

ESTUDIOS DE HONGOS CHILENOS I: METABOLITOS EN *RAMARIA FLACCIDA* (FR.) RICKEN VAR. *CHILENSIS* LAZO

CHILEAN FUNGI STUDIES I: METABOLITES IN *RAMARIA FLACCID* (FR.) RICKEN VAR. *CHILENSIS* LAZO

Virginia Torpoco Carmen¹ y Juan Garbarino Bacigalupo²

RESUMEN

De los cuerpos fructíferos de *Ramaria flaccida* (Fr.) Ricken var. *chilensis* Lazo, se aislaron ergosterol y peroxiergosterol, además de los ácidos mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linoléico. Las estructuras de estos metabolitos fueron determinadas mediante análisis espectroscópicos Masas, RMN ¹H y RMN ¹³C.

Palabras clave.- Metabolitos, Ergosterol, Acidos grasos.

ABSTRACT

From fruit bodies of *Ramaria flaccida* (Fr.) Ricken var. *chilensis* Lazo, were isolated ergosterol, peroxiergosterol, as well as myristic, palmitic, stearic, oleic, linoleic and linoleic acids. Structures of these metabolites were deduced by means of spectroscopic analysis mass, RMN ¹H and RMN ¹³C.

Keywords.- Metabolitos, Ergosterol, Fat acid.

INTRODUCCION

Es bien conocido que los hongos son productores de un sin número de metabolitos que, debido a su diversidad estructural, presentan interés químico y un gran potencial relacionado por sus actividades biológicas.

El sistema fúngico tiene una constitución genética compleja y exhibe una gran variabilidad morfológica, intra e interespecífica, la cual es influenciada considerablemente por factores ambientales.

Los esteroides emergen como una importante característica en la quimiotaxonomía, ellos pueden proveer ayuda adicional en la discusión de especies o subespecies cercanamente relacionadas, las cuales, no pueden ser fácilmente delimitadas sobre una base morfológica [2].

El hongo en estudio es *Ramaria flaccida* (Fr.) Ricken var. *chilensis* Lazo, conocido vulgarmente como hongo coral, tiene su carpóforo de color amarillo ocráceo, se desarrollan en el suelo en los bosques de *Cupressus macrocarpa* Hartw [3].

Estudios previos realizados en el Laboratorio de Productos Naturales (Dpto. de Química-UTFSM) condujeron posteriormente a la especie fúngica en estudio [1].

Esta es la primera vez que se reporta dos esteroides en la especie *Ramaria flaccida* (Fr.) Ricken var. *chilensis* Lazo: ergosterol y peroxiergosterol.

También se detectaron los ácidos mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linoléico [4].

¹Docente investigadora de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, ²Departamento de Química, Universidad Técnica Federico de Santa María, Valparaíso – Chile.



Fig. 1 *Ramaria flaccida* (Fr.) Ricken var. *chilensis lazo*.

PARTE EXPERIMENTAL

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN ^1H) y Carbono (RMN ^{13}C), se obtuvieron en un espectrómetro Broker AC-210. Los análisis de CG-EM se registraron en un espectrómetro de masas VG-TRIO Modelo 1000, acoplado a un cromatógrafo de gases Fisons y un computador digital DEC Laser 1800.

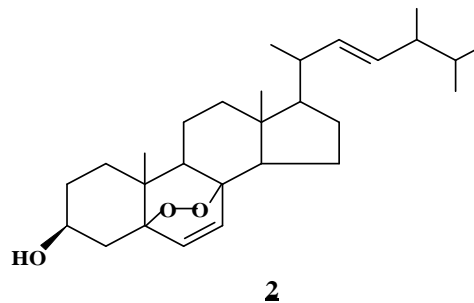
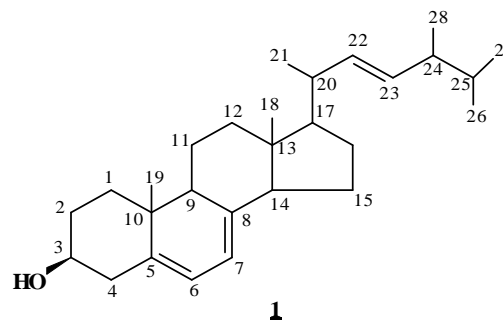
Los compuestos lipídicos se identificaron por cromatografía en fase gaseosa (CG) utilizando un equipo Varian Aerograph, serie 2100, operando desde 150° a 260°C a 6°C/min. Las muestras metiladas se inyectaron en fase etérea.

El material fúngico (Fig. 1) fue colectado entre Jul-Ago'95, en la zona del Lago Peñuelas (Valparaíso, Chile) y fue identificado por el Micólogo W. Lazo.

Los cuerpos fructíferos frescos (1 800g) se extrajeron sucesivamente con éter de petróleo (60-80°) y acetato de etilo. Los extractos se trabajaron en forma separada y cada uno de ellos se fraccionó en columnas de sílica gel dando 312 mg de ergosterol **1** y 125 mg de peroxiergosterol **2**.

Asimismo, la mezcla de ácidos grasos (82 mg) fue metilada con diazo metano CH_2N_2 ; sus ésteres metílicos se identificaron por cromatografía de gases CG y se compararon con muestras

estándares. Los cuales corresponden a los ácidos mirístico (C 14:0), palmítico (C 16:0), esteárico (C 18:0), oleico (C 18:1), linoleico (C 18:2) y linolénico (C 18:3).



RESULTADOS

El espectro de RMN ^1H del ergosterol **1** (Tabla 1) muestra la presencia de dos grupos metilos terciarios a 0,63 (3H, s) y 0,94 ppm (3H,s), correspondientes a los protones de los grupos metilos H-18 y H-19 y cuatro grupos metilos secundarios a 0,81; 0,85; 1,03 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, 3Me) y 0,92 ppm (3H, d, $J = 6,8$ Hz, 1Me) correspondientes a los protones de los grupos metilos H-26, H-27, H-21 y H-28.

Igualmente se observan señales a 2,27 (1H, t, $J = 11,9$ Hz), 2,47 (1H,ddd, $J = 14,2, 4,5$ y 2,2 Hz) y 3,63 (1H, m) las cuales se asignaron a los protones H-4, H-4 y H-3.

Las señales de los cuatro protones olefínicos a 5,19 (2H, m); 5,57 (1H, m) y 5,37 ppm (1H, m) corresponden a H-22, H-23, H-6 y H-7, respectivamente.

Tabla 1. Datos del Espectro RMN ¹H (200 MHz) del Ergosterol (1).

ppm	(N°H, m)	H	J
0,63	(3H, s)	H-18	
0,81	(3H, d)	H-26 o H-27	6,6 Hz
0,85	(3H, d)	H-27 o H-26	6,6 Hz
0,92	(3H, d)	H-28	6,8 Hz
0,94	(3H, s)	H-19	
1,03	(3H, d)	H-21	6,6 Hz
2,27	(1H, t)	H-4	11,9 Hz
2,47	(1H, ddd)	H-4 α	14,2 4,5 2,2 Hz
3,63	(1H, m)	H-3	
5,19	(2H, m)	H-22, H-23	
5,37	(1H, m)	H-7	
5,57	(1H, m)	H-6	

En el espectro de RMN ¹³C (Tabla 2) los valores a 12,0; 16,2; 17,6; 19,6; 19,9 y 21,1, ppm corresponden a los carbonos de los seis grupos metilos C-18, C-19, C-28, C-26 y C-27 y C-21.

Asimismo, en la región correspondiente a carbonos olefínicos se observan señales a 141,3; 119,6;

116,3 y 139,7 ppm, las cuales se atribuyen a la existencia de dos dobles enlaces trisustituidos localizados en los C-5 y C-6, C-7 y C-8; señales a 135,5 y 131,9 ppm se asignaron a un doble enlace disustituido localizado en los carbonos C-22 y C-23.

Tabla 2. Datos del Espectro RMN ¹³C (50,28 MHz) con Experimento DEPT-135 del Ergosterol (1).

C	ppm	C	ppm\
C-1 CH ₂	38,3	C-15 CH ₂	23,0
C-2 CH ₂	31,9	C-16 CH ₂	28,2
C-3 CH	70,4	C-17 CH	55,7
C-4 CH ₂	40,7	C-18 CH ₃	12,0
C-5 C	141,3	C-19 CH ₃	16,2
C-6 CH	119,6	C-20 CH	40,4
C-7 CH	116,3	C-21 CH ₃	21,1
C-8 C	139,7	C-22 CH	135,5
C-9 CH	46,2	C-23 CH	131,9
C-10 C	37,0	C-24 CH	42,8
C-11 CH ₂	21,1	C-25 CH	33,0
C-12 CH ₂	39,1	C-26 CH ₃	19,6
C-13 C	42,8	C-27 CH ₃	19,9
C-14 CH	54,5	C-28 CH ₃	17,6

Del espectro de masas la señal a *m/z* 396 corresponde al ion molecular [M]⁺ y el resto de los fragmentos son rupturas posteriores a este ion, las cuales dan información sobre la longitud de la cadena y las posibles insaturaciones en ellas en el sistema anular. Los iones de mayor importancia son: el ion a *m/z* 378 que se origina de la pérdida de una molécula de agua [M - H₂O]⁺; este ion con pérdida de un metilo genera el ion *m/z* 363 [M -

H₂O - Me]⁺, el ion *m/z* 337 deriva de la pérdida de [M - C₃H₇O]⁺ [5], el ion *m/z* 271 se genera del rompimiento de la cadena lateral. Señales importantes a *m/z* 143 y 128 son características de $\Delta^{5,7}$ dienos [6].

El espectro RMN ¹H del peroxiergosterol 2 (Tabla 3) muestra la presencia de dos grupos metilos terciarios a 0,80 ppm (3H, s) y 0,88 ppm (3H, s),

correspondientes a los protones de los grupos metilos H-18 y H-19, cuatro grupos metilos secundarios a 0,82 (3H, d, $J = 6,8$ Hz, 1 Me), 0,84, 0,90 y 0,94 ppm (3H, d, $J = 6,6$ Hz, 1Me) correspondientes a los protones de los grupos metilos H-26, H-27, H-28 y H-21. Igualmente se

observan señales características de un sistema AB olefínico a 6,24 (1H, d, $J = 11,4$ Hz) y 6,50 ppm (1H, d, $J = 11,4$ Hz) correspondientes a los protones H-6 y H-7, y señales de un doble enlace disustituido en la cadena lateral a 5,16 ppm (2H, m) correspondientes a los protones H-22 y H-23.

Tabla 3. Datos del Espectro RMN 1H (200 MHz) del Peroxi ergosterol (2).

ppm	(N°H, m)	H	J
0,80	(3H, s)	H-18	
0,82	(3H, d)	H-26 o H-27	6,8 Hz
0,84	(3H, d)	H-27 o H-26	6,6 Hz
0,88	(3H, s)	H-19	
0,90	(3H, d)	H-28	6,6 Hz
0,94	(3H, d)	H-21	6,6 Hz
3,97	(1H, m)	H-3	
5,16	(2H, m)	H-22, H-23	
6,24	(1H, d)	H-7	11,4 Hz
6,50	(1H, d)	H-6	11,4 Hz

En el espectro de RMN ^{13}C (Tabla 4) los valores a 12,8; 17,5; 18,1; 19,9; 20,5 y 20,8 ppm corresponden a los carbonos de los seis grupos metilos C-18, C-28, C-19, C-26, C-27 y C-21. Asimismo, en la región correspondiente a carbonos olefínicos se observan señales a 135,1; 130,6; 135,1 y 132,3 ppm, las cuales se atribuyen a la existencia de dos dobles enlaces disustituidos localizados en los C-6 y C-7, C-22 y C-23.

Del espectro de masas el ion m/z 396 presumiblemente se origina del ion molecular por la pérdida de una molécula de oxígeno por una fragmentación Diels-Alder [7] $[M - O_2]^+$; este ion presenta la misma fragmentación que el ergosterol. La eliminación de una molécula del agua origina el ion a m/z 410 $[M - H_2O]^+$, el ion m/z 303 se genera del rompimiento de la cadena lateral $[M - C_9H_{17}]^+$.

Tabla 4. Espectro RMN ^{13}C (50,28 MHz) con experimento DEPT-135 del Peroxi ergosterol (2).

C		ppm	C	ppm
C-1	CH ₂	39,3	C-15	CH ₂ 23,3
C-2	CH ₂	34,7	C-16	CH ₂ 28,5
C-3	CH	66,3	C-17	CH 56,2
C-4	CH ₂	39,6	C-18	CH ₃ 12,8
C-5	C	79,3	C-19	CH ₃ 18,1
C-6	CH	135,1	C-20	CH 39,8
C-7	CH	130,6	C-21	CH ₃ 20,8
C-8	C	79,3	C-22	CH 135,1
C-9	CH	51,1	C-23	CH 132,3
C-10	C	36,9	C-24	CH 42,7
C-11	CH ₂	20,6	C-25	CH 33,0
C-12	CH ₂	30,0	C-26	CH ₃ 19,9
C-13	C	44,5	C-27	CH ₃ 20,5
C-14	CH	51,6	C-28	CH ₃ 17,5

CONCLUSIONES

A partir de los cuerpos fructíferos de *Ramaria flaccida* (Fr.) Ricken var. *chilensis* Lazo se aislaron ergosterol, peroxiergosterol, así como sus respectivos derivados acetilados, los cuales fueron identificados mediante sus espectros de Masas, RMN¹H y RMN¹³C, y la comparación de estos con muestras patrones o con datos reportados en la bibliografía

Se identificaron por cromatografía de gases CG por comparación con muestras patrones 6 componentes de la mezcla de ácidos grasos, previamente esterificados con diazometano CH₂N₂, los cuales corresponden a los ácidos mirístico (C 14:0), palmítico (C 16:0), esteárico (C 18:0), oleico (C 18:1), linoleico (C 18:2) y linolénico (C 18:3).

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Mic. Waldo Lazo (Prof. de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile) por la identificación de la especie fúngica. Al Instituto de Cooperación Iberoamericano - ICI de España. Al Departamento de Química, Universidad Técnica Federico de Santa María (Valparaíso - Chile). A los integrantes del Grupo de Investigación de Productos Naturales (Dpto. Química, UTFSM). Asimismo, a la Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería (Lima-Perú).

REFERENCIAS

1. **Conejeros, A.**, "Aislamiento e identificación de un fenol tetraprenilado del *Suillus Luteus* (Hongo)", Tesis para optar el Título de Técnico Universitario con mención en Química Analítica, UTFSM, 1995.
2. **De Bernardi, M., Garlas Chelli, L., Vidari, G., Vita Finzi, P.**, "Rev. Latinoam. Quím.", 20: 57, 1989.
3. **Lazo, W., Gutiérrez, P. M. y J. Torrico**, "Los hongos más comunes del Jardín botánico de Viña del Mar y de los bosques de Peñuelas y el Tabo", *Bol. Téc. Fac. Cs. Forestales*, Universidad de Chile 38: p. 8, 1977.
4. **Torpoco Carmen, V.**, "Estudio Químico de la *Ramaria flaccida* (Fr.) Ricken var. *chilensis* Lazo y *Gastrum triplex* Jungh (Hongos)", Tesis para optar el grado de Maestría en Ciencias con mención en Química, UTFSM, 146 p., 1997.
5. **Kenny, P. T. M., Wetzel, J. M.**, "Letter: Fragmentations Studies of ergosterol". The formation of the fragment ion at m/z 337, *Eur. Mass Spectrom* 1: 411-13, 1995.
6. **Vásquez, M.**, Metabolitos de algunas Poríferas del Litoral Chileno, Tesis de Maestría en Ciencias con mención en Química, Facultad de Ciencias, Univ. de Chile 156 p., 1989.
7. **Lu, W., Adachi, Y., Kano, K., Yasuta, A., Toriizuka, K., Ueno.**, "Chem. Pharm. Bull". 33: 5083-87, 1985.

Correspondencia: vtorpoco@uni.edu.pe