

ÁCIDOS GRASOS, ÉSTERES Y ESTEROLES DEL CUERPO FRUCTÍFERO DEL HONGO *Laccaria laccata*

FATTY ACIDS, ESTERS AND STEROLS OF THE *Laccaria laccata* MUSHROOM

ÁCIDOS GRAXOS, ÉSTERES E ESTERÓIS DO CORPO FRUTÍFERO DO FUNGO *Laccaria laccata*

Ivonne J. Nieto R.¹, Edna del P. Cucaita V.^{1,2}

Recibido: 19/07/07 – Aceptado: 14/11/07

RESUMEN

Del extracto en acetato de etilo del hongo comestible *Laccaria laccata* se aislaron 3 ácidos grasos, 6 esterés etílicos, 5 esteróles y un triterpeno ergostánico.

Los compuestos se identificaron por EM como ácido palmítico, ácido linoléico y ácido oléico, hexadecanoato de etilo, 8-octadecenoato de etilo, 9-octadecenoato de etilo, 9,12-octadecadienoato de etilo, estearato de etilo, eicosanoato de etilo, ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno, ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol (ergosterol), ergosta-7,22-dien-3 β -ol, ergosta-7-en-3 β -ol, ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol y estigmast-5-en-3 β -ol. Tanto los ésteres como los dos últimos compuestos se reportan por primera vez en la especie *laccata*.

Palabras clave: esteróles, macromiceto, hongo comestible, *Laccaria laccata*, ácidos grasos.

ABSTRACT

From the extract in ethyl acetate of the eatable fungus *Laccaria laccata* were isolated three fatty acids, 6 ethylic esters, 5 sterols and an ergostanic triterpene.

The compounds were identified by M.S. as palmitic, linoleic and oleic acid, ethyl Hexadecanoate, ethyl 8-octadecenoate, ethyl 9-octadecenoate; 9,12-ethyl octadecadienoate, ethyl estearate, ethyl eicosanoate, ergost-2,5,7,9(11),22-pentaene, ergost-5,7,22-triene-3 β -ol (ergosterol), ergost-7-22-diene-3 β -ol, ergost-7-ene-3 β -ol, ergost-5,7,9 (11),22-tetraen-3 β -ol and estigmast-5-ene-3 β -ol. The esters and the two latter compounds are reported by first time in the *Laccata* mushroom.

Key words: Sterols, macromycete, eatable fungus, *Laccaria laccata*, fatty acids.

¹ Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Bogotá – Colombia.

² edcucaitav@unal.edu.co

RESUMO

Do extrato em acetato de etilo do fungo comestível *Laccaria laccata*, isolaram-se 3 ácidos graxos, 6 ésteres etílicos, 5 esteróis e um triterpeno ergostânico.

Os compostos identificaram-se por E.M. como ácido palmítico, ácido linoléico e ácido oléico, hexadecanoato de etilo, 8-octadecenoato de etilo, 9-octadecenoato de etilo, 9,12-octadecadienoato de etilo, estearato de etilo, eicosanoato de etilo, ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno, ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol (ergosterol), ergosta-7,22-dien-3 β -ol, ergosta-7-en-3 β -ol, ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol y estigmast-5-en-3 β -ol.

Os ésteres e os dois últimos esteróis reportaram-se pelo primeira vez na espécie *laccata*.

Palavras-chave: esteróis, macromiceto, fungo comestível, *Laccaria laccata*, ácidos graxos.

INTRODUCCIÓN

Las investigaciones realizadas sobre los metabolitos secundarios en hongos macromicetos se centran casi exclusivamente en aquellas especies que se han empleado desde siempre en las culturas orientales para el tratamiento de varias enfermedades, y cuyo estudio ha arrojado la presencia de componentes con bioactividad, entre las cuales se encuentran adaptogénica, antihipertensiva, antialérgica, hipocolesterolémica (triterpenoides), inmunomoduladora, antiviral (triterpenos tetracíclicos), antibacterial, antibiótica, pro-vitamina D (esteroles y sesquiterpenos), hepatoprotectora (ácidos lanostánicos), antifúngica (ésteres diterpénicos), antitumoral

(esteroles, lactonas, ácidos esteroidales, beta y heteroglucanos y enzimas), insecticida (ecdisteroides), antimicrobiana (aldehídos sesquiterpénicos insaturados) e inmunoestimulativa (beta, heteroglucanos y enzimas) entre otras. Sin embargo, se ha dejado de lado el estudio químico de los hongos comestibles, los cuales también pueden presentar dentro de sus constituyentes metabolitos con bioacción.

En el caso del hongo *Laccaria laccata*, sus estudios se han basado casi exclusivamente en su calidad nutricional y en su aplicación agronómica ya que posee carácter ectomicorrízico, propiedad que lo hace beneficioso en plantaciones que se encuentran en terrenos de poca fertilidad (1, 2), hallándose solo un estudio químico preliminar sobre sus metabolitos secundarios (3).

En el presente artículo se muestran los resultados obtenidos del estudio químico de los metabolitos secundarios de la fracción en éter de petróleo y en acetato de etilo (AcOEt) provenientes del extracto etanólico de dicho hongo, el cual arroja como resultado la presencia de tres ácidos grasos, seis ésteres, cinco esteroles y un triterpeno ergostánico.

MATERIALES Y MÉTODOS

La recolección fue realizada en el parque natural represa del Neusa (Colombia), zona de alta pluviosidad, con una temperatura promedio de 16,5 °C y una altura cercana a los 3000 msnm, en agosto de 2004. El hongo se encontró como una especie gregaria, desarrollándose principalmente en los bosques de pino, y fue identificado por el ingeniero agrónomo Luis Guillermo Henao de la Fundación Inguedé.

Del hongo previamente limpio, seco y molido se sometieron a extracción con etanol del 96% 500 g, durante ocho días con remoción diaria de solvente. El extracto etanólico obtenido se concentró al vacío y se saponificó de la manera usual. La parte saponificada se trató con HCl (dil) hasta pH ácido al papel universal con el fin de regenerar los ácidos, los cuales se extrajeron con éter de petróleo. A la fracción insaponificable, previa neutralización, se le efectuó partición AcOEt/agua 1:1. La fase orgánica se llevó a sequedad (5,5 g), se procedió a la separación de los compuestos presentes empleando cromatografía de columna (CC) en sílica gel, con una relación muestra:sílica 1:30, utilizando como eluyente diclorometano/acetato de etilo 95:5 con gradiente de elusión desde 0 hasta 5% de AcOEt.

En todos los casos las fracciones se caracterizaron por CG-EM en un cromatógrafo Hewlett Packard 6890 (Columna Capilar HP5 30 m; 0,33 mm diámetro interno, y 25 μm de espesor. Gas de arrastre He 4,5 a 1 ml/min modo split 1:10. Temperatura desde 90 °C hasta 300 °C a 5 °C/min) acoplado a espectrómetro de masas 5973 (70eV en modo scan).

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Los componentes de la fracción saponificada fueron identificados como los ácidos palmítico, linoleico y oleico, con base en los rompimientos característicos de esta clase de compuestos como son $[\text{M} - \text{agua}]^+$, $[\text{M} - \text{OH}]^+$, $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H}]^+$ y pérdidas consecutivas de 14 unidades de masa, así como el pico m/z 60, que corresponde al rearrreglo de McLafferty.

De la separación por columna de la parte insaponificada se obtuvieron dos fracciones denominadas A y B. De la fracción A se aislaron 6 compuestos que en su espectro de masas presentan iones característicos de ésteres de cadena alifática, como son el producido por el rearrreglo de McLafferty ($m/z = 88$ u.m.a), así como los iones correspondientes a pérdidas de etilo $[\text{M} - 29]^+$, pérdida de etoxilo $[\text{M} - 45]^+$, y pérdidas sucesivas de metileno, lo que permitió identificarlos como hexadecanoato de etilo (palmitato de etilo), estearato de etilo y eicosanoato de etilo. Los tres compuestos restantes, además de contar con algunos de los iones antes mencionados, tienen en común la presencia de señales correspondientes a fragmentaciones típicas de cadenas doblemente insaturadas, como son los iones de la serie $\text{C}_n\text{H}_{2n-3}^+$ (67, 81, 95, 109, 123, 137...), y la presencia de iones de la serie $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}^+$ y $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}^+$. Además del ión típico de ésteres etílicos a $m/z = 88$; aparece un fragmento m/z 81, que es debido a un rearrreglo con un hidrógeno gama a un doble enlace y luego una ruptura de tipo A3 con el otro doble enlace, formándose un carbocación ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH}^+ - \text{CH} = \text{CH}_2$) en posición alílica a un doble enlace cuya estabilidad es alta (4). El patrón de fragmentación descrito anteriormente permite identificarlos como: 8-Octadecenoato de etilo, 9-octadecenoato de etilo (Oleato de etilo), y 9,12-octadecadienoato de etilo.

La fracción B está constituida por 6 compuestos de carácter triterpénico (I-VI) (Figura 1).

Compuesto I. Su espectro de masas (IE) 70 eV m/z (in. Rel.) muestra un $[\text{M}]^+$ a $m/z = 394$ (85), consistente con la

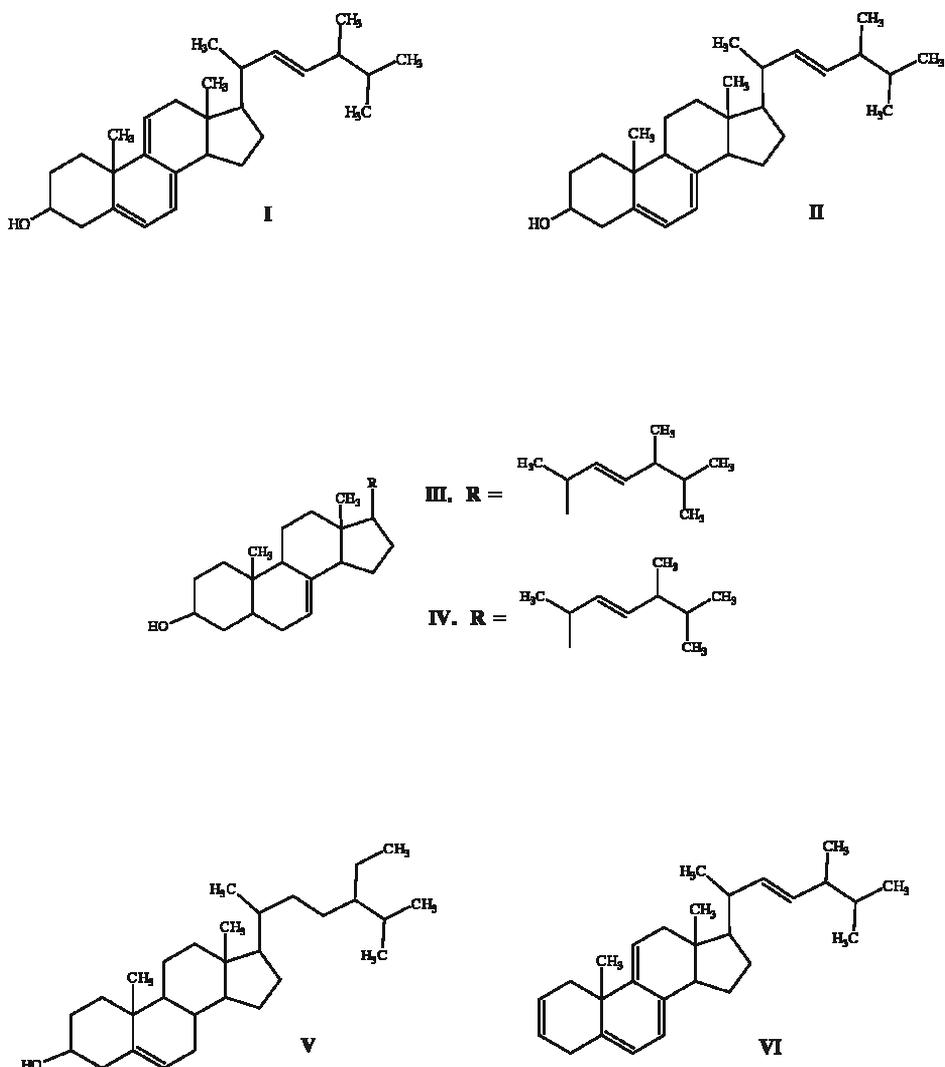


Figura 1. Compuestos de carácter triterpénico.

fórmula molecular $C_{30}H_{52}O$, y fragmentaciones típicas de esteroides como son: 379 [M - metilo]⁺ (70), 376 [M - H₂O]⁺ (100), 361 [M - Metilo - H₂O]⁺ (65), 269 [M - Cadena lateral]⁺ (90), 251 [M - Cadena lateral - H₂O]⁺ (94), 209 [fisión anillo D - H₂O]⁺ (36) y 141 [M - H₂O - Fi-

sión anillo C - metilo]⁺ (43), que concuerda con lo reportado para el ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol. (5, 6).

Compuesto II. Este compuesto presenta en el EM (IE) 70 eV m/z (in. Rel.) un [M]⁺ = 396 (55) u.m.a. (C₂₈H₄₄O), y

los iones característicos de esteroides. El pico a $m/z = 381$ [M - metilo]⁺ (78), 378 [M - H₂O]⁺ (65), 363 [M - metilo - H₂O]⁺ (75), 337 [M - 59]⁺ (60), así como los iones específicos $m/z = 271$ [M - cadena lateral]⁺ (68), $m/z = 253$ [M - cadena lateral - agua]⁺ (85), $m/z = 229$ [fisión del anillo D]⁺ (45), $m/z = 211$ [fisión del anillo D - H₂O]⁺ (50), los cuales se presentan cuando el núcleo es diinsaturado. Las fragmentaciones con $m/z = 158$ [fisión anillo C]⁺, 143 [158 - metilo]⁺ y 128 [158 - dos grupos metilo]⁺ muestran con gran claridad que el esteroide es del tipo $\Delta^{5,7}$ - 3β -hidroxiandrostano presentando total coincidencia con lo reportado para el ergosta-5,7,22, trien- 3β -ol, mejor conocido como ergosterol, el cual es el esteroide más abundante en los hongos superiores (7).

Compuesto III. Revela en el EM (IE) 70 eV m/z (in. Rel.), el pico de ión molecular en 398 u.m.a., concordante con la fórmula condensada C₂₈H₄₆O, así como picos a $m/z = 383$ [M - metilo]⁺ (42), 380 [M - H₂O]⁺ (65), 365 [M - Metilo - H₂O]⁺ (78), 337 [M - 59]⁺ (55) pérdida de isopropilo y los iones característicos $m/z = 273$ [M - cadena lateral]⁺ (72), 271 [M - cadena lateral - 2H]⁺ (65), 255 [273 - H₂O]⁺ (77), 213 [fisión del anillo D - H₂O]⁺ (41), para esteroides monoinsaturados.

Haciendo uso de los picos diagnósticos, el ión a $m/z = 246$ (46) permite localizar la insaturación del núcleo en el C-7, y los fragmentos $m/z = 273$ [M - cadena lateral]⁺ y $m/z = 300$ (38), localizan la insaturación de la cadena lateral en el C-22, lo que permitió identificarlo como ergosta-7,22 - dien- 3β -ol (8) (9) (10).

Compuesto IV. Su EM (IE) 70 eV m/z (in. Rel.), muestra un [M]⁺ a $m/z = 400$ (65), consistente con la fórmula condensada C₂₈H₄₈O. Este compuesto presenta, al igual que el anterior, los iones generales para esteroides, y los característicos para núcleos Δ^7 , salvo la no aparición del ión a $m/z = 300$, de donde se deduce que la cadena lateral es saturada. El análisis del espectro de masas permite identificarlo como ergosta-7-en- 3β -ol (11).

Compuesto V. Presenta en su EM (IE) 70 eV m/z (in. Rel.), un ión molecular en $m/z = 414$ (65) (C₂₉H₅₀O), y las fragmentaciones generales de esteroides en $m/z = 399$ [M - metilo]⁺ (36), 396 [M - metilo - agua]⁺ (85), 273 [M - cadena lateral]⁺ (73), 255 [M - CL - agua]⁺ (85), $m/z = 231$ [fisión del anillo D]⁺ (54), 213 [fisión del anillo D - agua]⁺ (50); y los correspondientes a $m/z = 329$ [M - 85]⁺ (41) y 303 [M - 111]⁺ (38) característicos de esteroides con insaturación en el C-5. La pérdida de 141 u.m.a., correspondientes a la cadena lateral, sugiere el aumento de la misma en un metileno en el carbono 24, lo que está acorde con las rutas biosintéticas en los hongos (12), y permite proponer como estructura para el compuesto la correspondiente al estigmast-5-en- 3β -ol, compuesto que tiene como característica estructural -que lo diferencia de los esteroides comunes- la presencia de un grupo etilo en la posición 24. Cabe anotar que compuestos triterpenoides con esta misma característica se han aislado de hongos poliporáceos (13).

Compuesto VI. Su EM (IE) 70 eV m/z (in. Rel.), muestra un [M]⁺ a $m/z = 376$ (70), que se encuentra acorde con la fórmula C₂₈H₄₀. La ausencia en el espectro de masas de un ión a [M - agua]⁺, des-

carta la posibilidad de que sea un esteroide, y hace suponer que en el anillo A se encuentra localizada una de las insaturaciones, pero la presencia de picos debidos a la pérdida de metilo ($m/z = 361$) (92) y cadena lateral ($m/z = 251$) (100), así como los iones a $m/z = 209$ (52), 156 (72) y 141(47), que sugieren la presencia de un núcleo esteroide $\Delta^{5,7,9(11)}$, hacen inferir que se trata de un triterpeno tetracíclico. La cadena lateral se pierde gracias a una ruptura del enlace C-C en los carbonos C17-C20, originando el ión a $m/z = 251$, que por la posición alílica de la carga positiva origina un carbocatión bastante estable, constituyéndose así en el pico base. Debido a la pérdida de 125 u.m.a., se logra situar una de las insaturaciones en la cadena lateral, y de esta misma forma ubicar 3 dobles enlaces en lo que resta de molécula ($m/z = 251$). Este ión a su vez pierde un grupo metilo y un hidrógeno originando el ión a $m/z = 235$. Por fisión del anillo D en los carbonos C13-C17 y C15-C16 con transposición de un hidrógeno se forma el ión a $m/z = 225$ (40), y el ión a $m/z = 209$ que a su vez pierde un grupo metilo para formar el ión a $m/z = 194$ (64). La fisión del anillo C con transposición de H conlleva la formación del ión a $m/z = 156$, que también pierde un metilo y forma el ión a $m/z = 141$, característico de triterpenos tetracíclicos con insaturaciones en los carbonos 5,7 y 9. De acuerdo con el análisis mencionado, y teniendo en cuenta las rutas biosintéticas en los hongos (12), logra identificarse como: Ergosta- 2,5,7,9 (11),22-pentaeno que fue reportado por primera vez en el hongo *Laetiporus sulphureus* (14).

Los ácidos grasos han sido propuestos por algunos autores como marcadores

quimiotaxonómicos. En el caso del hongo estudiado los componentes mayoritarios de la fracción de ácidos grasos corresponden a los compuestos C16:0, C18:1, C18:2, $\Delta^{6,9}$, lo cual coincide con las investigaciones realizadas en 13 hongos ectomicorrícicos (15).

Diferentes reportes han demostrado que la aparición de dichos compuestos es común a varias familias, así como la variabilidad en la cantidad de los mismos (16, 17). Los resultados obtenidos arrojan que el uso de ellos como un recurso quimiotaxonómico es debatible. Sumado a esto se sabe que el contenido de ácidos grasos puede variar dependiendo de la parte (píleo, lamela) o fase de crecimiento del basidiocarpo analizado, por lo que los estudios se han dirigido al análisis de las esporas para el planteamiento de esquemas que ayuden a la diferenciación entre especies haciendo uso del contenido de ácidos grasos (18).

Es conocido que el componente mayoritario en hongos superiores a nivel de compuestos triterpenoidales es el ergosterol (II); sin embargo, el presente estudio revela que dicha posición en la especie *laccata* la ocupa el ergosta-7,22-dien-3 β -ol (III), con lo cual éste marca una diferencia en relación con las demás setas. Dicha diferencia puede deberse a los cambios morfológicos que implican el desarrollo de una ectomicorriza, como por ejemplo cambios bioquímicos importantes como son la acumulación de polipéptidos, dando como resultado una reorganización estructural de las proteínas, por tal razón se esperan cambios dramáticos en el patrón de metabolitos secundarios y, por qué no, en la cantidad de cada uno de ellos, que podrían en un futuro explicar

claramente las interacciones entre las raíces de los árboles y el suelo que soporta el hongo ectomicorrízico (19).

No obstante la presencia de los esteroides (I, II, III, IV) comúnmente encontrados en hongos comestibles, y siendo la *Laccaria laccata* una seta consumida principalmente por tribus indígenas, se ve la importancia en la dieta, lo cual promovería su introducción en la alimentación de otros sectores de la población, así como la implementación de técnicas para su cultivo, lo que abriría nuevos horizontes en su estudio.

Cabe anotar que en los reportes sobre el análisis químico del contenido graso de la *Laccaria laccata* éste solo arroja la presencia de ácidos grasos, de manera que los ésteres identificados en la presente investigación se reportan por primera vez. Lo mismo sucede con el estigmast-5-en-3 β -ol (V) y el ergosta-2,5,7,9(11), 22-pentaeno (VI).

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, y a la División de Investigación de la Sede Bogotá.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chalet, M.; Botton, B.; Bavoy, J. Seasonal fluctuations of growth and nitrogen metabolism in the ectomycorrhizal association Douglas Fr-Fr-*Laccaria laccata*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 1998. **28**: 59-64.
2. Chu-Chou, M.; Grace, L. Micorrizal fungi of *Pseudotsuga Menziesii* in the south island of New Zealand. *Soil. Biol. Biochem.* 1987. **19** (3): 243-246.
3. Rivera, A.; Nieto, I.; Valencia, M. Composición y cuantificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción esterólica de once hongos colombianos. *Rev. Colomb. Quim.* 2002. **31** (2): 95-102.
4. McLafferty, F.; Turecek, F. Interpretation of mass. Fourth Edition. 1993. Sausalito, California. Chapters 4, 5, 8, 9.
5. Valencia, M. Estudio preliminar del extracto etanólico de un basidiomiceto de la familia *Ganodermataceae*. Trabajo de grado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 2000. p. 26.
6. Heller, S.; Milne, G. EPA/NIH Mass spectral Data Base. Ed. by U.S. Government Printing Office, Washington D.C. 1978. p. 3081.
7. Nieto, I.; Valencia, M. Esteroides, ácidos grasos e hidrocarburos de los cuerpos fructíferos de *Ganoderma Australe*. *Bol. Soc. Chil. Quim.* 2002. **47**: 511-516.
8. Tokes, G.; Djerassi, C. Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*. *J. Chem. Soc.* 1968. **90** (20): 5465.
9. Keller, A.; Maillard, M.; Hostettmann, K. *Phytochem.* 1996. **41** (4): 1041-1046.

10. Torpoco, V.; Garbarino, J. Estudio de hongos chilenos y metabolitos en *Geasprum Triplex Jungh.* *Bol. Soc. Chil. Quim.* 1998. **43**: 227-229.
11. Shirane, N.; Takenaka, K.; Hashimoto, K. Sterol analysis of DMI-Resistant and -sensitive strains of *Venturia inaequalis*. *Phytochem.* 1996. **41** (5): 1301-1307.
12. Weete, J. D. Sterols of the fungi: distribution and biosynthesis. *Phytochem.* 1973. **12**: 1843-4864.
13. Acosta, A. Estudio químico del extracto en acetato de etilo del Hongo polyporaceo *Trametes menziesii* (Berk) Ryv. Tesis de Maestría en Ciencias - Química, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Bogotá. 2001. p. 45.
14. Coy, E. Estudio químico de metabolitos secundarios del hongo micetico *Laetiporus sulphureus*. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá. 2004. p. 28.
15. Karlinski, L.; Ravnskov, S.; Kieliszewska-Rokica, B.; Larsen, J. Fatty acid composition of various ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas of Norway spruce. *Soil Biology Biochemistry.* 2007. **39**: 854-866.
16. Kavishree, S.; Hemavathy, J.; Lokesh, B. R.; Shashirekha, S.; Rajarathnam, S. Fat and fatty acids of Indian edible mushrooms. *Food Chemistry.* 2008. **106**: 597-602.
17. Ruess, L.; Häggblom, M.; García, E.; Dighton, J. Fatty acids of fungi and nematodes - posible biomarkers in the soil food chain? *Soil Biology Biochemistry.* 2002. **34**: 745-756.
18. Brondz, I.; Hoiland, K.; Ekeberg, D. Multivariate análisis análisis of fatty acids in spores of higher basidiomycetes: a new method for chemotaxonomical classification of fungi. *J. Chrom. B.* 2004. **800**: 303-307.
19. Baumert, A.; Schumann, B.; Porzel, A.; Schmidt, J.; Strack, D. Triterpenoids from *Pisolithus tinctorius* isolates and ectomycorrhizas. 1997. **45** (3): 499-504.