

QUÍMICA Y ACTIVIDADES ANTIOXIDANTE Y BACTERICIDA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL HONGO *Ganoderma lucidum*

RESUMEN

El extracto etanólico del hongo *Ganoderma lucidum* fue analizado mediante CGAR-EM identificándose 14 compuestos destacándose 4,4-dimetil-ergosta-7-en-3 β -ol (**4**), 4-metil-2-nitropentan-1-ol (**5**), 1-nitrododeca-2,10-dien-6-ino (**6**), 4-metil-ergosta-5,7,9,14,22,24-hexen-3 β -ol (**13**) y 4-metil-23-isopropil-ergosta-5,7,9,14,22,24-hexen-3 β -ol (**14**). De estos compuestos no se encontró información en la bibliografía, por lo tanto se proponen como compuestos químicos novedosos. Los ensayos de actividad bactericida mostraron resultados negativos. Por su parte, la evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo a través de los métodos DPPH y ABTS encontrándose valores de CE₅₀ de 48.7 ppm y 15.5 ppm en el subextracto de acetato de etilo y 80.7 ppm y 19.2 ppm en el subextracto de diclorometano, respectivamente.

PALABRAS CLAVES. Hongos macromicetos, *Ganoderma lucidum*, esteroides, compuestos nitrogenados, actividad antioxidante.

ABSTRACT

The ethanolic extract of the fungi Ganoderma lucidum was analyzed by HRGC-MS identifying 14 compounds highlighting 4,4-dimethyl-ergosta-7-en-3 β -ol (4), 4-methyl-2-nitropentan-1-ol (5), 1-nitrododeca-2,10-dien-6-ino (6), 4-methyl-ergosta-5,7,9,14,22,24-hexen-3-ol (13) y 4-methyl-23-isopropyl-ergosta-5,7,9,14,22,24-hexen-3-ol (14). Information about these compounds was not found in the bibliography, therefore, these can be considered as new chemical compounds. The bactericide assay showed negative results. The antioxidant activity was carried out by DPPH and ABTS methods finding values of EC₅₀ = 48.7 ppm and 15.5 ppm in the EtOAc subextract and 80.7 ppm y 19.2 ppm in the CH₂Cl₂ subextract, respectively.

KEY WORDS. Macromicets fungi, *Ganoderma lucidum*, sterols, nitrogenated compounds, antioxidant activity.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos pertenecientes al género *Ganoderma* han estado en la cumbre de la medicina oriental desde hace cientos de años. Durante las dos últimas décadas se han identificado un buen número de compuestos caracterizados por presentar diferentes tipos de actividad biológica, destacándose sustancias con actividad cardiovascular, citotóxica, inmunomodulatoria, analgésica, antidiabética, antioxidante, insecticida y nematocida, entre otras. De solo dos especies *G. lucidum* y *G. applanatum* se obtuvieron más de 130 metabolitos con núcleos lanostano y ergostano, su aislamiento junto con la determinación de la actividad biológica han sido objeto de un gran número de publicaciones [1].

Esta variedad de metabolitos secundarios que presentan los hongos, es debida principalmente a que estos organismos son incapaces de sintetizar macromoléculas a partir del dióxido de carbono y la energía procedente de la luz porque no poseen clorofila, por lo tanto, su biogénesis está condicionada principalmente por el tipo de nutrientes propios del sustrato donde se desarrollan,

además de las condiciones climáticas que los rodean, haciendo que hongos presentes en regiones diferentes o que crezcan en sustratos que varíen en composición, puedan alterar y cambiar su metabolismo generando una amplia diversidad de compuestos químicos [2][3].

Dentro de este contexto, el presente trabajo describe el estudio químico y el de las actividades bactericida y antioxidante realizado en el hongo *Ganoderma lucidum* recolectado en el Caribe Colombiano.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del hongo

La recolección del hongo de género *Ganoderma* fue realizada en primera instancia en la región del medio Sinú que comprende el municipio de San Pelayo Córdoba, esta zona se caracteriza por poseer una temperatura media de 28 °C, una altura de 9 m.s.n.m. y pluviosidad mediana. Una segunda recolección fue realizada en el parque Los Laureles de la Ciudad de Montería. Un ejemplar de colección se encuentra en

JUAN ZULUAGA VEGA

M.Sc Profesor asistente
Universidad de Córdoba
jucazuve@hotmail.com

CARLOS PÉREZ C.

Químico
carlosalpc1@yahoo.es

ALBERTO ANGULO

M.Sc Profesor asociado
Universidad de Córdoba
aangulo@sinu.unicordoba.edu.co

OMAR TORRES

M.Sc Profesor asistente
Universidad de Córdoba
omartorres@hispanista.com

GILMAR SANTAFÉ

Ph.D Profesor Titular
Departamento de Química
Universidad de Córdoba
gsantafe@sinu.unicordoba.edu.co

herbario del Instituto de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia con el número 352016 con el nombre de *Ganoderma lucidum*. Una vez efectuada la recolección, los hongos se molieron y se colocaron en contacto con etanol durante ocho días en la oscuridad, posteriormente, el solvente fue eliminado mediante destilación a presión reducida.

Técnicas empleadas.

Cromatografía en capa fina y cromatografía en columna. Los procesos de fraccionamiento y purificación de los extractos y fracciones de interés se llevaron a cabo mediante cromatografía en columna (CC) empleando como fase estacionaria sílica gel (0.063 - 0.2 mm, Merck®) en relación fase estacionaria: muestra (50:1) y como fase móvil se utilizaron soluciones con gradiente de polaridad de los solventes Hexano, Acetato de etilo y Metanol. El monitoreo por cromatografía en capa delgada (CCD) se realizó en cromatoplasmas de aluminio 20 x 20 cm de sílica gel 60F 254 y un espesor de 0.2 mm utilizando como fase móvil mezclas de los solventes anteriormente mencionados. Como medios de detección se utilizaron una lámpara Ultravioleta marca CAMAG (con longitudes de onda de 254 y 366 nm), solución de ácido fosfomolibdico al 5% en etanol y reactivo Liebermann-Burchard, con aspersiones sobre las placas y posterior calentamiento.

Cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. El análisis por cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (CGAR-EM) para todos los compuestos se realizó en un equipo Hewlett Packard 6890, utilizando una columna capilar de sílica fundida columna HP-5 (30 m de largo, 0.33 mm de diámetro y 25 µm de espesor de película) y Helio como gas de arrastre a 1.0 mL / min. El detector utilizado fue un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5973, equipado con una fuente de ionización de 70 eV y un filamento de 60 µ A mantenido a 300 °C. La temperatura varió desde 90 °C hasta 310 °C a 10 °C por minuto.

Actividad bactericida. Método de difusión en agar.

Diámetro de los discos: 5 mm, medio de cultivo: Agar de Mueller-Hinton, espesor del agar: 4 mm, tiempo de incubación: 24 h, temperatura de incubación: 37 °C. Las fracciones y los extractos fueron evaluados por triplicado en experimentos *in Vitro* contra cepas de microorganismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*) y Gram-negativos (*Escherichia coli*). Se emplearon sensidiscos S&S® (Sigma-aldrich, 6 mm) esterilizados por exposición a la luz ultravioleta durante 1 hora, posteriormente cada sensidisco fue impregnado con soluciones de las muestras a concentraciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 y 7.81 µg/mL. De cada una de las muestras se aplicaron 500 µL por cada sensidisco,

15 minutos después, las cajas Petri fueron incubadas y posteriormente se midieron los halos de inhibición [4].

Actividad antioxidante

Método DPPH

Muestra: se evaluaron los extractos de diclorometano y acetato de etilo. Se prepararon por triplicado soluciones con concentraciones de 3.12, 6.25, 12.5, 25 y 50 ppm para cada uno de los extractos en MeOH; 10 µL de cada concentración se mezclaron con 990 µL de solución madre de DPPH* (2,2-difenil-1-picril hidrazilo, 200 mg/L). **Blanco de la muestra:** A 10 µL de cada concentración de extracto de acetato de etilo se le adicionaron 900 µL de metanol. **Referencia:** 10 µL de DMSO se introdujeron en un tubo de reacción con 900 µL de solución madre de DPPH (200 mg/L). **Blanco de referencia:** 10 µL de DMSO se introdujeron en un tubo de reacción con 900 µL de metanol. Después de incubar a temperatura ambiente por 30 min en la oscuridad se procedió a leer absorbancia a 517 nm. Posteriormente, se graficó el porcentaje de inhibición-vs-la concentración de la muestra (ppm) para obtener la concentración eficiente en el 50% (EC₅₀); es decir la concentración de extracto necesario para captar el 50% de los radicales libres DPPH*. [5]

Método ABTS

Muestra: se prepararon por triplicado soluciones de 3.12, 6.25, 12.5 y 50 ppm para cada uno de los extractos. 10 µL de cada concentración se mezclaron con 990 µL de la solución de ABTS*+ (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato de amonio). **Blanco de la muestra:** 900 µL de buffer fosfato se combinaron con 10 µL de cada muestra. **Referencia:** 900 µL de solución de ABTS*+ se combinaron con 10 µL de buffer fosfato. Se determinó la variación de absorbancia a 730 nm después de un minuto. Se graficó el porcentaje de captación vs la concentración de la muestra (ppm) para obtener la concentración eficiente en el 50% (EC₅₀). [5]

3. RESULTADOS

El extracto etanólico (20.9 g) se suspendió en agua y se realizó un reparto con solventes de polaridad creciente (hexano, CH₂Cl₂ y AcOEt) obteniéndose las fracciones correspondientes (Hexano: 5.1 g, CH₂Cl₂: 3.1 g, AcOEt: 10.3 g) [6]. Para continuar con el proceso de purificación se seleccionaron las fracciones de CH₂Cl₂ y AcOEt, por presentar respuestas positivas en los ensayos de actividad antioxidante, por lo tanto, ambas fracciones fueron sometidos a CC abierta repetitiva empleando solventes de polaridad creciente (hexano, CH₂Cl₂, AcOEt y MeOH) monitoreando el proceso mediante CCF comparando los Rf con patrones conocidos de esteroides, epidiosteroides

y ácidos grasos. De esta forma, se seleccionaron 4 fracciones para CH_2Cl_2 y 3 para AcOEt , las cuales fueron posteriormente analizadas por CGAR-EM. El análisis cromatográfico y de los espectros de masas permitió determinar la estructura de 14 compuestos. En la fracción CH_2Cl_2 se identificaron 8 compuestos, entre los cuales se encontraron 4 esteroides, 2 compuestos nitrogenados y 2 ácidos grasos, los compuestos identificados fueron: ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol (**1**), ergosta-7,22-dien-3 β -ol (**2**), ergosta-7-en-3 β -ol (**3**) [7] [8], 4,4-dimetil-ergosta-7-en-3 β -ol (**4**), 4-metil-2-nitropentán-1-ol (**5**), 1-nitrododeca-2,10-dien-6-ino (**6**), ácido *n*-octadecanoico (**7**) y ácido eicosaenoico (**8**). Por su parte en la fracción acetato de etilo se identificaron 6 compuestos tipo esteroidales monohidroxilados: ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol (**9**), ergosta-7,22-dien-3 β -ol (**10**), ergosta-5,7-dien-3 β -ol (**11**), 4-metil-ergosta-7,25-dien-3 β -ol (**12**) [7] [8], 4-metil-ergosta-5,7,9,14,22,24-hexen-3 β -ol (**13**) y 4-metil-23-isopropil-ergosta-5,7,9,14,22,24-hexen-3 β -ol (**14**). De los compuestos (**4**), (**5**), (**6**), (**13**) y (**14**) (Figura 1) no se encontró información en la bibliografía consultada, por lo tanto pueden considerarse como compuestos químicos novedosos.

Al extracto etanólico se le evaluó su actividad antimicrobiana contra la bacterias *Staphylococcus aureus* (Gram +) y *Escherichia coli* (Gram-), empleando el método de dilución en caldo, dando resultados negativos a todas las concentraciones estudiadas. Por su parte, la evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo a través de los métodos DPPH y ABTS, encontrándose valores de EC_{50} de 48.7 ppm y 15.5 ppm en la fracción acetato de etilo y 80.7 ppm y 19.2 ppm en la de diclorometano, respectivamente. Estos valores permiten considerar como promisorias las sustancias evaluadas.

Datos espectroscópicos:

A continuación se abreviará la Cadena Lateral como (CL).

4,4-dimetil-ergosta-7-en-3 β -ol (4). EMIE, m/z 428 $[\text{M}]^+$ (8.3%), 385 $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$ (8.3), 367 $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7-\text{H}_2\text{O}]^+$ (5.5%), 329 $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_{15}]^+$ (6.4%), 301 $[\text{M}-\text{C}_9\text{H}_{19}(\text{CL})]^+$ (19.3%), 283 $[\text{M}-\text{CL}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (5.6%), 267 $[\text{M}-\text{CL}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3-\text{H}]^+$ (12.8%), 259 [Fisión D] $^+$ (5.5%), 255 $[\text{M}-\text{CL}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4]^+$ (6.4%), 239 $[\text{M}-\text{CL}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CH}_3-\text{H}]^+$ (15.6%), 221 [Fisión C, C12] $^+$ (6.4%), 207 [Fisión C, C11] $^+$ (7.4%), 191 [Fisión C, C10] $^+$ (5.5%) y 173 [Fisión C, C10- H_2O] $^+$ (5.5%). Fórmula molecular: $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}$.

4-metil-2-nitropentán-1-ol (5). EMIE, m/z 147 $[\text{M}]^+$ (18.4%), 130 $[\text{M}-\text{OH}]^+$ (18.4%), 129 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (100), 112 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3-2\text{H}]^+$ (31), 101 $[\text{M}-\text{NO}_2]^+$ (16.1), 84 $[\text{M}-\text{OH}-\text{NO}_2]^+$ (17.2), 83 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{NO}_2]^+$ (28.7), 70 $[\text{M}-\text{CH}_2\text{OH}-\text{NO}_2]^+$ (52.9), 69 $[\text{M}-\text{CH}_2\text{OH}-\text{H}-\text{NO}_2]^+$ (16.1), 57 $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4\text{NO}_3]^+$ (97) y 43 $[\text{M}^+-\text{C}_3\text{H}_6\text{NO}_3]^+$ (63.2). Fórmula molecular: $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_3$

1-nitrododeca-2,10-dien-6-ino (6). EMIE, m/z 207 $[\text{M}]^+$ (2.5%), 161 $[\text{M}-\text{NO}_2]^+$ (1.8), 147 $[\text{M}-\text{CH}_2\text{NO}_2]^+$ (1.8), 123 $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_6\text{NO}_2]^+$ (6.2), 121 $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_4\text{NO}_2]^+$ (13.5), 109 $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_4\text{NO}_2]^+$ (4.9), 107 $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_6\text{NO}_2]^+$ (6.2), 95 $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_6\text{NO}_2]^+$ (14.8), 93 $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_2]^+$ (14.8), 81 $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_8\text{NO}_2]^+$, 69 $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_8\text{NO}_2]^+$ (100), 67 $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NO}_2]^+$ (14.8), 55 $[\text{M}-\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_2]^+$ (8), 53 $[\text{M}-\text{C}_8\text{H}_{12}\text{NO}_2]^+$ (4.9), y 41 $[\text{M}-\text{C}_9\text{H}_{12}\text{NO}_2]^+$ (38.3). Fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_2$.

4-metil-ergosta-5,7,9,14,22,24-hexaen-3 β -ol (13). EMIE, m/z 404 $[\text{M}]^+$ (5.8 %), 386 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (12.8), 371 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3]^+$ (25.6), 343 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$ (7), 327 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_4\text{H}_{11}]^+$ (8), 315 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_5\text{H}_9-2\text{H}]^+$ (12), 303 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_6\text{H}_{11}]^+$ (9.5), 291 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_7\text{H}_{11}]^+$ (11.4), 281 $[\text{M}-\text{CL}]^+$ (12.8), 267 $[\text{M}-\text{CL}-\text{CH}_2]^+$ (11.5), 254 [M-fisión D] $^+$ (8.2), 251 $[\text{M}-\text{CL}-2\text{CH}_3]^+$ (11.6), 239 [M-fisión D- CH_3] $^+$ (39.5), 225 [M-fisión D-C14] $^+$ (31), 207 [M-fisión D-C14- H_2O] $^+$ (30), 189 [M-fisión C, C11] $^+$ (29), 173 [M-fisión C, C11- CH_3] $^+$ (18), 123 $[\text{CL}]^+$ (31) y 43 típico de un grupo isopropilo terminal (100). Fórmula molecular: $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}$.

4-metil-23-isopropil-ergosta-5,7,9,14,22,24-hexaen-3 β -ol (14). EMIE, m/z 404 $[\text{M}]^+$ (38.6%), 386 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (12.8), 358 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4]^+$ (80.5), 303 $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{11}]^+$ (4.6), 343 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{isopropilo}]^+$ (5.7), 331 [M-isopropilo- $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{H}$] $^+$ (18.4), 315 [M-isopropilo- $2\text{CH}_3-2\text{H}$] $^+$ (4.6), 281 $[\text{M}-\text{CL}]^+$ (6.9), 264 $[\text{M}-\text{CL}-\text{CH}_3-2\text{H}]^+$ (37.9), 250 $[\text{M}-\text{CL}-2\text{CH}_3-\text{H}]^+$ (11.5), 220 [fisión D, C15- H_2O] $^+$ (20.7), 207 [fisión D, C14- H_2O] $^+$ (18.4), 189 [M-fisión C, C11] $^+$ (18.2), 174 [M-fisión C, C11- CH_3] $^+$ (28.2), 203 [M-fisión C, C12] $^+$ (19.5), 187 [M-fisión C, C12- CH_3-H] $^+$ (18.2), 123 $[\text{CL}]^+$ (32.3). Fórmula molecular: $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}$.

4. CONCLUSIONES

En la fracción de diclorometano obtenida del extracto etanólico del hongo *Ganoderma lucidum*, se identificaron 8 compuestos, cuatro de ellos de naturaleza esteroidea tipo ergostánica, dos ácidos grasos y dos nitrogenados. El compuesto esteroidea metilado en el carbono 4 (4,4-dimetil-ergosta-7-en-3 β -ol, **4**) y los nitrogenados (4-metil-2-nitropentán-1-ol, **5** y 1-nitrododeca-2,10-dien-6-ino, **6**) son propuestos como estructuras novedosas.

En la fracción acetato de etilo obtenido del extracto etanólico del hongo *Ganoderma lucidum*, se identificaron 6 compuestos, todos con estructura tipo ergosterol caracterizados porque dos de ellos presentan núcleo Δ^7 , otros dos núcleo $\Delta^{5,7}$ y los restantes núcleos $\Delta^{5,7,9,14}$ y metilados en el carbono 4. Los compuestos 4-metil-ergosta-5,7,9,14,22,24-hexen-3 β -ol (**13**) y 4-metil-23-isopropil-ergosta-5,7,9,14,22,24-hexen-3 β -ol (**14**) son propuestos como estructuras novedosas.

Las fracciones de diclorometano y acetato de etilo presentaron alta actividad antioxidante referida principalmente a su capacidad de atrapar radicales libres

según los resultados obtenidos por los métodos DPPH y ABTS.

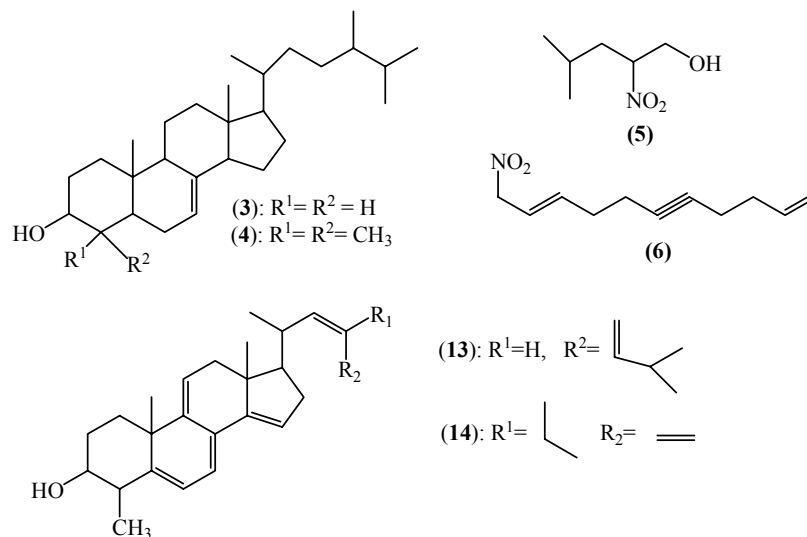


Figura 1. Algunos compuestos identificados en *Ganoderma lucidum*.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores queremos expresar nuestro agradecimiento a la Oficina Administradora de Investigación y Extensión de la Universidad de Córdoba, Colombia, por la financiación de este trabajo.

6. BIBLIOGRAFIA.

[1] JORDAN K. ZJAWIONY. (2004) Biologically active compounds form Aphylophorales (Polypore) fungi. *Journal of Natural Products*, 67 (2), 300-310.

[2] JONG S, BIRMINGHAM J M. (1992) Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. *Adv. Appl. Microbiology*, 37, 101-134.

[3] WAINWRIGHT M. (1995) Introducción a la biotecnología de hongos. Editorial Acirbia, Segunda edición. Pag 57-73.

[4] CYTED. (1995) Manual de Técnicas de Investigación. Subprograma X. Química Fina Farmacéutica. Pag 63-70.

[5] CAVIN A, HOSTETTMANN K, DYATMYKO W, POTTERAT O. (1998) Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Med.* 64, 393-396.

[6] GONZÁLEZ A, LEÓN F, RIVERA A, ZULUAGA J. (2002) New Lanostanoids from the fungus *Ganoderma concinna*. *Journal of Natural Products*, 65, 417-421.

[7] NIETO I, VALENCIA M. 2002. Esteroles, ácidos grasos e hidrocarburos de los cuerpos fructíferos de *Ganoderma australe*. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 47, (4), 220-224.

[8] JOHN WILEY & SONS, INC. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 7th Edition. 2003