

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ESTUDIO QUÍMICO DEL HONGO *Pleurotus djamor* RECOLECTADO EN CÓRDOBA

ANTIOXIDANT ACTIVITY AND CHEMICAL STUDY OF THE FUNGUS *Pleurotus djamor* COLLECTED IN CORDOBA

MIGUEL GUZMÁN¹, NEVER ZÚÑIGA¹, GILMAR GABRIEL SANTAFÉ²,
OMAR TORRES⁴ Y ALBERTO ANGULO³.

PALABRAS CLAVE:

Hongos, *Pleurotus djamor*, actividad antioxidante, Córdoba.

KEY WORDS:

Fungus, mushroom, *Pleurotus djamor*, antioxidant activity, Córdoba.

RESUMEN

Del extracto etanólico obtenido del hongo comestible Pleurotus djamor fue aislada mediante columnas abiertas desarrolladas sobre sílica gel la fracción esterólica. El análisis químico realizado mediante cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas permitió identificar 13 compuestos esteroidales, los cuales son reportados por primera vez en esta especie. Al extracto etanólico le fue evaluada la actividad antioxidante mediante los métodos DPPH y ABTS encontrando valores IC₅₀ de 115.5 µg/mL y 29,37 µg/mL, respectivamente. Los datos obtenidos sugieren que Pleurotus djamor puede ser usado como una sustancia antioxidante natural.

ABSTRACT

The sterolic fraction was isolated from the ethanolic extract obtained from mushroom Pleurotus djamor by chromatography columns on silica gel. Its chemical analysis was done through high resolution gas chromatography coupled to mass spectrometry identifying 13 sterolic compounds which are found for the first time in this specie. The evaluation of the antioxidant activity for the ethanolic extract was carried out by DPPH and ABTS methods,

Recibido para evaluación: 2 agosto. Aprobado para publicación: 11 de agosto

- 1 Químico, Departamento de Química. Universidad de Córdoba
- 2 Ph.D. Departamento de Química. Universidad de Córdoba.
- 3 M.Sc. Departamento de Química. Universidad de Córdoba
- 4 M.Sc. Departamento de Regencia de Farmacia. Universidad de Córdoba

Correspondencia: gsantafe@sinu.unicordoba.edu.co

finding values IC_{50} of 115.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 29,37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. The data obtained suggest that *Pleurotus djamor* can be used as a natural antioxidant substance.

INTRODUCCIÓN

Los hongos han estado en la cumbre de la medicina oriental desde hace 2000 años, los productos derivados de estos organismos actualmente presentan los más altos volúmenes de venta en el mercado de alimentos saludables en países como Taiwán y China. Recientemente, el cuerpo fructífero y las esporas están recibiendo mucha atención, no solo como medicina homeopática sino como una nueva fuente promisoría de medicamentos. Numerosos compuestos con actividad cardiovascular, citotóxica, inmunomoduladora, analgésica, antidiabética, antioxidante, insecticida y nematocida se han aislado en las dos últimas décadas [1].

Esta amplia gama de metabolitos secundarios es debida principalmente a que los hongos son incapaces de sintetizar macromoléculas a partir del dióxido de carbono y la energía procedente de la luz por el hecho de no poseer clorofila, por lo tanto, su biogénesis está condicionada principalmente por el tipo de nutrientes que conforman el 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 variedad de compuestos químicos [2] [3].

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos (se han descrito aproximadamente 500.000, pero se estima que pueden existir entre 1 y 1,5 millones de especies) que presentan una amplia distribución en la naturaleza, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en los ciclos biológicos, solo un pequeño número son patógenos a animales y plantas. [4] Actualmente están siendo utilizados cultivos de algunas especies comestibles a gran escala como una alternativa de alimentación de bajo costo rica en vitaminas, minerales, aminoácidos, fibra y baja en grasa [5].

Colombia por su ubicación geográfica, su historia geológica, sus tipos de vegetación y clima tiene una gran biodiversidad en micoflora ya que ofrece las condiciones necesarias para que los hongos puedan producir una variedad importante de compuestos químicos. En nuestro país son relativamente pocos los estudios adelantados con relación a la constitución química de los hongos y estas investigaciones principalmente enfatizan en el contenido de ergosterol (provitamina D_2) [6].

En lo referente a la región del departamento de Córdoba, nuestro grupo de investigación ha informado sobre la identificación de cinco nuevos productos naturales aislados del hongo *Ganoderma lucidum*, a los cuales les fue evaluada su capacidad antioxidante obteniendo promisorios resultados [7]. También, se realizó un trabajo sobre el hongo *Ganoderma concinna*, en el cual se informó acerca de la identificación de tres nuevos metabolitos secundarios [8]. Por esta razón, es fundamental el seguir estudiando desde el punto de vista químico y de su bioprospección este tipo de organismos adicionando otras especies de diferentes géneros de las que se sabe habitan en la región, explorando de esta forma el potencial de bioactividad que poseen estos productos naturales.

Pleurotus spp. es un género de hongos superiores ampliamente distribuido a nivel mundial e incluye especies comestibles de alto valor económico en muchos países, resulta particularmente interesante desde el punto de vista nutricional en función de su contenido de proteínas, lípidos, niveles tolerables de ácidos nucleicos y por la presencia, además de vitaminas, minerales, fibra dietética, beta glucanos, de compuestos con actividad antioxidante e hipocolesterolémico [9][10][11]. Por lo tanto, los hongos pertenecientes a este género pueden ser utilizados para la producción de nuevos antibióticos, moléculas y compuestos útiles para mejorar la salud humana. Por su parte *Pleurotus djamor* es un hongo con distribución pantropical que crece de manera natural

sobre troncos en descomposición de varios árboles. Esta especie se encuentra con frecuencia en zonas cálidas de África, América, Asia y Australia. *P. djamor* es una especie consumida principalmente a partir de ejemplares silvestres ya que su cultivo comercial es aún incipiente, aunque se han observado avances en el consumo de dicha especie [12].

Así, dentro de este contexto general, y aprovechando la buena distribución de esta especie en nuestro medio, el presente trabajo describe el estudio químico de la fracción esterólica y actividad antioxidante del extracto etanólico del hongo *Pleurotus djamor* recolectado en el departamento de Córdoba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los especímenes del hongo *Pleurotus djamor* fueron recolectados en el corregimiento de Berástegui, municipio de Ciénaga de Oro en el departamento de Córdoba, esta es una zona tropical, se caracteriza por una temperatura de 27°C, humedad relativa del 80 %, precipitación promedia anual de 1200 mm, 160 m.s.n.m. El hongo fue clasificado taxonómicamente en la Fundación Flora y Fauna del departamento de Córdoba. Luego de la recolección, el material fúngico fue dividido en pedazos y sometido a percolación en EtOH por 8 días, posteriormente se filtro y se destilo a presión reducida obteniéndose de esta manera el extracto etanólico crudo.

Cromatografía en columna y cromatografía en capa fina: Una vez obtenido el extracto crudo, se sometió a un proceso de separación y purificación mediante cromatografía en columna desarrollada sobre sílica gel ((0.063-0.2 mm, Merck®) utilizando como mezcla isocrática eluyente hexano:acetato de etilo en relación 1:5 hasta obtener la fracción esterólica. Los procesos de fraccionamiento y purificación de la fracción esterólica también se llevaron a cabo mediante CC empleando una relación fase estacionaria: muestra (50:1) y como fase móvil se utilizaron mezclas de solventes con gradiente de polaridad de Diclorometano, Acetato de etilo y Me-

tanol. El monitoreo fue realizado por cromatografía en capa delgada (CCD) con cromatoplasmas de aluminio de sílica gel 60F 254 y un espesor de 0.2 mm utilizando como fase móvil mezclas de los solventes antes mencionados y colesterol como sustancia de referencia. La detección se llevó a cabo por medio de una lámpara Ultravioleta marca CAMAG (con longitudes de onda de 254 y 366 nm), y solución de ácido fosfomolibdico al 5% en etanol con posterior calentamiento, como revelador.

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 la fracción esterólica se realizó en un equipo Hewlett Packard 6890, utilizando como columna capilar Modelo Agilent 19091J-433, HP-5, 025 mm de diámetro, 30m de largo y 0.25µm de espesor de la película, temperatura máxima 350 °C y Helio como gas de arrastre. El detector utilizado fue un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5973, equipado con una fuente de ionización de 70 eV.

Actividad antioxidante

Método DPPH

Muestra: se evaluó el extracto etanólico, para esto se prepararon por triplicado soluciones con concentraciones de 80, 100, 120, 140, 160 y 180 µg/mL del extracto etanólico, en DMSO y posteriormente diluidas con solución de DPPH· medidas a una absorbancia ajustada a 0.311 hasta completar 2 mL en el tubo de reacción. **Blanco de la muestra:** A 20 µL de cada concentración del extracto etanólico se le adicionaron 1980 µL de Metanol. **Referencia:** A 20 µL de DMSO se le adicionaron 1980 µL de solución madre de DPPH· y se introdujeron en tubo de reacción. Después de incubar a temperatura ambiente por 30 min en la oscuridad se procedió a leer la absorbancia a 517 nm. Posteriormente, se graficó el porcentaje de inhibición Vs la concentración de la muestra para obtener la concentración eficiente en el 50% (CE₅₀); es decir la concentración de extracto necesario para captar el 5% de los radicales libres de DPPH· [13].

Método ABTS

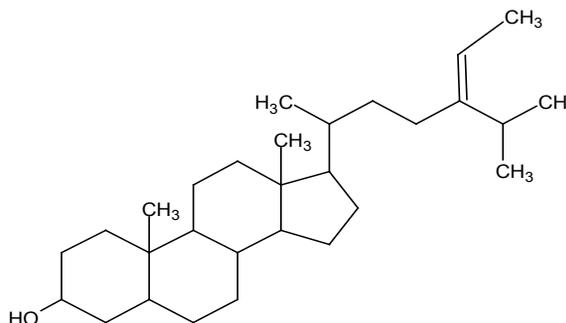
Muestra: se prepararon por triplicado soluciones de 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm del extracto etanólico en DMSO y posteriormente diluidas con solución de ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato de amonio) con una absorbancia ajustada a 0.702 hasta completar 2 mL en el tubo de reacción. **Blanco de la muestra:** A 20 μ L de cada concentración del extracto etanólico se le adicionaron 1980 μ L de buffer fosfato pH: 7.33. **Referencia:** A 20 μ L de buffer fosfato se le adicionaron 1980 μ L de solución de ABTS. Se determinó la variación de la absorbancia a 732 nm, se graficó el porcentaje de captación Vs la concentración de la muestra para obtener la concentración eficiente en el 50 % (CE_{50}).

RESULTADOS

El extracto etanólico (2g) fue sometido a fraccionamiento en CC repetitiva sobre sílica gel, con sistemas eluentes de CH_2Cl_2 , $CH_2Cl_2:AcOEt$ 5:3, $CH_2Cl_2:AcOEt$ 1:1 y $AcOEt$, hasta obtener una fracción esterólica de R_f en CCD similar al colesterol. Luego esta fracción esterólica fue analizada por CGAR-EM. El análisis cromatográfico y de los espectros de masas permitió la elucidación estructural de 13 compuestos, los cuales fueron identificados como; 24-nor-5 α -colest-22-en-3 β -ol (**1**), colest-22-en-3 β -ol (**2**), colest-3 β -ol (**3**), ergost-22-en-3 β -ol (**4**), ergosta-5-24(28)-dien-3 β -ol (**5**), ergost-3 β -ol (**6**), estigmasta-5-24(28)-dien-3 β -ol (**7**), estigmast-24(28)-en-3 β -ol (**8**), ergost-24(28)-en-3 β -ol (**9**), estigmast-28-en-3 β -ol (**10**), 24 ξ -estigmast-3 β -ol (**11**), 24 ξ -estigmast-3 β -ol (**12**), 24 ξ -estigmast-7-en-3 β -ol (**13**). Los compuestos (**11**) y (**12**) tienen estructuras similares, pero posiblemente tienen estereoquímica diferente, puesto que poseen el mismo patrón de fragmentación en el espectro de masas y tiempos de retención muy parecidos, los cuales son 37.705 y 37.765 min respectivamente. Por su parte del compuesto (**8**) no se encontró información en la bibliografía consultada (figura 1), por lo que se propone como novedoso. De otro lado es importante destacar

que es la primera vez que se reporta la extracción e identificación de compuestos esteroidales en el hongo *Pleurotus djamor*.

Figura 1. Estigmast-24(28)-en-3 β -ol (**8**)



A continuación se presentan algunos datos espectroscópicos de los esteroides mayoritarios en la fracción esterólica, la cadena lateral se abrevia como (CL)

Colest-3- β -OL (3). EMIE, m/z [388]⁺(66.6%), 373 [M-CH₃]⁺(43.1%), 355 [M-CH₃-H₂O]⁺(17.6%), 331 [M-C₄H₉ (CL)]⁺(7.8%), 233 [Fisión anillo D]⁺(84.3%), 215 [Fisión anillo D-H₂O]⁺(100%), 147 [Fisión anillo C-H₂O-CH₃]⁺(21.5%). Fórmula molecular: C₂₇H₄₈O

Ergostan-3- β -ol (6). EMIE, m/z [402]⁺(50%), 387 [M-CH₃]⁺(30.7%), 369 [M-CH₃-H₂O]⁺(13.4%), 233 [Fisión anillo D]⁺(80.7%), 215 [Fisión anillo D-H₂O]⁺(100%), 147 [Fisión anillo C-H₂O-CH₃]⁺(21.1%). Fórmula molecular: C₂₈H₅₀O

Estigmast-24(28)-en-3- β -ol (8). EMIE, m/z [414]⁺(39.2%), 399 [M-CH₃]⁺(5.8%), 353 [M-Isopropilo-H₂O]⁺(11.7%), 316 [M-C₇H₁₄ (CL)]⁺(15.6%), 302 [M-C₈H₁₆ (CL)]⁺(50.9%), 275 [M-CL]⁺(13.7%), 273 [M-CL-2H]⁺(90.2%), 257 [M-CL-H₂O]⁺(76.4%), 233 [Fisión anillo D]⁺(23.5%), 215 [Fisión anillo D-H₂O]⁺(43.1%) Fórmula molecular: C₂₉H₅₀O

Estigmast-28-en-3- β -ol (10). EMIE, m/z [414]⁺(75.5%), 399 [M-CH₃]⁺(34.6%), 381 [M-H₂O-CH₃]⁺(30.6%), 353 [M-Isopropilo-H₂O]⁺(10.2%), 330 [M-C₆H₁₂ (CL)]⁺(51%), 303 [M-C₈H₁₇ (CL)]⁺(53%), 275 [M-CL]⁺(34%), 255 [M-CL-2H-H₂O]⁺(34.6%), 233 [Fisión

anillo D]⁺(75.5%). 215 [Fisión anillo D-H₂O]⁺(100%)
Fórmula molecular: C₂₉H₅₀O.

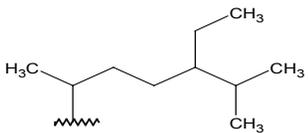
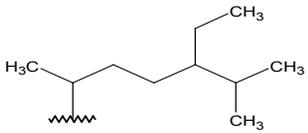
24ξ-estigmast-3β-ol (11). EMIE, m/z [416]⁺(63%),
401(32.6%), 383(14.2%), 316(6%), 290(12%),
233(81.6%), 215(100%), 165(42.8%), 107(44%),
43(44%). Fórmula molecular: C₂₉H₅₂O

24ξ-estigmast-3β-ol (12). EMIE, m/z [416]⁺(28%),
401(18%), 383(14.2%), 316(20%), 290(10%),
233(69%), 215(97%), 165(16%), 107(59%), 43(100%).
Fórmula molecular: C₂₉H₅₂O

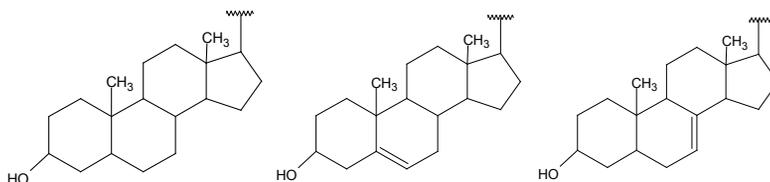
En la tabla 1 se muestran los compuestos identificados
en la fracción esterólica de *Pleurotus djamor*, y su

Tabla 1. Esteroles monohidroxilados aislados del hongo *Pleurotus djamor*

	Cadena lateral	Núcleo	Tiempo retención (min.)	P.M.	Nombre
1		Δ ⁰	29.557	372	24-nor-colest-22-en-3β-ol
2		Δ ⁰	31.938	386	colest-22-en-3β-ol
3		Δ ⁰	33.889	388	colest-3β-ol
4		Δ ⁰	34.448	400	ergost-22-en-3β-ol
5		Δ ⁵	34.877	398	ergosta-5-24(28)-dien-3β-ol
6		Δ ⁰	35.806	402	ergost-3β-ol
7		Δ ⁵	36.055	412	estigmasta-5-24(28)-dien-3β-ol
8		Δ ⁰	36.132	414	Estigmast-24(28)-en-3β-ol
9		Δ ⁰	36.227	400	Ergost-24(28)-en-3β-ol
10		Δ ⁰	37.533	414	Estigmast-28-en-3β-ol
11		Δ ⁰	37.705	416	24ξ-estigmast-3β-ol

12		Δ^0	37.765	416	24ξ-estigmast-3β-ol
13		Δ^7	38.032	414	24ξ-estigmast-7-en-3β-ol

Núcleo:



movilidad cromatográfica (tiempos de retención), se identificaron 13 compuestos, 10 de ellos con núcleo Δ^0 , otros dos con núcleo Δ^5 y solo uno con núcleo Δ^7 . Núcleo: Δ^0 , otros dos con núcleo Δ^5 y solo uno con núcleo Δ^7 .

La evaluación de la actividad antioxidante para el extracto etanólico se llevó a cabo mediante los métodos DPPH y ABTS, encontrándose valores de CE_{50} de 115.5 $\mu\text{g/mL}$ y 29.37 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Estos resultados encontrados permiten considerar como promisorias las sustancias de la especie del hongo *Pleurotus djamor*.

CONCLUSIONES

De la fracción esterólica del extracto etanólico del hongo *Pleurotus djamor*, se identificaron 13 compuestos, 10 de ellos con núcleo Δ^0 , otros dos con núcleo Δ^5 y solo uno con núcleo Δ^7 . El compuesto estigmast-24-en-3β-ol (**8**) se propone como estructura novedosa.

El extracto etanólico del hongo *Pleurotus djamor* presentó actividad antioxidante promisorias según los resultados obtenidos por los métodos DPPH y ABTS, encontrándose valores de IC_{50} de 115.5 $\mu\text{g/mL}$ y 29,37 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar agradecimientos a la Universidad de Córdoba por la financiación del trabajo y a la Fundación Flora y Fauna de Córdoba por la clasificación del hongo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. JONG, S.C y BIRMINGHAM, J.M. Medicinal Benefits of the mushroom Ganoderma. Adv. Appl. Microbiol. 1992. 37. pág 101-34.
- [2]. TEE, Susanna. Setas, identificación y recolección. ISBN 1405478063. 2006. Editorial Parragón.
- [3]. GARCÍA-PAJÓN C.M y COLLADO I.G. Nat. Prod. Rep. 2003, 20,426.
- [4]. RAVEN P y JHONSON. G. Biology, 2002 (Vol. VI). pág. 720
- [5]. DABA, Ayman et al. Production of Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in Egypt as a Source of Nutritional and Medicinal Food. World Journal of Agricultural Sciences. 2008. vol 4. ISSN 1817-3047. 630-634.
- [6]. NIETO, Ivonne et al. Dehidroergosterol: un artefacto generado durante el proceso de extracción de esteroides en el hongo *Pleurotus sajor-caju*. Rev. Colomb. Quim. 2005. vol.34 no.2
- [7]. SANTAFÉ, Gilmar et al. Química y actividades

- antioxidante y bactericida del extracto etanólico del Hongo *Ganoderma lucidum*. Publicado en la revista *Scientia et Technica*. 2007. XIII, Vol 33, ISSN 0122-1701. pag 329-332..
- [8]. ZULUAGA, Juan. New Lanostanoids from the Fungus *Ganoderma concinna*, *Journal of Natural Products*. ISSN 01633864. Volumen 65. Págs. 417 - 421
- [9]. BOVEK P, OZDI L y GALBAVY S. Dose Time-Dependent Hypocholesterolemic Effect of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in Rats, *Nutrition*. 1998. Vol. 14. págs. 282-286.
- [10]. GUO L; LIN J y LIN J. Non-volatile components of several novel species of edible fungi in China, *Food Chemistry*. 2007. Vol. 100. págs. 643-649.
- [11]. TSAI S, et al. Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms, *Food Chemistry*. 2009. Vol. 113. - págs. 578-584.
- [12]. VEGA A, et al. Cultivo de cepas nativas de *Pleurotus djamor* en Panamá, en paja de arroz y pulpa de café, *Revista Mexicana De Micología*. 2006. Vol. 23. págs. 93-97.
- [13]. MOLYNEUX P. Activity, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant , *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 2004. No. 2. Vol. 26.