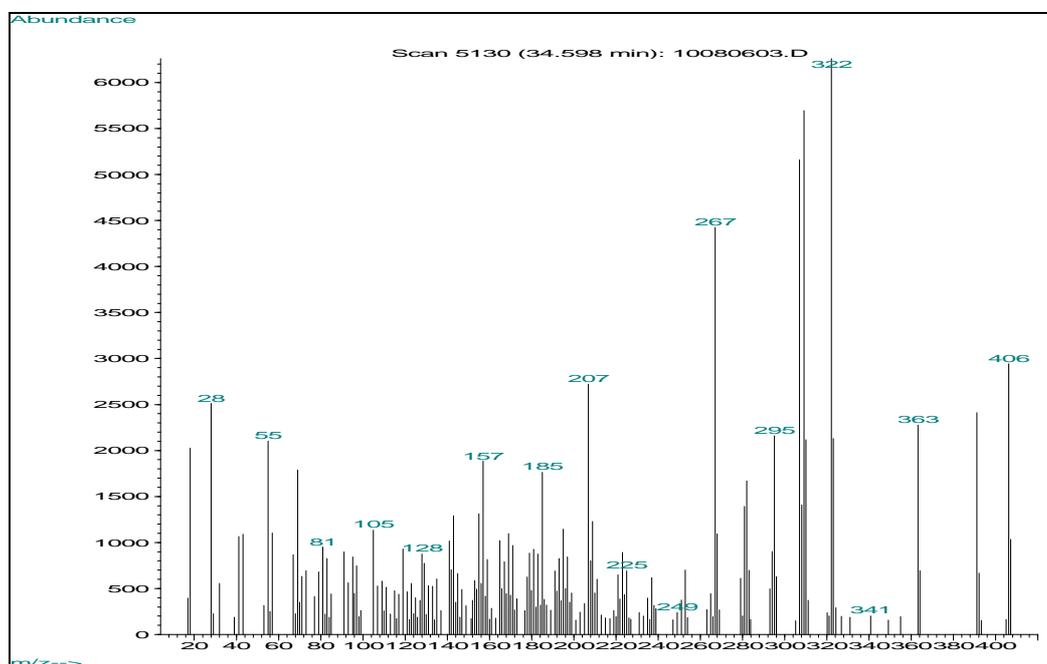
En la zona comprendida entre 32 y 40 min se observa la presencia de compuestos que presentan fragmentaciones de esteroides y triterpenoides. La ampliación del cromatograma (Fig 3-17) permite identificar 5 compuestos cuyo análisis se describe a continuación.

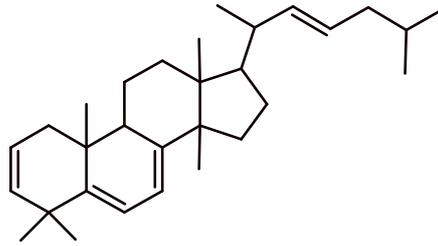
**Figura 3-17: Ampliación de cromatograma zona triterpenoidal Fracción F<sub>ED1</sub>**

## Compuesto F<sub>ED1</sub>(IV)

El compuesto F<sub>ED1</sub>(IV) con un tr = 34.598 min. presenta en su **EM** un ion molecular M<sup>+</sup> = 406 u.m.a (Fig. 3-19), que corresponde a una fórmula molecular condensada C<sub>30</sub>H<sub>46</sub> con un IDH = 8, debido al cierre de los anillos y a cuatro dobles enlaces presentes en la molécula. Según su patrón de fragmentación (Diagrama 3-1) y la ausencia de fragmentos originados por pérdida de moléculas de agua, es probable que el compuesto F<sub>ED1</sub>(IV) sea un triterpeno. Los fragmentos característicos se dan a m/z 406 (M<sup>+</sup>), m/z 391 (M<sup>+</sup> - CH<sub>3</sub>), m/z 363 (M<sup>+</sup> - Isop), m/z 322 (M<sup>+</sup> - C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>), m/z 309, m/z 295 (M<sup>+</sup> - CL). Los fragmentos a m/z 267 (Fisión entre C15 - C17), m/z 253 (m/z 267 - CH<sub>3</sub>), m/z 225 (Fisión anillo D - 2H), m/z 185 (Fisión anillo C - 2H), m/z 169 (m/z 185 - CH<sub>3</sub> - H), m/z 157 (Fisión anillo C - CH<sub>3</sub> - 2H) y m/z 128 permiten establecer la presencia de dos grupos metilo en el carbono C4 y uno más en C14 y ubicar tres insaturaciones en los carbonos C2, C5 y C7 respectivamente. La diferencia de 111 u.m.a entre el ion molecular M<sup>+</sup> y el fragmento a m/z 295 determina una cadena lateral insaturada C<sub>8</sub>H<sub>15</sub> con lo cual el núcleo del compuesto es de tipo Lanosta. La insaturación en la cadena lateral se presenta en C22, justificada por la señal intensa a m/z 322. Con base en estas fragmentaciones se propone como estructura más probable el Lanosta-2,5,7,22-tetraeno, metabolito del cual no se encontraron reportes previos en literatura.

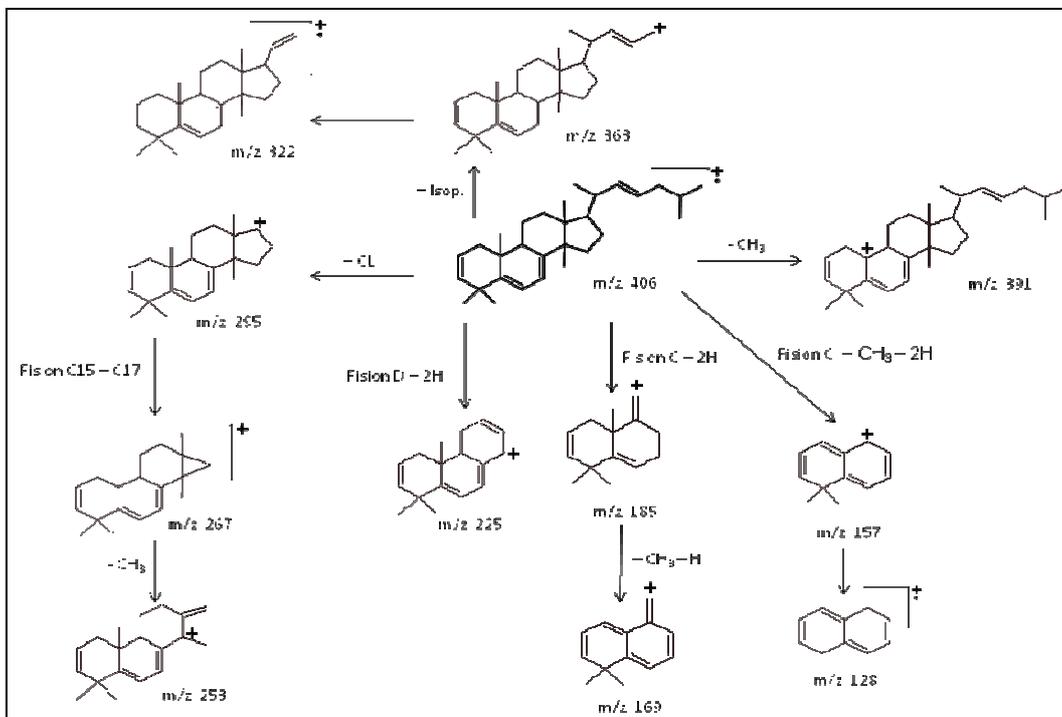
Figura 3-18: Espectro de masas compuesto F<sub>ED1</sub>(IV)  
Lanosta-2,5,7,22-tetraeno





Lanosta-2,5,7,22-tetraeno

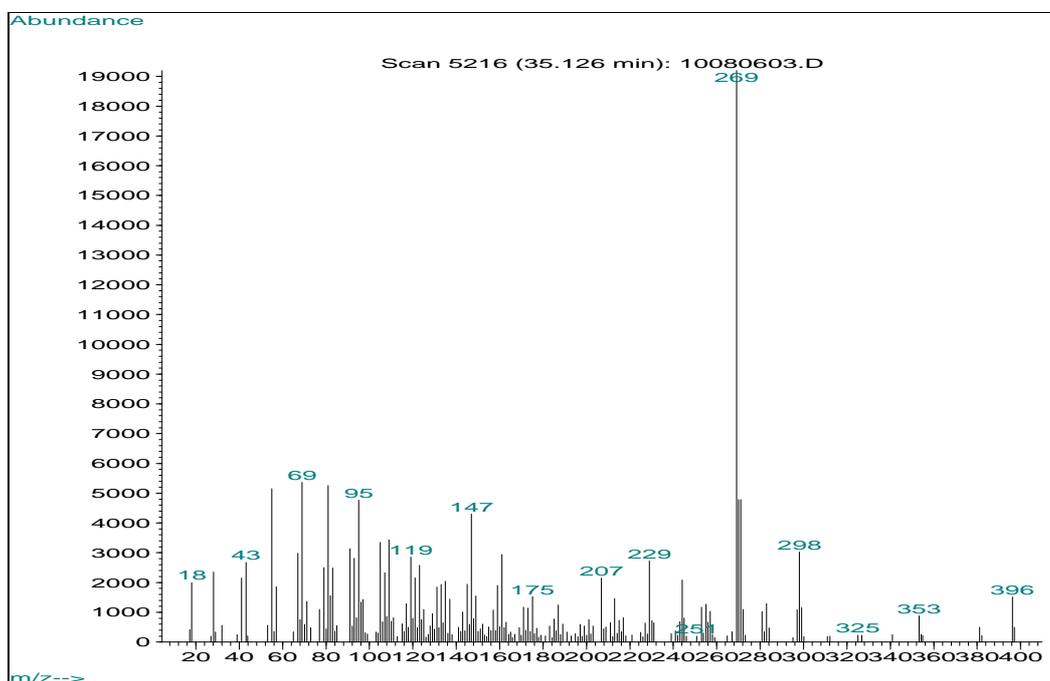
**Diagrama 3-1: Fragmentación propuesta para el compuesto F<sub>ED1</sub>(IV)  
Lanosta-2,5,7,22-tetraeno**

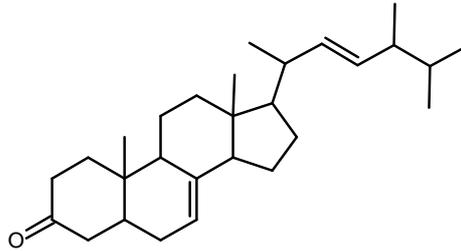


## Compuesto F<sub>ED1</sub>(V)

En el cromatograma de gases este compuesto presenta un  $t_r = 35.126$  min. Su **EM** exhibe un ion molecular  $M^+ = 396$  u.m.a. (Fig. 3-20), concordante con la fórmula molecular  $C_{28}H_{44}O$  y un IDH = 7 correspondiente a 7 insaturaciones, 4 de las cuales se atribuyen al cierre de los anillos y 3 a dobles enlaces ubicados en la molécula. En su patrón de fragmentación, el compuesto no presenta pérdida de agua, lo cual hace pensar que probablemente sea o un triterpeno o un cetoesteroide. Los fragmentos característicos se dan a  $m/z$  396 ( $M^+$ ),  $m/z$  381 ( $M^+ - CH_3$ ),  $m/z$  353 ( $M^+ - CH_2CO - H$ ),  $m/z$  325,  $m/z$  298 ( $M^+ - C_7H_{13} - H$ ),  $m/z$  271 ( $M^+ - CL$ ),  $m/z$  269 ( $M^+ - CL - 2H$ ),  $m/z$  246,  $m/z$  229 (fisión anillo D - 2H),  $m/z$  175 (fisión anillo C - 2H),  $m/z$  161 y  $m/z$  147 ( $m/z$  175 - CO), fragmentos que confirman la presencia de un grupo ceto y un núcleo insaturado de tipo  $\Delta^7$ . La diferencia de 125 u.m.a entre el pico molecular y el fragmento a  $m/z$  271 permite establecer una cadena lateral insaturada  $C_9H_{17}$ , ubicando la insaturación en el C-22 por la señal a  $m/z$  298 con lo cual el compuesto tendría un núcleo del tipo Ergosta. De lo anteriormente analizado, el compuesto F<sub>ED1</sub>(V) se identifica como Ergosta-7,22-dien-3-ona, metabolito también aislado en los Basidiomicetos *G. applanatum*. (Gan *et al.*, 1998) y *Fomes fomentarius* (Cole 2003). En el diagrama 3-2 presenta el patrón de fragmentación propuesto para este compuesto.

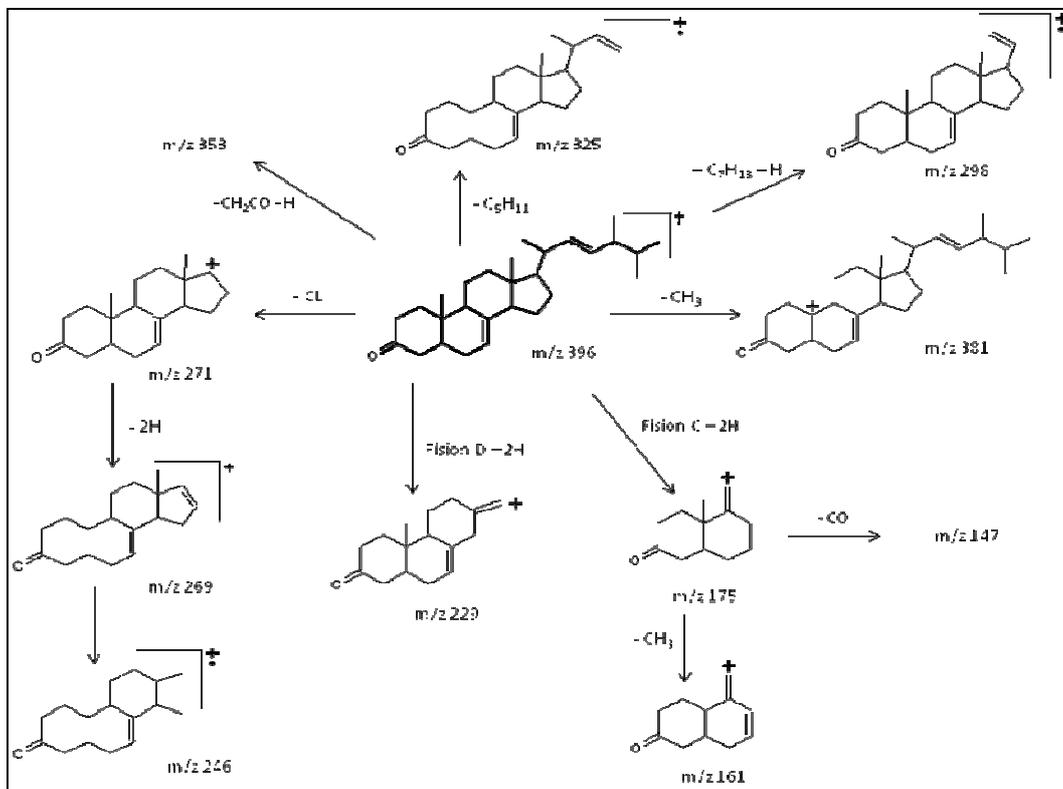
Figura 3-19: Espectro de masas compuesto F<sub>ED1</sub>(V)





Ergosta-7,22-dien-3-ona

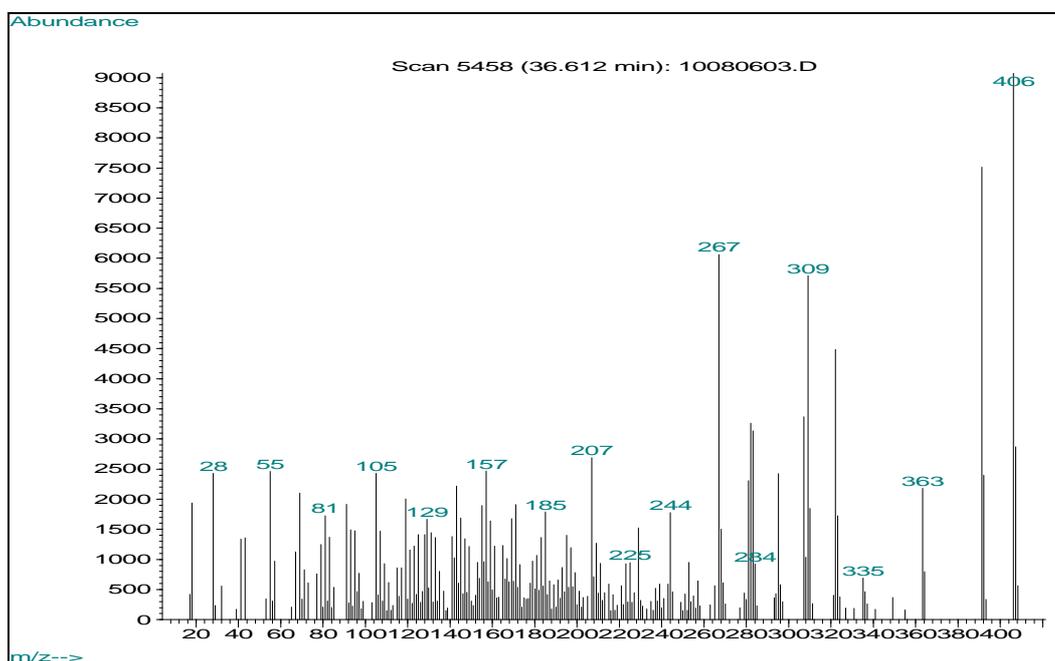
Diagrama 3-2: Fragmentación propuesta para el compuesto F<sub>ED1</sub>(V)  
Ergosta-7,22-dien-3-ona

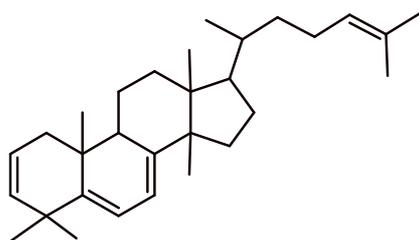


## Compuesto F<sub>ED1</sub>(VI)

El compuesto F<sub>ED1</sub> (VI) con un tr = 36.612, presenta en su EM (Fig. 3-21) un ion molecular M<sup>+</sup> = 406 u.m.a correspondiente a una fórmula molecular condensada C<sub>30</sub>H<sub>46</sub> con un IDH = 8, indicando la presencia de 8 insaturaciones, cuatro de las cuales se atribuyen al cierre de los anillos y las cuatro restantes a la presencia de cuatro dobles enlaces en la molécula. En el espectro no se presentan fragmentos originados por la pérdida de agua, hecho que aunado a que el patrón de fragmentación es similar al que presenta el compuesto F<sub>ED1</sub>(IV) hace inferir que probablemente el compuesto sea un triterpeno. La principal diferencia con el compuesto antes mencionado radica en la presencia de la señal a m/z 335 lo que permite ubicar la insaturación de la cadena lateral en C24. Entre los fragmentos característicos (Diagrama 3-3) se encuentran: m/z 406 M<sup>+</sup>, m/z 391 (M<sup>+</sup> - CH<sub>3</sub>), m/z 363 (M<sup>+</sup> - Isop.), m/z 335 (M<sup>+</sup> - C<sub>5</sub>H<sub>9</sub> - 2H), m/z 309, m/z 295 (M<sup>+</sup> - CL), m/z 281 (M<sup>+</sup> - CL - CH<sub>3</sub>), m/z 267 (Fisión entre C<sub>15</sub> - C<sub>17</sub>), m/z 253 (m/z 267 - CH<sub>3</sub>), m/z 225 (Fisión anillo D - 2H), m/z 185 (Fisión anillo C - 2H), m/z 157 y m/z 129. Del análisis anterior y teniendo en cuenta las rutas biosintéticas de metabolitos triterpenoidales en hongos, se propone como estructura más probables para el compuesto F<sub>ED1</sub>(VI) el Lanosta-2,5,7,24-tetraeno del cual no se encontraron reportes previos en literatura.

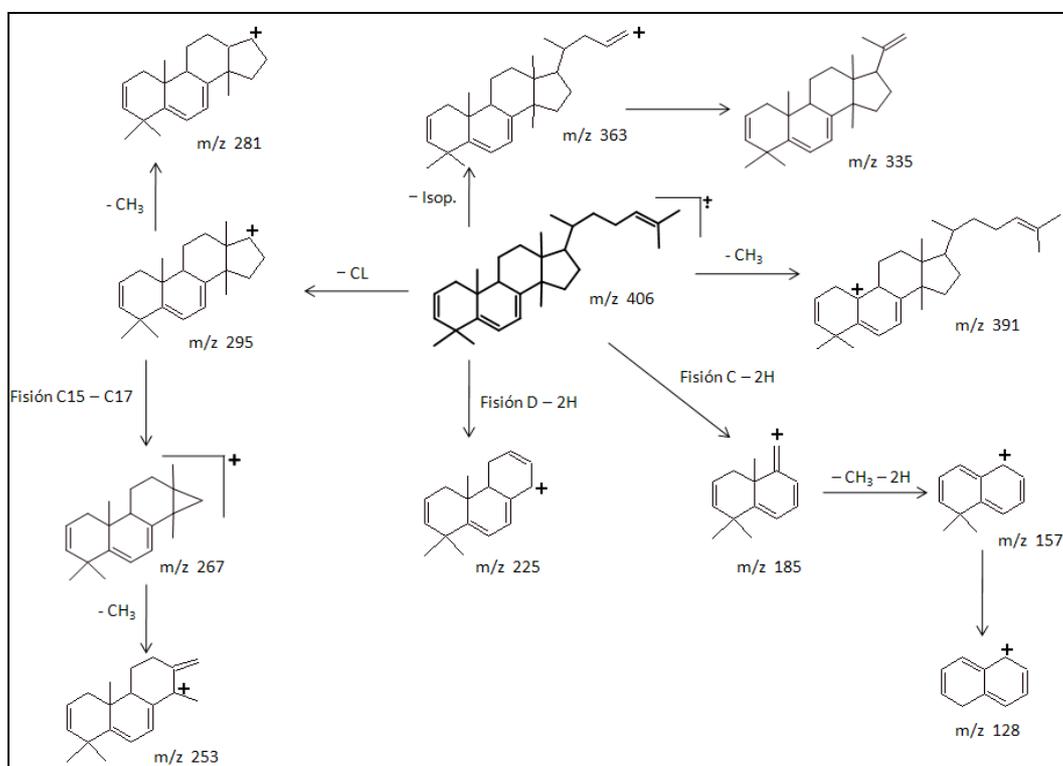
Figura 3-20: Espectro de masas compuesto F<sub>ED1</sub>(VI)





Lanosta-2,5,7,24-tetraeno

**Diagrama 3-3: Fragmentación propuesta para el compuesto F<sub>ED1</sub>(VI)  
Lanosta-2,5,7,24-tetraeno**

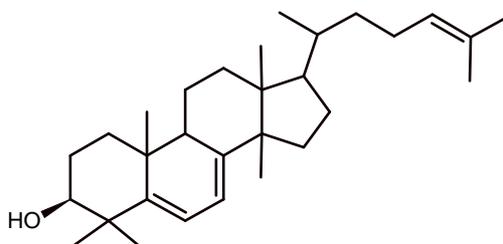
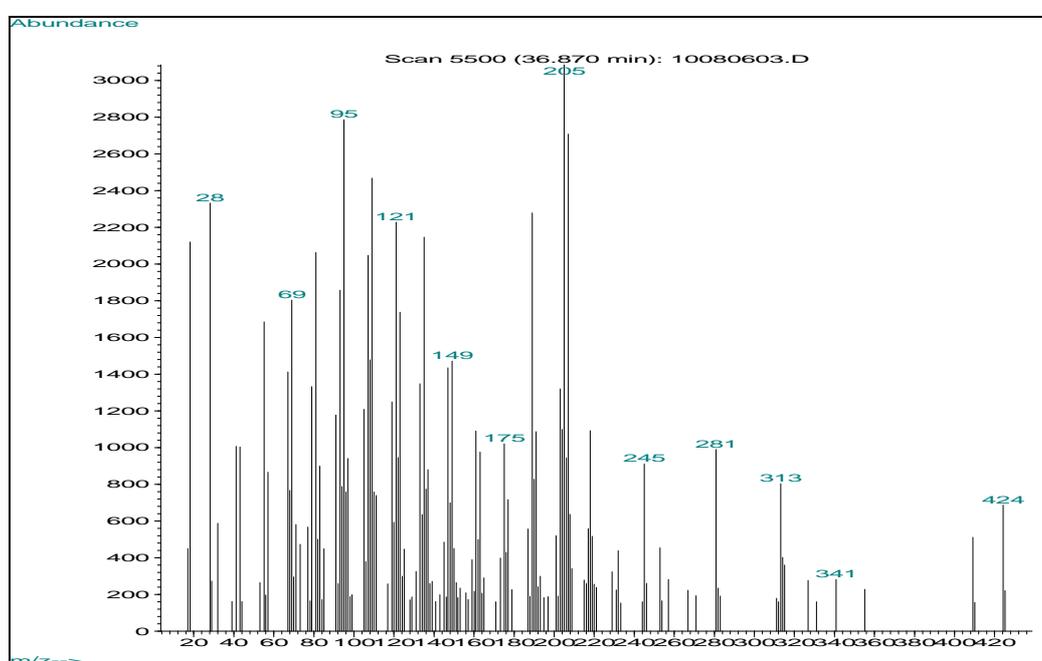


### Compuesto F<sub>ED1</sub>(VII)

Este compuesto con un  $t_r = 36.870$  min. exhibe en su EM un ion molecular  $M^+ = 424$  u.m.a (Fig. 3-22), concordante con la fórmula molecular condensada  $C_{30}H_{48}O$ , con un IDH = 7, el cual indica 7 insaturaciones, donde 4 se atribuyen a los cierres de anillos y las restantes se deben a la presencia de tres dobles enlaces en la molécula. Los fragmentos característicos (Diagrama 3-4) se originan a:  $m/z$  424 ( $M^+$ ),  $m/z$  409 ( $M^+ - CH_3$ ),  $m/z$  355 ( $M^+ - C_5H_9$ ),

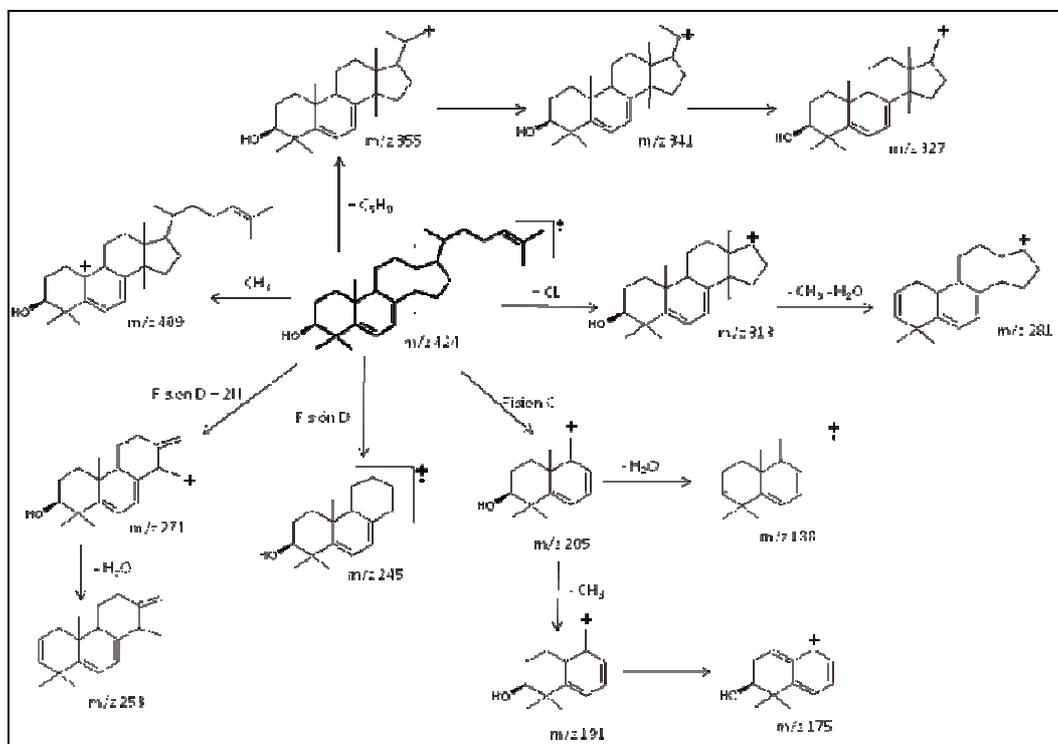
m/z 341, m/z 327, m/z 313 ( $M^+ - CL$ ), m/z 271 (Fisión anillo D - 2H), m/z 253 (m/z 271 -  $H_2O$ ), m/z 245 (Fisión anillo D -  $2CH_3$ ), m/z 205 (Fisión anillo C), m/z 191 (m/z 205 -  $CH_3$ ), m/z 188 (Fisión anillo C -  $H_2O$ ) y m/z 175 (Fisión anillo C -  $CH_3$ ), indicando que el compuesto es un esteroide con núcleo lanostano. Las insaturaciones se ubican en C-5 y C-7 debido principalmente a la presencia de los iones a m/z 271 y 253, diagnósticos de núcleos  $\Delta^{5,7}$ . La diferencia de 111 u.m.a entre el fragmento a m/z 313 y el ion molecular permite establecer una cadena lateral insaturada  $C_8H_{15}$ , ubicando la insaturación restante en el C-24 con base en la presencia de los fragmentos a m/z 355 y m/z 341. Del análisis anterior y teniendo en cuenta las rutas biosintéticas de los fungimetabolitos, se propone como estructura probable del compuesto **F<sub>EDI</sub>(VII)** el Lanosta-5,7,24-trien-3 $\beta$ -ol, metabolito del cual no se encontraron reportes previos en literatura.

Figura 3-21: Espectro de masas compuesto **F<sub>EDI</sub>(VII)**



Lanosta-5,7,24-trien-3 $\beta$ -ol

**Diagrama 3-4: Fragmentación propuesta para el compuesto F<sub>ED1</sub>(VII)  
Lanosta-5,7,24-trien-3 $\beta$ -ol**

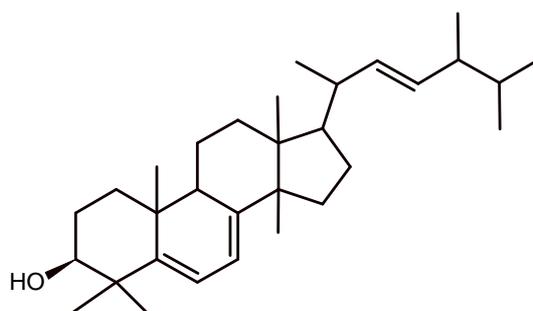
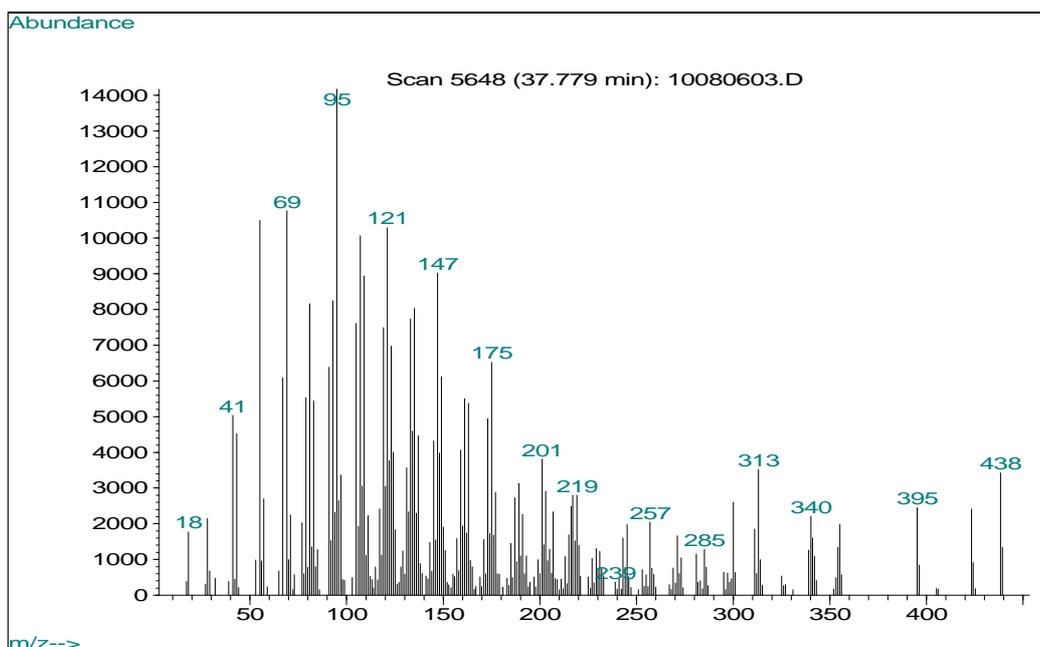


### Compuesto F<sub>ED1</sub>(VIII)

Este compuesto, el mayoritario de la fracción con un  $t_r = 37.779$  min. presenta en su EM (Fig. 3-23) un ion molecular  $M^+ = 438$  concordante con una fórmula molecular condensada  $C_{31}H_{50}O$ , con un IDH = 7 indicando la presencia de 7 insaturaciones, cuatro de las cuales se atribuyen al cierre de los anillos y las restantes a tres insaturaciones en la molécula. Entre sus fragmentos característicos se presentan:  $m/z$  438  $M^+$ ,  $m/z$  423 ( $M^+ - CH_3$ ),  $m/z$  405 ( $M^+ - CH_3 - H_2O$ ),  $m/z$  395 ( $M^+ - \text{Isop.}$ ),  $m/z$  355,  $m/z$  341,  $m/z$  313 ( $M^+ - CL$ ),  $m/z$  285 (Fisión entre C15-C16),  $m/z$  271 ( $m/z$  285 -  $CH_2$ ),  $m/z$  257 (Fisión anillo D),  $m/z$  239 ( $m/z$  257 -  $H_2O$ ),  $m/z$  219,  $m/z$  201 ( $m/z$  219 -  $H_2O$ ),  $m/z$  175 (Fisión anillo C -  $CH_3 - 2H$ ) y  $m/z$  147, fragmentos que, al igual que el compuesto anterior, indican un esteroide con núcleo Lanostano. La diferencia de 125 u.m.a entre el ion molecular y el fragmento a  $m/z$  313 permite establecer una cadena lateral insaturada  $C_9H_{17}$ , presentando un metilo más en la cadena lateral con respecto al compuesto anterior, en la posición C-24. Las insaturaciones se ubican en C-5, C-7 justificadas por los fragmentos a  $m/z$  271 y  $m/z$  257 y en el C-22 de la cadena lateral, debido a la señal a  $m/z$  327. Del análisis anterior y teniendo en cuenta las rutas biosintéticas de los metabolitos en los hongos, se propone como estructura del compuesto F<sub>ED1</sub>(VIII) El 24-metil-lanosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol, metabolito del cual no se

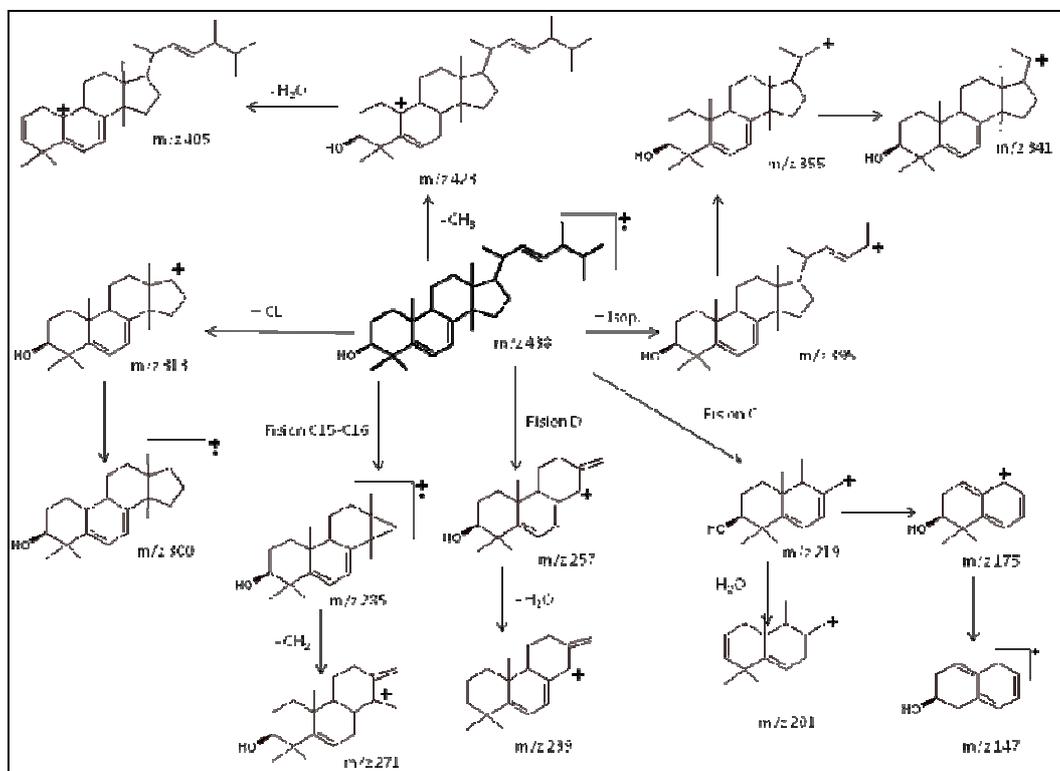
encontraron reportes previos en literatura. En el diagrama 3-5 presenta el patrón de fragmentación propuesto para este compuesto.

**Figura 3-22: Espectro de masas compuesto F<sub>EDI</sub>(VIII)**



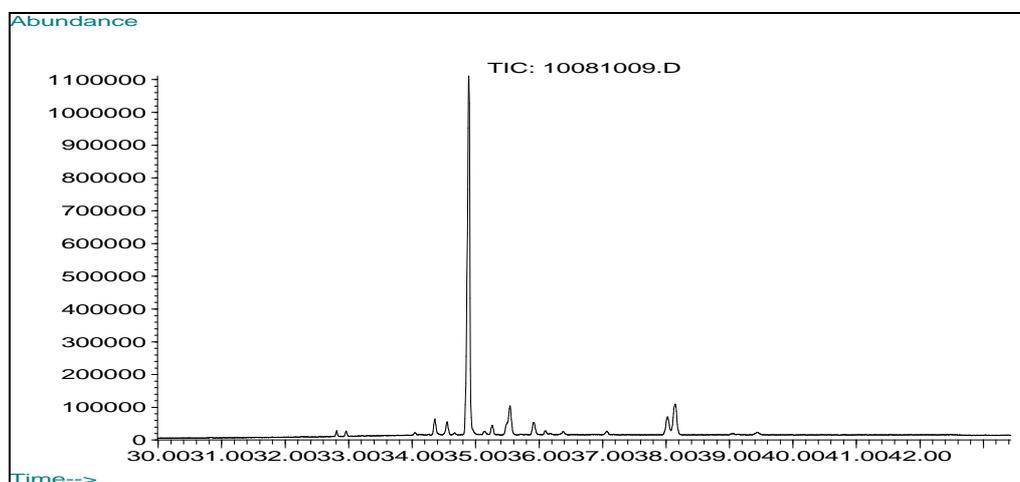
**24-metil-lanosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol**

**Diagrama 3-5: Fragmentación propuesta para el compuesto F<sub>ED1</sub>(IX)  
24-metil-lanosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol**



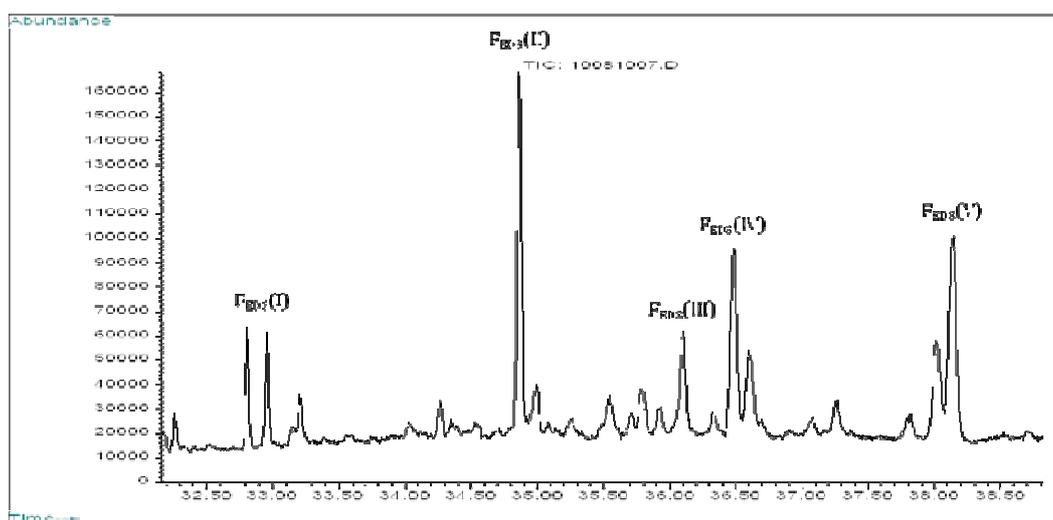
## ▪ FRACCIÓN F<sub>ED2</sub>

Esta fracción mostró en CCD una sola mancha al revelar con **CZ**. El análisis por CG-EM (Fig. 3-23) determinó la presencia de un componente mayoritario en la zona triterpenoidal a un tr = 34.900 min. El **EM** de este compuesto concuerda en su totalidad con el compuesto identificado en la fracción anterior como Ergosta-7,22-dien-3-ona.

**Figura 3-23: Cromatograma Fracción F<sub>ED2</sub>**

### ▪ **FRACCIÓN F<sub>ED3</sub>**

El cromatograma de esta fracción (Fig. 3-24) evidencia la presencia de 5 compuestos cuyos tiempos de retención y fragmentaciones corresponden a triterpenoides.

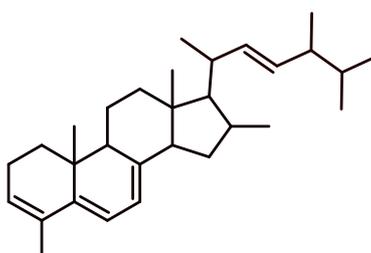
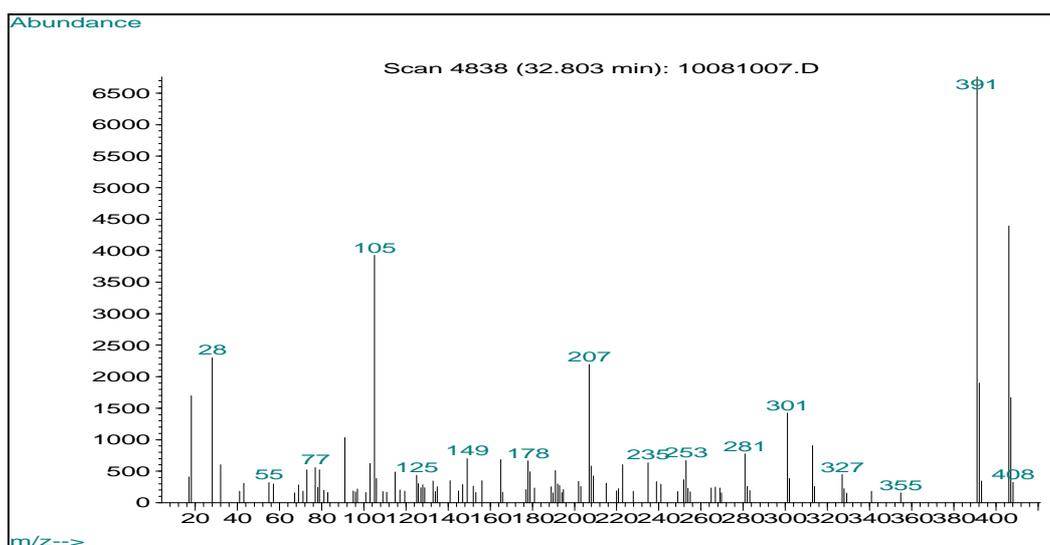
**Figura 3-24: Cromatograma Fracción F<sub>ED3</sub>**

## Compuesto F<sub>ED3</sub>(I)

El compuesto F<sub>ED3</sub>(I) aparece en el cromatograma de gases a un  $t_r = 32.803$  min. Su EM exhibe un ion molecular  $M^+ = 406$  u.m.a (Fig. 3-25), en concordancia con la fórmula molecular condensada C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>, con un IDH = 8, indicando 8 insaturaciones, donde 4 corresponden a los cierres de anillos y las restantes se deben a la presencia de 4 dobles enlaces en la molécula. Por la ausencia de señales que originan los fragmentos por pérdida de moléculas de agua, se presume que el compuesto posiblemente sea un triterpeno.

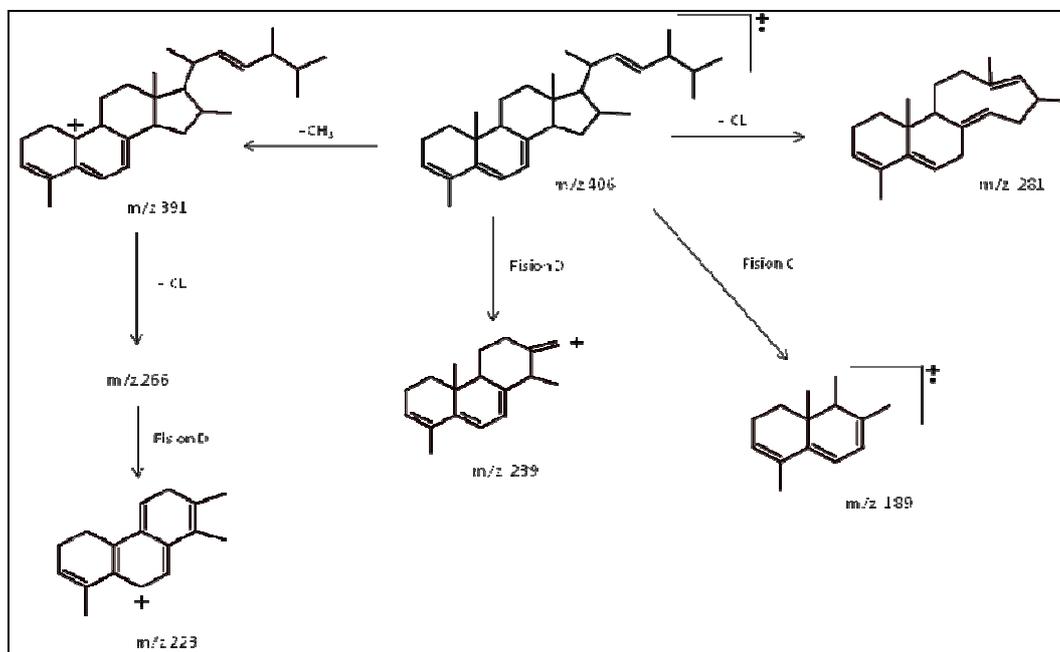
Los fragmentos característicos (Diagrama 3-6) se dan a  $m/z$  406 ( $M^+$ ),  $m/z$  391 ( $M^+ - CH_3$ ),  $m/z$  281 ( $M^+ - CL$ ),  $m/z$  266 ( $M^+ - CH_3 - CL$ ),  $m/z$  239 (Fisión anillo D), 223 (Fisión D - CH<sub>3</sub>) y  $m/z$  189 (Fisión anillo C). La diferencia de 125 u.m.a entre el pico molecular y el fragmento a  $m/z$  281 permite deducir la cadena lateral C<sub>9</sub>H<sub>17</sub> que presenta una insaturación en C22 confirmado por el pico a  $m/z$  301. Del análisis anterior y por comparación con literatura, el compuesto se identificó como el 4,16-dimetil-ergosta-3,5,7,22-tetraeno, reportado previamente en el basidiomiceto *Lycoperdon sp.* (Hernández 2007).

Figura 3-25: Espectro de masas compuesto F<sub>ED3</sub>(I)



4,16-dimetil-ergosta-3,5,7,22-tetraeno

**Diagrama 3-6: Fragmentación propuesta para el compuesto F<sub>ED3</sub>(I)  
4,16-dimetil-ergosta-3,5,7,22-tetraeno**



### Compuesto F<sub>ED3</sub>(II)

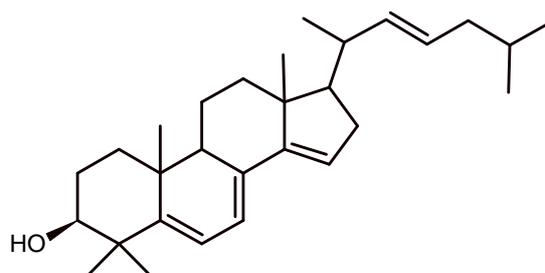
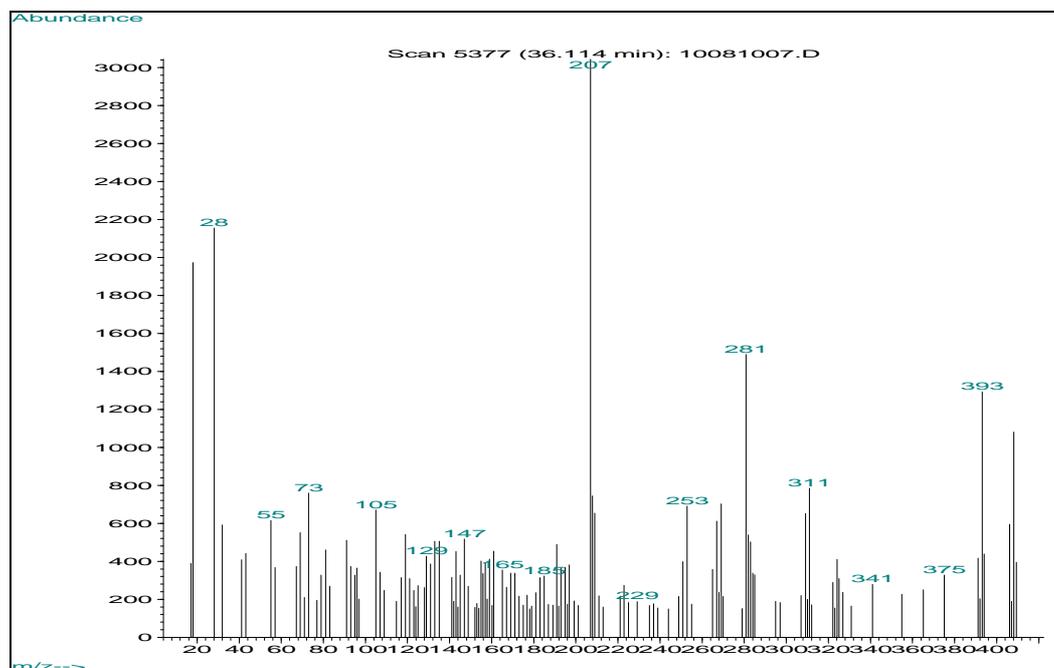
Este compuesto, el mayoritario de la fracción presenta un **EM** que coincide en su totalidad con el compuesto Ergosta-7,22-dien-3-ona identificado en la fracción anterior.

### Compuesto F<sub>ED3</sub>(III)

El compuesto F<sub>ED3</sub>(III) con un tr: 36.114 min, muestra en su **EM** (Fig. 3-26) un ion molecular  $M^+$  a  $m/z$  408 que es consistente con una fórmula condensada  $C_{29}H_{44}O$  con un IDH = 8, el cual está dado por el cierre de los cuatro anillos y cuatro dobles enlaces en la molécula. Entre los fragmentos característicos se encuentran:  $m/z$  408 ( $M^+$ ),  $m/z$  393 ( $M^+ - CH_3$ ),  $m/z$  390 ( $M^+ - H_2O$ ),  $m/z$  375 ( $M^+ - CH_3 - H_2O$ ),  $m/z$  365 ( $M^+ - \text{Isop.}$ ),  $m/z$  325,  $m/z$  311,  $m/z$  297 ( $M^+ - CL$ ), que indican la presencia de un estero con cadena lateral insaturada  $C_8H_{15}$ ; así como los iones a  $m/z$  281 ( $M^+ - CL - CH_3 - 2H$ ),  $m/z$  271 (Fisión entre C15 y C17 -  $CH_3$ ),  $m/z$  253 ( $m/z$  271 -  $H_2O$ ),  $m/z$  239 (Fisión D -  $H_2O$ ),  $m/z$  191 (Fisión anillo C),  $m/z$  185 (Fisión anillo C -  $H_2O - 2H$ ), y  $m/z$  159, los cuales permiten determinar la presencia de tres insaturaciones en los anillos, en las posiciones C-5, C-7 y C-14 respectivamente, así como también dos grupos metilo en la posición C-4. La insaturación restante se ubica en el C-22 de la cadena lateral justificada por la señal a  $m/z$  311. Del análisis anterior se propone como estructura más probable para el compuesto F<sub>ED3</sub>(III) el 4,4-dimetil-colesta-5,7,14,22-tetraen-3 $\beta$ -ol, metabolito del cual no se encontraron

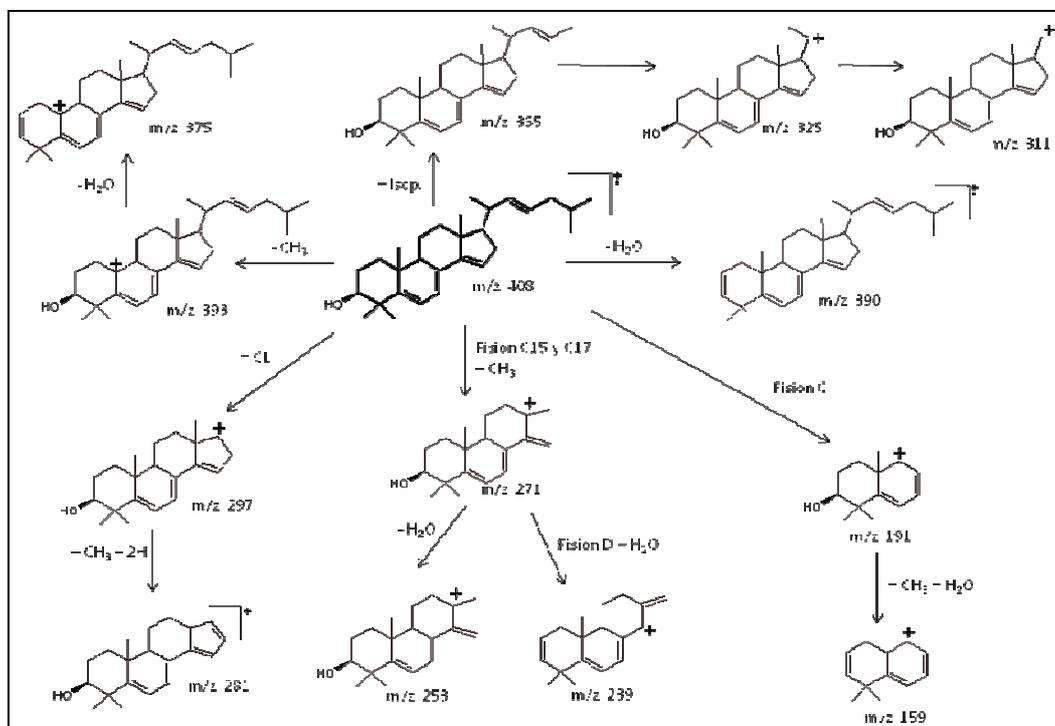
reportes previos en literatura. El diagrama 3-7 muestra la fragmentación propuesta para este compuesto.

**Figura 3-26: Espectro de masas compuesto F<sub>ED3</sub>(III)**



**4,4-dimetil-colesta-5,7,14,22-tetraen-3 $\beta$ -ol**

**Diagrama 3-7: Fragmentación propuesta para el compuesto F<sub>ED3</sub>(III)  
4,4-dimetil-colesta-5,7,14,22-tetraen-3 $\beta$ -ol**



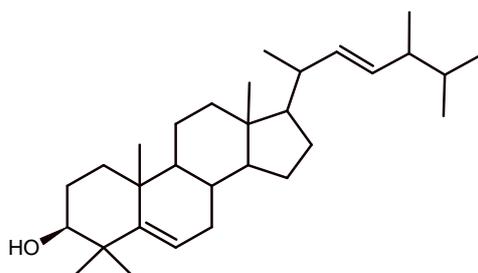
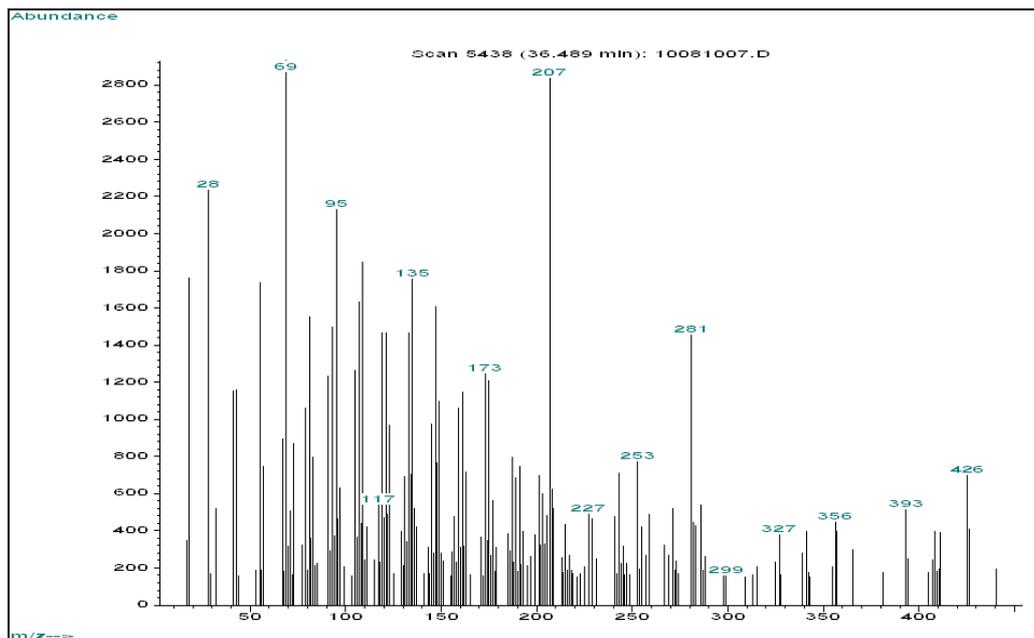
### Compuesto F<sub>ED3</sub>(IV)

El compuesto F<sub>ED3</sub>(IV) con un  $t_r = 36.489$  min. muestra en su EM (Fig. 3-27) un ion molecular  $M^+$  a  $m/z$  426 que es consistente con una fórmula condensada  $C_{30}H_{50}O$  con un IDH = 6, lo que permite establecer la presencia de 6 insaturaciones, cuatro de las cuales se pueden atribuir al cierre de los anillos y las dos restantes a dos dobles enlaces localizados en la molécula. Entre los fragmentos característicos se encuentran:  $m/z$  426 ( $M^+$ ),  $m/z$  408 ( $M^+ - H_2O$ ),  $m/z$  393 ( $M^+ - CH_3 - H_2O$ ),  $m/z$  356 ( $M^+ - C_5H_{11}$ ),  $m/z$  341 ( $M^+ - 85$ ),  $m/z$  327 y  $m/z$  299 ( $M^+ - Cl - 2H$ ), que permiten establecer un esteroide con cadena lateral insaturada. Los fragmentos a  $m/z$  281 ( $m/z$  299 -  $H_2O$ ),  $m/z$  273,  $m/z$  259 (Fisión anillo D - 2H),  $m/z$  255 ( $m/z$  273 -  $H_2O$ ),  $m/z$  241 (Fisión anillo D -  $H_2O - 2H$ ),  $m/z$  213,  $m/z$  207 (Fisión anillo C),  $m/z$  173 (Fisión C -  $CH_3 - H_2O - 2H$ ) son indicativos de que el núcleo esteroide presenta una insaturación en el carbono C-5 ( $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hidroxiandrosteno) y dos metilos en la posición C-4.

La diferencia entre el ion molecular  $M^+$  426 y el ion a  $m/z$  299 permitió establecer la composición de la cadena lateral, como  $C_9H_{17}$ , la cual presenta una insaturación en C-22 principalmente por la presencia de la señal a  $m/z$  327.

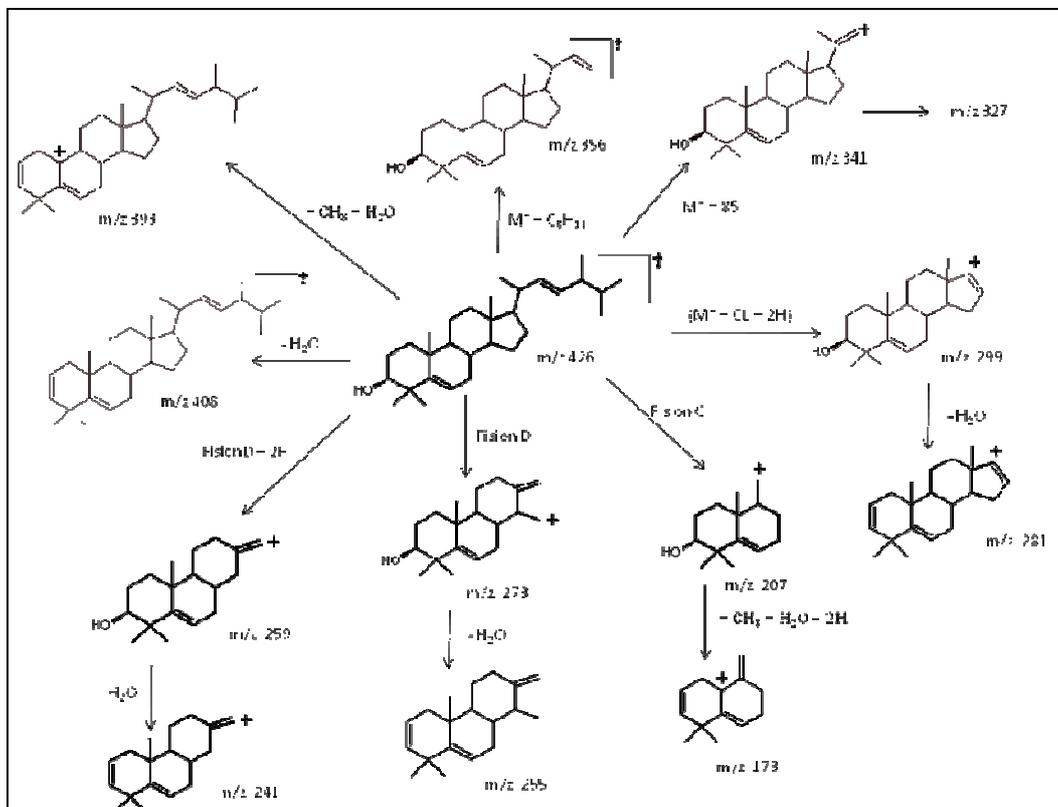
Por lo tanto, teniendo en cuenta el análisis anterior se propone como estructura probable para este compuesto el 4,4-dimetil-ergosta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol, del cual no se encontraron reportes previos en la bibliografía consultada. El diagrama 3-8 muestra el patrón de fragmentación propuesto para este compuesto.

**Figura 3-27: Espectro de masas compuesto F<sub>ED3</sub>(IV)**



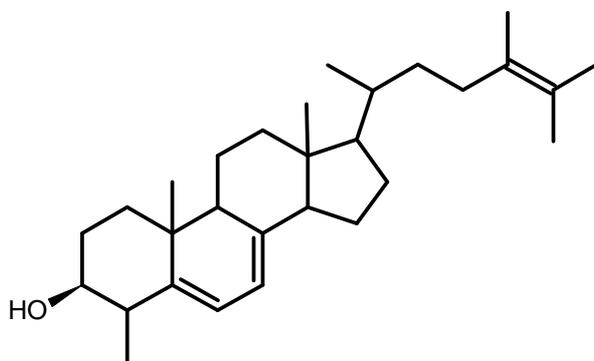
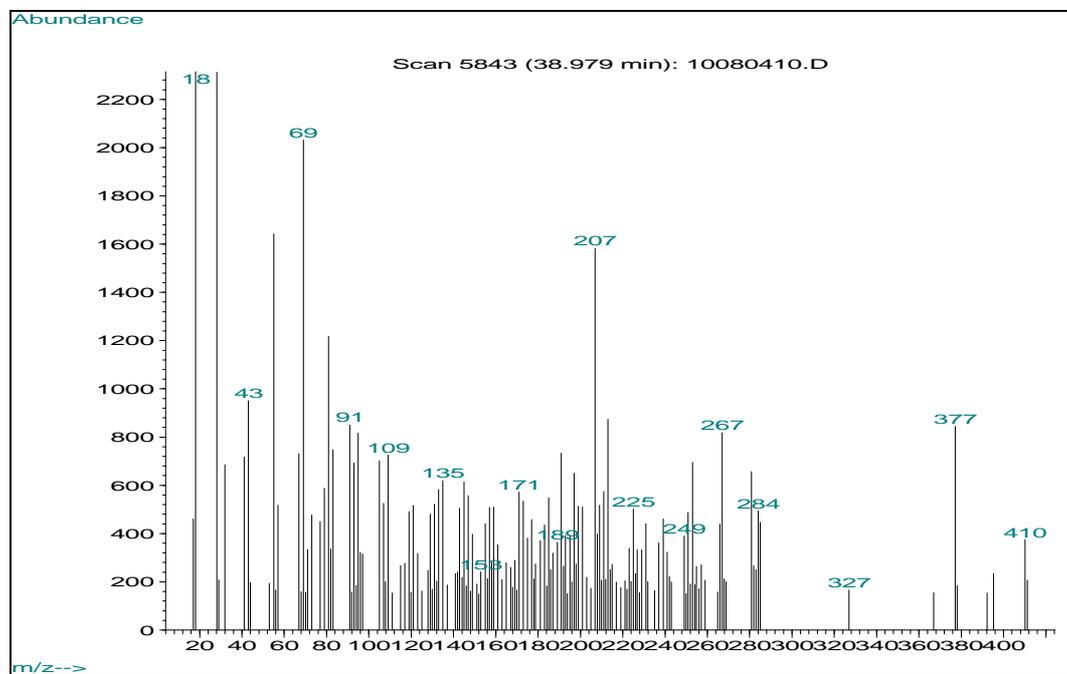
**4,4-dimetil-ergosta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol**

**Diagrama 3-8: Fragmentación propuesta para el compuesto F<sub>ED3</sub>(IV)  
4,4-dimetil-ergosta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol**

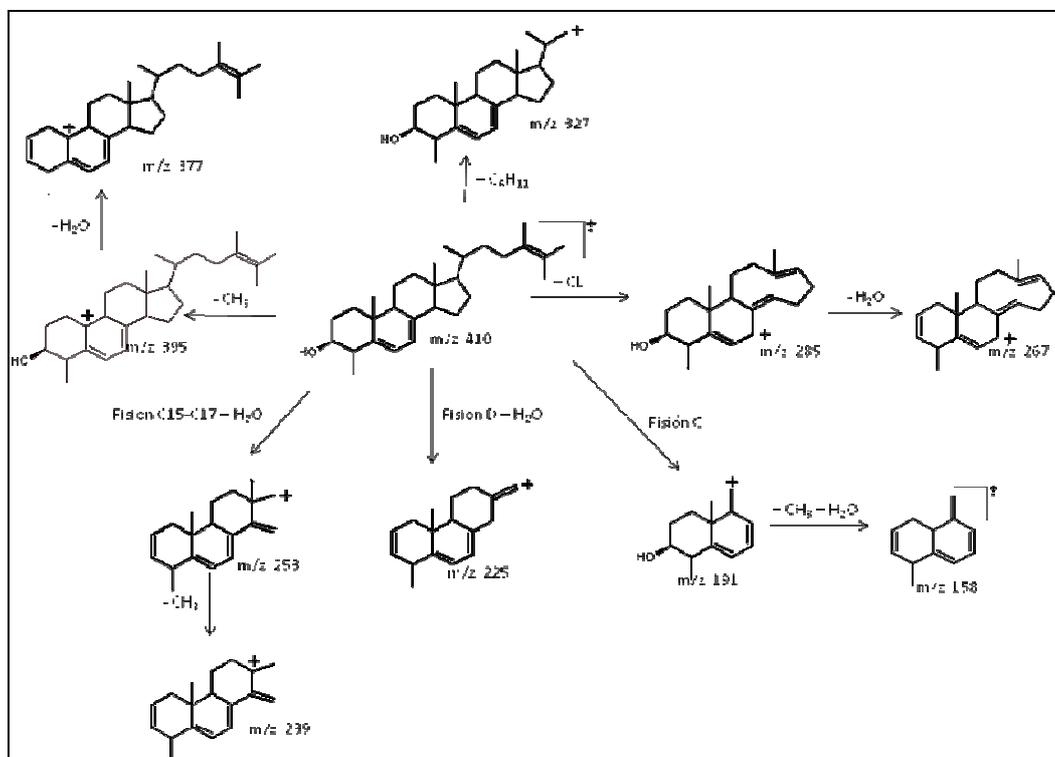


### Compuesto F<sub>ED3</sub>(V)

Este compuesto con un  $t_r = 38.141$  min. presenta en su **EM** (Fig. 3-28) un ion molecular de 410 u.m.a. concordante con una fórmula molecular  $C_{29}H_{46}O$  con un IDH = 7, indicando la presencia de 7 insaturaciones, de las cuales cuatro se atribuyen al cierre de los anillos y las tres restantes a dobles enlaces presentes en la molécula. Entre los fragmentos característicos se presentan:  $m/z$  410 ( $M^+$ ),  $m/z$  395 ( $M^+ - CH_3$ ),  $m/z$  392 ( $M^+ - H_2O$ ),  $m/z$  377 ( $M^+ - CH_3 - H_2O$ ),  $m/z$  327,  $m/z$  285 ( $M^+ - CL$ ), y  $m/z$  267 ( $M^+ - CL - H_2O$ ) característicos de esteroides con cadena lateral  $C_9H_{17}$  insaturada. Los iones a  $m/z$  253 (Fisión entre C15-C17 -  $H_2O$ ),  $m/z$  225 (Fisión anillo D -  $H_2O$ ),  $m/z$  191 (Fisión anillo C) y  $m/z$  158 (Fisión anillo C -  $CH_3 - H_2O$ ) permiten ubicar dos insaturaciones en los carbonos 5 y 7 ( $\Delta^{5,7}$ ) y un grupo metilo en el carbono 4. La presencia del fragmento a  $m/z$  327 ubica la insaturación restante en el carbono C-24 de la cadena lateral. Del análisis anterior se propone como estructura probable para el compuesto F<sub>ED3</sub>(V) el 4-metilergosta-5,7,24-trien-3 $\beta$ -ol, metabolito del cual no se encontraron reportes previos en literatura. El diagrama 3-9 ilustra el patrón de fragmentación propuesto para este compuesto.

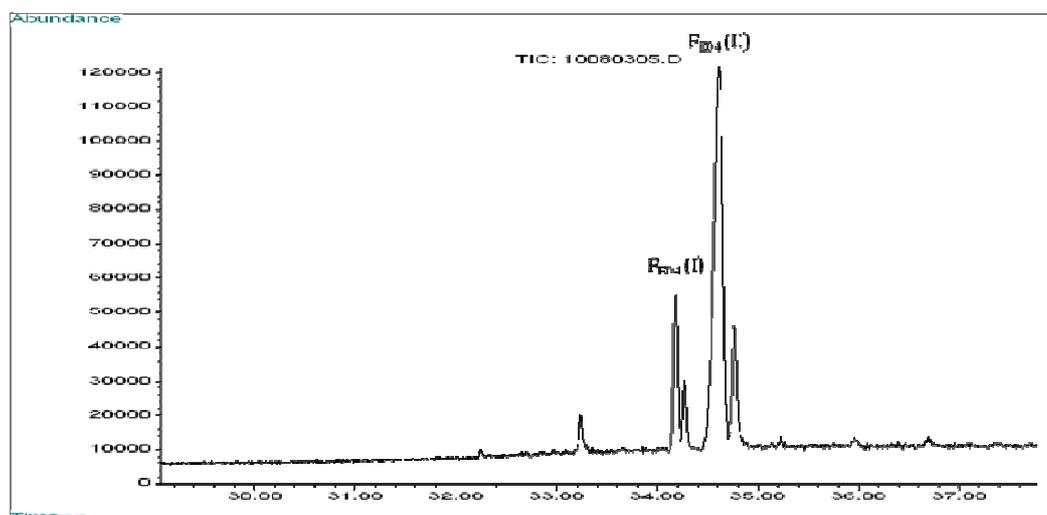
**Figura 3-28: Espectro de masas compuesto F<sub>ED3</sub>(V)****4-metil-ergosta-5,7,24-trien-3 $\beta$ -ol**

**Diagrama 3-9: Fragmentación propuesta para el compuesto F<sub>ED3</sub>(V)  
4-metil-ergosta-5,7,24-trien-3 $\beta$ -ol**



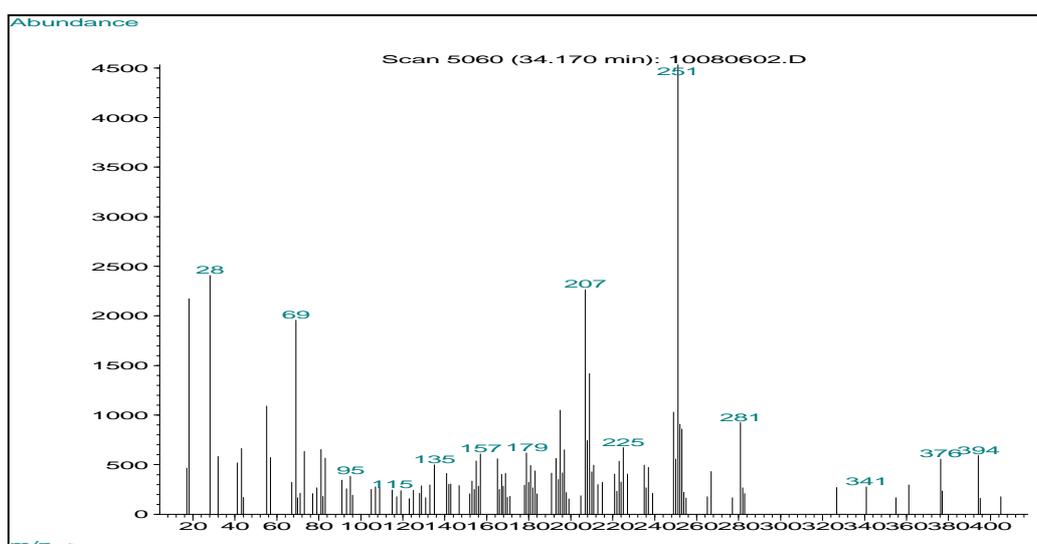
#### ▪ FRACCIÓN F<sub>ED4</sub>

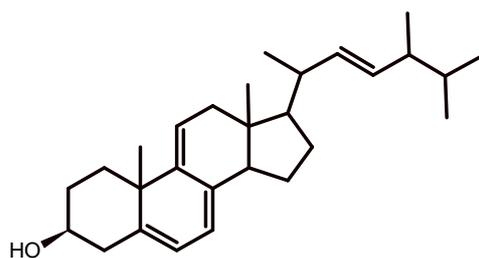
En esta fracción se presentan dos compuestos como claramente se aprecia en el cromatograma (Fig. 3-29), compuestos que se nombraron como F<sub>ED4</sub>(I) y F<sub>ED4</sub>(II) y se describen a continuación.

Figura 3-29: Cromatograma Fracción F<sub>ED4</sub>

### Compuesto F<sub>ED4</sub>(I)

El compuesto F<sub>ED4</sub>(I) con un  $t_r = 34.170$  min, muestra en su EM (Fig. 3-30) un ion molecular  $M^+$  a  $m/z$  394 que es consistente con una fórmula condensada  $C_{28}H_{42}O$ . Entre los fragmentos característicos del EM del compuesto se encuentran:  $m/z$  394 ( $M^+$ ),  $m/z$  376 ( $M^+ - H_2O$ ), 361 ( $M^+ - CH_3 - H_2O$ ),  $m/z$  269 ( $M^+ - CL$ ); así como un conjunto de fragmentos propios de núcleo  $\Delta^{5,7,9(11)}-3\beta$ -Hidroxiandrostatrieno, como lo son los picos a  $m/z$  251 ( $M^+ - CL - H_2O$ ),  $m/z$  209 (Fisión anillo D -  $H_2O$ ) y  $m/z$  141 (Fisión anillo C -  $H_2O - CH_3 - 2H$ ). El espectro coincide en su totalidad para el compuesto Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 $\beta$ -ol, reportado previamente en los Basidiomicetos *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum* (Chegwin 2007; Jaramillo 2009).

Figura 3-30: Espectro de masas compuesto F<sub>ED4</sub>(I)

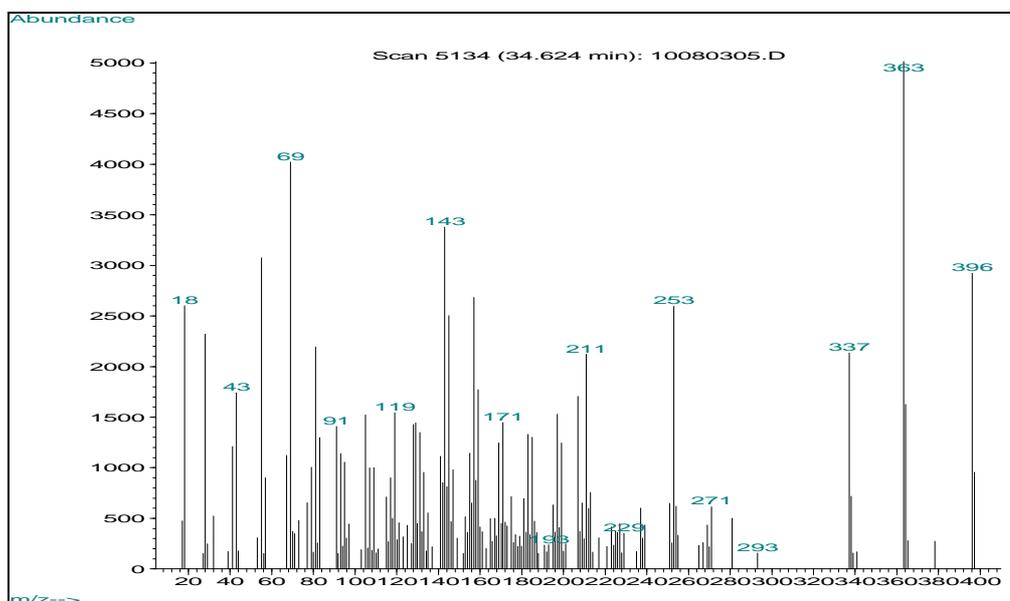


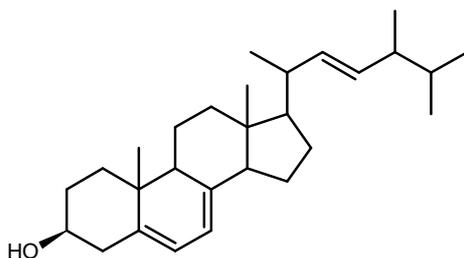
**Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol**

## Compuesto F<sub>ED4</sub>(II)

Este compuesto con un  $t_r = 34.624$  min. Presenta un ion molecular  $M^+ = 396$  u.m.a. consecuente con una fórmula molecular condensada  $C_{28}H_{44}O$  con un IDH = 7, indicando la presencia de 7 insaturaciones, de las cuales 4 se atribuyen al cierre de los anillos y las tres restantes a la presencia de tres dobles enlaces en la molécula. Su fragmentos característicos en **EM** (Fig. 3-31) se dan a:  $m/z$  396 ( $M^+$ ),  $m/z$  378 ( $M^+ - H_2O$ ),  $m/z$  363 ( $M^+ - CH_3 - H_2O$ ),  $m/z$  337,  $m/z$  271 ( $M^+ - CL$ ),  $m/z$  253 ( $M^+ - CL - H_2O$ ),  $m/z$  229 (Fisión anillo D),  $m/z$  211 (Fisión de anillo D -  $H_2O$ ) y  $m/z$  143 (Fisión anillo C -  $H_2O - CH_3$ ), que concuerdan en su totalidad con lo reportado (Cucaita 2007; Valencia 2002) para el compuesto Ergosta-5,7,22-trien-3β-ol (Ergosterol), el cual es el esteroil más abundante en hongos superiores.

**Figura 3-31: Espectro de masas compuesto F<sub>ED4</sub>(II)**





**Ergosta-5,7,22-trien-3β-ol**

### ▪ FRACCIÓN F<sub>ED5</sub>

El comportamiento cromatográfico en CCD de esta fracción mostraba una sola mancha que revelaba positivo frente a **CZ**, hecho que se confirma en **CG**, donde se aprecia un sólo compuesto nombrado como F<sub>ED5</sub>(I) (Fig. 3-32). Este compuesto presenta un tr = 34.776 min. Su **EM** presenta un ion molecular M<sup>+</sup> = 398 u.m.a (Fig. 3-33) y muestra un conjunto de iones típicos para esteroides del tipo 3-Hidroxi ergostano insaturado como son: m/z 383 (M<sup>+</sup> - CH<sub>3</sub>), m/z 355 (M<sup>+</sup> - isop.), m/z 271 (M<sup>+</sup> - CL - 2H), m/z 255 (M<sup>+</sup> - CL - H<sub>2</sub>O), m/z 231 (M<sup>+</sup> - CL - Fisión D - H) y m/z 213 (M<sup>+</sup> - CL - Fisión D - H - H<sub>2</sub>O). La insaturación debe estar ubicada en C-7 debido a la presencia del ion a m/z 246, el cual es diagnóstico de núcleos Δ<sup>7</sup>-3-Hidroxiandrosteno. Los iones a m/z 273 (M<sup>+</sup>-CL) y m/z 271 (M<sup>+</sup> - CL - 2H) originados en la pérdida de 125 y 127 u.m.a respectivamente, indican la presencia de una insaturación en la cadena lateral, específicamente en C-22 ya que está presente el fragmento de m/z 300 (M<sup>+</sup> - C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>). Del análisis anterior y por comparación con lo reportado, el compuesto se identificó como Ergosta-7,22-dien-3β-ol, metabolito identificado en los hongos basidiomicetos *Ganoderma applanatum* (Valencia 2002), *Lentinula edodes* (Benavides 2004), *Lycoperdon sp.* (Hernández 2007), *Suillus luteus* (Ávila 2007), *Auricularia auricula-judae* (Serrano 2009) y *Ganoderma lucidum* (Jaramillo 2009).

**Figura 3-32: Cromatograma Fracción F<sub>ED5</sub>**

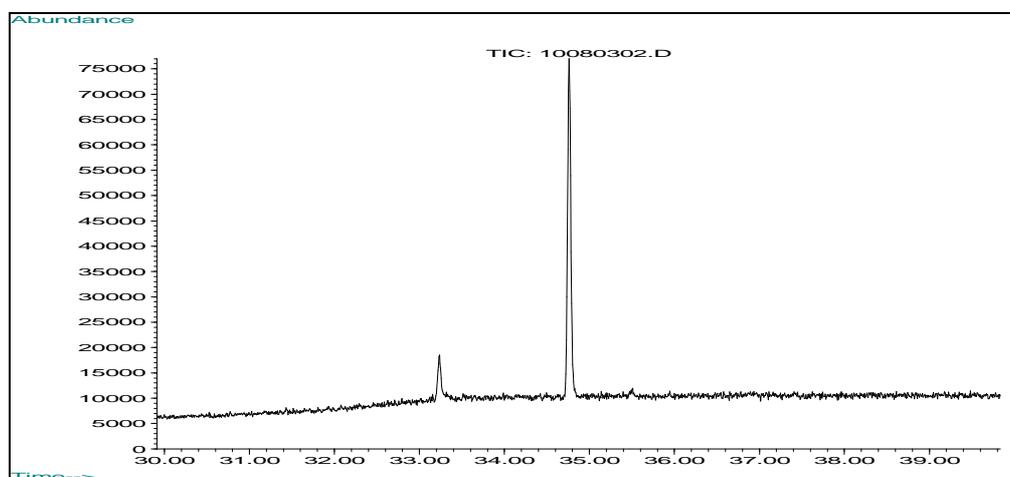
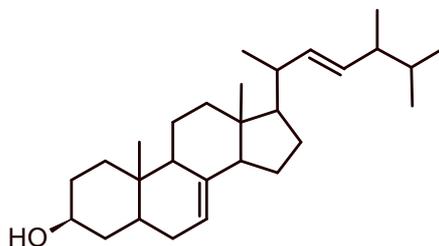
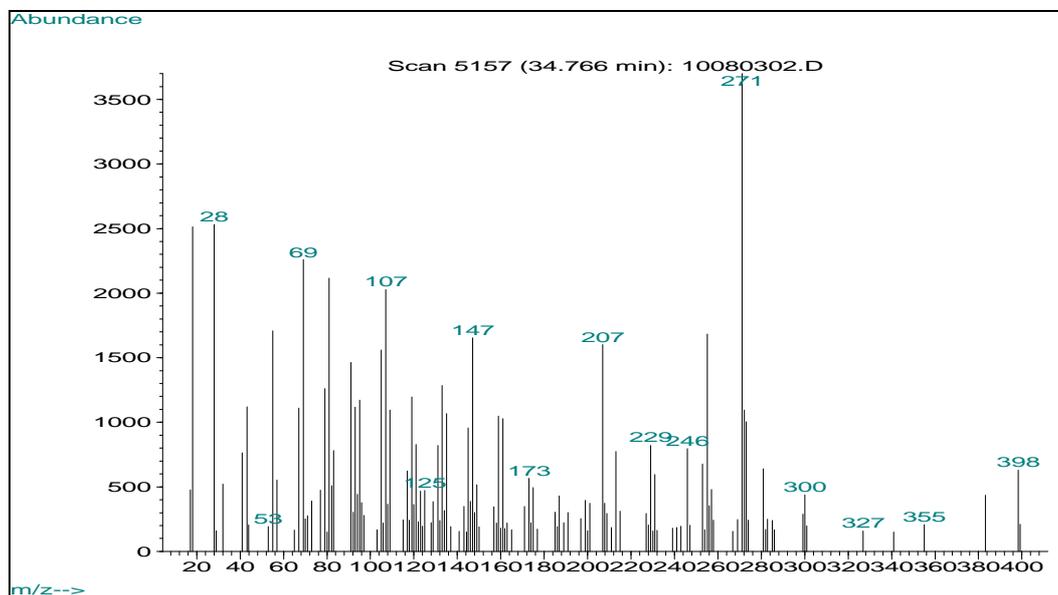
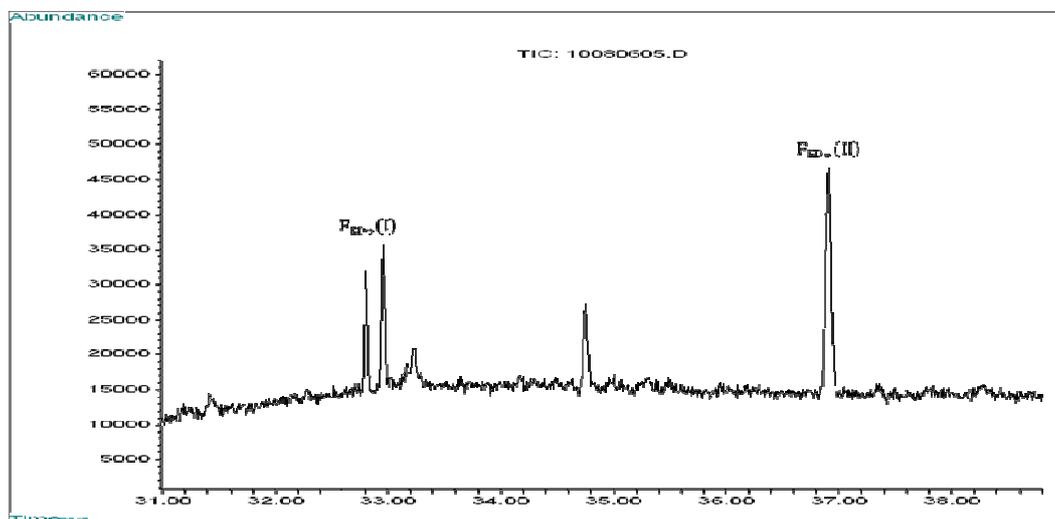


Figura 3-33: Espectro de masas compuesto F<sub>ED5</sub>(I)Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol

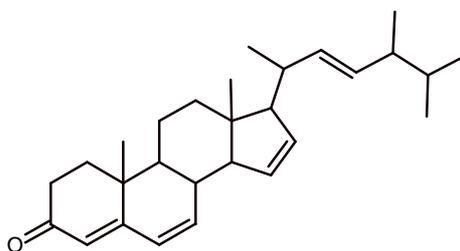
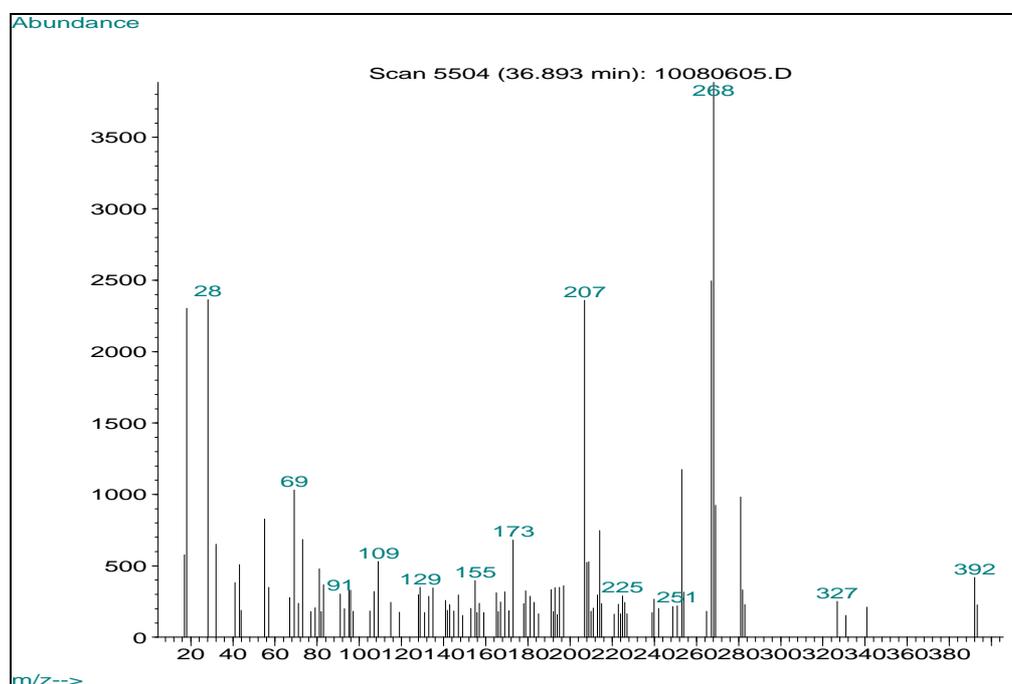
#### ▪ FRACCIÓN F<sub>ED6</sub>

El cromatograma de esta fracción (Fig. 3-34) muestra dos compuestos, uno denominado F<sub>ED6</sub>(I) con un tr = 32.791 min y cuyo EM coincide en su totalidad con el compuesto identificado como 4,16-dimetilergosta-3,5,7,22-tetraeno, y el compuesto mayoritario de la fracción denominado F<sub>ED6</sub>(II) se describe a continuación.

**Figura 3-34: Cromatograma Fracción F<sub>ED6</sub>**

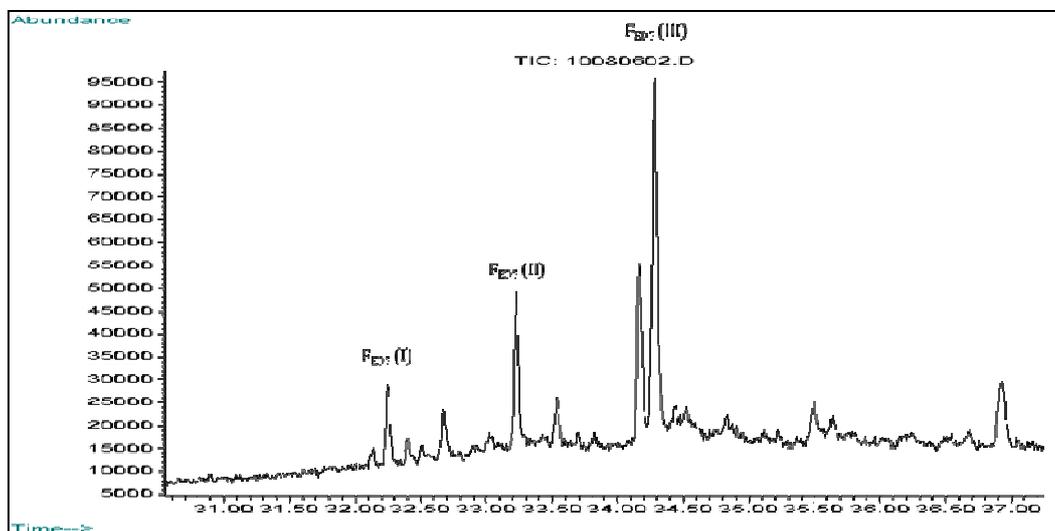
### Compuesto F<sub>ED6</sub>(II)

Este compuesto presenta un  $t_r = 36.893$  min y un patrón de fragmentación característico de un núcleo tipo ergostano (Fig. 3-35). Su ion molecular  $M^+ = 392$  u.m.a consistente con la fórmula molecular condensada  $C_{28}H_{40}O$  y un IDH = 9, que se explican por la presencia de cuatro anillos y cinco insaturaciones en la molécula. La ausencia de picos atribuibles a pérdida de agua, hace pensar que el compuesto presente una función carbonilo de tipo cetona como el compuesto F<sub>ED1</sub>(V). Entre sus fragmentos característicos se encuentran:  $m/z$  392 ( $M^+$ ),  $m/z$  293,  $m/z$  268 ( $M^+ - CL$ ),  $m/z$  253 ( $M^+ - CL - CH_3$ ),  $m/z$  251 ( $m/z$  253 - 2H),  $m/z$  240 (Fisión anillo D),  $m/z$  173 (Fisión anillo C) que concuerdan en su totalidad con lo reportado para el compuesto Ergosta-4,6,15(16),22-tetraen-3-ona, metabolito aislado en *Pleurotus sajor-cajú* (Chewing 2005) y *P. ostreatus* (Chegwin 2007).

**Figura 3-35: Espectro de masas compuesto F<sub>ED6</sub> (I)****Ergosta-4,6,15(16),22-tetraen-3-ona**

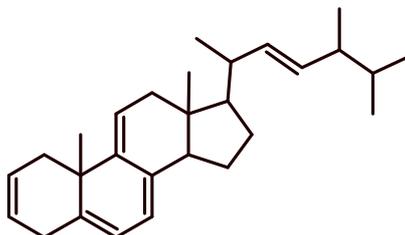
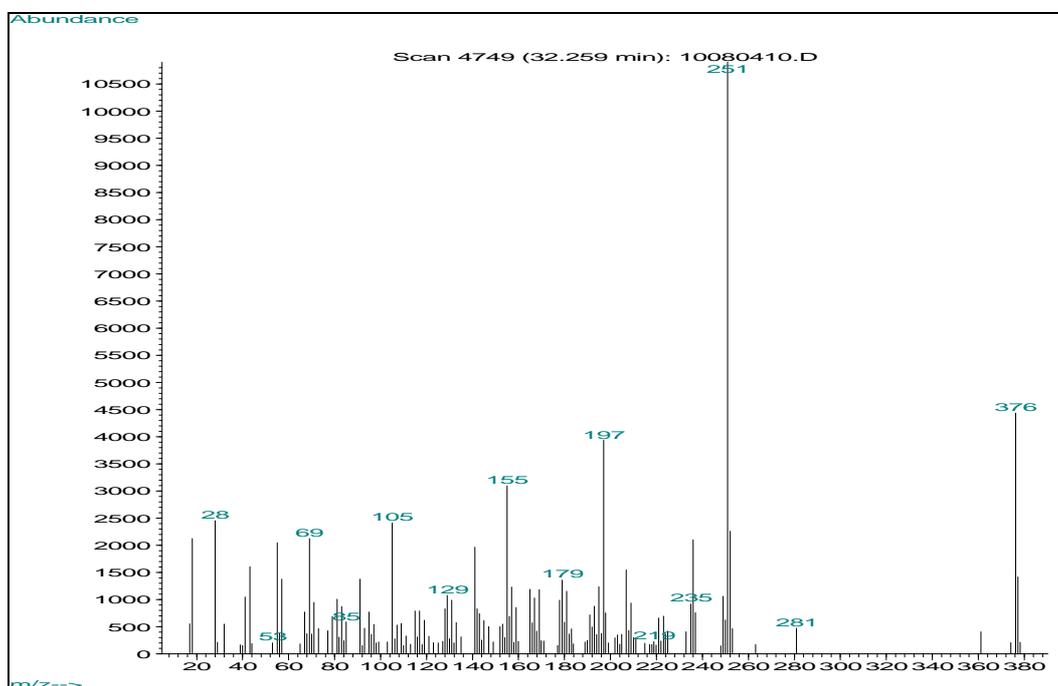
#### ▪ **FRACCIÓN F<sub>ED7</sub>**

En el cromatograma de esta fracción (Fig. 3-36) se aprecian tres compuestos cuyas fragmentaciones y tiempos de retención hace pensar en compuestos triterpenoidales.

Figura 3-36: Cromatograma Fracción F<sub>ED7</sub>

### Compuesto F<sub>ED7</sub>(I)

Este compuesto, con un  $t_r = 32.436$  min. presenta en su **EM** un ion molecular  $M^+ = 376$  u.m.a. (Fig. 3-37), el cual concuerda con una fórmula molecular  $C_{28}H_{40}$ , con un IDH = 9, dado por el cierre de los cuatro anillos y cinco dobles enlaces ubicados en la molécula. Sus fragmentaciones y la ausencia de los picos que originan los fragmentos por pérdida de moléculas de agua, permiten inferir que el compuesto correspondería a un triterpeno. Los fragmentos característicos se dan a  $m/z$  361 ( $M^+ - CH_3$ ),  $m/z$  251 ( $M^+ - CL$ ) intenso, el cual es diagnóstico para esteroides  $\Delta^{5,7,9(11)}$ , 236 ( $M^+ - CL - CH_3$ ), así como los picos a  $m/z$  209 (Fisión anillo D - 2H),  $m/z$  197 (Fisión D -  $CH_3$ ), 157 (Fisión anillo C) y  $m/z$  141 (Fisión anillo C -  $CH_3$ ). Por el análisis anterior y por comparación con literatura, este compuesto se identificó como Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno, reportado previamente para *Ganoderma lucidum* (Jaramillo 2006), *Pleurotus ostreatus* (Chegwin 2007), *Lycoperdon sp.* (Hernández 2007) y *Auricularia auricula-judae* (Serrano 2009).

Figura 3-37: Espectro de masas compuesto F<sub>ED7</sub> (I)

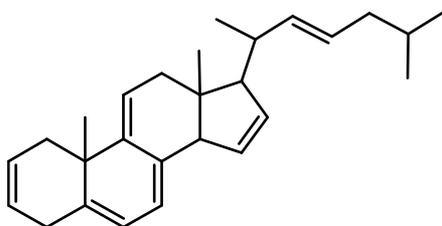
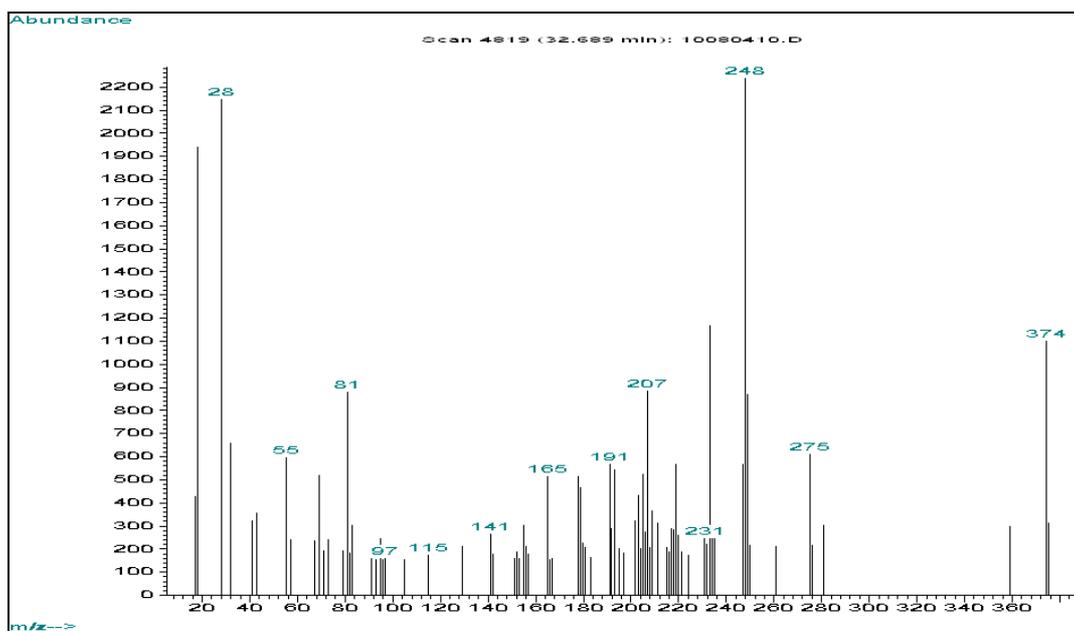
Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno

### Compuesto F<sub>ED7</sub>(II)

El compuesto F<sub>ED7</sub>(II) aparece en el cromatograma de gases a un tr = 32,671. Su EM presenta un ion molecular M<sup>+</sup> = 374 u.m.a (Fig. 3-38), que corresponde a una fórmula molecular condensada C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>, con un IDH = 10. Según su patrón de fragmentación y la ausencia de los picos que originan los fragmentos por pérdida de moléculas de agua, se puede inferir que, al igual que el compuesto anterior, se trata de un triterpeno. Los fragmentos característicos se dan a m/z 374 (M<sup>+</sup>), m/z 359 (M<sup>+</sup> - CH<sub>3</sub>), m/z 275 (M<sup>+</sup> - C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>), m/z 249 (M<sup>+</sup> - CL), m/z 248 (M<sup>+</sup> - CL - H), m/z 234 (M<sup>+</sup> - CL - CH<sub>3</sub>), m/z 219 (m/z 234 - CH<sub>3</sub>), y m/z 209 (Fisión anillo D - CH<sub>3</sub>). De la presencia de estas fragmentaciones y su comparación con datos de literatura, el compuesto se identificó como

el Ergosta-2,5,7,9(11),14,22-hexaeno, reportado previamente en los basidiomicetos *Pleurotus ostreatus* (Chegwin 2007), *Suillus luteus* (Ávila 2007), *Auricularia auricula-judae* (Serrano 2009) y *Ganoderma lucidum* (Jaramillo 2009).

**Figura 3-38: Espectro de masas compuesto F<sub>ED7</sub> (II)**



**Ergosta-2,5,7,9(11),14,22-hexaeno**

### **Compuesto F<sub>ED7</sub> (III)**

Este compuesto, el mayoritario de la fracción, presenta un tiempo de retención y EM idéntico al compuesto identificado como Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 $\beta$ -ol.

La Tabla 3-3 recopila los metabolitos triterpenoidales propuestos en el extracto de la partición en diclorometano del extracto metanólico crudo obtenido del cuerpo fructífero del hongo basidiomiceto silvestre colombiano *Fomitopsis sp.* Dado que es el primer estudio sobre este hongo, todos los metabolitos son reportados por primera vez.

Como se puede ver, de las estructuras dadas a los compuestos triterpenoidales presentes en las fructificaciones del hongo estudiado corresponden al núcleo Lanosta y Ergosta, en contraste con lo encontrado en *Ganoderma lucidum* cultivada por FEL, en el cual los componentes mayoritarios corresponden a núcleos Ergosta y Colesta (Jaramillo 2009). De este resultado se puede deducir que posiblemente la actividad biológica, en cuanto a acción antimicrobiana, puede ser algo diferente a la presentada por la *Ganoderma* empleada como patrón de comparación de bioactivos durante la investigación.

**Tabla 3-3: Metabolitos triterpenoidales presentes en el extracto de la partición en diclorometano del extracto metanólico obtenido del cuerpo fructífero del hongo basidiomiceto colombiano *Fomitopsis sp.***

Nombre	Fórmula molecular	Tr. (min)	M <sup>+</sup>	IDH	Fragmentos característicos EM(IR) <sup>†</sup>
Lanosta-2,5,7,22-tetraeno	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub>	34.598	<b>406</b>	8	406(47); 391(38,5); 363(36,3); 322(100); 309(90,9); 307(82,4); 295(34,5); 267(70,6); 253(3); 225(11); 185(28,1); 157(30,1); 128(13,9)
Ergosta-7,22-dien-3-ona	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O	35.126	<b>396</b>	7	396(7,9); 381(2,5); 353(4,5); 325(1,2); 298(15,7); 271(25); 269(100); 246(10,8); 229(14,1); 175(7,9); 161(15,2); 147(22,3)
Lanosta-2,5,7,24-tetraeno	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub>	36.612	<b>406</b>	8	406(100); 391(82,8); 363(24); 335(7,6); 309(62,9); 295(26,7); 281(25,4); 267(66,8); 253(3,2); 225(10,4); 185(19,7); 157(27,1); 129(18,3)
Lanosta-5,7,24-trien-3β-ol	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O	36.870	<b>424</b>	7	424(22,2); 409(16,5); 355(7,3); 341(9,1); 313(26); 271(6,3); 253(5,3); 245(29,5); 205(100); 191(35,2); 188(73,8); 175(33); 121(72,2); 95(90,3)
24-metil-lanosta-5,7,22-trien-3β-ol	C <sub>31</sub> H <sub>50</sub> O	37.779	<b>438</b>	7	438(24,1); 423(17); 405(1,3); 395(17,2); 355(13,9); 341(11,3); 313(24,7); 285(9); 271(11,7); 257(14,4); 239(2,5); 219(19,7); 201(26,8); 175(45,9); 147(63,6); 121(72,6); 107(71); 95(100)
4,16-dimetilergosta-3,5,7,22-tetraeno	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub>	32.803	<b>406</b>	8	406(64,9); 391(100); 301(21); 281(11,4); 266(3,6); 239(4,9); 223(8,9); 189(3,7); 178(9,8); 149(10,3); 125(6,4); 105(58)
4,4-dimetil-colesta-5,7,14,22-tetraen-3β-ol	C <sub>29</sub> H <sub>44</sub> O	36.114	<b>408</b>	8	408(72,5); 393(86,7); 390(27,9); 375(21,9); 365(16,7); 325(20,7); 311(52,7); 297(12,2); 281(100); 271(14,4); 253(46,3); 239(10,4); 191(32,8); 185(21,6); 159(27,6)

<sup>†</sup>Intensidad Relativa en porcentaje.

**Tabla 3-3 (continuación): Metabolitos triterpenoidales presentes en el extracto de la partición en diclorometano del extracto metanólico obtenido del cuerpo fructífero del hongo basidiomiceto colombiano *Fomitopsis* sp.**

Nombre	Fórmula molecular	Tr (min)	M <sup>+</sup>	IDH	Fragmentos característicos EM(IR) <sup>†</sup>
4,4-dimetil-ergosta-5,22-dien-3β-ol	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	36.489	<b>426</b>	6	426(13,9); 408(13,4); 393(17,4); 356(15,2); 341(13,4); 327(12,8); 299(5,2); 281(49,5); 273(8,1); 259(16,6); 255(14,4); 241(16,3); 213(8,7); 207(96,6); 173(42,4); 135(59,7); 121(50); 95(72,5); 69(100).
4-metil-ergosta-5,7,24-trien-3β-ol.	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O	38.141	<b>410</b>	7	410(18,4); 395(11,5); 392(7,5); 377(41,5); 327(8,1); 285(21,9); 267(40,2); 253(34,2); 225(24,6); 191(36); 158(13,7); 135(30,4); 109(35,6); 91(41,8); 69(100).
Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> O	34.170	<b>394</b>	8	394(13); 376(12,2); 361(6,5); 269(9,5); 251(100); 209(31,2); 179(13,6); 157(13,3); 141(9,1); 135(10,9); 69(43,1).
Ergosta-5,7,22-trien-3β-ol	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O	34.624	<b>396</b>	7	396(58,2); 378(5,4); 363(100); 337(42,5); 271(12,2); 253(51,7); 229(7); 211(42,2); 171(28,8); 143(67,3); 119(30,7); 69(80,1).
Ergosta-7,22-dien-3β-ol	C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O	35.018	<b>398</b>	6	398(17); 383(11,7); 355(5,5); 327(4,2); 300(11,8); 273(27,1); 271(100); 255(45,5); 246(21,4); 231(16,1); 213(21); 147(44,6); 107(54,7); 69(61).
Ergosta-4,6,15(16),22-tetraen-3-ona	C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> O	36.892	<b>392</b>	9	392(10,7); 341(5,4); 327(6,4); 281(25,2); 268(100); 267(64,2); 253(30,2); 251(5,6); 240(6,8); 225(7,4); 173(17,5); 155(10,1); 129(8,9); 109(13,6); 69(26,5).
Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno	C <sub>28</sub> H <sub>38</sub>	32.436	<b>376</b>	9	376(40,7); 361(3,7); 251(100); 236(19,2); 209(8,6); 197(36,1); 157(11,2); 141(18); 129(9,8); 105(22,1); 69(19,5).
Ergosta-2,5,7,9(11),14,22-hexaeno	C <sub>28</sub> H <sub>40</sub>	32.671	<b>374</b>	10	374(51,8); 359(11,1); 275(28,1); 249(38,5); 248(100); 234(14); 233(43,7); 219(25); 209(15,7); 191(25,5); 165(23,1); 141(17,1); 115(7,3); 81(48,9); 55(38,6).

<sup>†</sup>Intensidad Relativa en porcentaje.

Compuestos lanostánicos altamente oxidados se han reportado en especies del género *Fomitopsis*, destacándose ácidos pinicolicos, ácidos fomitopsicos y alcoholes lanostánicos polihidroxilados (Popova *et al.*, 2009; Petrova *et al.*, 2007; Rösecke; König 1999; Keller *et al.*, 1996). No obstante, para el hongo estudiado no se presentan compuestos similares, por el contrario hay total ausencia de funciones oxigenadas (aparte del grupo hidróxilo propio de los esteroides) en las estructuras de los metabolitos triterpenoidales identificados.

Por otra parte, los compuestos con núcleo Lanosta reportados en el presente estudio representan el 26% del total de esteroides y triterpenoides, en contraste con lo reportado en otros *Fomitopsis* en donde compuestos de igual núcleo representan casi el 100% de los triterpenoides identificados, como en el caso de *F. pinicola* (Keller et al., 1996; Rösecke; König 1999) y *F. rosea* (Popova et al., 2009). No se descarta el hecho de que al alcanzar la madurez, éste hongo produzca una mayor variedad de triterpenoides derivados del Lanosterol, teniendo en cuenta que, por ejemplo, se reporta que en el hongo *F. pinicola*, un hongo Basidiomiceto saprófito de madera, similar al hongo *Fomitopsis sp.*, la concentración de compuestos triterpenoidales con núcleo Lanostánico aislados del extracto metanólico difiere significativamente en aquellos especímenes maduros que presentan corteza a aquellas especies muy jóvenes que aún no la poseen; en éstos últimos, la concentración y variedad de triterpenoides es inferior con respecto al hongo en estado de madurez (Rösecke; König 2000).

### 3.3 Ensayos de actividad antimicrobiana

Los ensayos de actividad antimicrobiana se realizaron empleando el extracto metanólico crudo y el extracto obtenido de la partición en diclorometano del extracto metanólico del cuerpo fructífero del hongo *Fomitopsis sp.* utilizando la técnica de difusión en agar por pozo como se explicó en el numeral 2.5. Los microorganismos utilizados en los ensayos fueron los que generalmente se emplean para esta clase de procedimientos. Se tuvo en cuenta lo reportado por Lee et al. en 2004 en cuanto a las zonas de inhibición y la respuesta de las muestras a ensayar ya que estos autores clasifican según la actividad antibacteriana en: respuesta muy fuerte (diámetro de la zona de inhibición  $\geq 30$  mm); respuesta fuerte (diámetro de zona de inhibición de 21-29 mm); respuesta moderada (diámetro de zona de inhibición de 16-20 mm); respuesta leve (de zona de inhibición de 10-15 mm) y pequeña respuesta (de zona de inhibición  $\leq 10$  mm).

Las Tablas 3-4 y 3-5 presentan los resultados del ensayo de actividad antimicrobiana, las concentraciones y los microorganismos empleados.

**Tabla 3-4: Actividad antimicrobiana del extracto metanólico obtenidos a partir del cuerpo fructífero del hongo Colombiano *Fomitopsis sp.***

E.C.M. <sup>a</sup>	Microorganismos ensayados <sup>b</sup>						
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pne.</i>	<i>P. aer</i> ATCC 27853	<i>S. ent</i> CA	<i>S. mar</i>	<i>S. aur</i> ATCC 25923	<i>S. aur</i> ATCC29213
1000 µg/mL	--	--	--	--	--	ZD*	ZD
2000 µg/mL	--	--	--	--	--	10.4 <sup>†</sup>	10.2
4000 µg/mL	--	--	--	--	--	10.6	10.1

**Tabla 3-5: Actividad antimicrobiana del extracto obtenido por partición en diclorometano del extracto metanólico del cuerpo fructífero del hongo Colombiano *Fomitopsis sp.***

E.P.D. <sup>a</sup>	Microorganismos ensayados <sup>b</sup>						
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pne.</i>	<i>P. aer</i> ATCC 27853	<i>S. ent</i> CA	<i>S. mar</i>	<i>S. aur</i> ATCC 25923	<i>S. aur</i> ATCC29213
1000 µg/mL	--	--	--	--	--	--	ZD
2000 µg/mL	--	--	--	--	--	8.8	9.2
4000 µg/mL	--	--	--	--	--	9.3	9.7

- a. E. C. M: extracto crudo metanólico  
E. P. D: extracto proveniente de la partición en diclorometano del extracto crudo metanólico.

- b. *E. coli*: *Escherichia coli* ATCC 25922  
*K. pne*: *Klebsiella pneumoniae*  
*P. aer*: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853  
*S. ent*: *Salmonella enteritidis* cepa ambiental  
*S. mar*: *Serratia marcescens*  
*S. aur*: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923  
*S. aur*: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

\* ZD: zona difusa

<sup>†</sup> Halos de inhibición medidos en mm ± 0.1

-- Sin zona de inhibición

Como demuestran los resultados, la respuesta antimicrobiana de los extractos evaluados obtenidos a partir del análisis químico del cuerpo fructífero del hongo *Fomitopsis sp.* fue positiva frente a bacterias Gram-positivas (*S. aureus*) siendo el extracto metanólico crudo el que presentó mejor respuesta (halo de inhibición de 10.2 y 10.1 respectivamente) frente a la cepa ATCC 25923, y negativa frente a microorganismos Gram-negativos ensayados.

Estos resultados concuerdan con lo reportado en literatura (Tabla 3-6) para hongos Basidiomicetos, cuyos extractos y/o fracciones han sido evaluados frente a bacterias Gram

positivas y negativas similares, empleando el método de difusión en agar por pozo. En dichos resultados, se observa que la tendencia a la respuesta antimicrobiana es significativamente marcada frente a *Staphylococcus aureus* más que a otras bacterias.

**Tabla 3-6: Actividades antimicrobianas reportadas para hongos Basidiomicetos**

HONGO	Extracto	Conc. Evaluada (mg/mL)	Microorganismos evaluados y zona de Inhibición (mm) <sup>a</sup>						Referencia
			<i>E. coli</i>	<i>K. pne</i>	<i>P. aur</i>	<i>S. ent</i>	<i>S. mar</i>	<i>S.a</i>	
<i>Lepista nuda</i>	MeOH	25	14.6	6.0	14.7	NE <sup>b</sup>	NE	16.0	Dulguera 2002
<i>Armillaria mellea</i>	Acuoso	100	9.0	NE	9.3	NE	NE	14.3	Imtiaj, et al., 2007
	EtOH	12	10	NE	NE	NE	NE	10	
	CH <sub>3</sub> Cl	12	0	NE	NE	NE	NE	0	Kalyoncu 2008
<i>Clitocybe geotropa</i>	EtOH	6	8	NE	NE	NE	NE	14	Kalyoncu 2008
	CH <sub>3</sub> Cl	12	0	NE	NE	NE	NE	0	
<i>Meripilus giganteus</i>	EtOH	5	10	NE	NE	NE	NE	13	
	CH <sub>3</sub> Cl	8	12	NE	NE	NE	NE	0	
<i>Sparassis crispa</i>	EtOH	15	8	NE	NE	NE	NE	11	
<i>Lentimula edodes</i>	Acuoso	1	9	8	9	NE	10	12	
<i>Lycoperdon pusillum</i>	MeOH	20	20.0	16.0	--	NE	NE	14.0	Jonathan, et al., 2003
<i>Lycoperdon giganteum</i>	MeOH	20	16.0	12.0	10.0	NE	NE	11.0	
<i>Irpex lacteus</i>	AcOEt	1	>12	NE	--	NE	NE	>12	Rosa, et al., 2008
<i>Nothopanus hygrophanus</i>	AcOEt	1	--	NE	--	NE	NE	>12	
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	AcOEt	1	--	NE	--	NE	NE	>12	
<i>Calvatia craniiiformis</i>	Acuoso	100	--	NE	9.3	NE	NE	16.0	Imtiaj, et al., 2007
<i>Dictyophora indusiata</i>	Acuoso	100	--	NE	9.6	NE	NE	16.3	
<i>Oudemansiella mucida</i>	Acuoso	100	9.6	NE	10.3	NE	NE	17.0	
<i>Pholiota adiposa</i>	Acuoso	100	--	NE	9.0	NE	NE	15.3	
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Acuoso	100	10.0	NE	12.3	NE	NE	18.0	
<i>Pycnoporus coccineus</i>	Acuoso	100	9.6	NE	11.3	NE	NE	16.3	
<i>Stereum ostrea</i>	Acuoso	100	11.6	NE	14.3	NE	NE	21.3	

- a. *E. coli*: *Escherichia coli*  
*K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*  
*P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*  
*S. enteritidis*: *Salmonella enteritidis*  
*S. marcescens*: *Serratia marcescens*  
*S. aureus*: *Staphylococcus aureus*

- b. NE: No evaluado  
 Símbolo "--": Sin actividad

Sin embargo, es de notar que la respuesta de actividad contra *Staphylococcus aureus* presentada por los extractos obtenidos del hongo *Fomitopsis sp.* es significativa máxime si se tiene en cuenta las concentraciones a las cuales fue evaluada (2 mg/mL y 4 mg/mL respectivamente), ya que en aquellos hongos donde se obtiene para el extracto alcohólico un resultado similar (halos de inhibición entre 9 y 10 mm), como son *Armillaria mellea*, *Sparassis crispa*, y *Lycoperdon giganteum* las concentraciones empleadas fueron entre 6 y 10 veces mayores, como se observa en la tabla 3-6. La actividad antimicrobiana sólo se ve superada por el *Lentinula edodes*, hongo que se ha empleado durante milenios en la farmacopea oriental y en investigaciones medicas actuales como antibiótico natural (Jones 1995; Hatvani 2001; Kitzberger *et al.*, 2007)

Para hongos Aphylophorales en particular, Suay y col. reportaron que el 42% de un total de 91 especies estudiadas presentaron actividad antimicrobiana, siendo notorio que las actividades contra bacterias Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *S. marcescens*) fueron mucho menores que contra bacterias Gram-positivas (*S. aureus*, *B. subtilis*) (Suay *et al.*, 2000).

Para hongos lignícolas de este mismo orden se demostró que los extractos orgánicos en metanol y cloroformo fueron activos principalmente frente a bacterias Gram-positivas, en especial *Bacillus sp.*, *Rhodococcus equi*, y *Staphylococcus aureus*, con una concentración mínima inhibitoria que comprende el rango de 17.5 a 9000 µg/mL siendo los extractos del hongo Basidiomiceto *Piptoporus betulinus* los más activos (Karaman *et al.*, 2009).

Tsvetkova y col. realizaron ensayos de actividad antimicrobiana empleando las fracciones polares y apolares respectivamente de 18 especies de hongos Basidiomicetos silvestres de origen Búlgaro, encontrándose que, a diferentes concentraciones de los extractos, todos demostraron ser inactivos para la bacteria Gram-negativa *E. coli* y la levadura *C. albicans*. (Tsvetkova *et al.*, 2006).

Estas comparaciones permiten entonces deducir el potencial antimicrobiano que presenta el hongo en estudio frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, teniendo en cuenta además la resistencia que dicho microorganismo presenta a los antibióticos de uso común.

Dado que esta investigación se planteó tomando como referencia los bioactivos aislados de *Ganoderma lucidum*, al realizar la comparación entre los metabolitos triterpenoidales aislados de ambos hongos (Tabla 3-7) resalta el hecho de que en contraste con la *G. lucidum* el *Fomitopsis sp.* contiene, además de los compuestos triterpenoidales de núcleos ergostánico y colestánico, compuestos de núcleo lanostánico.

Con base en lo anterior y en la actividad presentada por las fracciones obtenidas del *Fomitopsis*, que arrojó como resultado no presentar acción frente a bacterias Gram-negativas y teniendo en cuenta lo postulado por Jaramillo en 2009, de que los esteroides y los triterpenos con mayor número de endoinsaturaciones eran los responsables de la acción sobre los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enteritidis sp.*, lo obtenido en la presente investigación permite determinar que los triterpenos ergostánicos (pentaeno y hexaeno) parecen no contribuir a la acción antimicrobiana para esta clase de microorganismos. Esto puede ser debido o bien a la baja proporción de los mismos dentro del extracto (6.4 % y 13%), o a que la ausencia del hidroxilo en C3 es la responsable de la no actividad, lo que estaría en concordancia con el trabajo de Mutai (2009) quien determinó que parece ser que para presentar acción en compuestos triterpenoidales es necesario este requerimiento estructural.

**Tabla 3-7: Comparación entre los metabolitos triterpenoidales aislados de de los hongos *Ganoderma lucidum* y *Fomitopsis sp.***

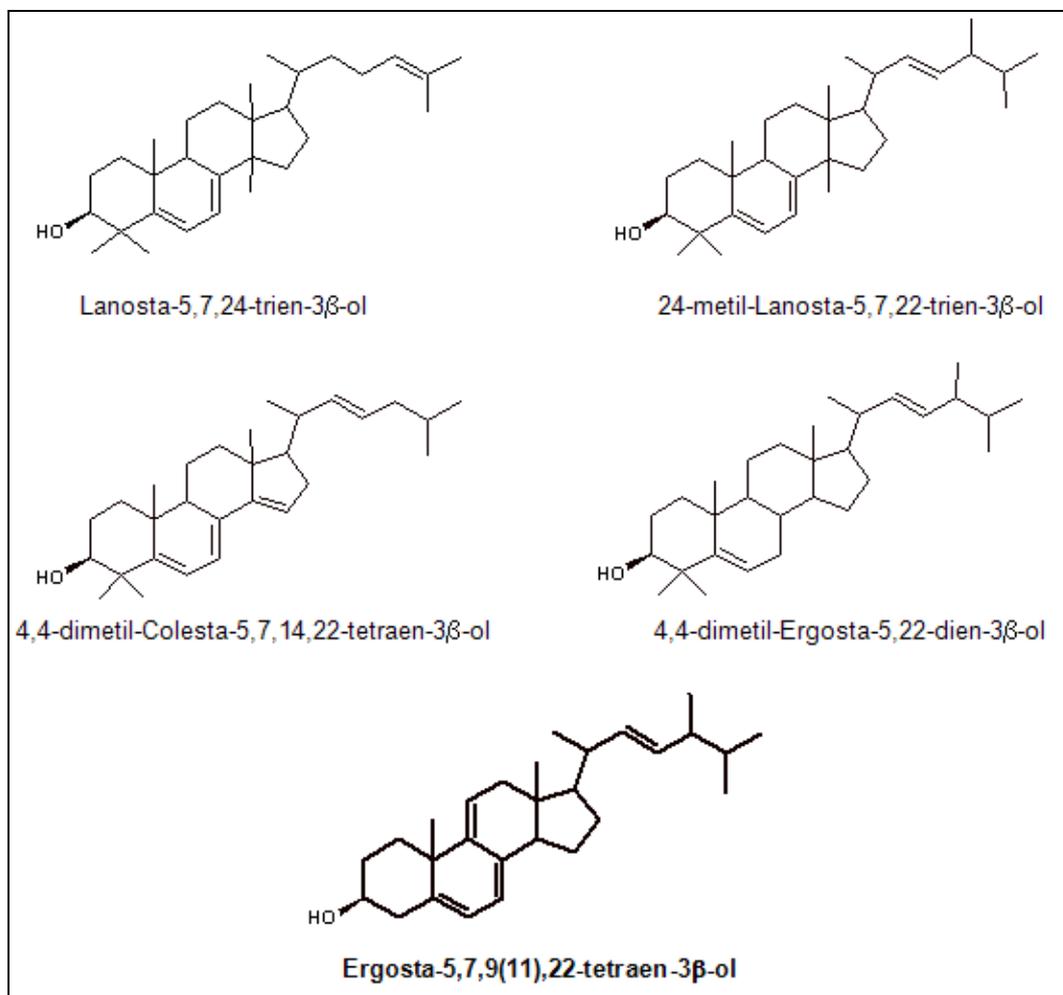
<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Fomitopsis sp.</i>
Ergosta-2,5,7,9(11),14,22-hexaeno*	Lanosta-2,5,7,22-tetraeno
	Ergosta-7,22-dien-3-ona
Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno*	Lanosta-2,5,7,24-tetraeno
Colesta-5,7,24-trien-3 $\beta$ -ol*	Lanosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol
Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 $\beta$ -ol*	24-metil-lanosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol
Colesta-4,6,24-trien-3 $\beta$ -ol	4,16-dimetilergosta-3,5,7,22-tetraeno
Colesta-7,9(11),24-trien-3 $\beta$ -ol	4,4-dimetil-colesta-5,7,14,22-tetraen-3 $\beta$ -ol
Colesta-7,24-trien-3 $\beta$ -ol	4,4-dimetil-ergosta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol
Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3 $\beta$ -ol	4-metil-Ergosta-5,7,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol
Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 $\beta$ -ol
Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol	Ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol
Estigmasterol	Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol
Ergosta-7-en-3 $\beta$ -ol	Ergosta-4,6,15(16),22-tetraen-3-ona
Estimast-5-en-3 $\beta$ -ol	Ergosta-2,5,7,9(11),14,22-hexaeno
	Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno

\* Compuestos propuestos como posibles responsables de la actividad antimicrobiana de *G. lucidum* (Jaramillo 2009).

En lo referente a las bacterias Gram-positivas y específicamente a *S. aureus*, si bien los extractos presentaron actividad, ésta fue aproximadamente del 50% de la exhibida por *Ganoderma lucidum*. Este resultado puede ser debido a la presencia en los extractos ensayados del Ergosta- 5,7,9(11),22-tetraen- 3 $\beta$ -ol, ya aislado de *G. lucidum* y al cual se le atribuyó la bioacción, pero que en el hongo en estudio, en contraste con *G. lucidum*, no es uno de los compuestos triterpenoidales mayoritarios (porcentaje relativo de 26.2), luego la disminución en el halo de inhibición es totalmente coherente. Así mismo, permite inferir que es este esteroles el más probable de conferir la actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas, aportando así datos que reafirman la hipótesis de que son los esteroides con mayor número de endoinsaturaciones los que presentan una mayor actividad (Jaramillo 2009).

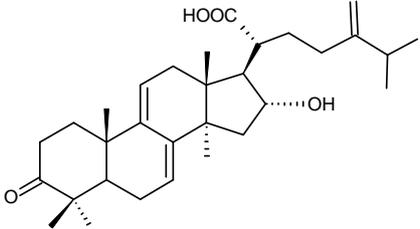
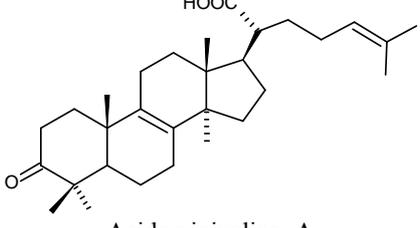
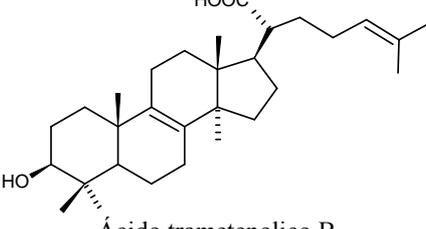
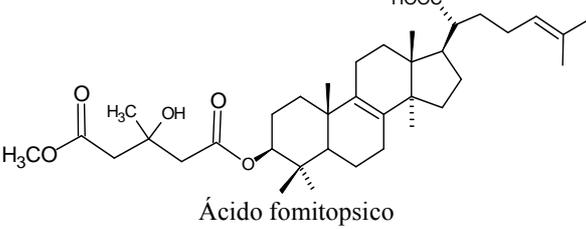
En cuanto a los demás compuestos triterpenoidales, pareciera ser que no contribuyen en proporción apreciable a la bioacción de los extractos. Si se observan sus estructuras ellos corresponden a núcleos colesta y ergosta 4-sustituídos, así como núcleo lanosta (Fig. 3–39).

**Figura 3-39: Comparación de estructuras de compuestos con núcleos Colesta, Ergosta 4-sustituídos y Lanosta.**

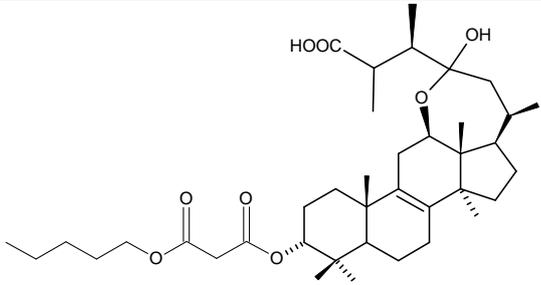
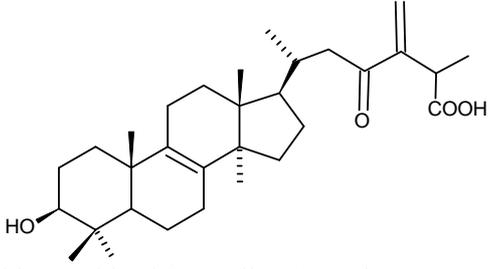
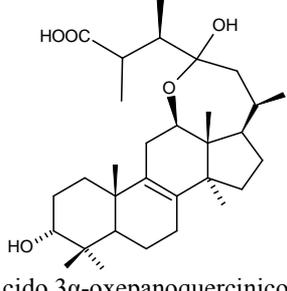
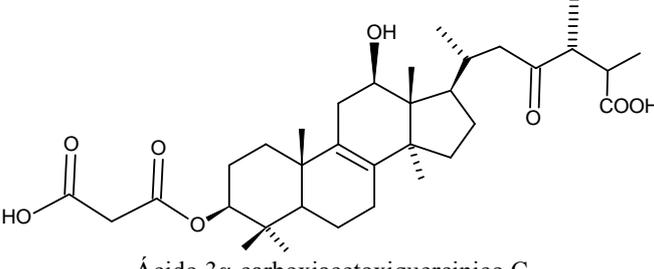


Si bien todos cumplen con la presencia del grupo OH en C3, hay que tener en cuenta los otros requerimientos estructurales, que en estudios realizados por diferentes autores sobre relación estructura actividad, se han determinado. Tal es el caso de esteroides de núcleo colestano derivados del colesterol (Brunel *et al.*, 2005) cuya investigación permitió determinar que los compuestos que no presentan en la cadena lateral sustituyentes carboxilo no exhiben actividad frente a *S. aureus*. Así mismo, los reportes de compuestos antimicrobianos aislados de diferentes Fomitopsis (Tabla 3-8) que presentaron actividad antibacteriana, específicamente frente a *S. aureus*, exhiben también en su estructura grupos carboxilo.

**Tabla 3-8: Compuestos con actividad antimicrobiana demostrada de hongos Fomitopsis**

Especie	Compuesto aislado	Actividad	Referencia.
<i>F. pinicola</i>	 <p>Ácido polyporenico C</p>	Antibacterial contra <i>B. subtilis</i>	Keller <i>et al.</i> , 1996
	 <p>Ácido pinicolico A</p>		
	 <p>Ácido trametenolico B</p>		
	 <p>Ácido fomitopsico</p>		

**Tabla 3-9 (continuación): Compuestos con actividad antimicrobiana demostrada de hongos Fomitopsis**

Especie	Compuesto aislado	Actividad	Referencia.
<i>F. rosea</i>	 <p>Ácido 3α-(3α-Butilcarboxiacetoxi)-oxopanoquercínico C</p>	Antibacterial contra <i>S. aureus</i>	Popova <i>et al.</i> , 2009
	 <p>Ácido 3α-Hidroxi-24-metilen-23-oxolanost-8-en-26-carboxílico</p>		
	 <p>Ácido 3α-oxepanoquercínico C</p>		
	 <p>Ácido 3α-carboxiacetoxiquercínico C</p>		

De la observación de las estructuras consignadas en la tabla anterior se puede inferir que la presencia del grupo OH en C3 no es tan determinante en la bioacción como si lo son los grupos carboxilo en la cadena lateral del esterol.

En lo referente a los esteroides ergosta y colestano 4-sustituídos, que si bien presentan el OH en C3 y un buen número de insaturaciones en los anillos, pareciese ser que no aportan a la actividad del extracto bien sea porque su cantidad en el mismo es poca o porque la sustitución en el C4 disminuya su acción, ya que en los estudios de REA (Relación Estructura Actividad) para el caso de esteroides pentacíclicos, se determinó que la actividad antimicrobiana tiene una marcada dependencia de factores estéricos en lo referente al OH en C3 (Mutai *et al.*, 2009).

De lo anterior se deduce fácilmente que ni los compuestos lanostánicos presentes en el hongo *Fomitopsis sp.*, por no corresponder a ácidos lanostánicos, ni los esteroides ergosta y colestano 4-sustituídos presentarían actividad antimicrobiana y por lo tanto se puede decir, con muy buena aproximación, que la actividad exhibida por los extractos del hongo estudiado es debida a la presencia dentro de los componentes triterpenoidales del Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 $\beta$ -ol, reafirmando así lo propuesto por Jaramillo en 2009, en cuanto a la actividad antimicrobiana de *Ganoderma lucidum* y que los triterpenos Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno y Ergosta-2,5,7,9(11),14,22-hexaeno, contrariamente a lo propuesto por dicho autor, no parecen poseer actividad antimicrobiana, aportando datos que complementen los hasta ahora pocos estudios de REA de esteroides antimicrobianos.



## 4. Conclusiones

- La especie fúngica nativa Colombiana recolectada y analizada en el presente trabajo pertenece a la familia Fomitopsidaceae género *Fomitopsis* y ha sido nombrada parcialmente como *Fomitopsis sp.*
- La comparación de las condiciones de extracción empleadas en el estudio arrojan que, en términos de cantidad de extracto y tiempo de extracción, el método de extracción asistido por Ultrasonido empleando metanol como solvente es más eficiente que el método tradicional de la maceración.
- Del extracto metanólico obtenido a partir del cuerpo fructífero del hongo *Fomitopsis sp.* se identificaron 9 compuestos que corresponden a 2 ácidos grasos, 4 ésteres metílicos de ácidos grasos, 3 hidrocarburos alifáticos.
- Del extracto en diclorometano obtenido a partir del extracto crudo metanólico del cuerpo fructífero del hongo *Fomitopsis sp.* se identificaron 15 compuestos que corresponden a 8 esteroides, 2 cetosteroides y 5 triterpenos.
- Los compuestos grasos no esterólicos en el extracto metanólico de cuerpo fructífero del hongo *Fomitopsis sp.* se identificaron como Hexadecanoato de metilo, 9,12-octadecadienoato de metilo, 9-octadecenoato de metilo, Octadecanoato de metilo, Hexadecano, Octadecano, Acido Hexadecanoico, Eicosano y Ácido 9-Octadecenoico
- De los compuestos grasos no esterólicos identificados, son los ésteres metílicos insaturados los que se encuentran en mayor proporción, siendo el 9,12-octadecadienoato de metilo el éster mayoritario.
- La presencia de ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos insaturados podrían conferir beneficios nutriceúticos al hongo estudiado, y eventualmente poder ser empleado como suplemento alimenticio, teniendo en cuenta el valor medicinal que presentan hongos del mismo género, empleados principalmente en la medicina tradicional de países como Corea, China y Japón.
- La presencia de los hidrocarburos alifáticos Hexadecano, Octadecano y Eicosano es una característica particular del hongo *Fomitopsis sp.* los cuales se reportan por primera vez en hongos del género *Fomitopsis* en Colombia.

- Los hidrocarburos encontrados en las fructificaciones de *Fomitopsis sp.* posiblemente son biosintetizados por el hongo y se podría estar frente a nuevos quimiomarcadores para este género en particular.
- Los esteroides y triterpenos presentes en el extracto proveniente de la partición en diclorometano del extracto crudo metanólico se identificaron como Lanosta-2,5,7,22-tetraeno, Ergosta-7,22-dien-3-ona, Lanosta-2,5,7,24-tetraeno, Lanosta-5,7,24-trien-3 $\beta$ -ol, 24-metil-lanosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol, 4,16-dimetilergosta-3,5,7,22-tetraeno, 4,4-dimetil-colesta-5,7,14,22-tetraen-3 $\beta$ -ol, 4,4-dimetil-ergosta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol, 4-metil-ergosta-5,7,24-trien-3 $\beta$ -ol, Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 $\beta$ -ol, Ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol, Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol, Ergosta-4,6,15(16),22-tetraen-3-ona, Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno y Ergosta-2,5,7,9(11),14,22-hexaeno. Todos ellos se reportan por primera vez para el hongo silvestre Colombiano *Fomitopsis sp.*
- Los extractos en metanol y en diclorometano obtenidos a partir del cuerpo fructífero del hongo *Fomitopsis sp.* se sometieron a evaluación de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, siendo las cepas de *S. aureus* las que presentaron respuesta leve al ensayo.
- De acuerdo con la respuesta al ensayo de actividad, el hongo *Fomitopsis sp.* presenta potencial antimicrobiano frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, el cual puede ser considerado en estudios de bioprospección, teniendo en cuenta la resistencia que dicho microorganismo presenta a los antibióticos de uso común.

## PERSPECTIVAS

- Iniciar los estudios relacionados con el cultivo biotecnológico de la *Fomitopsis sp.* por fermentación en estado líquido (FEL) y buscar el medio de cultivo óptimo para obtener la mayor producción tanto de biomasa como de bioactivos.
- Determinar la presencia de los hidrocarburos en el producto biotecnológico.
- Efectuar estudios químicos con otros *Fomitopsis* silvestres colombianos para determinar la existencia de los posibles nuevos quimiomarcadores en macrohongos.
- Realizar la FEL en un medio enriquecido con hexadecano a fin de comprobar si el hongo es o no un verdadero biorremediador.
- Con la aplicación del cultivo biotecnológico obtener un hongo con mayor proporción de los triterpenoides antimicrobiales, lo que permitiría su separación, purificación y posterior determinación individual de la actividad antimicrobiana.
- Con los datos obtenidos del numeral anterior corroborar la hipótesis de que el Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 $\beta$ -ol es el compuesto con potencial antibiótico.



## BIBLIOGRAFÍA

**Aoyama, Y.;** Yoshida, Y.; Saton, R. Yeast Cytochrome P - 450 Catalyzing Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylation. *J. Biol. Chem.* **1984**. 259 (3). 1661–1666.

**Avila, M.** Determinación de los compuestos triterpenoidales del extracto en metil etil cetona de *Suilus luteus*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Sede Bogotá. **2007**.

**Benavides, O.** Estudio químico de la fracción insaponificable del hongo macromiceto *Lentinula edodes* (shiitake). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Sede Bogotá. **2004**.

**Brizuela, M. A.;** García, L.; Pérez, L.; Mansuret, L. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev. Iberoam. Micol.* **1998**. 15. 69–74.

**Brocks, J.J.;** Buick, R.; Summons, R.E.; Logan, G.A. Reconstruction of Archean biological diversity based on molecular fossils from the 2.78 to 2.45 billion-year-old Mount Bruce Supergroup, Hamersley Basin, Western Australia. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **2003**. 67. 4321–4335.

**Chegwin, C.** Estudio químico preliminar de los metabolitos secundarios mayoritarios de tipo esterólico presentes en el extracto de acetato de etilo del hongo macromiceto *Pleurotus sajor-cajú* e inicio en la búsqueda de estatinas en el mismo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Sede Bogotá. **2005**.

**Chegwin, C.** Estudio de la influencia del sustrato en la cantidad y clase de triterpenoides de *Pleurotus ostreatus* así como en el contenido de estatinas si dicho hongo las presenta. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Sede Bogotá. **2007**.

**Chen, Baoliang.;** Wang, Yinshan.; Hu, Dingfei. Biosorption and Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solutions by a consortium of white-rot fungi. *J. Hazard. Mater.* **2010**. 179. 845–851.

**Choi, D.;** Park, S.; Ding, J.L.; Cha, W. Effects of *Fomitopsis pinicola* extracts on antioxidant and antitumor activities. *Biotechnol Bioproc Eng.* **2007**. 12. 516–524.

**Connolly J. D.;** Hill, Robert. A. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **2005**. 22. 230–248.

**Cole, R.J.;** Schweikert, M.A. Handbook of secondary fungal metabolites. Academic press. USA. **2003**. Vol. II.

**Colombo, Juan C.;** Cabello, Marta.; Arambarri, Angélica M.; Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolitic fungi. *Environmental Pollution*. **1996**. 94(3). 335–362.

**Coy, E.** Estudio químico de los metabolitos secundarios del hongo macromiceto *Laetiporus sulphureus*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Sede Bogotá. **2003**.

**Cucaita, E.** Estudio químico comparativo de metabolitos secundarios de los hongos comestibles *Laccaria laccata* y *Lentinula edodes* y determinación de su variación respecto al estadio del hongo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Sede Bogotá. **2007**.

**Curtis, M.;** *et al.* Farmacología integrada. Primera edición. Ed. Mosby. **1998**. Pág. 419.

**Cheng, Jing-Jy.;** Lin, Cha-Yui.; Lur, Huu-Sheng.; Chen, Hsuan-Pei.; Lu, Mei-Kuang. Properties and biological functions of polysaccharides and ethanolic extracts isolated from medicinal fungus, *Fomitopsis pinicola*. *Process Biochemistry*. **2008**. 43(8). 829–834.

**Chang, S.T.;** Miles, P. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. Ed. CRC Press. **2004**.

**Dashti, N.;** Al-Awadhi, H.; Khanafer, M.; Abdelghany, S. Radwan, S. Potencial of hexadecane-utilizing soil-microorganisma for growth on hesadecanol, hexadecanal and hexadecanoic acid as sole sources of carbon and energy. *Chemosphere*. **2008**. 70. 475–479.

**Deacon, J.** Fungal Biology. 4 ed. Ed. Wiley-Blackwell. **2005**.

**Dewick, Paul M.** Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 2 ed. Ed. John Wiley and Sons. **2002**. Pág. 167.

**D'armas, H.;** Castillo-Machalskis, I.; Noguera, T.; Quintero, M. Evaluación química del hongo *Aspergillus ochraceus* 3MCMC3 aislado de raíces de *Rhizophora mangle*. *Bol. Centro Invest. Biol*. **2009**. 43(2). 225–243.

**Dilip de Silva, E.;** *et al.* Lanostane Triterpenoids from the Sri Lankan Basidiomycete *Ganoderma applanatum*. *J. Nat. Prod*. **2006**. 69. 1245–1248.

**Dulgera, B.;** Cem Ergul, C.; Gucin, F. Antimicrobial activity of the macrofungus *Lepista nuda*. *Fitoterapia*. **2002**. 73. 695–697.

**Elshafie, A.;** Alkindi, A.; Al-Busaidi, S. Bakheit, C.; Albahry, S.N. Biodegradation of crude oil and *n*-alkanes by fungi isolated from Oman. *Marin. Pollut. Bull*. **2007**. 54. 1692–1696.

**Fan, L.;** Pan, H.; Thomaz S., A.; Pandey, A.; Soccol, C.A. Advances in Mushroom Research in the Last Decade. *Food Technol. Biotechnol*. **2006**. 44(3). 303–311.

**Gan, K.H.;** Kuo, S.H.; Lin, C.N. Steroidal Constituents of *Ganoderma applanatum* and *Ganoderma neo-japonicum*. *J. Nat. Prod.* **1998**. 61. 1421–1422.

**Gao, Y.;** Tang, W.; Gao, H.; Chan, E.; Lan, J.; Li, X.; Zhou, S. Antimicrobial Activity of the Medicinal Mushroom *Ganoderma*. *Food Reviews International.* **2005**. 21. 211–229.

**Goodman y Gilman.** Bases farmacológicas de la Terapéutica. 9 ed. Mc Graw-Hill Editores. N.York. **1998**. Pág 1095–1098.

**González, A.;** León, F.; Rivera, A.; Padrón, I.; González-Plata, J.; Zuluaga, J.; Quintana, J.; Estévez, F.; Bermejo, J. New Lanostanoids from the Fungus *Ganoderma concinna*. *J. Nat. Prod.* **2002**. 65(3). 417.

**González, A. G.;** León, F.; Rivera, A.; Muñoz, C.; Bermejo, J. Lanostanoid Triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *J. Nat. Prod.* **1999**. 62. 1700–1701.

**Guler, P.;** Akata, I.; Kutluer, F. Antifungal activities of *Fomitopsis pinicola* (Sw.:Fr) Karst and *Lactarius vellereus* (Pers.) Fr. *African Journal of Biotechnology.* **2009**. 8(16). 3811–3813.

**Hatvani, N.** Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents.* **2001**. 17. 71–74.

**Hearst, R.;** Nelson, D.; McCollum, G.; *et. al.* An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice.* **2009**. 15. 5–7.

**Hernández, Y.** Estudio químico de los metabolitos secundarios de tipo triterpenoidal mayoritarios presentes en el extracto etanólico del hongo *Lycoperdon sp.* Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Sede Bogotá. **2007**.

**Hibbett, D. S.;** Pine E.; Langer E.; Langer G.; Donoghue M. J.; Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1997**. 94. 12002–12006.

**Huie, C. W.,** Di, X. Chromatographic and electrophoretic methods for *Lingzhi* pharmacologically active components. *J. Chromatogr. B.* **2004**. 812. 241–257.

**Imtiaj, A.;** Lee, T.S. Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. *World J. Agric. Sci.* **2007**. 3(3). 316–321.

**Jaramillo, M.** Determinación estructural y de actividad antimicrobiana de los intra y exo metabolitos secundarios triterpenoidales en *Ganoderma lucidum* obtenido en cultivo sumergido. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Sede Bogotá. **2009**.

**Jaramillo, M.** Estudio químico preliminar del extracto metanólico del micelio del hongo basidiomiceto colombiano *Ganoderma lucidum* cultivado sobre suero de leche. Universidad

Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Sede Bogotá. **2006**.

**Jonathan, S.G.**; Fasidi, I.O. Antimicrobial activities of two Nigerian edible macro-fungi *Lycoperdon pusillum* (Bat. Ex) and *Lycoperdon giganteum* (Pers.). *African Journal of Biomedical Research*. **2003**. 6. 85–90.

**Jones, K.**; Shiitake The healing mushrooms. Ed. Healing Arts Press. **1995**. Pág. 13-34.

**Kalyoncu, F.**; Oskay, M. Antimicrobial Activities of Four Wild Mushroom Species Collected from Turkey. *Proceeding of the 6th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*. **2008**. 31–35.

**Kanaly, Robert A.**; Hur, Hor-Gil. Growth of *Phanerochaete chrysosporium* on diesel fuel hydrocarbons at neutral pH. *Chemosphere*. **2006**. 63. 202–211.

**Karaman, M.**; Mimica-Dukic, N.; Knezevic, P.; Svircev, Z.; Matavuly, M. Antibacterial Properties of Selected Lignicolous Mushrooms and Fungi from Northern Serbia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. **2009**. 11(3). 269–279.

**Keller, A.**; Maillard, M.; Hostettman, K. Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*. *Phytochemistry*. **1996**. 41(4). 1041–1046.

**Kleinwächter, P.**; Anh, N.; Kiet, T.; Schlegel, B.; Dahse, H.S.; Härtl, A.; Gräfe, U. Colossolactones, New Triterpenoid Metabolites from a Vietnamese Mushroom *Ganoderma colossum*. *J. Nat. Prod.* **2001**. 64(2). 236–239.

**Kitzberger, C.**; Smânia Jr. A.; Pedrosa, R.; Salvador Ferreira, S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *J. Food Eng.* **2007**. 80. 631–638.

**Ko, Horng-Huey.**; Hung, Chi-Feng.; Wang, Jih-Pyang.; Lin, Chun-Nan. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry*. **2008**. 69. 234–239

**Ladygina, N.**; Dedyukhina, E.G.; Vainshtein, M.B. A review on microbial synthesis of hydrocarbons. *Process Biochemistry*. **2006**. 41. 1001–1014.

**Lee W.**, Park Y., Know J., Hyeon K., Young S. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. *Enzyme and microbial technology*. **2007**. 40. 249-254.

**León, F.**; Valencia, M.; Rivera, A.; Nieto, I.; Quintana, J.; Estévez, F.; Bermejo, J. Novel Cytostatic lanostanoid triterpenes from *Ganoderma australe*. *Helvetica Chimica Acta*. **2003**. 86. 3088–3095.

**Lindequist, U.**; Niedermeyer, T.; Jülich, W.D. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM. Review*. **2005**. 2(3). 285–299.

**Malbran, C.** Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento Bacteriología. Servicio Antimicrobianos. Buenos Aires, Argentina. **2001**.

**Mandigan, M. T.;** Martinko, J.M.; Parker, J. Biología de los microorganismos. Ed. Prentice Hall. 8 ed. España. **2000**.

**Mattila, J. P.;** Suonpää, C.; Piironen, V. Functional properties of edible Mushrooms. *Nutrition*. **2000**. 6(7/8). 694–696.

**Mutai, C.;** Bii, C.; Vagias, C.; Abatis, D.; Roussis, V. Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *Journal of Ethnopharmacology*. **2009**. 123. 143–148.

**Miles, P.;** Chang, S.T. Biología de las setas. Fundamentos básicos y acontecimientos actuales. Primera edición. Bogotá. World Scientific. **1999**.

**Nakano C.;** Motegui A.; Sato, T. Sterol Biosynthesis by a Prokaryote: First *in vitro* identification of Genes Encoding Squalene Epoxidase and Lanosterol Synthase from *Methylococcus capsulatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2007**. 71 (10). 2543–2550.

**Nieto, I.;** Mora, M.A.; Jaramillo, M. Influencia del proceso de secado en la composición de triterpenoides antimicrobianos del micelio obtenido por FEL del hongo *Ganoderma lucidum*. *Rev. Col. Química*. **2010**. Sometido a revisión.

**Nieto, I.;** Chegwin, C. Triterpenoids and fatty acids identified in the edible mushroom *Pleurotus sajor-cajú*. *J. Chil. Chem. Soc*. **2008**. 53(2). 1515–1517.

**Nieto, I. J.;** Cucaita, E. Ácidos grasos, ésteres y esteroides del cuerpo fructífero del hongo *Laccaria laccata*. *Rev. Col. Química*. **2007**. 36 (3). 277–284.

**Peláez, F.** The historical delivery of antibiotics from microbial natural products — Can history repeat? *Biochem Pharmacol*. **2006**. 71(7). 981–990.

**Petrova, A.;** Popov, S.; Gjosheva, M.; Bankova, V. A new triterpenic alcohol from *Fomitopsis pinicola*. *Nat Prod Res*. **2007**. 21(5). 401–405

**Polese, Jean-Marie.** Miniguía Setas. Ed. Könemann. **2005**.

**Popova, M.;** Trusheva, B.; Gyosheva, M.; Tsvetkova, I.; Bankova, V. Antibacterial triterpenes from the threatened wood-decay fungus *Fomitopsis rosea*. *Fitoterapia*. **2009**. 80. 263–266.

**Quang, N.Q.;** Arakawa, Y.; Hashimoto, T.; Asakawa, Y. Lanostane triterpenoids from the inedible mushroom *Fomitopsis spraguei*. *Phytochemistry*. **2005**. 66. 1656–1661.

**Ren, G.;** Liu, X.Y.; Zhu, H.K.; Yang S.Z.; Fu, C.X. Evaluation of cytotoxic activities of some medicinal polypore fungi from China. *Fitoterapia*. **2006**. 77. 408–410.

**Rosa, L. E.;** Gomes M., K.; Jacob, C.; Capelari, M.; Rosa, C. A.; Zani, C. Screening of Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. **2008**. 98(7). 967–974.

**Rösecke, J.;** König, A. Constituents of various wood-rotting basidiomycetes. *Phytochemistry*. **2000**. 54. 603–610.

**Rösecke, J.;** Pietsch, M.; König, A. Volatile constituents of wood-rotting basidiomycetes. *Phytochemistry*. **2000**. 54. 747–750.

**Rösecke, J.;** König, A. Steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*. *Phytochemistry*. **1999**. 52. 1621–1627.

**Ruiz, A.;** Varela, A. New reports of Aphyllophorales (Basidiomycota) in humid and cloudy montane forests from Colombia. *Caldasia*. **2006**. 28(2). 259–266.

**SDBS: Integrated Spectral Database System for Organic Compounds.**  
<http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/menu-e.html>.

**Schinor, E.;** Salvador, M.; Turatti, I.; Zucchi, O.; Dias, D. Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta* spp. *Ultrasonics Sonochemistry*. **2004**. 11. 415–420.

**Schmidt, J.;** Hunek, S. *Organic Mass Spectrum*. **1979**. 14. 646.

**Serrano, E.** Estudio químico de los metabolitos secundarios presentes en el hongo *Auricularia auricula-judae*. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Química. **2009**.

**Shapiro, B. E.;** Gealt, M. A. Ergosterol and Lanosterol from *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **1982**. 128.1053–1056.

**Strobel, G.;** Knighton, B.; Kluck, K.; Ren, R.; Livinghouse, T.; Griffin, M.; Spakowicz, D.; Sears, J. The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). *Microbiology*. **2008**. 154. 3319–3328.

**Sunesson, A.L.;** Vaes, W.; Nilsson, C.A.; Blomquist, G.; Anderson, B.; Carlson, R. Identification of volatile metabolites from five fungal species cultivated on two media. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**. 61(8). 2911–2918.

**Y. Shin;** Y. Tamai; M. Terazawa; Triterpenoids, steroids and a new sesquiterpen from *Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.) Pilat. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. **2002**. 4(2). 77–84.

**Silva, M.;** Bittner, M.; Hoeneisen, M.; Becerra, J.; Campos, V.; Gonzales, F.; Cespedes, C.; Marambio, O. Química de los triterpenos. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C. **1992**.

**Suay, I.**; Arenal, F.; Asensio, F. J.; Basilio, A.; Cabello, M.A.; Díez, M. T.; García, J. B.; González del Val, A.; Gorrochategui, J.; Hernández, P.; Peláez, F.; Vicente, M. F. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie van Leeuwenhoek*. **2000**. 78. 129 – 139.

**Tsvetkova, I.**; Naydenski, H.; Petrova, A.; Kostadinova, E.; Gyosheva, M.; Georgieva, P.; Bankova, V.; Popov, S. Antibacterial Activity of Some Bulgarian Higher Basidiomycetes Mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. **2006**. 8(1). 63–66.

**Turkoglu, A.**; Duru, M.; Mercan, N.; Kivrak, I.; Gezer, K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*. **2007**. 101(1). 267–273.

**Valencia, M.** Estudio químico de metabolitos secundarios del hongo macromiceto *Ganoderma australe*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Sede Bogotá. **2002**.

**Vinatoru, Mircea.** An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herb. *Ultrasonic Sonochemistry*. **2001**. 8. 303–313.

**Volin, Pirkko.** Analysis of steroidal lipids by gas and liquid chromatography. *J. Chrom. A*. **2001**. 935. 125–140

**Volke-Sepúlveda, T.**; Gutiérrez-Rojas, M.; Favela-Torres, E. Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technol.* **2003**. 87. 81–86.

**Volke-Sepúlveda, T.**; Gutiérrez-Rojas, M.; Favela-Torres, E. Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: Kinetic analysis. *Bioresource Technology*. **2006**. 97. 1583–1591

**Wasser, S. P.**; Weis, A. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. **1999**. 1. 31–62.

**Wasser S. P.**; Weis A. Therapeutic Effects of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: A Modern Perspective. *Crit. Rev. Immunol.* **1999**. 19(1). 65.

**WU, S.**; Zorn, H.; Krings, U.; Berger, R.F. Characteristic Volatiles from Young and Aged Fruiting Bodies of Wild *Polyporus sulfureus* (Bull.:Fr.) Fr. *J. Agric. Food Chem.* **2005**. 53. 4524–4528.

**Xiao, J.H.**; Xiao, D.M.; Sun, Z.H.; Xiong, Q.; Liang, Z.Q.; Zhong, J.J. Chemical compositions and antimicrobial property of three edible and medicinal *Cordyceps* species. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. **2009**. 7 (3&4). 91–100.

**Yasunori, Y.**; Matsuki, K.; Iijima, T.; Nakano, S.; Kakuda, R.; Machida, K.; Kikuchi, M. New Sterols and Triterpenoids from Four Edible Mushrooms. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**. 49(5). 589–594.

**Yasunori , Y.;** Keiko, A.; Hiroyuki, O.; Katsuyuki, F.; Akihiro, M.; Toshihiko, M.; Masao, K. Sterol constituents from five edible mushrooms. *Chem. Pharm. Bull.* **1998.** 46(6). 944–950.

**Yokokawa Hiroko.** Fatty acid and sterol compositions in mushrooms of ten species of polyporaceae. *Phytochemistry.* **1980.** 19(12). 2615–2618.

**Yoshikawa, K.;** Nishimura, N.; Bando, S.; Arihara, S.; Matsumura, E.; Katayama S. New Lanostanoids, Elfvingic Acids A–H, from the Fruit Body of *Elfvigia applanata*. *J. Nat. Prod.* **2002.** 65. 548–552 .

**Zjawiony, J. K.** Biologically Active Compounds from Aphyllophorales (Polypore) Fungi. *J. Nat. Prod.* **2004.** 67. 300–310.

<http://www.cyberlipid.org/index.htm>. Consultada el 10/08/2009

<http://autorneto.com/referencia/ciencia/los-hongos-basidiomicotas/> consultada el 18/07/2009.

