

Curso 2004/05  
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/16  
I.S.B.N.: 84-7756-646-1

JUAN FRANCISCO LEÓN OYOLA

Química y síntesis de los principios  
activos aislados de hongos superiores.  
Sus posibles aplicaciones farmacológicas

Director  
JAIME BERMEJO BARRERA



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS  
Serie Tesis Doctorales

## ***AGRADECIMIENTOS***

Al finalizar esta memoria de Tesis Doctoral, quiero expresar mi agradecimiento a quienes de una forma u otra han colaborado en su realización. Muy especialmente a mis maestros los Drs. Antonio González y González (q. e. p. d) y Jaime Bermejo Barrera, por contagiarme sus pasiones por la Química Orgánica, ofrecerme la oportunidad de trabajar con ellos, así como su especial dedicación en la dirección y realización de este Trabajo. De ellos aprendí el significado de la honestidad científica, del trabajo bien hecho y que tanto la Universidad como el Consejo Superior de Investigaciones Científicas no son edificios cerrados, sino abiertos no sólo a nuevas líneas de investigación, sino a nuevas relaciones humanas ya sean de carácter científico o no. Por último, y no por ello menos importante, les agradezco su amistad, confianza y constante apoyo.

También deseo agradecer de manera muy especial a mi maestro el Profesor Dr. Augusto Rivera Umaña de la Universidad Nacional de Colombia, por haber sido y ser un gran referente en mi vida personal y profesional, habiendo depositado en mi la confianza y el interés por la Química, apoyándome e interesándose en mi futuro en todo momento.

Al grupo de Investigación Bioquímica Farmacológica del Departamento de Bioquímica, Biología molecular, Fisiología, Genética e Inmunología de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria que dirige el Profesor Dr. Francisco Estévez Rosas por la realización de los ensayos citotóxicos.

Al Profesor Dr. Jerry Pelletier del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Mc Gill (Montreal-Canadá) por la realización de los ensayos de inhibición de síntesis de proteínas.

A los Drs. Luís G. Henao y Jaime Uribe del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, por la descripción taxonómica del material fúngico.

A la Fundación Inguede por la recolección del material fúngico y la extraordinaria labor que realizan hacia la conservación y desarrollo de los valiosos recursos naturales presentes en Colombia.

Agradezco a las entidades que han financiado esta Tesis Doctoral, al CYTED, al Museo de la Naturaleza y el Hombre del Cabildo de Tenerife, al Ministerio de Ciencia y Tecnología y muy en especial al Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC).

A mis compañeros Candelaria García, Juan Ignacio Padrón, Iñaki Brouard y Juan C. Hernández de la Unidad Ecología Química al igual que a los componentes de la Unidad de Servicios, por la ayuda y amistad que en todo momento me dispensaron.

Por último a la mujer que me ha acompañado durante todo este largo trayecto que se ha hecho muy largo a veces, me ha soportado en las buenas y no tan buenas, con quien he compartido esto que se llama amor, me ha llenado de vivencias, experiencias, y quien me ha dado todo lo que uno aspira en su trasegar por la vida “mi hijo”. Con ellos Alba, Ofelia y Alberto espero continuar mi largo trasegar por la vida.

*A mis padres*  
*A mi mujer Alba*  
*A mi hijo Alberto*  
*A Ofelia*

## ÍNDICE

|  | Páginas |
|--|---------|
| Introducción   | 1       |
| Parte I.   |         |
| Estudio de los hongos <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>G. concinna</i> y <i>G. australe</i> |         |
| - Introducción   | 47      |
| - <i>Ganoderma lucidum</i>   |         |
| - Parte teórica  | 55      |
| - Parte experimental   | 71      |
| - <i>Ganoderma concinna</i>  |         |
| - Parte teórica  | 83      |
| - Parte experimental   | 103     |
| - <i>Ganoderma australe</i>  |         |
| - Parte teórica  | 115     |
| - Parte experimental   | 133     |
| Parte II.  |         |
| Estudio del hongo <i>Laetiporus sulphureus</i>   |         |
| - Introducción   | 143     |
| - Parte teórica  | 149     |
| - Parte experimental   | 163     |
| Parte III.   |         |
| Estudio del hongo <i>Suillus luteus</i>  |         |
| - Introducción   | 173     |
| - Parte teórica  | 179     |
| - Parte experimental   | 195     |
| Parte IV.  |         |
| Estudio del hongo <i>Trametes menziesii</i>  |         |
| - Introducción   | 207     |
| - Parte teórica  | 213     |
| - Parte experimental   | 229     |
| Parte V.   |         |
| Síntesis de ceramidas  |         |
| - Introducción   | 239     |
| - Parte teórica  | 245     |
| - Parte experimental   | 259     |

|  |     |
|--|-----|
| Parte VI.  |     |
| Actividad farmacológica de los hongos <i>Ganoderma lucidum</i> ,<br><i>G. concinna</i> , <i>G. australe</i> y <i>Laetiporus sulphureus</i> |     |
| - Introducción   | 273 |
| - Parte teórica  | 285 |
| - Parte experimental   | 301 |
| Técnica generales  | 309 |
| Abreviaturas   | 315 |
| Conclusiones   | 319 |
| Publicaciones  | 325 |

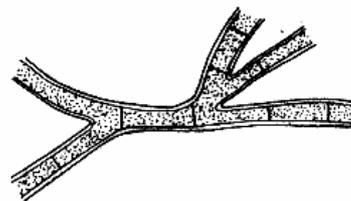
**“Química y Síntesis de los Principios Activos  
Aislados de Hongos Superiores. Sus Posibles  
Aplicaciones Farmacológicas”**

## ***INTRODUCCIÓN***

*“La senda del Investigador es dura. Consigue poca ganancia material, pero tiene oportunidades de elevación espiritual”*

*Fleming*

Los hongos son organismos filamentosos sin cloroplastos, por tanto, no son fotosintéticos sino que viven corrompiendo los tejidos de las plantas, menos comúnmente los de los animales y también pueden crecer en trozos de resina. Los filamentos son, generalmente, filas ramificadas de células de 1 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho, cubiertas de una firme pared de celulosa quitinosa o nitrogenada pero sin cutícula. Las divisiones entre las células son tabiques o septos que crecen hacia dentro desde la pared del tubo como un diafragma que se cierra hasta que queda un pequeño poro central como comunicación entre las células adyacentes. Así, los filamentos fúngicos se parecen a los de las algas pero sus colores, cuando existen, no son fotosintéticos. Los filamentos se denominan hifas, y su naturaleza es insidiosa porque, como finas y penetrantes prolongaciones o como agujas hipodérmicas pueden inyectar fortísimos productos químicos. A través de sus paredes excretan enzimas que descomponen las sustancias sobre las que crecen. Por esas paredes pueden absorber, para su propio crecimiento, agua y los productos de la digestión externa. De esta manera, por su presión externa sobre sus rígidas paredes, las hifas extienden sus ápices vegetativos para abrirse camino en su fuente de alimento. La manera exteriorizada de crecer en los alimentos que los rodean presenta un fuerte contraste con el contenido desarrollo de las plantas verdes.



La variedad de los hongos es increíble. Han explorado por medio de sus hifas el mundo de la materia muerta más eficazmente que cualquier otro tipo de organismo. En número son el equivalente a los insectos. Parece que la explicación se halla en la

limitada capacidad de cada tipo de hifa que son siempre estructuras diminutas, que no se transforman en cuerpos macizos de tejidos diversificados. De ese modo está restringido a la limitada química de su minúsculo tubo. Cada especie de hongo tiene su propio equipo químico y, como las especies de plantas verdes y la mayoría de las partes componentes de éstas difieren químicamente, hay tantas especies de hongos como de fanerógamas -acaso tantas como especies de espermatófitos en general- multiplicadas por el número de sus partes. Una especie de hongo crecerá en una raicilla muerta, otra en la madera de una raíz vieja, otra en la madera vieja de un tronco, otra en una rama o pedazo de corteza, en el limbo de una hoja caída o en su pecíolo, en un fruto caído, en una semilla o en una inflorescencia que yace en tierra.

Hay varias clases de hongos. Algunas especies completamente microscópicas que no forman fructificaciones compuestas de muchas hifas. Una o varias hifas aisladas crecen en el aire y cada una termina en un esporangio que contiene las pequeñas esporas de 3 a 5  $\mu\text{m}$ . El moho blanco del pan, con su esporangio negro en forma de cabeza de alfiler y situado en una hifa como un hilo de seda, es el ejemplo más conocido. Además, las hifas de estas especies rara vez son septadas. Estos hongos se denominan ficomicetes, por su parecido a las algas filamentosas simples. En oposición a ellos están los que tienen hifas completamente septadas, que se agregan a cientos o miles para formar fructificaciones macizas y, según el modo como estas fructificaciones produzcan las esporas, se dividen de modo natural en dos clases. En una de ellas, las esporas se forman dentro de células especiales, terminales y alargadas, llamadas ascos, que lanzan en forma de chorro las esporas cuando éstas están maduras. En la otra clase de esporas se forman sobre pedúnculos muy diminutos (esterigmas) en el exterior de las células terminales de las hifas. Esas células se denominan basidios; en ellos las esporas son lanzadas una a una cuando están maduras. Así pues, hay ascomicetes (hongos con ascos) y basidiomicetes (hongos con basidios); a este segundo grupo pertenecen todas las setas.

La prehistoria y la historia del hombre muestran que las referencias sobre los hongos son muy escasas. Indudablemente, los primeros pobladores del planeta tuvieron que saborear las setas y, tal vez, sufrir los hongos microscópicos. Sin embargo, al

parecer nunca llegaron a ser micófalos pues ni en la mitología ni en sus representaciones artísticas han quedado vestigios, al menos en fechas prehistóricas. La representación más antigua conocida de un hongo, parece ser la descubierta en la tumba de Amenamente, faraón egipcio, que se cree data del año 1450 A.C. Posteriormente, según la leyenda, el héroe griego Perseo, mató accidentalmente a su abuelo Acrisio, a quien había de suceder en el trono de Argos. Luego, según Pausanias:<sup>1</sup>

*“Cuando Perseo volvió a Argos, avergonzado por el escándalo causado por el homicidio, persuadió a Megapenthes, hijo de Proteo, para que intercambiaran los reinos respectivos. De esta forma, cuando recibió el reino de Proteo fundó Micenas, porque en aquel punto se había desprendido la contera de su vaina, y consideró que éste era un signo para que fundara una ciudad. Estando sediento cogió una seta (**mykes**) y que, al fluir agua de ella, satisfizo su sed y, contento con ello, dio al lugar el nombre de Micenas”*

Por consiguiente, una de las civilizaciones más importantes que han aparecido, “**la micénica**”, puede haber recibido su nombre de una seta legendaria. Derivada de la misma palabra griega, la **Micología** (Gr. *mykes* = seta + *logos* = estudio), etimológicamente, es el estudio de las setas.<sup>2</sup>

La influencia de las culturas greco-romanas en la historia de los hongos es de gran relevancia. Las especies más apreciadas fueron la *Amanita cesarea* (Oronja), *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus* (Níscalo) y *Tuber melanosporum* (Trufas).

*“Transcurría el año 41, cuando Claudio sucesor de Calígula como Emperador de Roma mandaba ejecutar a su adúltera esposa Mesalina, quien le había dado un hijo llamado Británico. No harto de tanto desafío el sagaz Claudio tomó nuevas nupcias con Agripina, la hermana del Sucesor Calígula, y viuda de un anterior matrimonio fruto del cual nació Nerón. Agripina entrada en deseos de que su verdadero hijo ocupara, algún día, los laureles del*

---

<sup>1</sup> Habicht, C. “Pausanias guide to ancient Greece”; University of California Press, Berkeley, Los Angeles; London, **1985**.

<sup>2</sup> En realidad, la palabra *micología* es un término acuñado inadecuadamente. La palabra correcta es *micetología*, dado que la raíz combinante de *mykes* es *miceto*, de acuerdo con los principios de la gramática griega.

*Imperio Romano, ideó un plan diabólico para acabar con la vida de Claudio ; pues no envano éste pensaba dejar su trono a su primer hijo Británico. Sabida la gran afición que Claudio tenía por las setas y su consumo sobre todo por la sabrosa oronja la malvada Agripina sedujo y obtuvo como cómplice a uno de los favoritos del Emperador, llamado Locusto. Entre ambos decidieron dar un gran manjar a Claudio repleto de ricas y frondosas oronjas pero camufladas entre ellas introdujeron alguna que otra oronja verde (Amanita phalloides). El inocente Claudio dió buen término a tan delicioso plato y siguiendo la costumbre Romana de la época se autoprovocó el vómito para seguir comiendo y comiendo hasta saciar su apetito glotón. El tiempo fue pasando, irremisiblemente y Claudio permanecía como una rosa mientras Agripina devenía un manojo de nervios. La pobre aún no sabía que los efectos de la oronja verde no se manifestaban hasta veinte horas después de haber sido consumida. Harta de esperar contactó con el médico del Emperador Xenofón otro avisado aliado que le proporcionó coloquintida (Citrullus colocynthis), un nuevo y venenoso mortífero con el que rematar a Claudio. A los pocos minutos el estómago del emperador Claudio explotó y murió. Poco después siendo ya Emperador Nerón, alguien dejó caer (entre las viandas) el comentario de que: -Los hongos son manjar de Dioses-, a lo que Nerón con una sonrisa en sus labios respondió: Sí, ellos son los que han hecho de mi padre un Dios”.*<sup>3</sup>

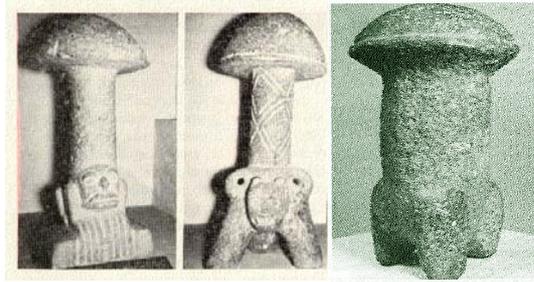
Ésta y otras intoxicaciones en tiempos romanos le dieron a los hongos la denominación latina de fungi que proviene de *funus* = cadáver y de *ago* = yo hago.

En América, el conocimiento y uso de los hongos parece haber sido más común pues en los pueblos de mesoamérica se conoce el culto a las divinidades y a las propiedades alucinógenas de ciertas setas, principalmente de los géneros *Psilocybe*, *Stropharia* y *Amanita*. Cabe mencionar los interesantes trabajos del Dr. Wasson y su esposa quienes develaron el uso religioso, tanto antiguo como contemporáneo de los hongos alucinógenos en el sur de México y Guatemala (Figura 1).<sup>4</sup>

---

<sup>3</sup> López, J. A. S. “Botánica Mágica y Misteriosa”; Ed. Mundi-Prensa, Madrid-Barcelona-México, 2000, pp. 272.

<sup>4</sup> a) Wasson, R. G. "The hallucinogenic mushrooms of Mexico and *Psilocybine*: a bibliography", *Bat. Mus. Leaflet*. Harvard Univ. 20, 1962; b). Wasson, R. G. “*Soma-divine mushroom of immortality*”, Harcourt, Brace and World, Nueva York, 1968.



**Figura 1.** Piedras en forma de setas, usadas en ceremonias religiosas. Cultura Maya

Uno de los objetos arqueológicos americanos más fascinantes y enigmáticos es un tipo de pectoral antropomorfo de oro encontrado en el Darién (Colombia). Tales ornamentos, denominados "Pectorales del Darién", no se limitan a una sola región, si bien su existencia se concentra mayormente en la zona sinú, en el noroeste colombiano, cerca de la frontera con la provincia panameña de Darién.

Aunque con ligeras variaciones, se observa en estas piezas un estilo común, son antropomorfas y en muchos casos muy estilizadas. La característica más sobresaliente consiste en el par de detalles redondeados o en forma de cúpula dispuestos a ambos lados de la cabeza del pectoral, que, por lo general, se halla enmarcada por adornos laterales como alas formadas por una doble espiral (Figura 2).

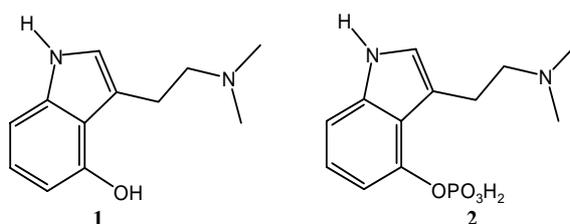


**Figura 2.** A) Pectoral de la cultura Quimbaya en el que se observan claramente las "Campanas de teléfono". B) Colgante sinú. C) Pectoral sinú en el cual se observan claramente las representaciones aladas.

Estos pectorales han sido denominados popularmente "los dioses de la campana del teléfono". Este término se originó, al parecer, en la descripción que el Dr. José Pérez de

Barradas hizo en 1954,<sup>5</sup> cuando mencionó “los botones semiesféricos a los que me he referido que me recuerdan las campanas de los teléfonos antiguos o un par de hongos”. Parece que los adornos semiesféricos que adornan la cabeza, no identificados y que han producido confusión y toda suerte de hipótesis, representan de hecho un par de hongos, probablemente con propiedades alucinógenas. Wasson fue el primero en proporcionar una descripción detallada de la intoxicación por hongos conteniendo psilocina **1** y psilocibina **2**, dos alcaloides obtenidos de hongos del género *Psilocybe*,<sup>6</sup> señalando específicamente, entre otros efectos experimentados, el de la levitación:

“La persona que ha ingerido hongos se sitúa en el espacio, con una visión fuera del cuerpo, invisible, incorpórea, viendo sin ser observada, su cuerpo yace en la oscuridad, tan pesado como plomo, pero el espíritu parece vagar, con la velocidad del pensamiento para viajar ilimitadamente, en el tiempo y en el espacio”.<sup>7</sup>



Los estudios que se han realizado sobre los pectorales del Darién y los pectorales relacionados han afianzado la hipótesis de que la función mágico-religiosa de los hongos se hallaba ampliamente difundida en las culturas aborígenes de México y Centroamérica, así como a lo largo de los Andes hasta el Perú. Considerando la difusión del uso mágico-religioso de los hongos en el nuevo mundo, se cree que los “dioses de la campana del teléfono” colombianos son piezas relacionadas con los

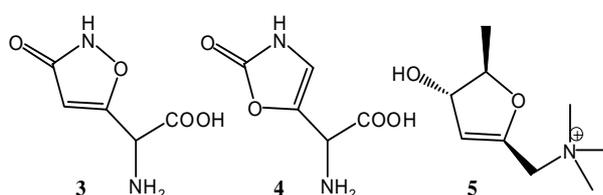
<sup>5</sup> Pérez de Barradas, J. *Orfebrería prehispánica de Colombia: estilo calima*, Gráficos Jura, Madrid, **1954**.

<sup>6</sup> Shirota, O.; Hakamata, W.; Goda, Y. “Concise large-scale synthesis of psilocin and psilocybin, principal hallucinogenic constituents of magic mushroom” *J. Nat. Prod.* **66**, **2003**, 885-887.

<sup>7</sup> Schultes, R. E. “An overview of hallucinogens in the Western Hemisphere”, en P. T. Furst (comp.), *Flesh of the Gods*, Praeger, Nueva York, **1972**, pág. 28.

hongos. Siendo de gran importancia dentro del estudio la función de los alucinógenos en las sociedades primitivas americanas.<sup>8</sup>

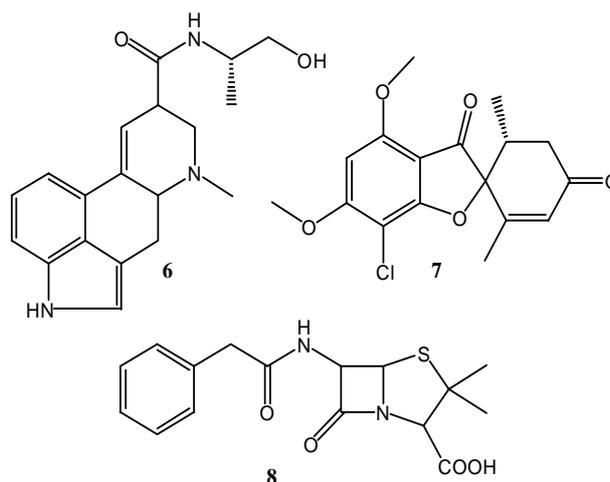
Algo parecido también ocurrió en Borneo y Nueva Guinea y, aún más al norte en los pueblos de Siberia, éstos adquirieron el conocimiento de los poderes relajantes de la *Amanita phalloides* conocida como oronja verde cuyos principios activos, el ácido iboténico **3**, la muscazona **4** y la muscarina **5** tienen propiedades hipnóticas y sedantes. Estos principios se eliminan fácilmente con la orina, no perdiendo su actividad por lo que pueden ser reutilizados, así, en Siberia se acostumbró incluso a beber las orinas propias o ajenas con los mismos efectos.<sup>4b</sup>



Por otra parte, como es sabido, los hongos causan la mayoría de las enfermedades conocidas de las plantas y muchas enfermedades de los animales e incluso de los seres humanos. Constituyen la base de varios procesos biotecnológicos para la producción comercial de muchos compuestos químicos; algunas drogas, como por ejemplo la ergometrina **6**, algunos preparados vitamínicos y varios antibióticos, principalmente penicilina **7** y griseofulvina **8**.<sup>9</sup>

<sup>8</sup> Schultes, R. E.; Bright, A. "Antiguos pectorales de oro: ¿representaciones de hongos?", *Boletín cultural y bibliográfico*, Museo del Oro, número 5, volumen XXII, **1997**.

<sup>9</sup> Bigby, M. "Newer antifungal agents" *J. Am. Acad. Dermatol.* 49, **2003**, 357-358.



La mayor parte de los hongos crecen entre 0°C y 35°C pero la temperatura óptima varía de 20°C a 30°C. Existen varias especies termófilas (Gr. *thermos* = caliente + *philein* = amar) que presentan una temperatura máxima para su crecimiento de 50°C o más y una mínima de 20°C.<sup>10</sup> La capacidad de los hongos para soportar temperaturas extremadamente bajas, en fase de reposo, se utiliza para el almacenamiento a largo plazo de cultivos de hongos en nitrógeno líquido a la temperatura de – 196°C.

A diferencia de las bacterias, los hongos prefieren medios ácidos para su crecimiento, siendo aproximadamente un pH de 6 el óptimo para la mayoría de las especies investigadas.

En la naturaleza, los hongos obtienen su alimento bien infectando organismos vivos, como ocurre con los **parásitos**, bien atacando materia orgánica muerta, como ocurre en los **saprobios**.<sup>11</sup> Otros muchos establecen relaciones simbióticas con plantas como ocurre en líquenes y en las micorrizas. La mayoría de los hongos conocidos, sean habitualmente parásitos o no, pueden vivir sobre material orgánico muerto, como se desprende de su capacidad de crecer en el laboratorio sobre medios sintéticos.

Los hongos que viven sobre la materia muerta y son incapaces de infectar organismos vivos se denominan **saprófitos obligados**; los hongos capaces de causar

<sup>10</sup> Cooney, D. G.; Emerson, R. "Thermophilic Fungi: An Account of their Biology, Activities, and Classification" W. H. Freeman and Co, San Francisco **1964**.

<sup>11</sup> Kendrick, B.; "The fifth Kingdom" Focus Information Group, Newburyport, MA, **1992**.

enfermedades o sobrevivir sobre materia orgánica muerta, según las circunstancias, se denominan **saprófitos facultativos**; y los que sólo pueden vivir a expensas del protoplasma vivo se denominan **parásitos obligados**. Probablemente, cuando se tengan más datos sobre la fisiología de los hongos, se podría elaborar medios sintéticos en los cuales crezcan los denominados parásitos obligados.

Sabemos que los hongos requieren siempre alimentos elaborados para vivir, debido a que, al carecer de clorofila, son incapaces de sintetizar su propio alimento. Cuando se les suministran hidratos de carbono, preferiblemente glucosa o maltosa, la mayoría de los hongos pueden sintetizar sus propias proteínas, utilizando fuentes inorgánicas u orgánicas conteniendo nitrógeno y varios elementos minerales esenciales para su crecimiento. Estudios realizados en el laboratorio han establecido que C, O, H, N, P, K, Mg, S, B, Mn, Cu, Mo, Fe, Zn son requeridos por muchos hongos,<sup>12</sup> otros elementos, como el calcio son requeridos por algunos. Que el calcio sea también esencial para todos los hongos no ha sido demostrado exactamente, pero parece ser muy probable.<sup>13</sup> Por regla general, la glucosa es la mejor fuente de carbono y los compuestos orgánicos nitrogenados son la mayor fuente de nitrógeno, seguidos de cerca por los compuestos de amonio y los nitratos. Muchos hongos son capaces de sintetizar compuestos que funcionan como vitaminas para otros organismos.

Cuando los hongos son distintos, presentan requerimientos alimentarios distintos. Algunos son omnívoros y pueden subsistir sobre cualquier sustrato que mantenga materia orgánica, siempre que exista algo de humedad, crecen sobre cualquier sustrato. Otros hongos presentan una dieta más restringida; unos pocos parásitos obligados no sólo requieren protoplasma vivo como alimento, sino que además están muy especializados respecto a la especie o incluso la variedad del hospedante que parasitan. Siempre que los hongos obtengan su alimento en forma disuelta, las moléculas de éstos deben tener un tamaño suficientemente pequeño para atravesar con

---

<sup>12</sup> a) Winkelmann, G. "Recent advances in uptake and storage of iron in fungi" *Dev. Plant and Soil Sci.* 43, **1991**, 233-238; b) Ross, I. S. "Uptake of zinc by fungi" *Mycol. Series* 11, **1994** 237-257; c) Mehra, R. K.; Winge, D. R. "Metal ion resistance in fungi: molecular mechanisms and their regulated expression" *J. Cell. Biochem.* 45, **1991** 30-40.

<sup>13</sup> Catty, P.; Goffeau, A. "Calcium in yeasts and fungi" en *Calcium as a Cellular Regulator*, Carafoli, E.; Klee, C. (Ed), Oxford University Press, New York, **1999**, 441-474.

libertad las paredes celulares. Por consiguiente, un hongo debe escindir las moléculas más grandes en otras más pequeñas antes de que puedan absorberlas. Esto lo logra segregando enzimas extracelulares que actúan sobre el sustrato digiriendo el alimento fuera del cuerpo del hongo. De las enzimas que un hongo es capaz de producir depende, en gran manera, su capacidad para utilizar ciertas sustancias como alimento.

A continuación describiremos una pequeña introducción sobre la “Química de Productos Naturales” que, como bien sabemos, es el estudio de sustancias tanto de origen vegetal, fúngico y animal que pueden obtenerse bien directamente de dicho material (plantas, hongos, insectos, bacterias etc) en sus diferentes estadios, como de sus transformados, cultivos y residuos derivados de estos. Estos organismos producen una vasta y diversa cantidad de compuestos orgánicos con estructuras moleculares a veces simples pero la mayor parte de las veces bastante complejas. De estas sustancias tradicionalmente denominadas como **metabolitos secundarios** (flavonoides, lignanos, terpenos, fenoles, alcaloides, esteroides, etc) diferentemente distribuidos y limitados a unos grupos taxonómicos en cada reino en especial, se desconocen muchas de sus funciones aunque actualmente se está trabajando con intensidad en este campo. A su vez, los **metabolitos primarios** son usualmente descritos como aquellas sustancias que son la unidad química fundamental de la vida de las células tal como los ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos sin embargo es enorme la complejidad de sus estructuras químicas y por ende sus vías biosintéticas. Los metabolitos secundarios han tenido históricamente una cierta insignificancia biológica,<sup>14</sup> sin embargo, los químicos orgánicos se han interesado en estas sustancias y han investigado sus propiedades químicas desde la segunda mitad del siglo XIX. Los estudios de Productos Naturales en los laboratorios de investigación han sido estimulados gracias al desarrollo de:

- a) Técnicas físico-químicas de separación.
- b) Sistemas analítico-instrumentales de identificación (aprovechamiento de la espectroscopía en la elucidación estructural).

---

<sup>14</sup> Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. “Natural Products (Secondary Metabolites)” en *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. (Eds), *American Society of Plant Physiologist*, USA, **2000**, 1250-1251.

- c) Metodologías sintéticas.
- d) Métodos de obtención por biosíntesis o biotransformaciones (Biotecnología).
- e) Utilización de la Ingeniería Genética.

El interés en los Productos Naturales no ha sido puramente académico, dicho interés es promovido por su gran utilidad como fármacos, tintes, polímeros, perfumes entre otros. El reconocimiento de las propiedades físicas, químicas y biológicas han fortalecido a muchos sectores industriales como son: Alimentario, Farmacéutico, Agroquímico, Cosmético, etc. Nosotros nos hemos propuesto realizar, en la introducción de la presente Tesis Doctoral, un estudio de los metabolitos secundarios aislados de basidiomicetes, los cuales han tenido relevantes aplicaciones en diferentes ámbitos científicos. A continuación mencionaremos una serie de metabolitos clasificados de acuerdo a su naturaleza química, origen biogénico y actividad biológica con la finalidad de presentar un panorama general, sin ánimo de hacer una revisión exhaustiva, pero sí teniendo en cuenta revisiones completas hechas con anterioridad.<sup>15</sup>

#### **Metabolitos derivados de la glucosa:**

Podemos enumerar una gran gama de macromoléculas en las cuales encontramos polisacáridos,  $\beta$ -glucanos, exopolisacáridos, heteropolisacáridos entre otros, los cuales han ido recibiendo en los últimos años una creciente atención debido a sus actividades antitumorales.<sup>16</sup> Como ejemplo podemos citar los polisacáridos con estructura de  $\beta$ -(1-3)-glucanos aislados de *Lentinus edodes* potenciador de los mecanismos de defensa en

---

<sup>15</sup> a) Turner, W. B.; Aldridge, D. C. "Fungal Metabolites II" Academic Press, London, **1983**; b) Gill, M. "Pigments of fungi (Macromycetes)" *Nat. Prod. Rep.* 11, **1992**, 67-90; c) Lorenzen, K.; Anke, T. "Basidiomycetes as a source for new bioactive natural products" *Curr. Org. Chem.* 2, **1998**, 329-364; d) Ayer, W. A.; Browne, L. M. "Terpenoid metabolites of mushrooms and related basidiomycetes" *Tetrahedron* 37, **1991**, 2199-2248.

<sup>16</sup> a) Wasser, S. P.; Sytnik, K. M.; Buchalo, A. S.; Solomko, E. F. "Medicinal mushrooms: past, present and future" *Ukrains'kii Botanichnii Zhurnal* 59, **2002**, 499-524; b) Wasser, S. P. "Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, **2002**, 258-274.

pacientes con cáncer gástrico y comercializado con el nombre de Lentinan®.<sup>17</sup> Otro polisacárido antitumoral fue aislado de *Coriolus versicolor*, éste está formado por una mezcla de un 75% de un glucano y un 25% de proteína, usado como agente inmunoterapéutico en cánceres de pulmón, colorectales, gástricos y cérvico-uterino, siendo especialmente activo frente a la metástasis, comercialmente se conoce con el nombre de Krestin® (PKS).<sup>18</sup> El tratamiento tópico de polisacáridos aislados de fermentación de los hongos *Phellinus igniarius* o *Agrocybe cylindracea* inhibió el número de tumores de piel en ratones en un porcentaje de 70 y 88% respectivamente.<sup>19</sup>

### Metabolitos derivados del ácido shikímico:

Los ácidos shikímico y corísmico son intermediarios claves en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptofano. Estos tres aminoácidos aromáticos y el ácido corísmico son importantes precursores para numerosos metabolitos secundarios que incluyen un sistema de anillo aromático.

Las estrobilurinas **9-13** y las oudesmansinas **14-16** son antibióticos antifúngicos producidos por diferentes géneros de basidiomicetes (*Agaricus*, *Oudesmansia*, *Favolaschia*, *Xerula*, *Crepidotus*, *Hydropus*, *Mycena*, *Strobilurus* y *Filoboletus*) tanto de climas templados como tropicales.<sup>20</sup> Es interesante resaltar aquí que algunas

---

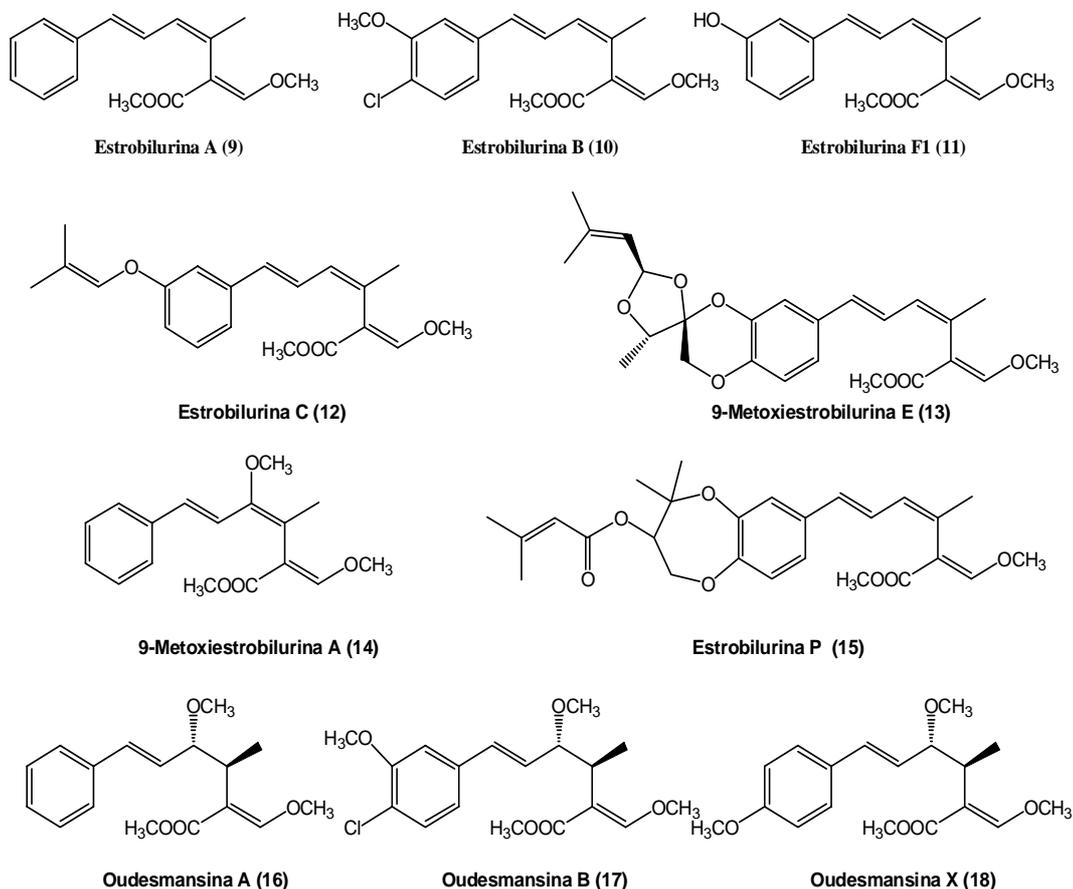
<sup>17</sup> a) Taguchi, T.; Furue, H.; Kimura, T. "Results of phase III study of lentinan" *Jap. J. Cancer Chemoter.* 12, **1985**, 366-378; b) Wasser, S. P.; Weis, A. L. "Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective" *Crit. Rev. Immunol.* 19, **1999**, 65-96.

<sup>18</sup> a) Kobayashi, H.; Matsunaga, K.; Oguchi, Y. "Antimetastatic effects of PSK (krestin), a protein-bound polysaccharide obtained from basidiomycetes: an overview" *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 4, **1995**, 275-281; b) Ohara, M.; Konno, T.; Oguchi, Y.; Matsunaga, K. "Anticancer and growth factor-inhibiting glycoproteins and their manufacture" Patent CODEN: JKXXAF JP 09309842 A2 19971202, **1997**.

<sup>19</sup> Shon, Y. H.; Nam, K. S. "Inhibition of cytochrome P450 isozymes and ornithine decarboxylase activities by polysaccharides from soybeans fermented with *Phellinus igniarius* or *Agrocybe cylindracea*" *Biotechnol. Lett.* 26, **2004**, 159-163.

<sup>20</sup> a) Anke, T.; Oberwinkler, F.; Steglich, W.; Schramm, G. "The strobilurins new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*" *J. Antibiot.* 30, **1977**, 806-810; b) Hosokawa, N.; Momose, I.; Sekizawa, R.; Naganawa, H.; Iinuma, H.; Takeuchi, T.; Matsui, S. "New strobilurins O and P from a mushroom" *J. Antibiot.* 53, **2000**, 297-300; c) Anke, T.; Besl, H.; Mocek, U.; Steglich, W. "Antibiotics from basidiomycetes. XVIII. Strobilurin C and oudesmansin B, two new antifungal metabolites from *Xerula* species (Agaricales)" *J. Antibiot.* 36, **1983**, 661-666.

estrobilurinas también han sido aisladas de un ascomicete *Bolinea lutea*.<sup>21</sup> Las estrobilurinas y oudesmansinas inhiben, a bajas concentraciones, el crecimiento de un gran número de plantas y patógenos humanos.<sup>22</sup>

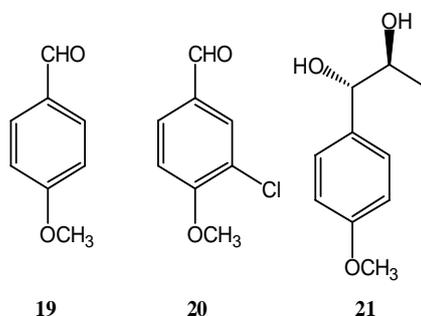


El anisaldehído **19**, el 3-cloro-anisaldehído **20** y el 1-(4-metoxifenil)-1,2-propanodiol **21** fueron aislados de las fermentaciones y de sustratos naturales de varios

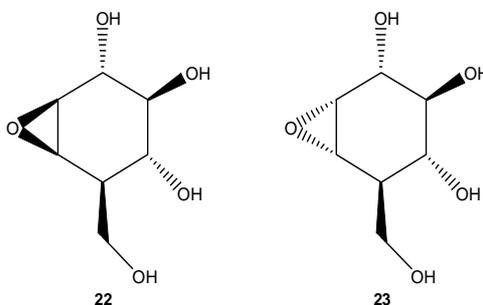
<sup>21</sup> Fredenhagen, A.; Kuhn, A.; Peter, H. H.; Cuomo, V.; Giuliano, U. "Strobilurin-F, strobilurin-G and strobilurin-H, 3 new antifungal metabolites from *Bolinea lutea* .1. Fermentation, isolation and biological-activity" *J. Antibiot.* 43, **1990**, 655-660.

<sup>22</sup> a) Sauter, H.; Steglich, W.; Anke, T. "Strobilurins: evolution of a new class of active substances" *Angew. Chemie, Int. Ed.* 38, **1999**, 1329-1349; b) Bartlett, D. W.; Clough, J. M.; Godwin, J. R.; Hall, A. A.; Hamer, M.; Parr-Dobrzanski, B. "The strobilurine fungicides" *Pest Manag. Sci.* 58, **2002**, 649-662.

hongos degradadores de madera (por ejemplo: *Pleurotus eryngii*, *Bjerkandena adusta*, *Hypholoma fasciculare* y *Pholiota squarrosa*)<sup>23</sup> el anisaldehído y el 1-(4-metoxifenil)-1,2-propanodiol han mostrado una cierta actividad antifúngica, nematocida y citotóxica.



De una especie de *Phellinus* fue aislado el ciclofelitol **22**, un ciclohexano totalmente oxigenado que, aunque no mostró actividad antimicrobiana ni citotóxica, resultó ser un inhibidor competitivo de la  $\beta$ -glucosidasa del almendro. Para estudiar su modo de acción se sintetizó el esteroisómero 1,6-epi-ciclofelitol **23**, la actividad inhibitoria de la  $\beta$ -glucosidasa resultó ser para **22** ( $IC_{50}$  0.8  $\mu$ g/ml) y para **23** ( $IC_{50}$  1.0  $\mu$ g/ml) lo cual indica que la glucosidasa reconoce específicamente la posición C<sub>1</sub> de los  $\alpha$  y  $\beta$ -glucopiranosidos.<sup>24</sup>



<sup>23</sup> a) Lapadatescu, C.; Ginies, C.; Le Quere, J. L.; Bonnarme, P. "Novel scheme for biosynthesis of aryl metabolites from L-phenylalanine in the fungus *Bjerkandera adusta*" *Appl. Environ. Microbiol.* 66, **2000**, 1517-1522; b) Guillen, F.; Evans, C. S. "Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Pleurotus eryngii*" *Appl. Environ. Microbiol.* 60, **1994**, 2811-2817.

<sup>24</sup> a) Atsumi, S.; Umezawa, K.; Iinuma, H.; Naganawa, H.; Nakamura, H.; Iitaka, Y.; Takeuchi, T. "Production, isolation and structure determination of a novel  $\beta$ -glucosidase inhibitor, cyclophellitol, from *Phellinus* sp" *J. Antibiot.* 43, **1990**, 49-53; b) Marco-Contelles, J. "Cyclohexane epoxides-chemistry and biochemistry of (+)-cyclophellitol" *Eur. J. Org. Chem.* 9, **2001**, 1607-1618.

Las quinonas naturales se encuentran ampliamente distribuidas y se generan a través de diversas rutas biogénicas. Unidades de isopreno y el ácido 4-hidroxibenzoico son los precursores para ubiquinonas y benzoquinonas. Otras benzo-, nafto y antroquinonas pueden ser derivadas de policétidos o precursores terpénicos. Varias antraquinonas y fenoxazinonas, aisladas de basidiomicetes, exhiben fuertes propiedades tóxicas y antibióticas. La actividad biológica de muchas quinonas se debe a la reactividad química con residuos nucleofílicos de enzimas y péptidos.

La micenona **24**, una quinona que contiene tres cloros y una cadena lateral acetilénica, fue aislada del cultivo de una variedad de *Mycena*. En semillas de *Ricinus communis* la micenona es inhibidora de la liasa isocitrato, una enzima clave en el ciclo del glioxilato.<sup>25</sup>

La frustulosina **25**, un acetileno aromático relacionado con la micenona, fue aislado de *Stereum frustulosum* y *S. hirsutum* y mostró actividad inhibitoria en el crecimiento de varias bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus mycoides*, *B. Subtilis* y *Vibrio cholerae*).<sup>26</sup>

La panepoxidona **26**, un derivado bencénico altamente oxigenado aislado de la fermentación de *Panus conchatus* y *P. rudis*, mostró efectos tóxicos en ratones con un LD<sub>50</sub> de 23 mg/Kg.<sup>27</sup> Esta sustancia además inhibe el factor de transcripción NF-κB siendo un posible agente antiinflamatorio y anticarcinogénico.<sup>28</sup>

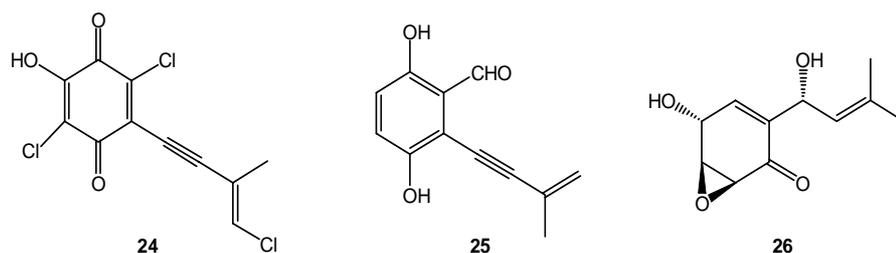
---

<sup>25</sup> Hautzel, R.; Anke, H.; Sheldricks, W. S. "Mycenon, a new metabolite from a *Mycena* species (basidiomycetes) as an inhibitor of isocitrate lyase" *J. Antibiot.* 43, **1990**, 1240-1244.

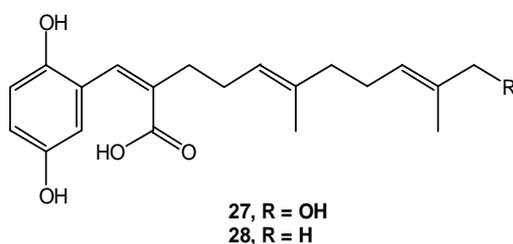
<sup>26</sup> a) Nair, M. S. R.; Anchel, M. "Frustulosin, an antibiotic metabolite of *Stereum frustulosum*" *Tetrahedron Lett.* 31, **1975**, 2641-2642; b) Dubin, G. M.; Fkyerat, A.; Tabacchi, R. "Acetylenic aromatic compounds from *Stereum hirsutum*" *Phytochemistry* 53, **2000**, 571-574.

<sup>27</sup> Kis, Z.; Closse, A.; Sigg, H. P.; Hruban, L.; Snatzke, G. "Structure of Panepoxydone and related fungi metabolites" *Helv. Chim. Acta* 53, **1970**, 1577.

<sup>28</sup> Umezawa, K.; Ariga, A.; Matsumoto, N. "Naturally occurring and synthetic inhibitors of NF-kappa B functions" *Anti-cancer Drug Des.* 15, **2000**, 239-244.



Recientemente se han aislado de *Ganoderma pfeifferi*, dos nuevas farnesil hidroquinonas, denominadas ganomicina A y B **27** y **28** respectivamente. Ambas sustancias exhiben actividad antimicrobiana frente a bacterias gram-positiva y gram-negativa.<sup>29</sup>



#### Metabolitos secundarios derivados de los ácidos grasos:

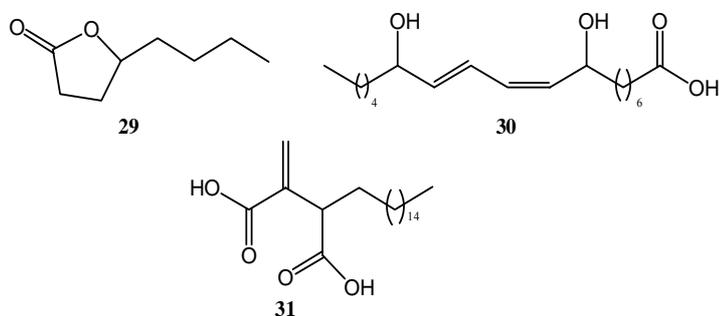
La biosíntesis de ácidos grasos con largas cadenas saturadas, a partir de acetil-CoA y malonil-CoA, involucra una serie de reacciones iterativas de condensación, reducción y deshidratación. Cualquier cambio de esta secuencia conduce a un elevado número de derivados de ácidos grasos, entre los que encontramos el ácido oleico, linoleico, linolénico, etc,<sup>30</sup> así como  $\gamma$ -lactonas por ejemplo la  $\gamma$ -octanolactona **29**,<sup>31</sup> aislada de *Piptoporus solonensis*. También se encuentran ácidos poco usuales como el ácido filobolético **30** aislado del género *Filoboletus*, este último con potente actividad

<sup>29</sup> Mothana, R. A. A.; Jansen, R.; Julich, W. D.; Lindequist, U. "Ganomyccins A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*" *J. Nat. Prod.* 63, **2000**, 416-418

<sup>30</sup> a) Rezanka, T.; Rozentsvet, O. A.; Dembitsky, V. M. "Characterization of the hydroxy fatty acid content of Basidiomycotina" *Folia Microbiol.* 44, **1999**, 635-641; b) Sumner, J. L. "Fatty acid composition of basidiomycetes" *New Zeal. J. Bot.* 11, **1973**, 435-442.

<sup>31</sup> Okamoto, K.; Chimori, M.; Iwanaga, F.; Hattori, T.; Yanase, H. "Production of  $\gamma$ -lactones by the brown-rot basidiomycete *Piptoporus soloniensis*" *J. Biosci. Bioeng.* 94, **2002**, 182-185.

antiviral.<sup>32</sup> El ácido ceripórico B **31** es un metabolito relacionado con el proceso de degradación de lignina producido por diferentes géneros de hongos lignolíticos.<sup>33</sup>



### Policétidos:

Los policétidos son producidos abundantemente por los actinomicetes y quizás representan la familia más rica en metabolitos secundarios microbianos. El caloporosido<sup>34</sup> **32** un compuesto de origen biogenético mixto fue aislado de *Caloporus dichrous*.<sup>35</sup> Esta sustancia actúa como inhibidor selectivo de la fosfolipasa C y presenta una débil actividad antimicrobiana. Su parte policétida contiene el ácido dihidromerulínico B **33**.<sup>36</sup>

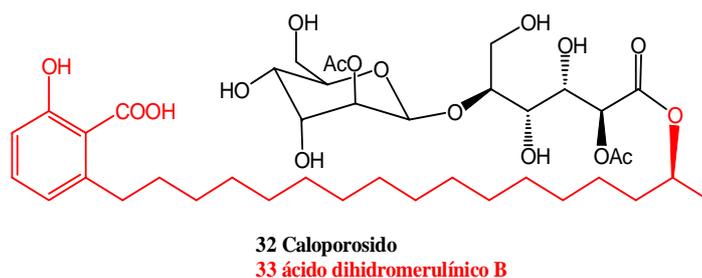
<sup>32</sup> Simon, B.; Anke, T.; Sterner, O. "Hydroxylated unsaturated fatty-acid from cultures of a *Filoboletus* species" *Phytochemistry* 36, **1994**, 815-816

<sup>33</sup> Del Río, A.; Martínez-Íñigo J. C.; Martínez, M. J.; Martínez, A. T. "Production of new unsaturated lipids during wood decay by ligninolytic basidiomycetes" *Applied Environ. Microbiol.* 68, **2002**, 1344-1350.

<sup>34</sup> Furstner, A.; Konetzki, I. "Total synthesis of caloporoside" *J. Org. Chem.* 63, **1998**, 3072-3080.

<sup>35</sup> Weber, W.; Schu, P.; Anke, T.; Velten, R.; Steglich, W. "Antibiotics from basidiomycetes. Caloporoside, a new inhibitor of phospholipases-c from *Caloporus dichrous*" *J. Antibiot.* 47, **1994**, 1188-1194.

<sup>36</sup> Giannetti, B. M.; Steglich, W.; Quack, W.; Anke, T.; Oberwinkler, F. "Antibiotics from basidiomycetes. Merulinic acids A, B, and C, new antibiotics from *Merulius tremellosus* and *Phlebia radiata*" *Z. Naturforsch.* 33, **1978**, 807-816.



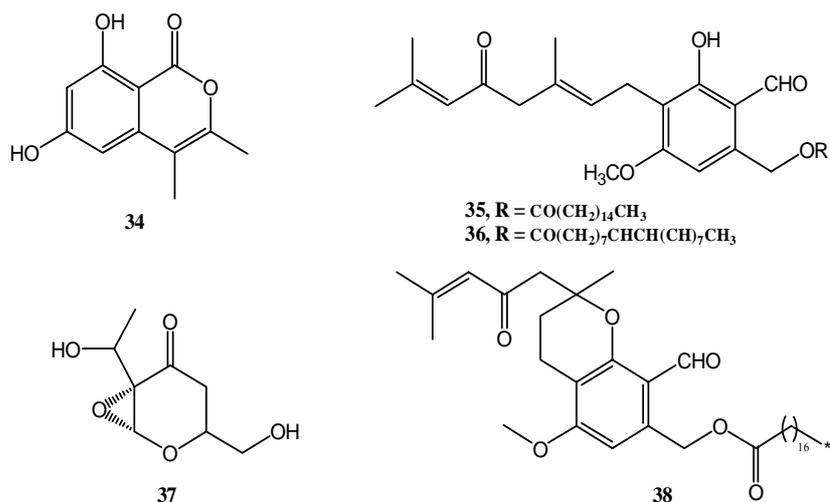
La fermentación del basidiomicete *Gloeophyllum sepiarium* en madera descompuesta condujo al aislamiento de la isocumarina ospolactona **34** la cual presenta actividad antifúngica.<sup>37</sup>

De la fermentación del hongo comestible *Hericiium erinaceum* se aislaron los hericenos A **35**, B **36** y la  $\gamma$ -dihidropirona denominada erinapirona C **37**. Se supone que estas moléculas están formadas por una unidad tetracétida conectada a una cadena lateral isoprénica. Los hericenos exhibieron un efecto citotóxico débil, en cambio, la erinapirona C presentó efectos contra bacteria Gram-positiva.<sup>38</sup> Por otro lado, la hericenona G **38**, induce activación de los factores de crecimiento en enfermedades neurodegenerativas.<sup>39</sup>

<sup>37</sup> Nakajima, S.; Kawai, K.; Yamada, S.; Sawai, Y. "Isolation of ospolactone as antifungal principle of *Gloeophyllum-sepiarium*" *Agric. Biol. Chem.* 40, **1976**, 811-812.

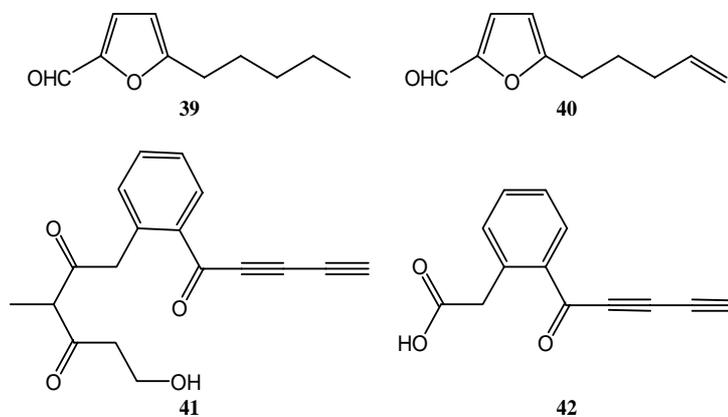
<sup>38</sup> Arnone, A.; Cardillo, R.; Nasini, G.; Depava, O. V. "Secondary mold metabolites. Hericenes A, C and erinapyrone C, new metabolites produced by the fungus *Hericiium erinaceus*" *J. Nat. Prod.* 57, **1994**, 602-606.

<sup>39</sup> Mizuno, T. "Bioactive substances in *Hericiium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Yamabushitake), and its medicinal utilization" *Int. J. Med. Mushrooms* 1, **1999**, 105-112.



Los furaldehídos 5-pentil-2-furaldehído **39** y el 5(4-pentenil)-2-furaldehído **40** fueron aislados de *Irpex lacteus* y mostraron actividad nematocida contra *Aphelenoides besseyi* con un IC<sub>50</sub> de 25-50 µg/mL.<sup>40</sup>

Las penioforinas A **41** y B **42** obtenidas de *Peniophora affinis*, son compuestos acetilénicos que poseen fuerte actividad antibacteriana (MIC de 0.5 µg/mL para penioforina B contra *Proteus vulgaris* y varias especies de *Staphylococcus*).<sup>41</sup>



<sup>40</sup> Hayashi, M.; Wada, K.; Munakata, K. "New nematocidal metabolitos from a fungus *Irpex lacteus*" *Agric. Biol. Chem.* 45, **1981**, 1527-1529.

<sup>41</sup> Gerber, N. N.; Shaw, S. A.; Lechevalier, H. A. "Structures and anti-microbial activity of peniophorin A and peniophorin B, 2 polyacetylenic antibiotics from *Peniophora affinis*" *Antimicrob. Agents Chemother.* 17, **1980**, 636-641.

### Terpenos:

Los terpenos predominantes en basidiomicetes son los sesquiterpenos, aunque también encontramos, en menor medida, monoterpenos, diterpenos y triterpenos, muchos de los cuales poseen estructuras que, hasta ahora, sólo han sido detectadas en esta clase de microorganismos, mientras que otras están estrechamente ligadas a un cierto número de plantas.<sup>42</sup>

### Sesquiterpenos derivados del *Trans, Trans*-Farnesol

#### Protoiludanes:

La fermentación de *Lentinellus cochleatus* rinde lentinelona **43**, la cual puede ser un precursor del ácido lentinélico **44**, un protoiludano producido por *L. omphalodes* y *L. ursinus*. Biogenéticamente **44** puede ser formado por condensación de un aldehído protoiludano con una unidad de malonato.<sup>43</sup> El ácido lentinélico exhibe fuertes efectos antibacteriales con concentraciones mínimas inhibitorias MIC de 1-5 µg/mL, sin embargo no fueron observados efectos antifúngicos, en cambio su metil éster muestra una pronunciada actividad antifúngica. El ácido lentinélico inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas en células de carcinoma de Ehrlich (ECA) con valores de 20 µg/mL.<sup>44</sup>

Las meleolidas B **45**, C **46** y D **47** son los primeros terpenoides orsellinatos aislados de *Armillaria mellea*. Por otra parte, algunos ésteres del ácido orsellínico han sido aislados de líquenes o de sus micobiontes. Las meleolidas exhiben actividades antibióticas frente a un número de bacterias Gram-positiva y contra los hongos

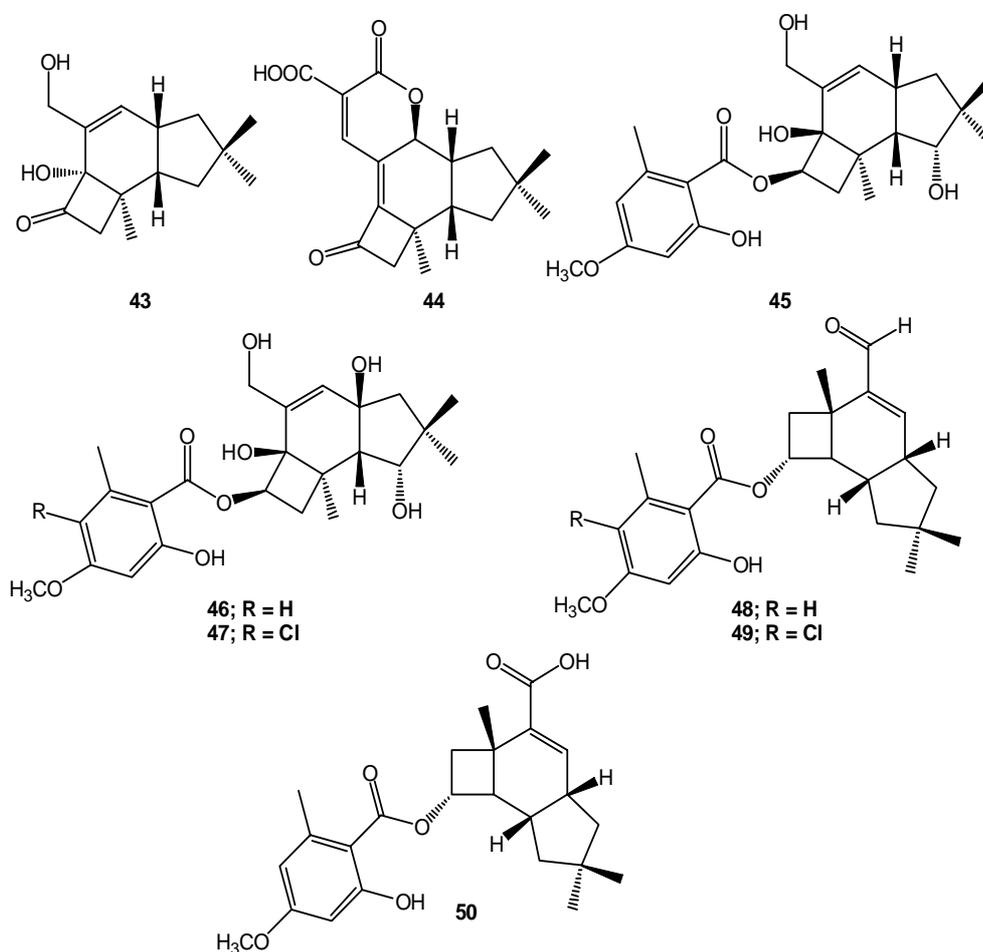
---

<sup>42</sup> Brizuela, M. A.; García, L.; Pérez, L.; Mansur, M. "Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios" *Rev. Iberoam. Micol.* 15, **1998**, 69-74.

<sup>43</sup> Wunder, A.; Anke, T.; Klostermeyer, D.; Steglich, W. "Lactarane type sesquiterpenoids as inhibitors of leukotriene biosynthesis and other, new metabolites from submerged cultures of *Lentinellus cochleatus*" *Z. Naturforsch. C* 51, **1996**, 493-499.

<sup>44</sup> Stark, A.; Anke, T.; Mocek, U.; Steglich, W.; Kirfel, A.; Will, G. "Antibiotics from basidiomycetes. Lentinelic acid, a biologically-active protoilludane derivative from *Lentinellus* species (basidiomycetes)" *Z. Naturforsch. C* 43, **1988**, 177-183.

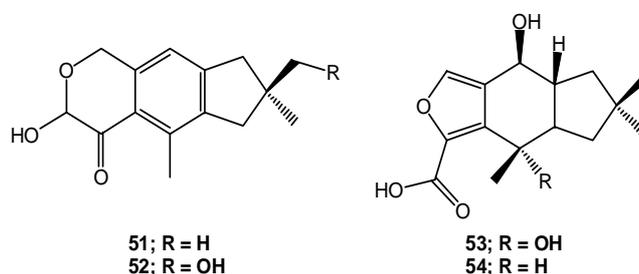
*Cladosporium cucumerinum*. Posteriores investigaciones han permitido aislar otros tres derivados, armilarina **48**, armilaridina **49** y el antibiótico ácido armilárico **50**.<sup>45</sup>



Del cultivo del basidiomicete *Clavicornia divaricata*, se han aislado cuatro nuevos sesquiterpenos con origen de protoiludano, la divaricatina A **51** y B **52**, la 7-

<sup>45</sup> a) Midland, S. L.; Izac, R. R.; Wing, R. M.; Kaki, A. I.; Munnecke, D. E.; Sims, J. J. "Melleolide, a new antibiotic from *Armillaria mellea*" *Tetrahedron lett.* 23, **1982**, 2515-2518; b) Obuchi, T.; Kondoh, H.; Watanabe, N.; Tamai, M.; Amura, S.; Yang, J. S.; Liang, X. T. "Armillaric acid, a new antibiotic produced by *Armillaria mellea*" *Planta Med.* 56, **1990**, 198-201.

episugicolina H **53** y la sugicolina M **54**, todos estos metabolitos muestran moderados efectos antibacterianos.<sup>46</sup>



### Iludanos:

Las iludinas M **55** y S **56** son metabolitos fuertemente antimicrobianos y citotóxicos aislados de la fermentación de *Omphalotus olearius* (*Clitocybe illudens*, *Lapteromyces japonicus*). Los hongos que los producen son altamente tóxicos para los humanos, mostrando la iludina S una excelente actividad *in vivo* contra el Carcinoma de Ehrlich (ECA) en ratones.<sup>47</sup> El basidiomicete *Pleurotus japonicus* produce el 6-desoxiderivado de los compuestos **55** y **56**. La 6-desoxiludina M **57** incrementó significativamente la vida de ratones que padecían de leucemia murina p388 a una dosis diaria de 5 µg/mL durante 5 días, mientras que la 6-desoxiludina S **58** era inactiva.<sup>48</sup>

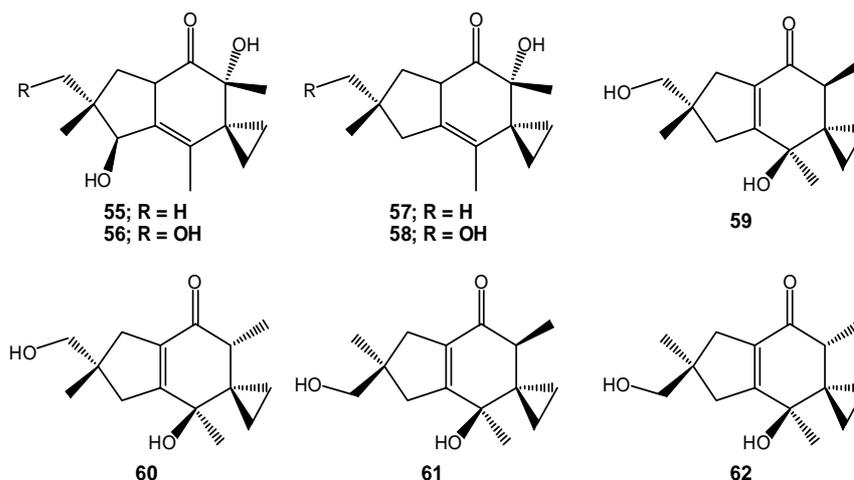
Las iludinas I **59**, I<sub>2</sub> **60**, J **61** y J<sub>2</sub> **62** han sido aisladas de la fermentación del basidiomicete *Coprinopsis episcopalisis*, los compuestos **59**, **60** y **62** resultaron ser moderadamente activos frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, éstos también exhibieron propiedad citotóxica.<sup>49</sup>

<sup>46</sup> Arnone, A.; Candini, G.; Nasini, G.; Sinisi, R. "Isolation and structure elucidation of a new sesquiterpene of protoilludane origin from the fungus *Clavicornia divaricata*" *Tetrahedron* **59**, **2003**, 5033-5038.

<sup>47</sup> Shinozawa, S.; Tsutsui, K.; Oda, T. "Enhancement of the anti-tumor effect of illudin-S by including it into liposomes" *Experientia* **35**, **1979**, 1102-1103.

<sup>48</sup> Hara, M.; Yoshida, M.; Morimoto, M.; Nakano, H. "6-Deoxyilludin-M, a new antitumor antibiotic fermentation, isolation and structural identification" *J. Antibiot.* **40**, **1987**, 1643-1646.

<sup>49</sup> Reina, M.; Orihuela, J. C.; González-Coloma, A.; De Inés, C.; De la Cruz, M.; Del Val, A. G.; Torno, J. R.; Fraga, B. M. "Four illudane sesquiterpene from *Coprinopsis episcopalisis*" *Phytochemistry* **65**, **2004**, 381-385.



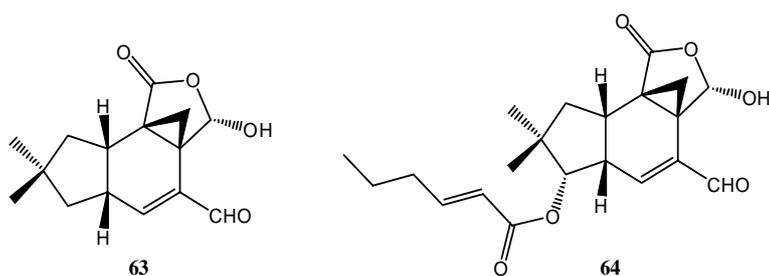
### Marasmanos:

Tanto el ácido marásmico **63** como la pilatina **64** son sesquiterpenos con esqueleto de marasmano. El ácido marásmico fue aislado, por primera vez, de cultivos de *Marasmius conigenus*,<sup>50</sup> la pilatina fue obtenida de *Flagelloscypha pilatii*,<sup>51</sup> ambos compuestos interfieren intensamente en la biosíntesis de los ácidos nucleicos. Se ha propuesto que la función aldehídica  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada puede unirse covalentemente a grupos aminos de ácidos nucleicos o de enzimas. Las ARN polimerasas II y *m*-ARN guanidiltransferasas son marcadamente afectadas *in vitro* después de pre-incubación con ácido marásmico.<sup>52</sup> Para la pilatina sólo se ha detectado efecto citotóxico pero no antitumoral.

<sup>50</sup> a) Dugan, J. J.; Demayo, P.; Nisbet, M.; Robinson, J. R.; Anchel, M. "Terpenoids. Constitution and biogenesis of marasmic acid" *J. Am. Chem. Soc.* 88, **1966**, 2838-2845; b) Forsby, A.; Andersson, M.; Lewan, L. "Structure-activity-relationships for unsaturated dialdehydes. The cytotoxicity of 22 sesquiterpenoid unsaturated dialdehydes, as determined by the neutral red absorption assay and by protein determination" *Toxicol. In vitro* 5, **1991**, 9-14.

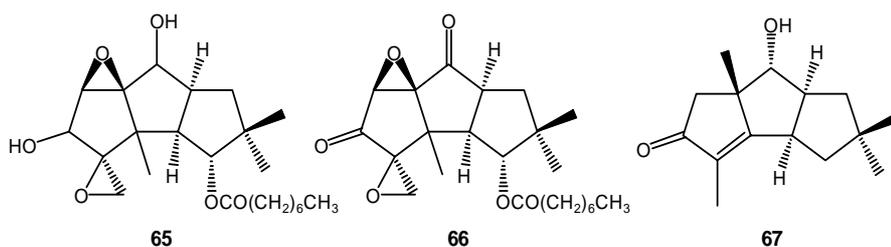
<sup>51</sup> Heim, J.; Anke, T.; Mocek, U.; Steffan, B.; Steglich, W. "Antibiotics from basidiomycetes. Pilatin, a new antibiotically active marasmane derivative from cultures of *Flagelloscypha pilatii*" *J. Antibiot.* 41, **1988**, 1752-1757.

<sup>52</sup> Kupka, J.; Anke, T.; Mizumoto, K.; Gianetti, B. M.; Steglich, W. "Antibiotics from basidiomycetes. The effect of marasmic acid on nucleic-acid metabolism" *J. Antibiot.* 36, **1983**, 155-160.



### Hirsutanos:

La coriolina B **65** fue aislada de *Coriolus consors*,<sup>53</sup> su derivado oxidado, diketocoriolina B **66** mostró actividad antibacteriana, antitumoral e inmunostimuladora.<sup>54</sup> Se cree que estos últimos efectos están causados por la inhibición de la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPasa.<sup>55</sup> El cultivo del *Coriolus consors* en agua de mar rinde un nuevo compuesto el hirsutanol D **67**, este último presenta un nuevo esqueleto de isohirsutano.<sup>56</sup>



<sup>53</sup> Takeuchi, T.; Inhuma, H.; Iwanaga, J.; Takahash, S.; Takita, T.; Umezawa, H. "Coriolin a new basidiomycetes antibiotic" *J. Antibiot.* 22, **1969**, 215-216

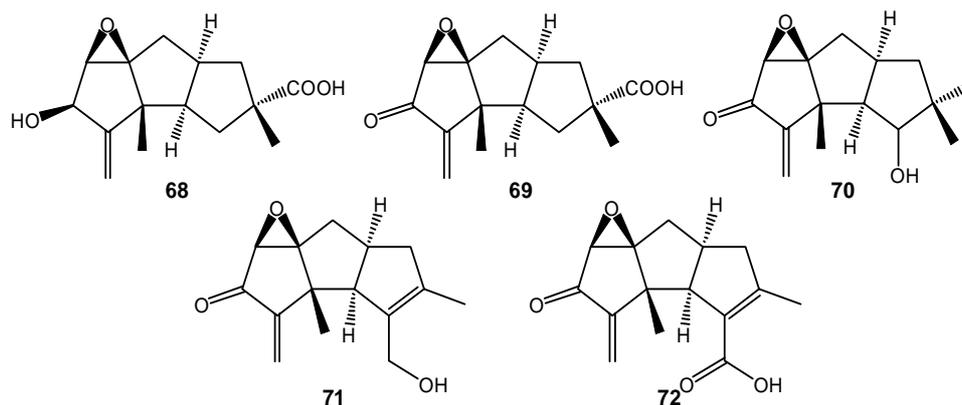
<sup>54</sup> Takeuchi, T.; Takahash, S.; Inhuma, H.; Umezawa, H. "Diketocoriolin B, an active derivative of coriolin B produced by *Coriolus consors*" *J. Antibiot.* 24, **1971**, 631-632.

<sup>55</sup> Nishimura, Y.; Koyama, Y.; Umezawa, S.; Takeuchi, T.; Ishizuka, M.; Umezawa, H. "Chemical modification of the ester group of diketocoriolin B" *J. Antibiot.* 33, **1980**, 393-403.

<sup>56</sup> Wang, G. Y. S.; Abrell, L. M.; Avelar, A.; Borgeson, B. M.; Crews, P. "New hirsutane based sesquiterpenes from salt water culture of a marine sponge-derived fungus and terrestrial fungus *Coriolus consors*" *Tetrahedron* 54, **1998**, 7335-7342.

Los ácidos hirsútico C **68** y complicático **69** fueron aislados del basidiomicete *Stereum complicatum*. El compuesto **69** presentó efectos antimicrobianos moderados frente a *Staphylococcus aureus* debido a la presencia del grupo  $\alpha,\beta$ -insaturado.<sup>57</sup>

La hipnofilina **70**, el pleurotelol **71** y el ácido pleurotético **72** fueron aislados de la fermentación de *Pleurotellus hypnophilus*. El pleurotelol y el ácido pleurotético pueden provenir de un precursor hirsutano por migración 1-2 de un grupo metilo. Tanto la hipnofilina como el pleurotelol actúan como inhibidores del crecimiento de plantas.<sup>58</sup>

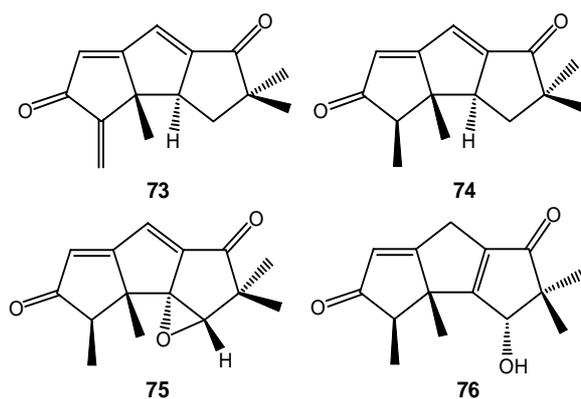


Del cultivo del basidiomicete *Macrocyttidia cucumis* se han aislado las cucuminas A-D **73-76** estos compuestos son derivados de hirsutanos altamente insaturados. La cucumina A exhibe actividad antibacteriana frente a *Bacillus brevis*, *Nematospora coryli* y *Mucor miehei*. Las cucuminas A-C muestran alta citotoxicidad contra la línea celular L1210 con  $IC_{100} = 0.5-1$  mg/mL.<sup>59</sup>

<sup>57</sup> a) Mantle, P. G.; Mellows, G. "Production of Hirsutanes by *Stereum complicatum*" *T. Brit. Mycol. Soc.* 61, **1973**, 513-519; b) Mantle, P. G.; Mellows, G. "Complicatic acid, a sesquiterpenoid antibiotic from *Stereum complicatum*" *J. Gen. Microbiol.* 73, **1972**, R22-R22.

<sup>58</sup> a) Kupka, J.; Anke, T.; Giannetti, B. M.; Steglich, W. "Antibiotics from basidiomycetes. Isolation and biological characterization of hypnophilin, pleurotelol, and pleurotellic acid from *Pleurotellus hypnophilus* (berk) sacc" *Arch. Microbiol.* 130, **1981**, 223-227; b) Giannetti, B. M.; Steffan, B.; Steglich, W.; Kupka, J.; Anke, T. "Antibiotics from basidiomycetes. Antibiotics with a rearranged hirsutane skeleton from *Pleurotellus hypnophilus* (Agaricales)" *Tetrahedron* 42, **1986**, 3587-3593.

<sup>59</sup> Hellwing, V.; Dasenbrok, J.; Schumann, S.; Steglich, W.; Leonhardt, K.; Anke, T. "New Triquinane-Type Sesquiterpenoids from *Macrocyttidia cucumis* (Basidiomycetes)" *Eur. J. Org. Chem.* 1, **1998**, 73-79.



### Lactaranos y Secolactaranos:

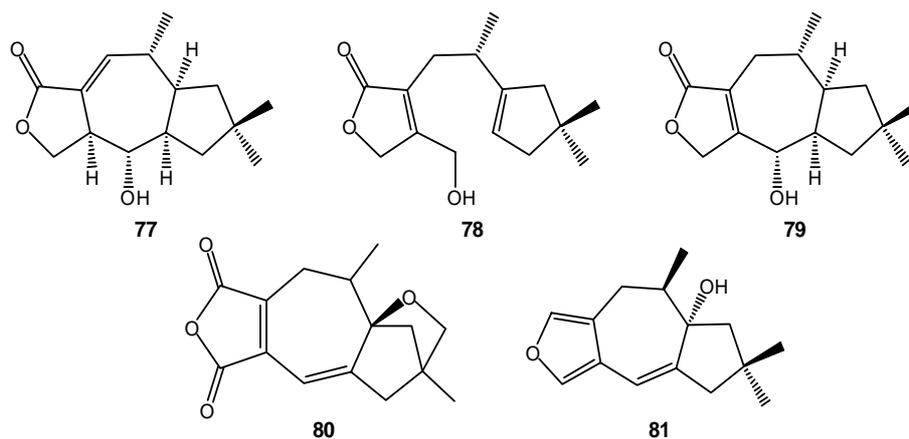
En una investigación sobre agentes antiinflamatorios, tres conocidos sesquiterpenos del tipo lactarano fueron aislados, blenina A **77**, C **78** y deoxilactarorufina A **79** los cuales se obtuvieron de la fermentación de *Lentinellus cochleatus*.<sup>60</sup> Compuestos con esqueleto de lactarano como su nombre indica han sido aislados con bastante frecuencia de *Lactarius* spp.<sup>61</sup>

La blenina A fue el primer lactarano aislado de *Lactarius blennius*.<sup>62</sup> Los compuestos **77-79** son fuertemente inhibidores de la biosíntesis de leucotrieno C<sub>4</sub> en células de leucemia de ratón RBL-1.

<sup>60</sup> Wunder, A.; Anke, T.; Klostermeyer, D.; Steglich, W. "Lactarane type sesquiterpenoids as inhibitors of leukotriene biosynthesis and other, new metabolites from submerged cultures of *Lentinellus cochleatus* (Pers ex Fr) Karst" *Z. Naturforsch.* 51, **1996**, 493-499.

<sup>61</sup> a) Zhang, J.; Feng, X. Z. "Sesquiterpene hydroxylactone from *Lactarius subvelleru*" *Phytochemistry* 46, **1997**, 157-159; b) Zhang, J.; Feng, X. Z. "Subvellerolactone C, a new lactarane sesquiterpene from *Lactarius subvelleru*" *Chin. Chem. Letters* 7, **1996**, 1097-1099; c) Daniewski, W. M.; Gumulka, M.; Przesmycka, D.; Ptaszynska, K.; Bloszyk, E.; Drozd, B. "Sesquiterpenes of lactarius origin, antifeedant structure-activity relationships" *Phytochemistry* 38, **1995**, 1161-1168; d) Wang, Y.; Yang, S. P.; Yue, J. M. "Novel sesquiterpenes from the fungus *Lactarius piperatus*" *Helv. Chim. Acta* 86, **2003**, 2424-2433.

<sup>62</sup> Vidari, G.; De Bernardi, M.; Vitafinzi, P.; Fronza, G. "Fungal metabolites. Sesquiterpenes from *Lactarius blennius*" *Phytochemistry* 15, **1976**, 1953-1955.



La onfalodina **80** contiene un agrupamiento del tipo anhídrido succínico y fue obtenida de algunas especies de *Lentinellus*.<sup>63</sup> Este compuesto, con actividad fitotóxica, retarda la germinación y reduce el crecimiento de *Lepidium sativum*. También se observó una débil actividad antifúngica. De este mismo género de basidiomicete se aisló el cocleol **81** que presenta en su estructura un inusual grupo furano.<sup>64</sup>

#### Isolactaranos y Esterpuranos:

El 1-esterpureno **82** junto con el ácido esterpúrico **83**, la esterepolida **84** y la dihidroesterepolida **85** fueron aislados de *Stereum purpureum*. El ácido esterpúrico posee propiedades fitotóxicas y se cree que es el agente causante del mal de la hoja plateada de muchos frutos y árboles ornamentales.<sup>65</sup>

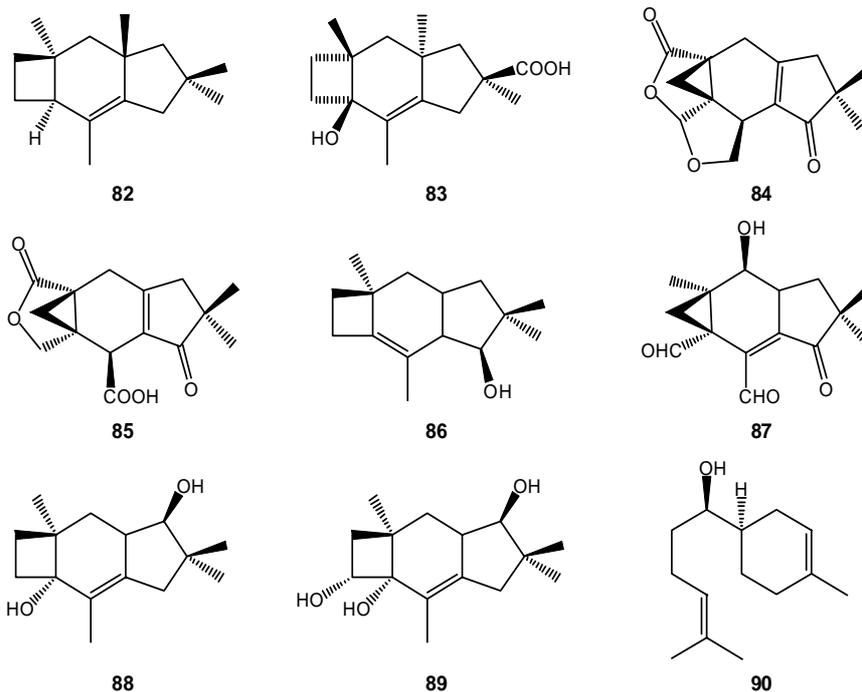
El 1-hidroxi-3-esterpureno **86**, aislado de *Gloeophyllum sp.*, mostró una débil actividad antibacteriana frente a *Mucor miehei* y *Penicillium notatum* y una moderada actividad citotóxica frente a células HL-60 y Hela S-3 con un IC<sub>50</sub> de 50 µg/mL.<sup>66</sup>

<sup>63</sup> Hillen-Maske, E. "Neue Wirkstoffe aus Basidiomyceten". PhD Thesis, University of Bonn, **1987**.

<sup>64</sup> Pang, Z.; Bocchio, F.; Sterner, O. "The isolation of a new lactarane furan from injured fruit bodies of *Lentinellus cochleatus*" *Nat. Prod. Lett.* **1**, **1992**, 65-70.

<sup>65</sup> Ayer, W. A.; Saedi-Ghomi, M. H. "1-Sterpurene-3,12,14-triol and 1-sterpurene, metabolites of silver-leaf disease fungus *Stereum purpureum*" *Can. J. Chem.* **59**, **1981**, 2536-2538.

<sup>66</sup> Passer, F.; Anke, T.; Sterner, O. "Secondary metabolites from a *Gloeophyllum* species" *Phytochemistry* **54**, **2000**, 511-516.



El merulidial **87**, un potente compuesto citotóxico y antifúngico, junto con el tremediol **88**, tremetriol **89** y el  $\alpha$ -1-bisabolol **90**, fueron aislados de las fermentaciones de *Merulinus tremellosus*.<sup>67</sup> Se ha observado que **88**, **89** y **90** inducen apoptosis en células HL-60 (leucemia promielocítica humana). Recientemente se ha descrito para **90** una actividad inhibitoria selectiva hacia el crecimiento y supervivencia de los gliomas humanos y de rata.<sup>68</sup>

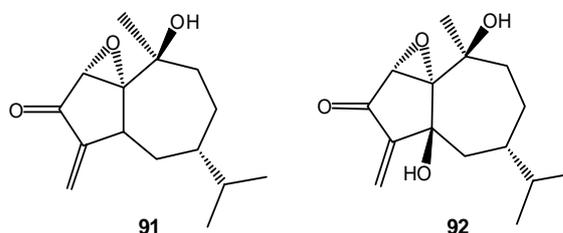
#### Guaianos, Eudesmanos y Germacranos:

El fimicolon **91** y el hidroxifimicolon **92**, aislados de *Panaeolus fimicola* y *Psathyrella orbicularum*, son guaianos con actividad antimicrobiana y citotóxica. El

<sup>67</sup> Sterner, O.; Anke, T.; Sheldrick, W. S.; Steglich, W. "New stepurane and isolactarane sesquiterpenes from the fungus *Merulinus tremellosus*" *Tetrahedron* 46, **1990**, 2389-2400.

<sup>68</sup> Cavaliere, E.; Mariotto, S.; Fabrizia, C.; De Prati, A. C.; Gottardo, R.; Leone, S.; Berra, L. V.; Lauro, G. M.; Ciampa, A. R.; Suzuki, H. " $\alpha$ -Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induce apoptosis in glioma cells" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, **2004**, 589-594.

elemento estructural responsable de esta actividad consiste en un anillo de cinco miembros con una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada adyacente a un anillo oxiránico. El compuesto **91** presenta fuerte actividad antibacteriana, antifúngica y fitotóxica.<sup>69</sup>



Del *Resupinatus leightonii* se han aislado dos nuevos sesquiterpenos del tipo 14-nor-eudesmano. La panelona **93** mostró fuerte actividad antimicrobiana, citotóxica y fitotóxica mientras que el panelol **94** fue inactivo.<sup>70</sup> Así mismo se aisló un germacrano el 1(10),4-germacradiene-2,6,12-triol **95** el cual induce inhibición del cAMP en *Magnaporthe grisea* y presenta una moderada actividad citotóxica.<sup>71</sup>

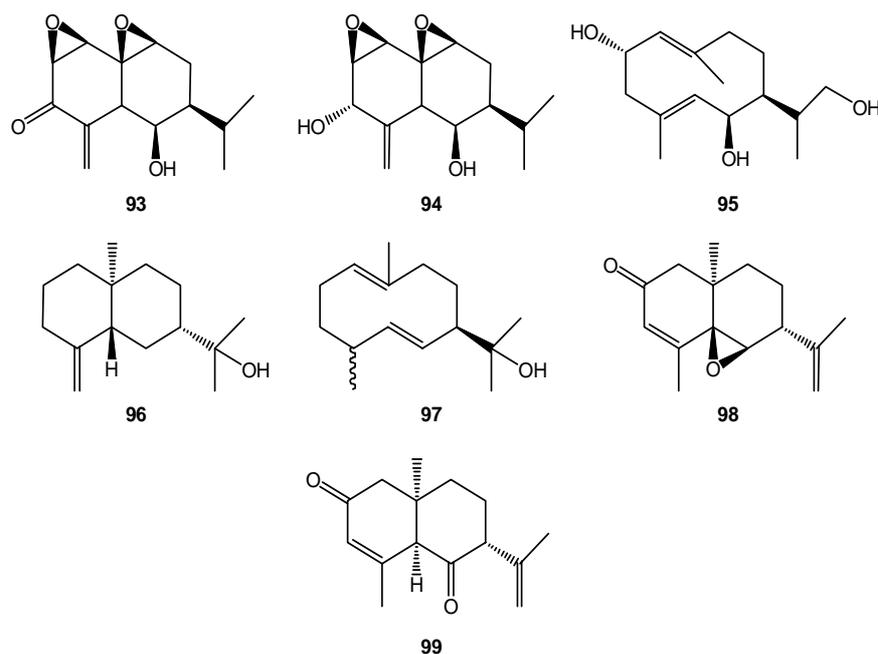
El  $\beta$ -eudesmol **96** y un germacrano, el alohediciariol **97** fueron aislados de un cultivo de *Ditiola sp.* Ambos sesquiterpenos, también encontrados en *Ferula communis*, inhibieron la síntesis de leucotrieno C<sub>4</sub> en células RBL-1 y en linfocitos de sangre humana hPBL's.<sup>72</sup>

<sup>69</sup> a) Mocek, U.; Stärk, A.; Anke, T.; Steglich, W.; Kirfel, A.; Will, G. "New Antifungal Metabolites from Basidiomycetes," Presentation at Tübinger Gespräche, Meeting on Antibiotics, September **1985**, Tübingen, Germany; b) Anke, T.; Backens, S.; Steglich, W. "New Bioactive Metabolites from Basidiomycetes", Meeting of American Society of Microbiology, **1985**, USA.

<sup>70</sup> Stadler, M.; Mayer, A.; Sheldrick, W. S.; Sterner, O.; Bergquist, K. E.; Sundin, A.; Anke, H. "Biologically active compounds from Basidiomycetes: Panellon and dihydropanellon from *Resupinatus leightonii*", In DECHEMA Biotechnology Conferences, Behrens, D.; Driesel, A. J. Ed VHC, Weinheim, **1992**, Vol 5, 721-724.

<sup>71</sup> Eilbert, F.; Engler-Lohr, M.; Anke, H.; Sterner, O. "Bioactive sesquiterpenes from the basidiomycete *Respinatus leightonii*" *J. Nat. Prod.* **63**, **2000**, 1286-1287.

<sup>72</sup> Wunder, A. Dissertation, University of Kaiserslautern, Germany, **1995**.



Las dictioforinas A **98** y B **99** son dos eudesmanos aislados de *Dictyophora indusiata* los cuales promueven la síntesis del factor de crecimiento NGF en células astrogliales.<sup>73</sup>

#### **Drimanos:**

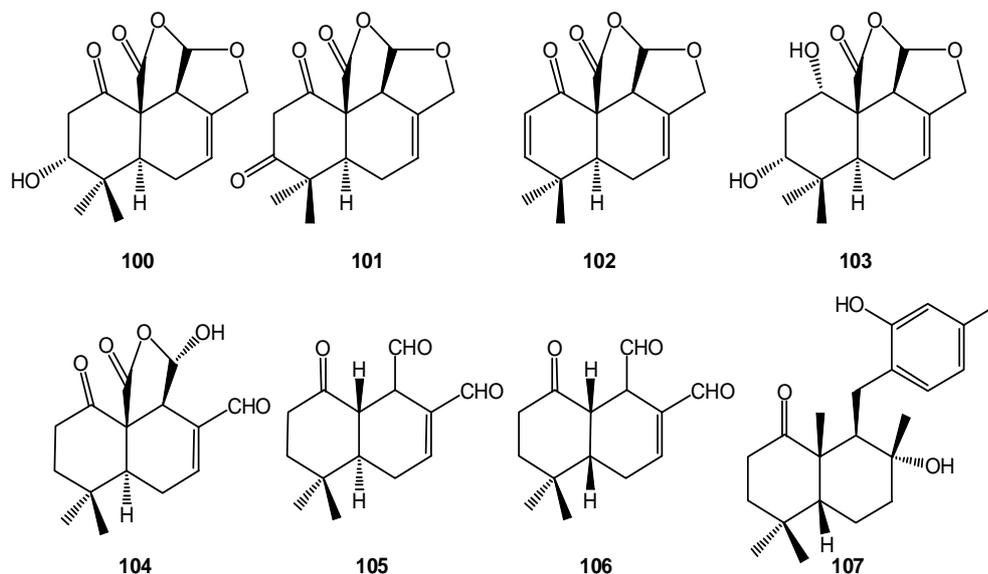
Cuatro sesquiterpenos tipo drimano fueron aislados de cultivos de *Marasmius oreades*: marasmona **100**, isomarasmona **101**, anhidromarasmona **102** y dihidromarasmona **103**. Estas sustancias presentan efectos antimicrobianos y se sugiere que poseen actividad reguladora del crecimiento de plantas.<sup>74</sup>

Los compuestos con esqueleto de drimano se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (plantas, moluscos, esponjas y ascomicetes). Muchas de estas sustancias presentan actividad como inhibidoras de la transcriptasa inversa, en

<sup>73</sup> Hirokazu, K.; Daisuke, I.; Hironobu, M.; Hideki, S.; Yukio, I.; Shoei, F.; Jingxuan, L. "Dictyophorines A and B, two stimulators of NGF-synthesis from the mushroom *Dictyophora indusiata*" *Phytochemistry* 45, **1997**, 1203-1205.

<sup>74</sup> Ayer, W. A.; Craw, P. A.; Stout, T. J.; Clardy, J. "Novel sesquiterpenoids from the fairy ring fungus, *Marasmius oreades*" *Can. J. Chem.* 67, **1989**, 773-778.

particular la queneromicina A **104** y B **105**, aisladas de una *Kuehneromyces*, inhiben preferentemente un virus de leucemia de ratones con un  $IC_{50}$  10  $\mu$ g/mL. Además, ambos compuestos tienen actividad antimicrobiana y citotóxica debido, probablemente, al grupo aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado.<sup>75</sup>



La queneromicina B es un potente inhibidor de la agrupación de plaquetas, preferentemente, la inducida por trombina.<sup>75</sup> De una variedad de *Panus* se aisló un esteroisómero de la queneromicina B, el panudial **106**, conteniendo un sistema de *cis* decalona. El panudial inhibe la agregación de plaquetas inducidas por diferentes agonistas siendo menos selectiva que su isómero *trans*.<sup>76</sup>

El albaconol **107** aislado de *Albatrellus confluens*, es un drimano directamente conectado a un resorcinol y representa un nuevo esqueleto prenilado.<sup>77</sup> Este compuesto

<sup>75</sup> Erkel, G.; Lorenzen, K.; Anke, T.; Velten, R.; Giminez, A.; Steglich, W. "Kuehneromycin A and kuehneromycin B, Two new biological active compounds from a tasmanian *Kuehneromyces* sp (Strophariaceae, Basidiomycetes)" *Z. Naturforsch.* 50, **1995**, 1-10.

<sup>76</sup> Lorenzen, K.; Anke, T.; Anders, U.; Hindermayr, H.; Hansske, F. "Inhibitors of platelet-aggregation from a *Panus* species (basidiomycetes)" *Z. Naturforsch.* 49, **1994**, 132-138.

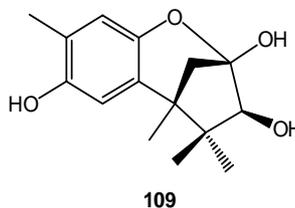
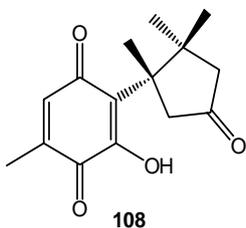
<sup>77</sup> Ding, Z. H.; Dong, Ze. J.; Liu, Ji. K. "Albaconol, a novel prenylated resorcinol (= benzene-1,3-diol) from basidiomycetes *Albatrellus confluens*" *Helv. Chim. Acta* 84, **2001**, 259-262.

induce la contracción e insensibilización de las células de tráquea en el cerdo enano de guinea.<sup>78</sup>

### Sesquiterpenos derivados del *Trans, Cis*-Farnesol

#### **Cuparanos:**

La lagopodina B **108**, se obtiene de *Coprinus cinereus* y es inhibidora de la agregación de plaquetas humanas a una concentración de 7 µg/mL.<sup>79</sup> De este mismo género también se aisló el coprinol **109**, el cual posee actividad antibiótica frente a bacterias resistentes Gram-positiva.<sup>80</sup>



#### **Bisabolanos y Acoranos:**

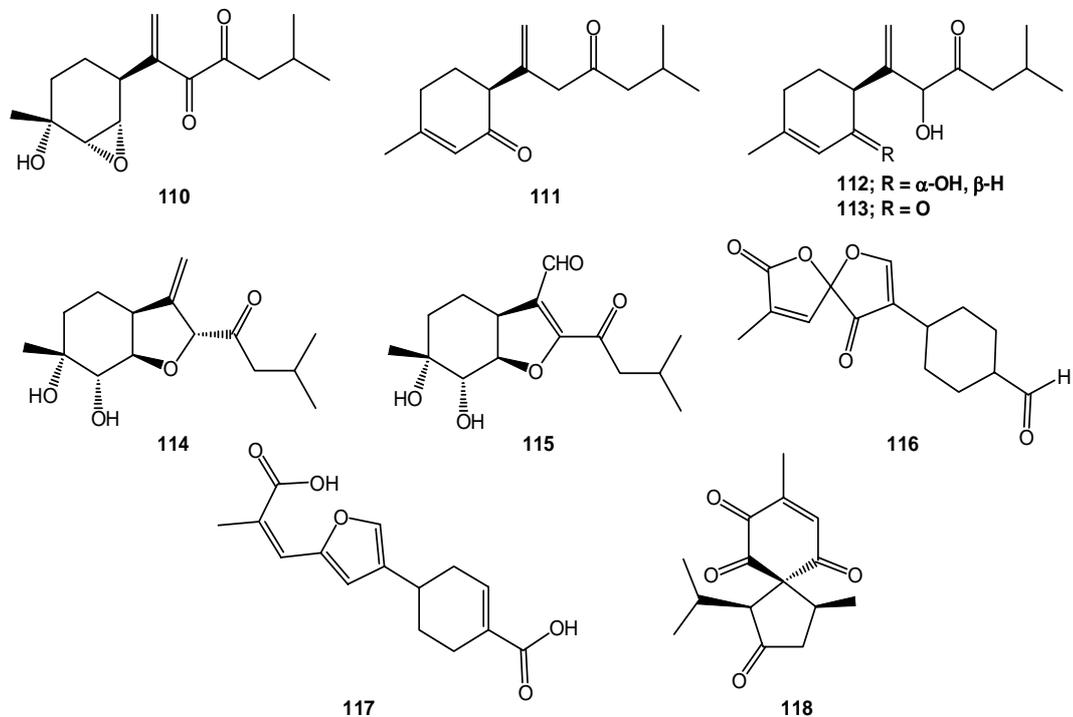
Seis nuevos sesquiterpenos tipo bisabolano, denominados cheimonofilones A- E (**110-114**) y el cheimonofilal **115**, fueron aislados de *Cheimonophyllum candissimum*. Estas sustancias presentaron actividad nematocida contra *Caenorhabditis elegans*, sin embargo, la dicetona **113** fue menos activa. También presentaron débil actividad antibiótica y fuerte efecto citotóxico. La pérdida de sus actividades biológicas después

<sup>78</sup> Yang, W. M.; Liu, J. K.; Ping, C.; Liu, Y. D.; Ding, Z. H.; Shen, Z. Q.; Chen, Z. H. "Albaconol from the mushroom *Albatrellus confluens* induces contraction and desensitization in guinea pig trachea" *Planta Med.* 69, **2003**, 715-719.

<sup>79</sup> Bu'lock, J. D.; Darbyshire, J. "Lagopodin metabolites and artefacts in cultures of *Coprinus*" *Phytochemistry* 15, **1976**, 2004-2005.

<sup>80</sup> Johansson, M.; Sterner, O.; Labischinski, H.; Anke, T. "Coprinol, a new antibiotic cuparane from a *Coprinus* species" *Z. Naturforsch.* 56, **2001**, 31-34.

de incubarlos con L-cisteína sugiere que el agrupamiento de carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado es el responsable de esta actividad.<sup>81</sup>



El nidulal **116** y el ácido nidulioico **117** fueron aislados de *Nidula candida*, estas sustancias presentan un débil efecto citotóxico y antibiótico, en cambio, **116** es inductor de diferenciación en células de leucemia HL-60.<sup>82</sup>

El acorano hemimicina **118** fue aislado del cultivo de *Hemimycena cucullata* y *H. Candida* mostrando efectos citotóxicos a concentraciones de 2  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>83</sup>

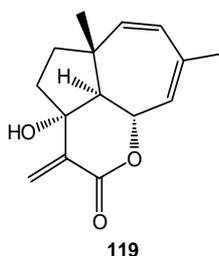
<sup>81</sup> a) Stadler, M.; Anke, H.; Sterner, O. "New nematocidal and antimicrobial compounds from the basidiomycete *Cheimonophyllum candidissimum* (Berk & Curt.) Sing. I. Producing organism, fermentation, isolation, and biological activities" *J. Antibiot.* 47, **1994**, 1284-1289; b) Anke, H.; Sterner, O. "Nematocidal metabolites from higher fungi" *Curr. Org. Chem.* 1, **1997**, 361-374.

<sup>82</sup> Erkel, G.; Becker, U.; Anke, T.; Sterner, O. "Nidulal, a novel inducer of differentiation of human promyelocytic leukemia cells from *Nidula candida*" *J. Antibiot.* 49, **1996**, 1189-1195.

<sup>83</sup> Bauerle, J.; Anke, T.; Hillenmaske, E.; Steglich, W. "Hemimycin, a new antibiotic from *Hemimycena* species (basidiomycetes)" *Planta Med.* 5, **1986**, 418.

**Carotanos:**

La fulvoferuginina **119**, un antibiótico antifúngico se aisló de *Marasmius fulvoferugineus*. El hongo más sensible fue el *Paecilomyces varioti* presentando una concentración mínima inhibitoria de 1-5 µg/mL.<sup>84</sup>

**Cariofilanos:**

Los derivados cariofilanos, naematolona **120** y naematolina **121** se obtuvieron de las fermentaciones de varias especies de *Naematolona*<sup>85</sup> y de una variedad de *Panus*.<sup>86</sup> En comparación con otros cariofilanos aislados de plantas superiores, los metabolitos fúngicos presentan un grado de oxigenación mayor y uno o dos grupos carbonilos  $\alpha,\beta$ -insaturados. La naematolina presenta una citotoxicidad cinco veces menor que la naematolona.

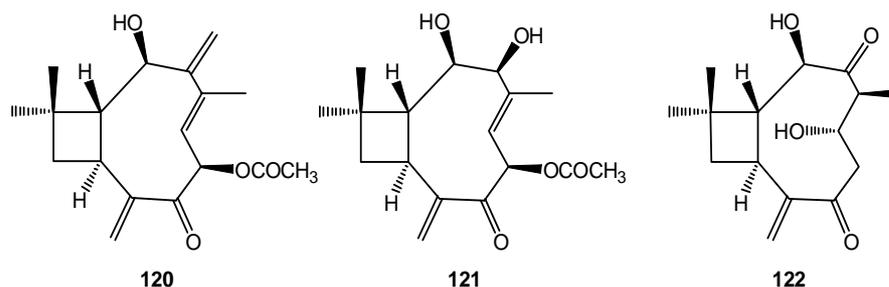
El 6,9-dihidroxi-3(15)-cariofilen-4,8-diona **122**, aislado de varias especies de *Marasmius* exhibe fuertes efectos citotóxicos sobre diferentes líneas celulares y muestra débil efecto antimicrobiano.<sup>87</sup>

<sup>84</sup> Klein, J.; Anke, T.; Sheldrick, W. S.; Bross, M.; Steffan, B.; Steglich, W. "Antibiotics from basidiomycetes. XXXV. Fulvoferuginin, a carotane antibiotic from *Marasmius fulvoferugineus* William" *Z. Naturforsch.* 45, **1990**, 845-850.

<sup>85</sup> Backens, S.; Steffan, B.; Steglich, W.; Zechlin, L.; Anke, T. "Antibiotics from Basidiomycetes, XIX. Naematolin and naematolone, two caryophyllane derivatives from cultures of *Hypholoma* species (Agaricales)" *Liebigs Ann.* 7, **1984**, 1332-1342.

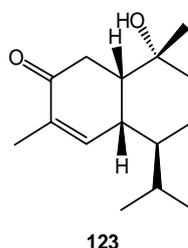
<sup>86</sup> Lorenzen, K.; Anke, T.; Anders, U.; Hindermayr, H.; Hansske, F. "Two inhibitors of platelet aggregation from a *Panus* species (Basidiomycetes)" *Z. Naturforsch.* 49, **1994**, 132-138.

<sup>87</sup> Fabian, K.; Anke, T.; Sterner, O. "6,9-Dihydroxy-3(15)-caryophyllen-4,8-dione a new antibiotic from a *Marasmius* species" *Z. Naturforsch.* 54, **1999**, 469-473.



### Cadinanos:

La (+)-10 $\alpha$ -hidroxi-4-murolen-3-ona **123**, aislada de unas especies de *Favolaschia*, inhibe la biosíntesis del leucotrieno C<sub>4</sub> en células RBL-1 a una concentración 5-10  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>88</sup>



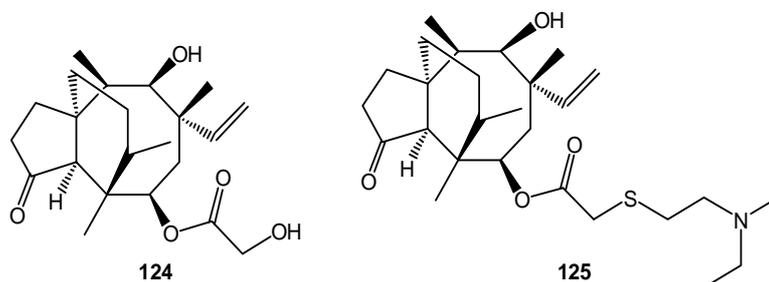
### Diterpenos

La pleuromutilina **124** fue aislada inicialmente de *Pleurotus mutilus* y de *Clitopilus passeckerianus*,<sup>89</sup> y resultó ser inhibidora selectiva de la síntesis de proteínas en células procarióticas interfiriendo con los ribosomas. Su modo de acción está relacionado con la formación de un complejo de iniciación inactivo el cual es incapaz de entrar en el ciclo de elongación del péptido. La pleuromutilina y su derivado, la tiamulina **125**

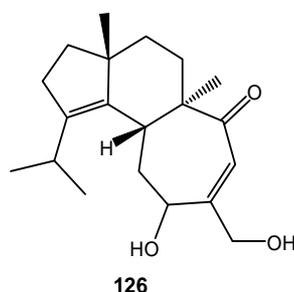
<sup>88</sup> Zapf, S.; Wunder, A.; Anke, T.; Klostermeyer, D.; Steglich, W.; Shan, R.; Sterner, O.; Scheuer, W. "(+)-10- $\alpha$ -hydroxy-4-murolen-3-one, a new inhibitor of leukotriene biosynthesis from a *Favolaschia* species. Comparison with other sesquiterpenes" *Z. Naturforsch.* 51, **1996**, 487-492.

<sup>89</sup> Kavanagh, F.; Hervey, A.; Robbins, W. J. "Antibiotic substances from Basidiomycetes. VIII. *Pleurotus mutilus* and *Pleurotus passeckerianus*" *Proc. Nat. Acad. Sci.* 37, **1951**, 570-574.

presentan actividades antibacterianas con valores MIC 6.25  $\mu\text{g/mL}$  para **124** y 0.003  $\mu\text{g/mL}$  para **125**.<sup>90</sup>



Dentro de un grupo de moléculas, denominadas ciatinas,<sup>91</sup> se ha obtenido la ciatina A<sub>3</sub> **126** que presenta propiedades antibióticas.



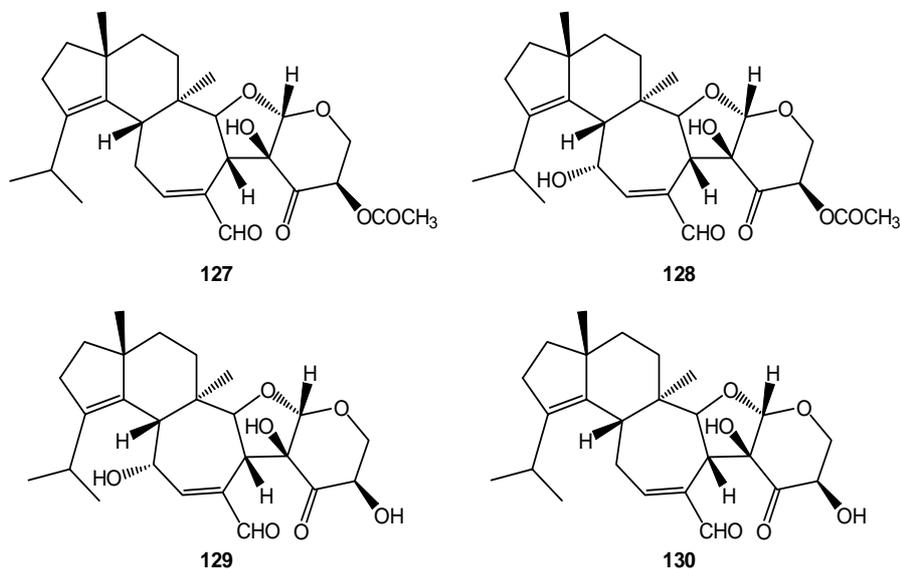
Las estriatalas A **127**, B **128**, C **129** y D **130** son diterpenos pentacíclicos aislados de *Cyathus striatus*, *C. poeppiggi*, *C. limbatus*, *C. montagnei* y *Gerronema fibula* y poseen actividad antibiótica y citotóxica.<sup>92</sup> Estos compuestos son producidos por

<sup>90</sup> Drews, J.; Georgopoulos, A.; Laber, G.; Schutze, E.; Unger, J. "Antimicrobial activities of 81.723 hfu, a new pleuromutilin derivative" *Antimicrob. Agents Chemother.* 7, **1975**, 507-516.

<sup>91</sup> a) Ayer, W. A.; Carstens, L. L. "Diterpenoid metabolites of *Cyathus helenae*. Cyathin B<sub>3</sub> and cyathin C<sub>3</sub>" *Can. J. Chem.* 51, **1973**, 3157-3160; b) Ayer, W. A.; Taube, H. "Metabolites of *Cyathus helenae*. New class of diterpenoids" *Can. J. Chem.* 51, **1973**, 3842-3854; c) Ayer, W. A.; Lee, S.; Ping, N.; Thomas, T. "Metabolites of bird's nest fungi. Studies on the biosynthesis of the cyathins" *Can. J. Chem.* 57, **1979**, 3338-3343.

<sup>92</sup> a) Anke, T.; Oberwinkler, F.; Steglich, W.; Hoefle, G. "The striatins - new antibiotics from the basidiomycete *Cyathus striatus* (Huds. ex Pers.) Willd" *J. Antibiot.* 30, **1977**, 221-225; b) Hecht, H. J.; Hoefle, G.; Steglich, W.; Anke, T.; Oberwinkler, F. "Striatin A, B, and C: novel diterpenoid antibiotics from *Cyathus striatus* X-ray crystal structure of striatin A" *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1978**, 665-666; c) Anke, T.; Rabe, U.; Schu, P.; Eizenhofer, T.; Schrage, M.; Steglich, W. "Studies on the biosynthesis of striatal-type diterpenoids and the biological activity of herical." *Z. Naturforsch.* 57, **2002**, 263-271.

fermentación sumergida, aunque también han sido detectados en cuerpos fructíferos. Su actividad está relacionada con la inhibición de la biosíntesis de ADN, ARN<sup>93</sup> y proteínas en células ECA.<sup>94</sup>

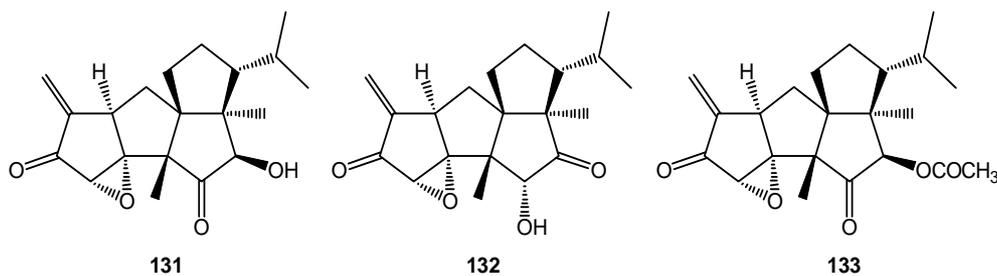


La potente actividad citotóxica y antibacteriana de las crinipelinas A **131**, B **132** y O-acetilcrinipelina A **133**, aisladas de *Crinipellis stipitaria*,<sup>95</sup> es debida a la presencia de un grupo cetónico exometilénico y a un anillo oxiránico vecino.

<sup>93</sup> Lee, S. G.; Anke, T. "Action of striatin-a, striatin-b and striatin-c on glucose-transport in chick fibroblasts, normal or transformed by rous-sarcoma virus" *Z. Phys. Chem.* 360, **1979**, 1170.

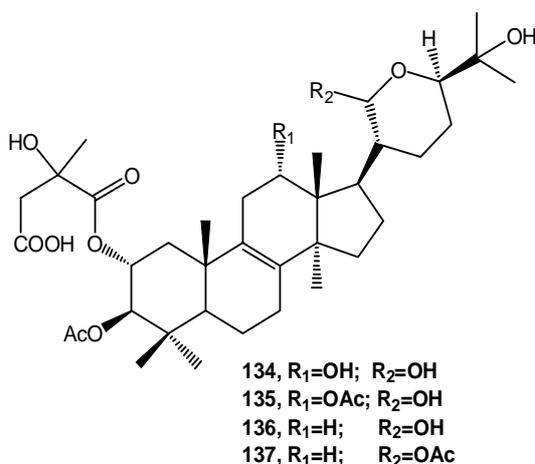
<sup>94</sup> Steglich, W.; Eizenhöfer, Th.; Casser, I.; Steffan, B.; Rabe, U.; Böker, R.; Knerr, H. J.; Anke, H.; Anke, T. "Untersuchungen zur Biosynthese von Wirkstoffen aus Pilzkulturen" In *Dechema Monographien Bd. 129. Wege zu neuen Produkten und Verfahren der Biotechnologie* Kühne, W.; Anke, T.; Onken, U. Eds. Wiley-VCH; Weinheim, **1993**, Vol. 129, pp 3-14.

<sup>95</sup> Anke, T.; Heim, J.; Knoch, F.; Mocek, U.; Steffan, B.; Steglich, W. "Antibiotics from Basidiomycetes. Part 21. Crinipellins, the first natural substances with tetraquinane structure" *Angew. Chem.* 97, **1985**, 714-716.



### Triterpenos y Esteroides

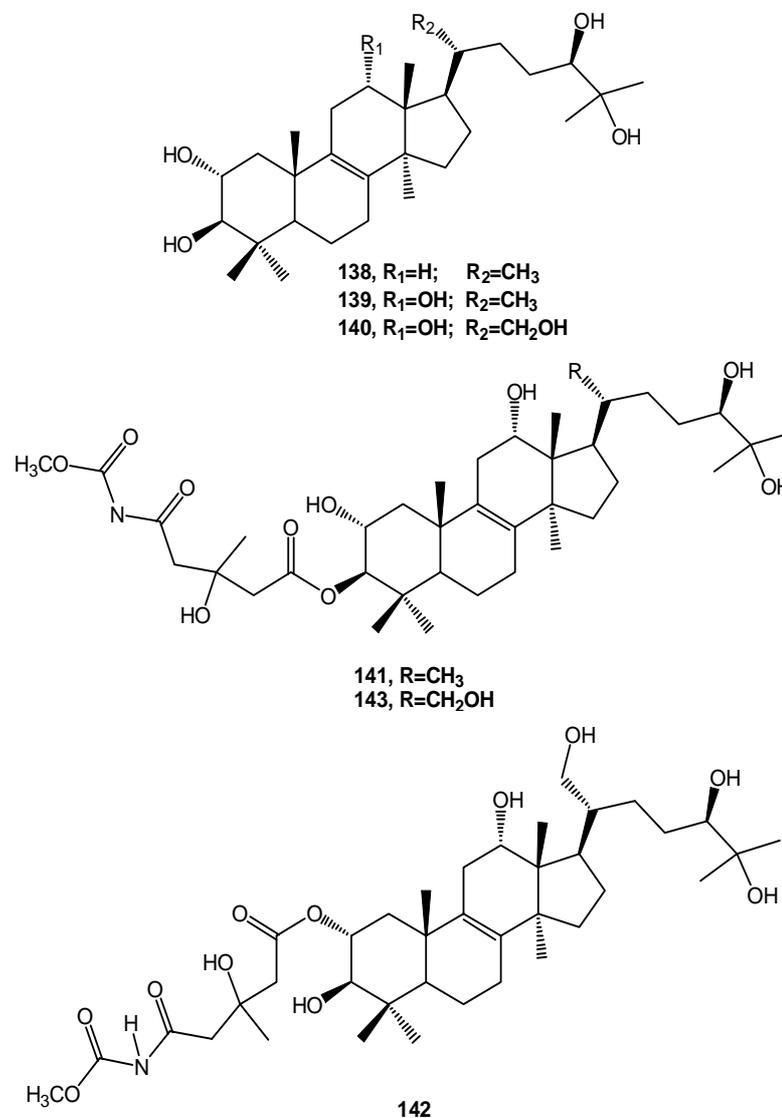
Los ácidos citotóxicos hebelómicos A **134**, B **135**, E **136** y F **137** fueron aislados junto con otros derivados triterpénicos del cultivo de *Hebeloma senescens*.<sup>96</sup> Además de los efectos citotóxicos también se les detectó una moderada actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. La comparación entre los derivados aislados mostró una relación entre la citotoxicidad y la estructura con respecto al grupo hidroxilo o acetato en el C-12.<sup>97</sup>



<sup>96</sup> Bocchi, M.; Garlaschelli, L.; Vidari, G.; Mellerio, G. "Fungal metabolites. 27. New farnesane sesquiterpenes from *Hebeloma senescens*" *J. Nat. Prod.* **55**, **1992**, 428-431.

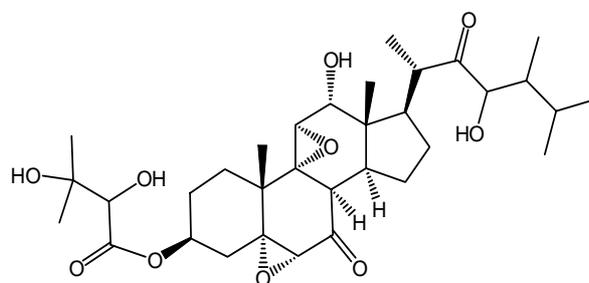
<sup>97</sup> Garlaschelli, L.; Vidari, G.; Virtuani, M.; Vita-Finzi, P.; Mellerio, G. "The structures of new lanostane triterpenes from the fruiting bodies of *Hebeloma senescens*" *J. Nat. Prod.* **58**, **1995**, 992-1002.

De los cuerpos fructíferos de *Hypholoma fasciculare* se obtuvieron varios derivados triterpénicos con esqueleto de lanostano, estos compuestos se denominaron fasciculoles A-F (138-143) y presentaron propiedades fitotóxicas y antimicrobianas relativamente débiles.<sup>98</sup>

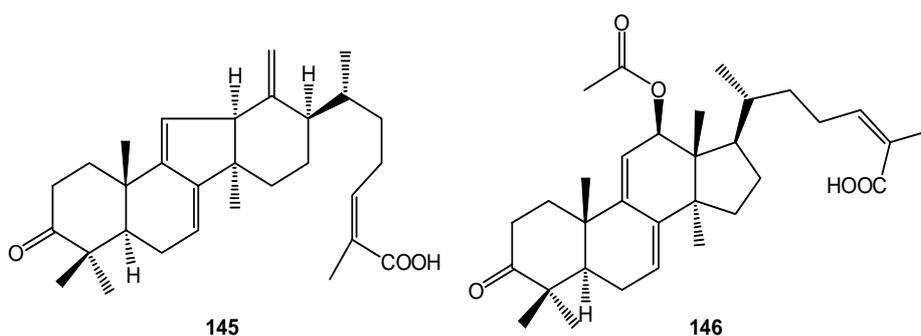


<sup>98</sup> Ikeda, M.; Niwa, G.; Tohyama, K.; Sassa, T.; Miura, Y. "Studies on biologically active substances isolated from fruit bodies of *N. fasciculare*. Structures of fasciculol C and its depsipeptides, new biologically active substances from *Neamatoloma fasciculare*" *Agric. Biol. Chem.* 41, **1977**, 1803-1805.

La favolona **144** es un esteroide con esqueleto de ergosterano y con una inusual unión *cis* del anillo B y C. Éste fue aislado de una variedad de *Favolaschia* y posee una fuerte actividad antifúngica pero no citotóxica ni antibacteriana.<sup>99</sup>



144

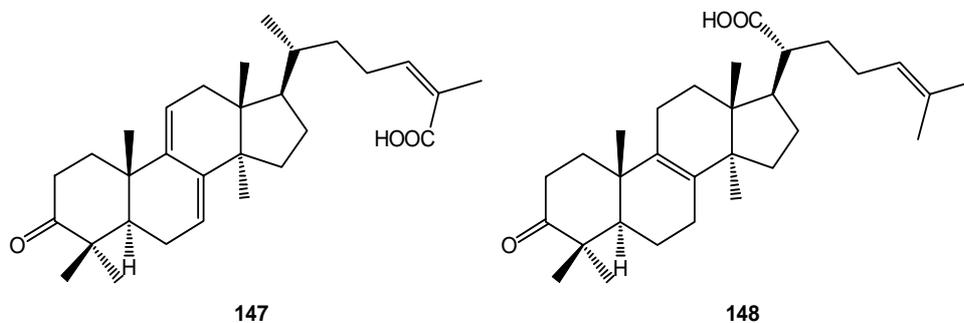


145

146

<sup>99</sup> Anke, T.; Werle, A.; Zapf, S.; Velten, R.; Steglich, W. "Favolon, a new antifungal triterpenoid from a *Favolaschia species*" *J. Antibiot.* 48, **1995**, 725-726.

Un estudio fitoquímico de un extracto metanólico del hongo japonés *Tyromyces fissilis* condujo al aislamiento de nuevos derivados del lanostano denominados ácidos tiromicico F **145** y G **146**, junto con dos conocidos, el ácido tiromicico **147** y trametenólico **148**.<sup>100</sup>



<sup>100</sup> Quang, D. N.; Hashimoto, T.; Tanaka, M.; Asakawa, Y. "Tyromycic acid F and G: Two new triterpenoids from the mushroom *Tyromyces fissilis*" *Chem. Pharm. Bull.* 51, **2003**, 1441-1443.

**PARTE I**

**ESTUDIO DE LOS HONGOS *GANODERMA LUCIDUM*,**  
***G. CONCINNA* Y *G. AUSTRALE***

## ***INTRODUCCIÓN***

El género *Ganoderma* pertenece a la familia Ganodermataceae, Aphylloporales, filo Basidiomycota (Basidiomycete), es uno de los géneros más grandes del orden de los polyporales. Su taxonomía es compleja debido a una pobre e inadecuada descripción morfológica y a múltiples nombres dados a una especie en particular. Existen cerca de 148 especies de *Ganodermas* consideradas por Moncalvo y Ryvarden.<sup>101</sup> Este género se encuentra en todas las regiones tropicales y subtropicales del planeta, siendo muy importante desde el punto de vista económico y ecológico, así juegan un papel importante como patógeno en plantas y árboles.<sup>102</sup> Igualmente poseen una alta capacidad de degradación de madera<sup>103</sup> y sus esporas son una de las causas de asma en algunos países,<sup>104</sup> pero quizás, el papel más importante es como fuente de productos medicinales, terapéuticos y cosméticos. Hace milenios, en la medicina tradicional oriental el cuerpo fructífero de *Ganodermas* especialmente *Ganoderma lucidum* fue usado en el tratamiento de varias enfermedades como está detallado en la farmacopea Shen Nong's *Materia Médica*.<sup>105</sup> Este hongo, denominado en China "Ling Zhi" y en Japón "Reishi", es el de mayor interés y demanda comercial, cultivado tanto el cuerpo como el micelio en procesos cada vez más exigentes.<sup>106</sup>



<sup>101</sup> Moncalvo, J. M.; Ryvarden, L. "A nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk" *Synopsis Fungorum* 11, **1997**, 1-114.

<sup>102</sup> Miller, R. N. G.; Holderness, M.; Bridge, P. D.; Cheng, G. F.; Zakaria, M. H. "Genetic diversity of *Ganoderma* in oil palm plantings" *Plant Pathology* 48, **1999**, 595-603.

<sup>103</sup> Adaskaveg, J. E.; Gilbertson, R. L.; Blanchette, R. A. "Comparative studies on delignification caused by *Ganoderma* Species" *Appl. Environ. Microbiol.* 56, **1990**, 1931-1943.

<sup>104</sup> a) Newhouse, C. P.; Leventin, E. "Correlation of environmental factors with asthma and rhinitis symptoms in Tulsa" *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 92, **2004**, 356-366; b) Cutten, A. E. C.; Hasnain, S. M.; Segedin, B. P.; Bai, T. R.; McKay, E. J. "The basidiomycete *Ganoderma* and Asthma: collection, quantitation and immunogenicity of the spores" *New Zeal. Med. J.* 101, **1988**, 361-363.

<sup>105</sup> Ying, J "Icones of medicinal fungi from China" Science press, Beijing, **1987**.

<sup>106</sup> a) Berovic, M.; Habijanac, J.; Zore, I.; Wraber, B.; Hodzar, D.; Boh, B.; Pohleven, F. "Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides" *J. Biotechnol.* 103, **2003**, 77-86; b) Lee, H.; Song, M.; Hwang, S. "Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidum*" *Process Biochem.* 38, **2003**, 1685-1693.

Recientemente se ha incrementado, de forma sistemática, la investigación en *Ganodermas* y compuestos activos aislados de estos hongos, mostrando numerosos efectos farmacológicos tales como: antialérgico,<sup>107</sup> antivirales,<sup>108</sup> antihepatotóxico,<sup>109</sup> cardiovascular,<sup>110</sup> antiHIV,<sup>111</sup> de acción inmunomoduladora,<sup>112</sup> antitumoral<sup>113</sup> y como suplemento alimenticio entre otros.<sup>114</sup>

Diversos grupos de aproximadamente 400 compuestos químicos,<sup>115</sup> tales como (triterpenos, polisacáridos, proteínas, aminoácidos, nucleósidos, esteroides, alcaloides, ácidos grasos y enzimas), han sido aislados del micelio y cuerpo fructífero de especies de *Ganoderma*.<sup>16,17b</sup> Los constituyentes más importantes desde el punto de vista farmacológico son triterpenos y polisacáridos.

Cerca de 150 triterpenos han sido encontrados en especies de *Ganoderma*. Estos contienen grupos funcionales oxigenados en un esqueleto de tipo lanostano **149**.

---

<sup>107</sup> Tasaka, K.; Akagi, M.; Miyoshi, K.; Miio, M.; Makimo, T. "Antiallergenic constituents in the cultura medium of *Ganoderma lucidum*" *Agents Actions* 23, **1988**, 153-156.

<sup>108</sup> Mothana, R. A. A.; Awadh, N. A.; Cansen, R.; Wegner, U.; Mentel, R.; Lindequist, U. "Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi*" *Fitoterapia* 74, **2003**, 177-180.

<sup>109</sup> Lin, J. M.; Lin, C. C.; Chen, M. F.; Ujjiie, T.; Takada, A. "Radical scavenger and antihepatotoxic activity of *Ganoderma formosanum*, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma neo-japonicum*" *J. Ethnopharmacol.* 47, **1995**, 33-41.

<sup>110</sup> Lee, S. Y.; Rhee, H. M. "Cardiovascular effects of mycelium extract of *Ganoderma lucidum*- inhibition of sympathetic outflow as a mechanism of its hypotensive action" *Chem. Pharm. Bull.* 38, **1990**, 1359-1364.

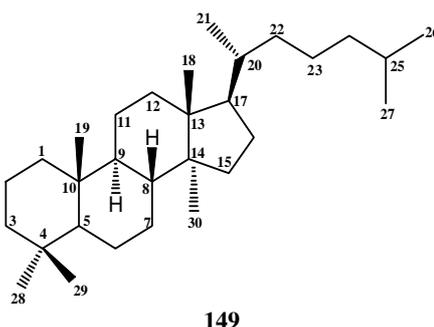
<sup>111</sup> Min, B. S.; Nakamura, N.; Miyashiro, H.; Bae, K. W.; Hattori, M. "Triterpenes from spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 Protease" *Chem. Pharm. Bull.* 46, **1998**, 1607-1612.

<sup>112</sup> Tan, B. K. H.; Vanitha, J. "Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional chinese medicinal herbs" *Current Med. Chem.* 11, **2004**, 1423-1430.

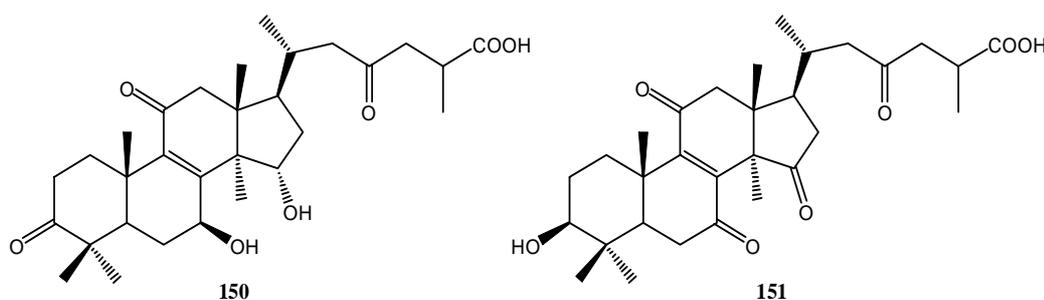
<sup>113</sup> Jiang, J. H.; Slivova, V.; Valachovicova, T.; Harvey, K.; Sliva, D. "*Ganoderma lucidum* inhibits proliferation and induces apoptosis in human prostate cancer cells PC-3" *Int. J. Oncol.* 24, **2004**, 1093-1099.

<sup>114</sup> Wachtel, G. S.; Tomlinson, B.; Benzie, I. F. F. "*Ganoderma lucidum* (Lingzhi), a Chinese medicinal mushroom: biomarker responses in a controlled human supplementation study" *Brit. J. Nutr.* 91, **2004**, 263-269.

<sup>115</sup> Boh, B.; Berovic, M.; Wraber, B.; Hodzar, D.; Habijanac, J.; Pohleven, F.; Zore, I. "*Ganoderma lucidum* and *Ganoderma applanatum* from slovenian habitats: Cultivation, Isolation, and Testing of active compounds" *Int. J. Med. Mushrooms* 6, **2004**, 15-32.



Así podemos encontrar como ejemplo: los ácidos ganodéricos A **150**,<sup>116</sup> AM<sub>1</sub> **151**,<sup>117</sup> de *Ganoderma lucidum*; ácido sugárico A **152**,<sup>118</sup> *G. tsugae*; o con fragmentación en las posición C-20, lucidona A **153**,<sup>119</sup> de *G. amboinense*, en C-24 gonolactona **154**<sup>120</sup> de *G. lucidum* y algunos agrupamientos inusuales como la colosolactona G **155**<sup>121</sup> aislada de *G. colossum*.



<sup>116</sup> Kubota, T.; Asaka, Y.; Miura, I.; Mori, H. "Structures of ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst" *Helv. Chim. Acta* 65, **1982**, 611-619.

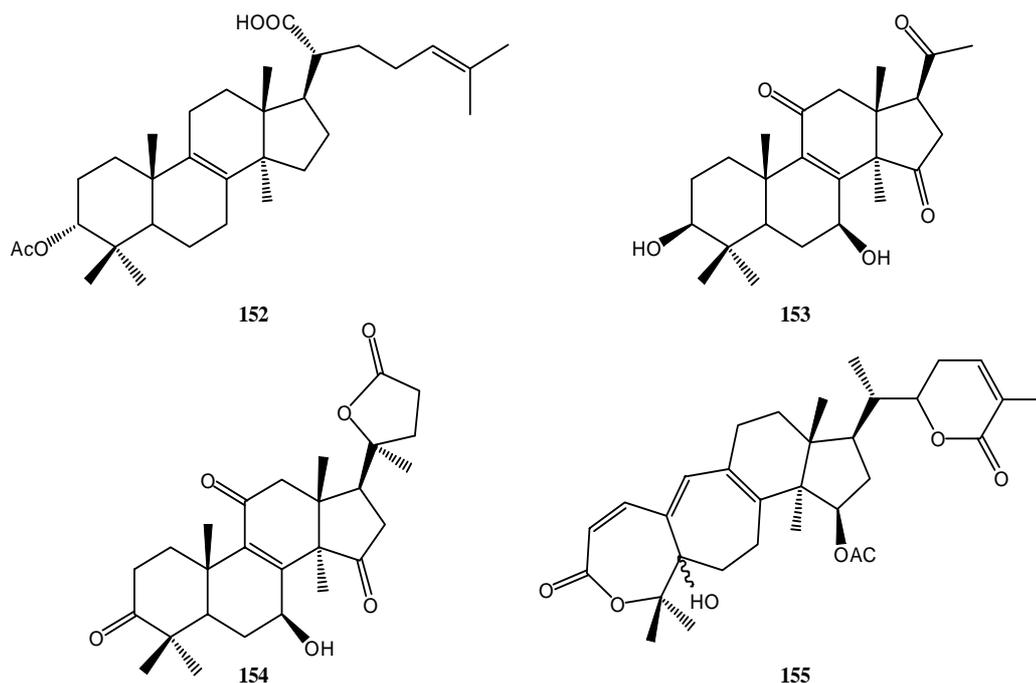
<sup>117</sup> Lin, C. N.; Kuo, S. H.; Won, S. J. "Steroids of formosan *Ganoderma amboinense*" *Phytochemistry* 32, **1993**, 1549-1551.

<sup>118</sup> Lin, C. N.; Fann, Y. F.; Cheng, M. I. "Steroids of formosan *Ganoderma tsugae*" *Phytochemistry* 46, **1997**, 1143-1146.

<sup>119</sup> Lin, C. N.; Kuo, S. H.; Won, S. J. "Steroids of formosan *Ganoderma amboinense*" *Phytochemistry* 32, **1993**, 1549-1551.

<sup>120</sup> Wang, F. S.; Cai, H.; Ping, Z. X. "A new triterpenoid from the fungus *Ganoderma lucidum*" *Chin. Chem. Lett.* 6, **1995**, 1049-1050.

<sup>121</sup> Kleinwachter, P.; Anh, N.; Kiet, T. T.; Schlegel, B.; Dahse, H. M.; Hartl, A.; Grafe, U. "Colosolactones, new triterpenoid metabolites from a vietnamese mushroom *Ganoderma colossum*" *J. Nat. Prod.* 64, **2001**, 236-239.



Recientemente los científicos han mostrado interés por los polisacáridos encontrados en *Ganoderma*. Extensos estudios han demostrado que los polisacáridos inmunomoduladores se obtienen a partir del extracto acuoso en forma de  $\beta$ -D-glucanos, los cuales se precipitan adicionando etanol, éstos presentan un patrón de unión 1-3, sus cadenas son relativamente pequeñas mostrando una estructura helicoidal.<sup>122</sup> El Ganopoly® es un extracto acuoso patentado (fracción polisacárida) que se encuentra en fase clínica, eficaz contra la diabetes mellitus tipo II.<sup>123</sup>

En vista de su gran interés y teniendo en cuenta la gran cantidad existente en Sudamérica, nosotros hemos estudiado en la presente Tesis Doctoral tres especies de *Ganodermas*, denominadas *G. lucidum*, *G. concinna* y *G. australe*.

<sup>122</sup> Fang, J. N.; Bao, X. F.; Yuen, W. H. "Studies on the polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum*. En *Ganoderma: Genetics, Chemistry, Pharmacology and Therapeutics*, Lin, Z. B. Ed.; Proceeding of Internacional Symposium on Ganoderma Research, Medical University Press, **2002**, pp 98-103.

<sup>123</sup> Gao, Y.; Lan, J.; Dai, X.; Ye, J.; Zhou, S. "A phase I/II study of ling zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.:Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetidae) Extract in patients with type II diabetes mellitus" *Int. J. Med. Mushrooms* **6**, **2004**, 33-39.

# **ESTUDIO DEL HONGO *GANODERMA LUCIDUM***

## ***PARTE TEÓRICA***

## AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL.

Como continuación de nuestras investigaciones sobre los metabolitos aislados de hongos, hemos estudiado el extracto del basidiomiceto *Ganoderma lucidum* tal como se muestra en la parte experimental. Para este estudio se recogió el hongo en el Parque Nacional Natural de los Farallones en el Valle-Colombia. La extracción con etanol y tratamiento cromatográfico rindió seis esteroides y cinco triterpenos, dos de ellos nuevos cuya elucidación estructural se describe a continuación.

De la fracción A, eluida con *n*-hexano-AcOEt (9:1), se aislaron cuatro sustancias **G<sub>1</sub>-G<sub>4</sub>** (ver parte experimental) cuyas estructuras fueron determinadas por métodos físicos y espectroscópicos.

### SUSTANCIA G<sub>1</sub>

La sustancia **G<sub>1</sub>** fue obtenida como un polvo amorfo. El espectro de masas muestra un peso molecular de *m/z* 396 correspondiéndole una fórmula empírica C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O. En su espectro de IR aparece una señal a  $\nu_{\max}$  1715 cm<sup>-1</sup> correspondiente a una cetona aislada. El conjunto de sus propiedades físicas y espectroscópicas (<sup>1</sup>H RMN, figura 3) resultaron ser idénticas a las del ergosta-7,22-dien-3-ona.<sup>124</sup>

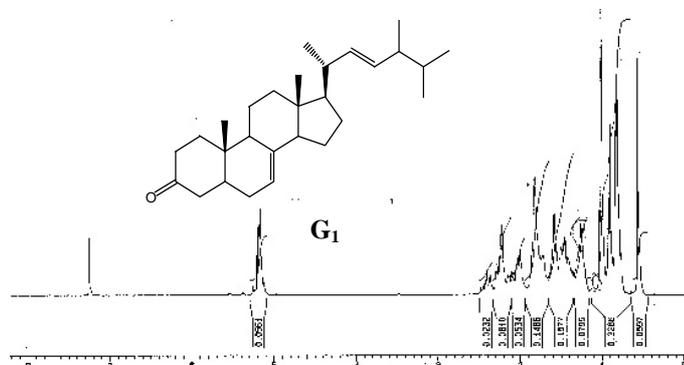
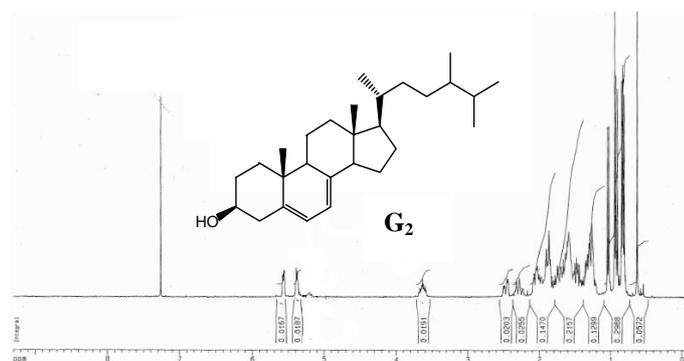


Figura 3. Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la sustancia **G<sub>1</sub>**.

<sup>124</sup> Ripperger H.; Budzikiewicz, H. "Steroide aus *Ganoderma applanatum*" *Phytochemistry* 14, 1975, 2297-2298.

### SUSTANCIA G<sub>2</sub>

La sustancia **G<sub>2</sub>** se comporta en capa fina como una muestra químicamente pura. En el espectro de masas, aparece un ión molecular a  $m/z$  398, correspondiente a la fórmula empírica  $C_{28}H_{46}O$ , de donde se deduce que se trata de un esteroide, efectivamente da positivo la reacción de Liebermann-Burchard. En su espectro de  $^1H$  RMN (figura 4) se observa, entre  $\delta$  0.6-1.0 ppm, señales para seis metilos, cuatro de ellos secundarios, a  $\delta$  3.63 ppm un multiplete, típico de hidrógeno geminal a grupo hidroxilo, y a  $\delta$  5.39 (1H, m, H-7) y 5.57 ppm (1H, dd,  $J = 5.6, 2.5$  Hz, H-5) dos hidrógenos correspondientes a protones sobre dobles enlaces. Por tratamiento con anhídrido acético y piridina dio un derivado monoacetilado. Los datos anteriores concuerdan perfectamente para el 22,23-dihidroergosterol (ergosta -5,7-dien-3 $\beta$ -ol).<sup>125</sup>



**Figura 4.** Espectro de  $^1H$  RMN de la sustancia **G<sub>2</sub>**.

### SUSTANCIA G<sub>3</sub>

La sustancia **G<sub>3</sub>** posee una fórmula molecular  $C_{28}H_{48}O$  que, junto con la reacción coloreada de Liebermann-Burchard y el espectro de  $^1H$  RMN (figura 5), indica que se trata de un esteroide. Tanto los datos espectroscópicos como las constantes físicas de nuestro producto fueron coincidentes con las del ergosta-7-en-3 $\beta$ -ol.<sup>126</sup>

<sup>125</sup> Yates, P. J.; Haughan, P. A.; Lenton, J. R.; Goad, L. J. "Four  $\Delta^{5,7}$ -sterols from terbinafine treated celery cell suspension cultures" *Phytochemistry* 31, **1992**, 3051-3058.

<sup>126</sup> Shirane N.; Takenaka, H.; Ueda, K.; Hashimoto, Y.; Katoh K.; Ishii, H. "Sterol analysis of DMI-resistant and sensitive strains of *Venturia Inaequalis*" *Phytochemistry* 41, **1996**, 1301-1308.

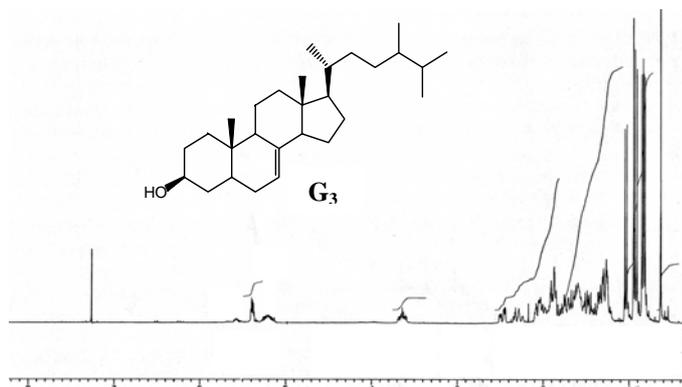


Figura 5. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia  $\text{G}_3$ .

### SUSTANCIA $\text{G}_4$

La sustancia  $\text{G}_4$  se obtuvo como un sólido cristalino de p.f. 166-168°C. Su espectro de masas da un peso molecular de  $m/z$  396 que corresponde a la fórmula empírica  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$ . En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 6) se observan, entre otras, tres señales a  $\delta$  5.21 (2H, m, H-22 y H-23), 5.39 (1H, m, H-7) y 5.58 ppm (1H, m, H-6) correspondientes a cuatro hidrógenos olefínicos. El producto  $\text{G}_4$  fue identificado a partir de sus propiedades físicas y espectroscópicas como ergosterol.<sup>127</sup>

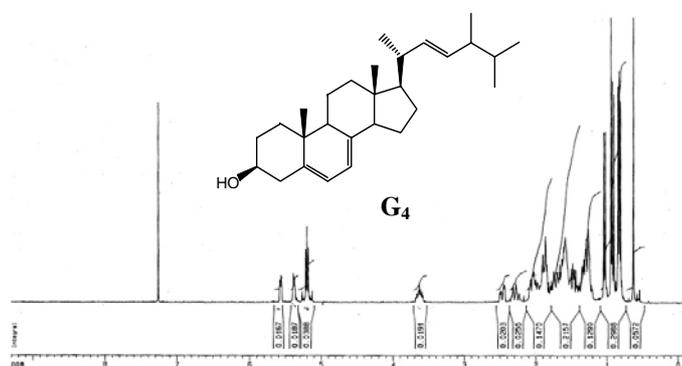


Figura 6. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia  $\text{G}_4$ .

<sup>127</sup> Zhou, W. X.; Nes, D. "Stereochemistry of hydrogen introduction at C-25 in ergosterol synthesized by the mevalonate-independent pathway" *Tetrahedron Lett.* 41, **2000**, 2791-2795.

De las fracciones eluidas con n-hexano-AcOEt (4:1) (fracción B) se aislaron cuatro sustancias **G<sub>5</sub>**-**G<sub>8</sub>**, las cuales se comportan en capa fina como muestras químicamente puras.

### SUSTANCIA G<sub>5</sub>

La sustancia **G<sub>5</sub>** se obtuvo como un sólido cristalino de p.f. 177-179°C. El espectro de masas presenta un ion molecular a  $m/z$  428 correspondiente a la fórmula empírica  $C_{28}H_{44}O_3$ . Su espectro de  $^1H$  RMN (figura 7) presenta dos dobletes a  $\delta$  6.23 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-7) y 6.50 ppm (1H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-6) correspondientes a dos hidrógenos vinílicos y a  $\delta$  3.94 ppm (1H, m, H-3) un multiplete típico de un hidrógeno geminal a un grupo hidroxilo. Estos datos nos permitieron identificar la sustancia como peróxido de ergosterol.<sup>128</sup>

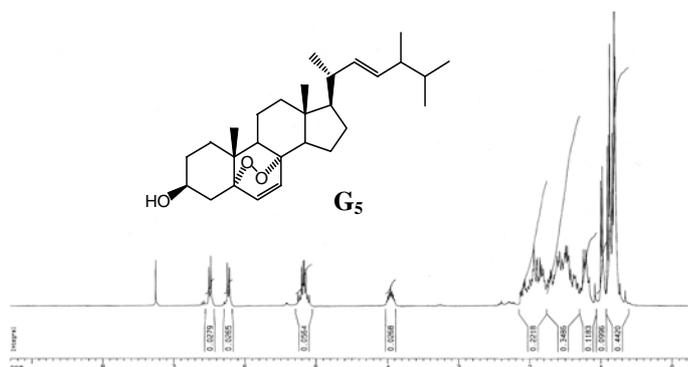


Figura 7. Espectro de  $^1H$  RMN de la sustancia **G<sub>5</sub>**.

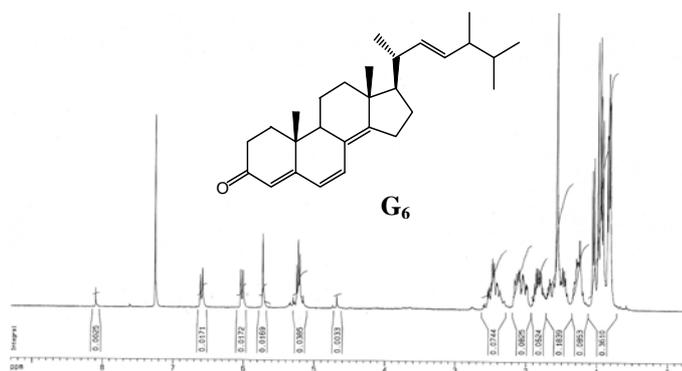
### SUSTANCIA G<sub>6</sub>

Esta sustancia cristaliza de metanol en forma de placas amarillas de p.f. 104-107°C. El espectro de masas muestra un peso molecular de  $m/z$  392 correspondiente a una fórmula empírica  $C_{28}H_{40}O$ . En el espectro de IR aparece una señal a  $\nu_{max}$  1663  $cm^{-1}$  correspondiente a una cetona poliinsaturada, esto está de acuerdo con su espectro

<sup>128</sup> Rosecke, J.; König, W. "Constituents of the fungi *Daedalea quercina* and *Daedaleopsis confragosa* var. *tricolor*" *Phytochemistry* 54, 2000, 757-762.

ultravioleta el cual presenta una banda de absorción a  $\lambda_{\max}$  346 nm (etanol), típica de una cetona conjugada.

Su espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 8) presenta un multiplete a  $\delta$  5.21 ppm característico de un doble enlace en  $\Delta^{22}$ , un singulete en  $\delta$  5.71 asignado a un hidrógeno vinílico en posición  $\alpha$  a una cetona y dos dobletes a  $\delta$  6.00 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz, H-6) y 6.58 ppm (1H, d,  $J = 9.2$  Hz, H-7) correspondientes a dos protones vinílicos de un sistema *cis*-alquénico. Los datos anteriores coinciden con los datos para el ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona.<sup>129</sup>



**Figura 8.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia **G<sub>6</sub>**.

La sustancia **G<sub>6</sub>** es fluorescente y ha sido relacionado con la bioluminiscencia de hongos<sup>130</sup> y bacterias.<sup>131</sup>

La emisión de luz producida por algunos extractos de hongos fue observada por primera vez por Airth y Mc Elroy.<sup>132</sup> Estudios posteriores<sup>133</sup> mostraron que la luz es emitida a través de las siguientes etapas:

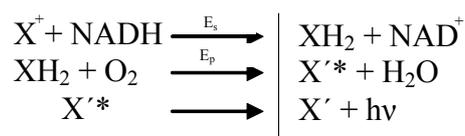
<sup>129</sup> González, A. G.; Bermejo, J. B.; Toledo, F. J. M. "The steroids and fatty acids of the basidiomycete *Scleroderma polyrhizum*" *Phytochemistry* 22, **1983**, 1049-1050.

<sup>130</sup> Weitz, H. J.; Ballard, A. L.; Campbell, C. D.; Killham, K. "The effect of cultura conditions on the mycelial growth and luminescence of naturally bioluminescent fungi" *FEMS Microbiol. Lett.* 202, **2001**, 165-170.

<sup>131</sup> Da Silva Nunes-Halldorson, V.; Duran, N. L. "Bioluminescent bacteria: lux genes as environmental biosensors" *Braz. J. Microbiol.* 34, **2003**, 91-96.

<sup>132</sup> Airth, R. L.; McElroy, W. D. "Ligh emission from extract of luminous fungi" *J. Bacteriol.* 77, **1959**, 249-250.

<sup>133</sup> Airth, R. L.; Foerster, G. E. "The isolation of catalytic components required for cell free fungal bioluminiscence" *Arch. Biochem. Biophys.* 97, **1962**, 567-573.



Donde:  $E_s$  = enzima soluble,  $E_p$  = enzima específica, X = aceptor de electrones,  
 $\text{XH}_2$  = luciferina,  $X'^*$  = estado excitado-de oxiluciferina y  $X'$  = oxiluciferina

Se han realizado numerosas investigaciones sobre las transformaciones biológicas y los sistemas involucrados en las etapas anteriores,<sup>134</sup> en este proceso se conoce que entran a formar parte las enzimas dismutasa superóxido (SOD) y catalasa.<sup>135</sup>

La razón por la cual se relaciona la ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (**G<sub>6</sub>**) con esta bioluminiscencia se basa en el hecho de que la emisión de luz por parte de extractos (*Armillaria mellea*, *Collybia velutipes*, *Mycena citricolor* y *Lampteromyces japonicus*)<sup>132</sup> de hongos está centrada en 528 nm y es idéntica a la emisión fluorescente de la ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona.<sup>136</sup>

Es interesante resaltar aquí que la sustancia **G<sub>6</sub>** se encuentra también en hongos no luminosos como *Ganoderma applanatum*<sup>137</sup> y *Ganoderma australe*.<sup>138</sup>

### SUSTANCIA G<sub>7</sub>

Producto aislado en forma cristalina de p.f. 168-170 °C, da positiva la reacción de Liebermann-Burchard para triterpenos. Su espectro de masas de alta nos dio un ion molecular a  $m/z$  440.3560, el cual corresponde a una fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$ . En el

<sup>134</sup> a) Minoru, I.; Tatsuya, F.; Ken, U.; Masaka, K. "Recent advances of chemistry of bioluminescence" *Seikagaku* 68, **1996**, 1683-1691; b) Woodland J. H. "Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review" *Gene* 173, **1996**, 5-11.

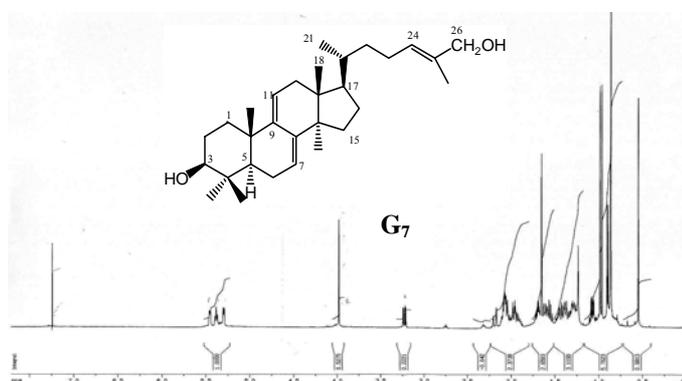
<sup>135</sup> Osamu, S. "The role of superoxide dismutase in regulating the lighth emission of luminescent fungi" *J. Exp. Bot.* 43, **1992**, 1519-1525.

<sup>136</sup> Boehme, R.; Kempfle, M. A. "Synthesis of fluorescent 4,6,8(14)-trien-3-one steroids via 3,5,7-trien-3-ol ethers. Important probes for steroid-protein interactions" *Steroids* 59, **1994**, 265-269.

<sup>137</sup> Gan, K. H.; Kuo, S. H.; Lin, C. N. "Steroidal constituents of *Ganoderma applanatum* and *Ganoderma neo-japonicum*" *J. Nat. Prod.* 61, **1998**, 1421-1422.

<sup>138</sup> González, A. G.; Bermejo J. B.; Toledo F. J. M.; Mediavilla, M. J. P.; Beltrán, E. T. "Constituents of higher fungi. Part II. Steroids and fatty acids from the basidiomycete *Ganoderma australe*" *Ann. Quim.* 82, **1986**, 149-151.

espectro de IR se observa una banda de absorción a  $\nu_{\max}$  3340  $\text{cm}^{-1}$  característica de grupos hidroxilos. Del estudio del espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 9) se deduce la presencia de un metilo secundario y cinco terciarios, uno de ellos a  $\delta$  1.67 ppm (3H, s,  $\text{CH}_3$ -27) correspondiente a metilo sobre doble enlace. De este estudio se desprende que la sustancia que nos ocupa debe de ser un triterpeno tetracíclico del tipo del lanosterol. También se aprecia un doble doblete a  $\delta$  3.25 ppm indicativo de un hidrógeno geminal a un hidroxilo en C-3, de igual manera un singulete a  $\delta$  4.00 ppm que integra para dos hidrógenos es típico de un alcohol primario situado sobre un doble enlace. Los datos anteriores encajan perfectamente para el 5 $\alpha$ -lanosta-7,9(11),24-trien-3 $\beta$ ,26-diol denominado ganodermadiol.<sup>139</sup>



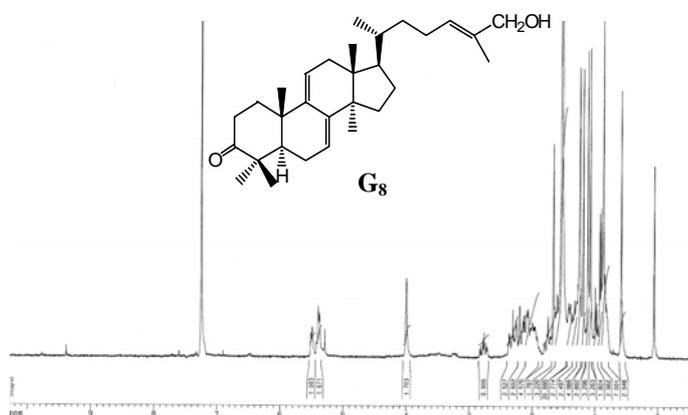
**Figura 9.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia **G7**.

### **SUSTANCIA G8**

Sustancia de p.f. 108-109 °C, cristalizado de metanol. En su espectro de IR se observó una banda fuerte a  $\nu_{\max}$  1700  $\text{cm}^{-1}$  indicativa de la presencia de una cetona aislada. Su espectro de  $^1\text{H}$  RMN (Figura 10) es similar al de la sustancia **G7** con la diferencia de que no aparece el doble doblete a  $\delta$  3.20 ppm correspondiente al hidrógeno geminal del hidroxilo en C-3 el cual se encuentra sustituido por un grupo carbonilo. Tanto los datos espectroscópicos como sus constantes físicas fueron

<sup>139</sup> Arisawa, M.; Fujita, A.; Saga, M.; Fukumura, H.; Hayashi, T.; Shimizu, M.; Morita, N. "Three new lanostanoids from *Ganoderma lucidum*" *J. Nat. Prod.* 49, **1986**, 621-625.

coincidentes con las de la 26-hidroxi-5 $\alpha$ -lanosta-7,9(11),24-trien-3-ona conocida como ganodermenonol.<sup>140</sup>



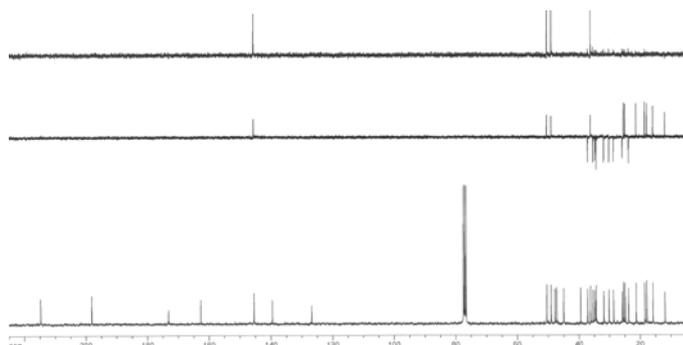
**Figura 10.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia **G<sub>8</sub>**.

De la fracción C eluida con n-hexano-AcOEt (1:1), se aislaron tres sustancias **G<sub>9</sub>**-**G<sub>11</sub>**, las cuales se comportan en capa fina como muestras puras.

#### SUSTANCIA **G<sub>9</sub>**

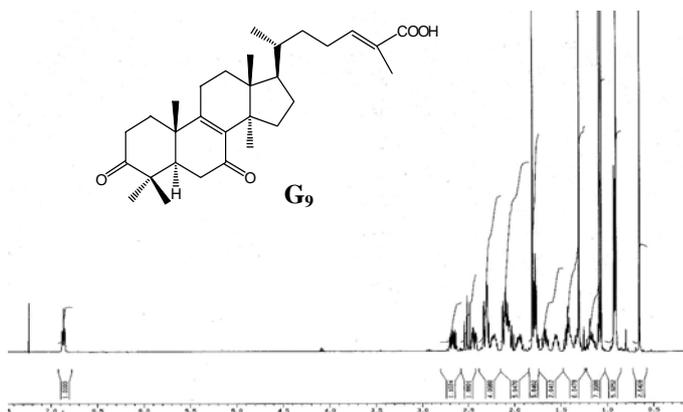
Se aisló en forma cristalina de p.f. 176-178°C, cuyo espectro de UV mostró una absorción máxima a  $\lambda_{\text{max}}$  250 nm correspondiente a una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada. Esto fue corroborado en su espectro de IR donde aparecen absorciones a  $\nu_{\text{max}}$  1707, 1683 y 1650  $\text{cm}^{-1}$  de acuerdo con la posibilidad de que, en la molécula, se encuentren tres grupos carbonilos, uno de ellos totalmente aislado. Esto está también de acuerdo con su espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (figura 11) en el cual podemos observar señales a  $\delta$  214.7 carbonilo aislado,  $\delta$  198.1 carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado y  $\delta$  173.1 de ácido. La composición molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}$  se dedujo de su espectro de masas de alta resolución donde se observó un pico molecular a  $m/z$  468.3294.

<sup>140</sup> Arisawa, M.; Fujita, A.; Hayashi, T.; Shimizu, M.; Morita, N.; Kikuchi, T.; Kadota, S.; Tezuka, Y. "Revision of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR assignments of lanostanoids from *Ganoderma lucidum* by 2D-NMR studies" *J. Nat. Prod.* 51, **1988**, 54-59.



**Figura 11.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la sustancia **G<sub>9</sub>**.

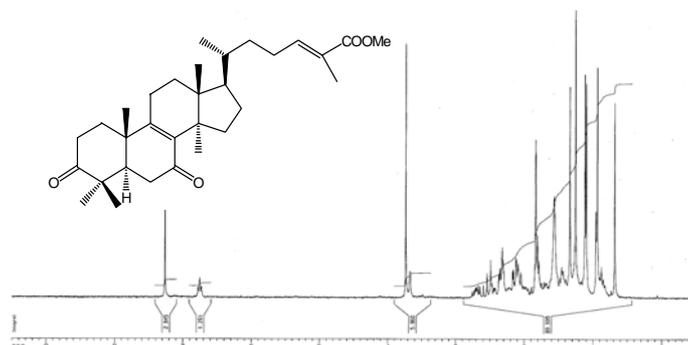
En su espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 12) pudimos observar, en la zona de los metilos, los mismos que los existentes en las sustancias anteriores pero, a  $\delta$  6.86 ppm, aparece un triplete ( $J = 7.54$  Hz), que podría ser debido a un hidrógeno olefinico desplazado a campo bajo.



**Figura 12.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia **G<sub>9</sub>**.

Por tratamiento con diazometano se obtuvo el metil éster en cuyo espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 13) aparece una nueva señal a  $\delta$  3.73 ppm correspondiente a un grupo metoxilo. Consultada la bibliografía observamos que nuestro producto posee propiedades espectroscópicas concordantes con el ácido ganodérico DM.<sup>141</sup>

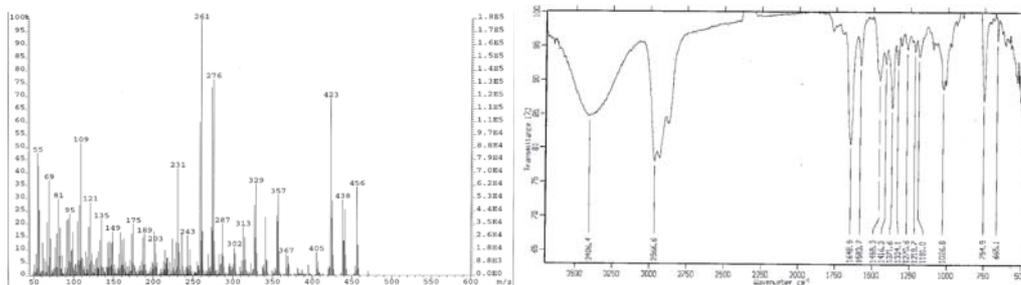
<sup>141</sup> Hui, C.; Fang, W. S.; Jun, Y. S.; Yi, Z. M. "Structure of Ganoderic acid DM, a new triterpenoid from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*" *Chin. Chem. Lett.* 6, **1995**, 1051-1052.



**Figura 13.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del éster metílico de la sustancia  $\text{G}_9$ .

### SUSTANCIA $\text{G}_{10}$

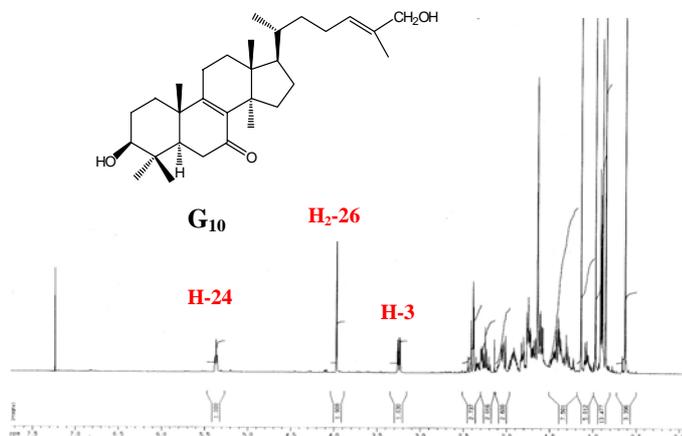
Sustancia de p.f. 163-165 °C cristalizada de metanol-acetato de etilo. Análisis de su espectro de masas da una fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$  (figura 14a). Su espectro de IR dio absorciones, entre otras, a  $\nu_{\text{max}}$  3406 y 1649  $\text{cm}^{-1}$  indicativa de grupo hidroxilo y cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada (figura 14b), esta última comprobada en su espectro de UV ya que se observó un máximo de absorción a  $\lambda_{\text{max}}$  253 nm que, como sabemos, es típica de una cetona insaturada.



**Figura 14.** a) Espectro de masas, b) Espectro de IR de la sustancia  $\text{G}_{10}$ .

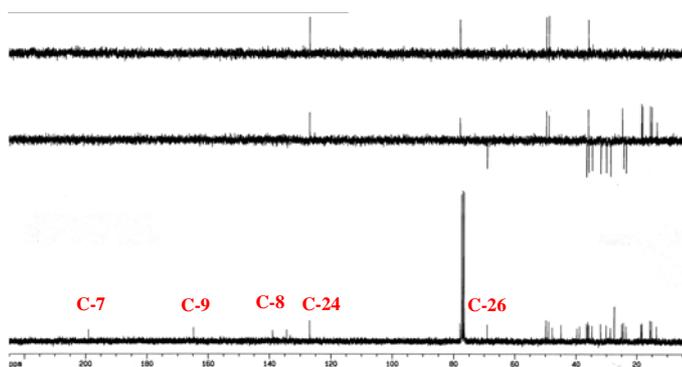
En su espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 15) se observaron señales para cinco grupos metilos terciarios a  $\delta$  0.63, 0.85, 0.89, 0.97 y 1.14 ppm, un metilo vinílico a  $\delta$  1.64 ppm y un metilo secundario a  $\delta$  0.91 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz) indicativos de un triterpeno con esqueleto de lanostano. Señales a  $\delta$  3.25 (1H, dd,  $J = 11.6, 4.4$  Hz), 3.97 (2H, s) y 5.37

(1H, t, J = 5.7 Hz) asignadas a un protón geminal de un hidroxilo secundario, a los dos protones de un hidroxilo primario y a un protón vinílico.



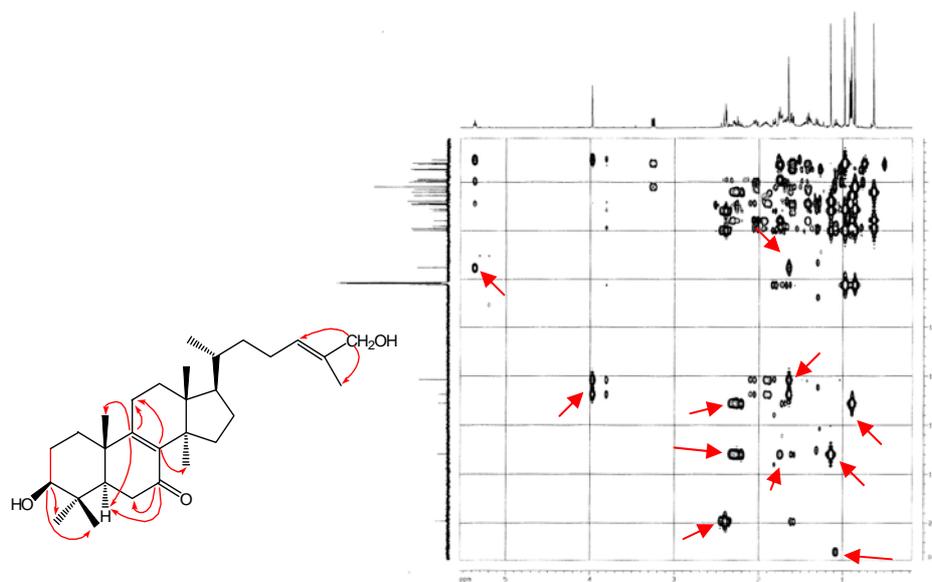
**Figura 15.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia  $\text{G}_{10}$ .

Su espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (figura 16) mostró, entre otras señales, la presencia de tres carbonos cuaternarios pertenecientes a dos dobles enlaces tri y tetrasustituídos. Por otra parte, aparece una señal a  $\delta$  199.0 ppm asignada a un grupo carbonilo.



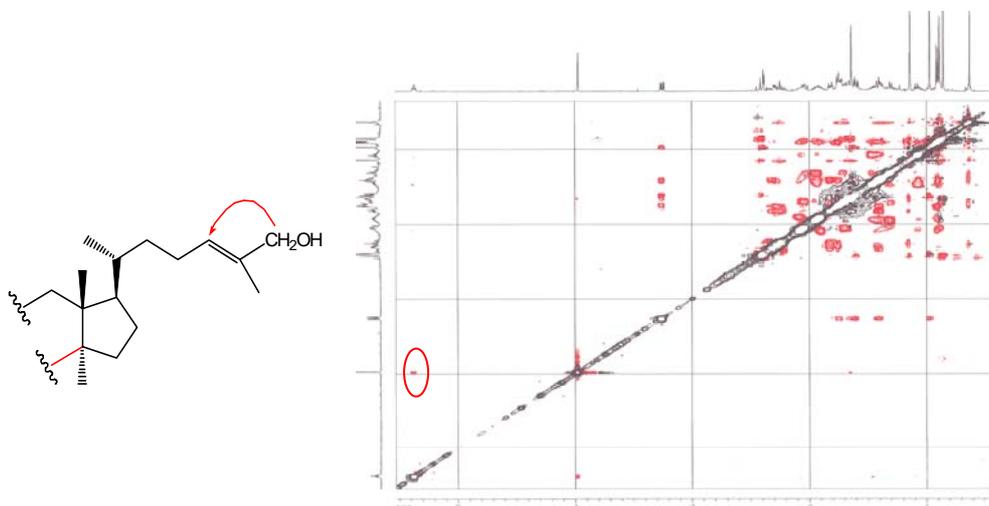
**Figura 16.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la sustancia  $\text{G}_{10}$ .

Un análisis de correlación bidimensional (HMBC, figura 17) establece las siguientes conectividades: C-7 con  $\text{H}_2$ -6 y H-5; C-3 con  $\text{H}_3$ -28,  $\text{H}_3$ -29 y  $\text{H}_2$ -2; C-8 con  $\text{H}_3$ -30 y  $\text{H}_2$ -11; C-9 con el H-5,  $\text{H}_3$ -19 y  $\text{H}_2$ -11; C-26 con  $\text{H}_3$ -27 y H-24.



**Figura 17.** Experimento HMBC (de C a H) de la sustancia **G<sub>10</sub>**.

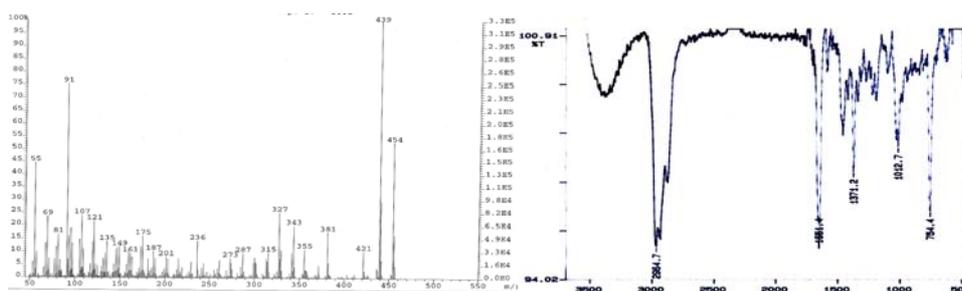
Los datos anteriores confirman la estructura de la nueva sustancia **G<sub>10</sub>** como 3 $\beta$ ,26-dihidroxi-5 $\alpha$ -lanosta-8,24-dien-7-ona a la que, debido a su origen, la hemos denominado lucidiol. La estereoquímica relativa fue determinada por un experimento NOESY (figura 18). Así, la configuración *E* del doble enlace en la cadena lateral fue asignada de acuerdo a la correlación existente entre el H-24 y H<sub>2</sub>-26.



**Figura 18.** Experimento NOESY de la sustancia **G<sub>10</sub>**.

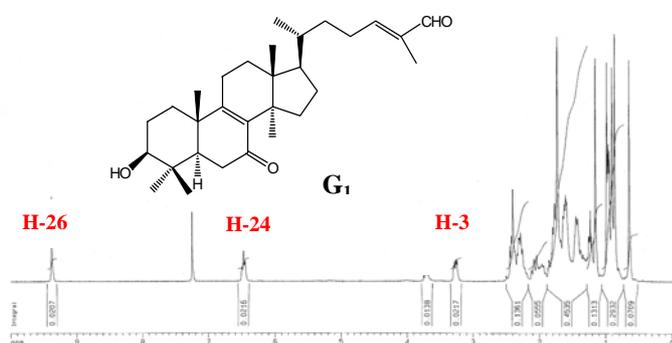
**SUSTANCIA G<sub>11</sub>**

Se aisló de la cromatografía general como un sólido que cristalizó de metanol fijando su p.f. en 106-108°C. En el espectro de masas se observa el ion molecular a  $m/z$  454, correspondiente a la fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>3</sub> (figura 19a). El espectro UV,  $\lambda_{\max}$  256 nm, indica un carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado. El espectro de IR exhibe bandas a  $\nu_{\max}$  3500 (hidroxilo), 1685 (aldehído) y 1660 cm<sup>-1</sup> (carbonilo) (figura 19b).



**Figura 19.** a) Espectro de masas, b) Espectro de IR de la sustancia G<sub>11</sub>.

El espectro de <sup>1</sup>H RMN (figura 20) es semejante al del lucidadiol con la diferencia de que la señal del hidroximetilo se encuentra sustituida por un singulete a  $\delta$  9.39 ppm correspondiente a un protón aldehídico.



**Figura 20.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la sustancia G<sub>11</sub>.

Su espectro de <sup>13</sup>C RMN (figura 21) también resultó ser similar al del lucidadiol a excepción de que presenta un carbono aldehídico el cual aparece a  $\delta$  195.3 ppm.

Efectivamente, el experimento NOESY (figura 22) mostró correlación entre el H-24 y el H-26.

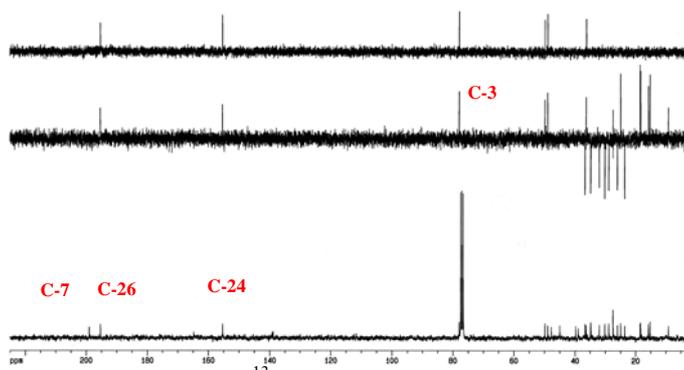


Figura 21. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la sustancia  $\text{G}_{11}$ .

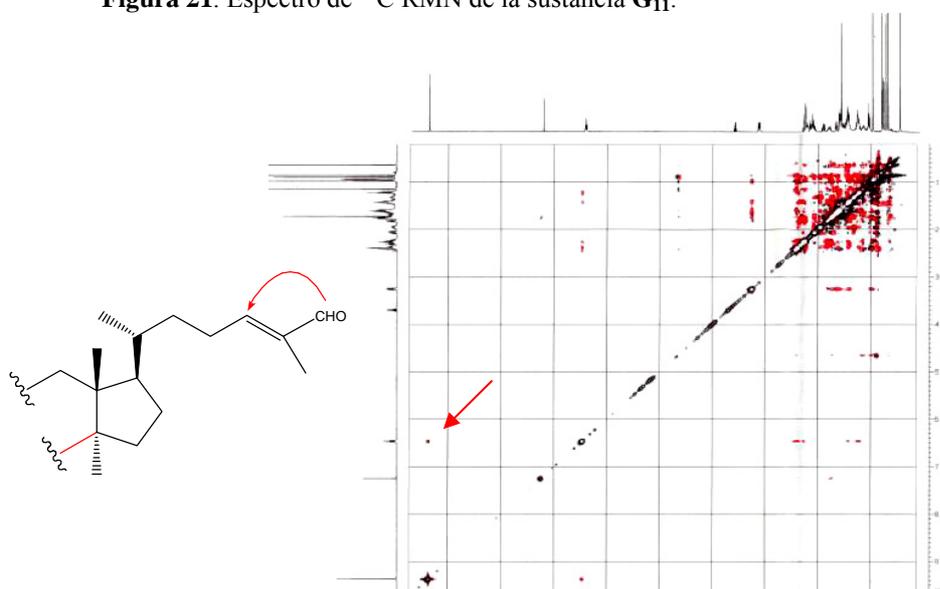


Figura 22. Experimento NOESY de la sustancia  $\text{G}_{11}$ .

Los datos anteriores confirman la estructura de la nueva sustancia  $\text{G}_{11}$  como 3 $\beta$ -hidroxi-7-oxo-5 $\alpha$ -lanosta-8,24-dien-26-al que, debido a su origen, le hemos denominado lucidal.

***PARTE EXPERIMENTAL***

El hongo *Ganoderma lucidum* (w.curt.: Fr.) Karst, es un hongo de consistencia leñosa, recolectado en el Parque Nacional Natural de los Farallones en Colombia en diciembre de 1997. Fue identificado por los Doctores Luis Eduardo Henao y Jaime Uribe del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, un ejemplar se encuentra en el Herbario Nacional Colombiano con el Número Col 352016.

300 gramos de hongo fueron reducidos a serrín y se extrajeron por maceración con etanol (96%) durante una semana hasta agotamiento. El extracto etanólico se concentró a vacío y dio 18 gramos, este residuo fue cromatografiado a través de una columna empaquetada con gel de sílice y eluida con mezclas de n-hexano-acetato de etilo de polaridad creciente. Se tomaron fracciones de 200 ml y se analizaron por cromatografía en capa fina (utilizando como agente revelador oleum) para luego reagruparlas en fracciones tal como se indica en la tabla 1.

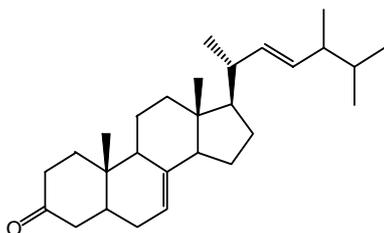
La fracción A (2.0 g) se recromatografió usando n-hexano-AcOEt (19:1) con incremento de polaridad hasta AcOEt, obteniéndose cinco subfracciones A-1 a A-5, según su polaridad. Así, de A-1 se obtiene la sustancia **G<sub>1</sub>**, de la subfracción A-2 se obtiene una mezcla de sustancias que por posterior TLC preparativa (benceno-AcOEt, 50:1) seis eluciones se obtuvo **G<sub>2</sub>** y **G<sub>3</sub>**. De la subfracción A-3 se purifican dos sustancias **G<sub>3</sub>** y **G<sub>4</sub>** empleando TLC-preparativa (n-hexano-AcOEt 20:1) tres eluciones.

De la fracción denominada B (1.5 g), por cristalización fraccionada en n-hexano-AcOEt y metanol se obtienen **G<sub>5</sub>** y **G<sub>6</sub>**, las aguas madres se cromatografían por TLC preparativa usando n-hexano-AcOEt (9:1) con dos recorridos y se obtienen las sustancias **G<sub>7</sub>** y **G<sub>8</sub>**.

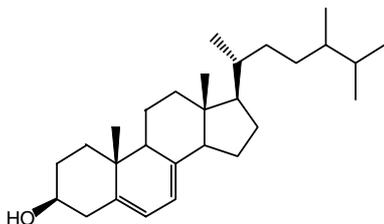
Por último, la fracción C (1.0 g) se purifica por cromatografía en columna de Sephadex LH-20 eluida con hexano-CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2:1:1), de la cual se recupera una subfracción que muestra ser una mezcla de, al menos, tres sustancias mayoritarias, las cuales se recromatografiaron usando columna de gel de sílice, eluida con éter de petróleo- AcOEt (6:4) separándose la sustancia **G<sub>9</sub>**, y una mezcla de sustancias que por TLC preparativa (CHCl<sub>3</sub>-Acetona, 25:1) dos eluciones nos proporcionó las sustancias **G<sub>10</sub>** y **G<sub>11</sub>**.

**Tabla 1.** Sustancias aisladas de *G. lucidum* por orden de elución.

| Fracción | Peso  | Eluyentes                | Sustancias   |
|----------|-------|--------------------------|--|
| A        | 1.5 g | n-hexano:AcOEt<br>(9:1)  | Ergosta 7,22-dien-3-ona, <b>G<sub>1</sub></b> ; ergosta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol, <b>G<sub>2</sub></b> ; ergosta-7-en-3 $\beta$ -ol, <b>G<sub>3</sub></b> ; ergosterol, <b>G<sub>4</sub></b> . |
| B        | 1.5 g | n-hexano: AcOEt<br>(4:1) | Peróxido de ergosterol, <b>G<sub>5</sub></b> ; ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona, <b>G<sub>6</sub></b> ; ganodermadiol, <b>G<sub>7</sub></b> ; ganodermenonol, <b>G<sub>8</sub></b> .       |
| C        | 1.0 g | n-hexano: AcOEt<br>(1:1) | ácido ganoderico DM, <b>G<sub>9</sub></b> ; lucidadiol <b>G<sub>10</sub></b> ; lucidal <b>G<sub>11</sub></b> .   |

**Sustancia G<sub>1</sub>:** Ergosta-7,22-dien-3-ona.

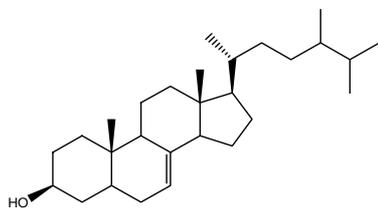
Sólido amorfo 100 mg; p.f.: 165-167 °C;  $[\alpha]_D$ : +10 (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 2953, 2869, 1715, 1475, 1330, 990 cm<sup>-1</sup>; EI-MS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 396.3384 [M]<sup>+</sup> (C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O, calcd 396.3392) (35), 298 (24), 271 (47), 269 (100), 244 (17), 229 (20), 161 (13), 147 (18), 119 (12); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.57 (3H, s, Me-18), 0.77 (3H, d, *J* = 5.7 Hz, Me-27), 0.79 (3H, d, *J* = 5.7 Hz, Me-26), 0.92 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, Me-28), 1.01 (3H, s, Me-19), 1.02 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, Me-21), 5.21 (3H, m, H-7, H-22 y H-23); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 12.10 (C-18), 12.40 (C-19), 17.60 (C-28), 19.65 (C-26), 19.92 (C-27), 21.10 (C-21), 21.70 (C-11), 22.93 (C-15), 28.00 (C-16), 30.00 (C-6), 33.15 (C-25), 34.47 (C-10), 38.14 (C-1), 38.89 (C-2), 39.34 (C-12), 40.48 (C-20), 42.80 (C-24), 42.93 (C-13), 44.25 (C-4), 48.9 (C-9), 55.05 (C-14), 55.97 (C-17), 117.9 (C-7), 132.06 (C-23), 135.57 (C-22), 139.5 (C-8), 211.9 (C-3).

**Sustancia G<sub>2</sub>:** Ergosta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol.

Sólido cristalino 150 mg; p.f.: 149-151 °C;  $[\alpha]_D$ : -128.7 (*c* 0.4, CHCl<sub>3</sub>); UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 294 (4.03), 283, 273 nm; IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3300, 2930, 1545, 1320, 1020 cm<sup>-1</sup>; EI-MS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 398.33464 [M]<sup>+</sup> (C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O, calcd 398.3396) (27), 383 (29), 380 (24), 365 (13); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.62 (3H, s, Me-18), 0.78 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, Me-28), 0.79 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, Me-26), 0.86 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, Me-27), 0.94 (3H, s, Me-19), 0.95 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, Me-21), 3.63 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 5.39 (1H, m, H-7), 5.57 (1H, dd, *J* = 5.6, 2.5 Hz, H-6); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 11.81 (C-18), 16.26 (C-19), 15.45 (C-28), 17.62 (C-26), 19.02 (C-21), 20.51 (C-27), 21.12 (C-11), 23.02 (C-15), 28.08 (C-16), 30.66 (C-23), 31.52 (C-25), 32.00 (C-2), 33.69 (C-22), 36.58 (C-20), 37.02 (C-10), 38.38 (C-1), 39.05 (C-24), 39.21 (C-12), 40.79 (C-4), 42.94 (C-13), 46.28 (C-9), 54.53

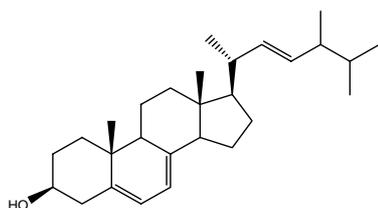
(C-14), 55.71 (C-17), 70.49 (C-3), 116.25 (C-7), 119.62 (C-6), 139.78 (C-5), 141.42 (C-8).

**Sustancia G<sub>3</sub>:** Ergosta-7-en-3 $\beta$ -ol (fungisterol).

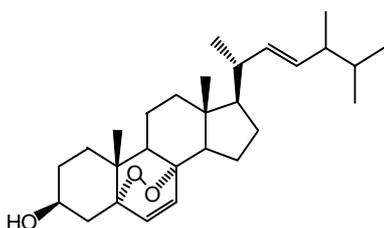


Sólido cristalino 120 mg; p.f.: 143-145°C;  $[\alpha]_D$ : -5 (c 0.4, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3250, 2965, 1541, 1320, 1020, 997 cm<sup>-1</sup>; EI-MS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 400.3651 [M]<sup>+</sup> (C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>O, calcd 400.3705) (100), 385 (14), 382 (19), 367 (4), 272 (25), 255 (97), 231 (21); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.54 (3H, s, Me-18), 0.78 (3H, d, J = 6.9 Hz, Me-28), 0.79 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me-26), 0.80 (3H, s, Me-19), 0.86 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me-27), 0.93 (3H, d, J = 6.7 Hz, Me-21), 3.59 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 5.16 (1H, m, H-7); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 11.84 (C-18), 13.03 (C-19), 15.45 (C-28), 17.63 (C-26), 19.06 (C-21), 20.53 (C-27), 21.54 (C-11), 23.00 (C-15), 27.98 (C-16), 29.68 (C-6), 30.71 (C-23), 31.50 (C-2 y 25), 33.69 (C-22), 34.26 (C-10), 36.65 (C-20), 37.15 (C-1), 38.05 (C-4), 39.55 (C-12), 39.15 (C-24), 40.26 (C-5), 43.38 (C-13), 49.45 (C-9), 55.02 (C-14), 56.03 (C-17), 71.10 (C-3), 117.46 (C-7), 139.65 (C-8).

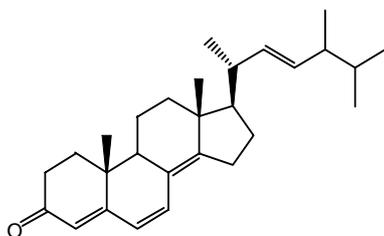
**Sustancia G<sub>4</sub>:** Ergosterol.



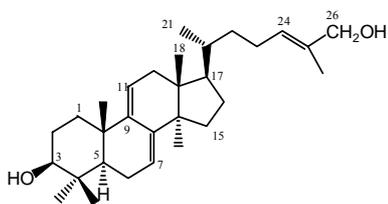
Sólido cristalino 210 mg; p.f.: 166-168 °C;  $[\alpha]_D$ : -120 (c 0.05, CHCl<sub>3</sub>); UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 280 (4.08) nm; IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3300, 2930, 1545, 1320, 1020 cm<sup>-1</sup>; EI-MS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 396.3418 [M]<sup>+</sup> (C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O, calcd 396.3392) (40), 378 (46), 363 (76), 337 (24), 253 (100), 211 (24), 199 (37); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.63 (3H, s, Me-18), 0.82 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me-27), 0.84 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me-26), 0.91 (3H, d, J = 6.3 Hz, Me-28), 0.92 (3H, s, Me-19), 1.03 (3H, d, J = 6.7 Hz, Me-21), 3.63 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 5.21 (2H, m, H-22 y H-23), 5.39 (1H, m, H-7), 5.58 (1H, m, H-6); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 12.00 (C-18), 16.35 (C-19), 17.60 (C-28), 19.65 (C-26), 19.92 (C-27), 21.10 (C-11 y C-21), 23.04 (C-15), 28.30 (C-16), 32.00 (C-2), 33.15 (C-25), 37.05 (C-10), 38.41 (C-1), 39.15 (C-12), 40.40 (C-20), 40.83 (C-4), 42.80 (C-13 y C-24), 46.30 (C-9), 54.63 (C-14), 55.81 (C-17), 70.50 (C-3), 116.35 (C-7), 119.63 (C-6), 132.06 (C-23), 135.67 (C-22), 139.8 (C-5), 141.30 (C-8).

**Sustancia G<sub>5</sub>:** Peróxido de ergosterol.

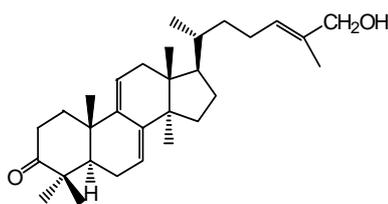
Sólido cristalino 210 mg; p.f.: 177-179 °C;  $[\alpha]_D$ : +23 (*c* 0.8, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3250, 2955, 2871, 1457, 1374, 1042, 967 cm<sup>-1</sup>; EI-MS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 428.3289 [M]<sup>+</sup> (C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>, calcd 428.3290) (11), 410 (22), 396 (40), 392 (18), 385 (10), 376 (23), 353 (17), 303 (10), 301 (10), 285 (19), 267 (26), 251 (39), 249 (34), 235 (14), 209 (18); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.82 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, Me-27), 0.82 (3H, s, Me-18), 0.83 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, Me-26), 0.88 (3H, s, Me-19), 0.91 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, Me-28), 1.00 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, Me-21), 3.94 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 5.18 (2H, m, H-22 y H-23), 6.23 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-7), 6.50 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-6); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 12.80 (C-18), 17.50 (C-28), 18.10 (C-19), 19.65 (C-26), 19.92 (C-27), 20.61 (C-15), 20.82 (C-21), 23.4 (C-11), 28.60 (C-16), 30.10 (C-2), 33.01 (C-25), 34.74 (C-1), 36.97 (C-4 y C-10), 39.35 (C-12), 39.74 (C-20), 42.75 (C-24), 44.52 (C-13), 51.14 (C-9), 51.73 (C-14), 56.28 (C-17), 66.47 (C-3), 79.45 (C-8), 82.16 (C-5), 130.72 (C-7), 132.35 (C-23), 135.29 (C-22), 135.44 (C-6).

**Sustancia G<sub>6</sub>:** Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona.

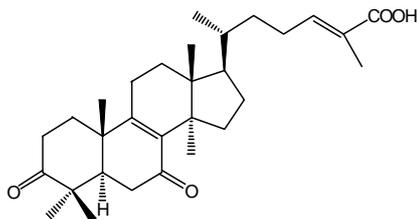
Sólido amarillo 80 mg; p.f.: 104-107 °C;  $[\alpha]_D$ : +58 (*c* 0.1, CHCl<sub>3</sub>); UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH) (log  $\epsilon$ ): 346 (4.08), 237 (1.1) nm; IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 2957, 2870, 1663, 1586, 1457, 1221, 957, 880 cm<sup>-1</sup>; EI-MS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 392.3047 [M]<sup>+</sup> (C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>O, calcd 392.3079) (30), 268 (100), 253 (21), 240 (7), 214 (18), 173 (12); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.81 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, Me-27), 0.82 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, Me-26), 0.90 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, Me-28), 0.94 (3H, s, Me-18), 0.97 (3H, s, Me-19), 1.03 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, Me-21), 5.21 (2H, m, H-22 y H-23), 5.71 (1H, s, H-4), 6.00 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, H-6), 6.58 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, H-7); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 16.52 (C-19), 17.50 (C-24), 18.80 (C-11 y C-18), 19.55 (C-27), 19.92 (C-26), 21.18 (C-21), 25.30 (C-15), 27.64 (C-16), 33.02 (C-25), 34.01 (C-2 y C-12), 35.53 (C-1), 36.74 (C-10), 39.16 (C-20), 42.73 (C-24), 43.94 (C-13), 44.32 (C-9), 55.64 (C-17), 122.95 (C-4), 124.45 (C-6), 132.45 (C-22), 133.96 (C-5 y C-7), 134.97 (C-23), 155.98 (C-8), 164.23 (C-14), 199.3 (C-3).

**Sustancia G<sub>7</sub>:** 5 $\alpha$ -Lanosta-7,9(11),24-trien-3 $\beta$ ,26-diol (ganodermediol).

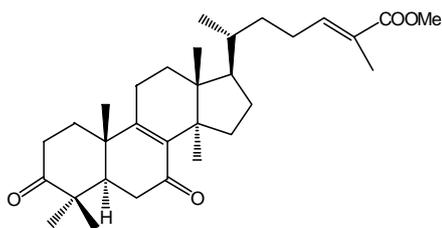
Sólido cristalino 30 mg; p.f.: 168-170 °C;  $[\alpha]_D$ : +53 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 236 (4.08), 243 (4.12), 251 (3.95) nm; IR  $\nu_{max}$  (film, KBr): 3340, 2930, 1440, 1430, 1370, 1070, 1010 cm<sup>-1</sup>; EI-MS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 440.3560 [M]<sup>+</sup> (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub>, calcd 440.3654) (100), 425 (12), 422 (30), 407 (12), 311 (95), 295 (12), 271 (44), 253 (30), 171 (28), 157 (32), 145 (39), 119 (38), 95 (48), 69 (70), 55 (98); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.57 (3H, s, Me-18), 0.88 (3H, s, Me-28), 0.88 (3H, s, Me-30), 0.92 (3H, d, J = 6.3 Hz, Me-21), 0.98 (3H, s, Me-19), 1.00 (3H, s, Me-29), 1.67 (3H, s, Me-27), 3.25 (1H, dd, J = 5.4, 10.1 Hz, H-3 $\alpha$ ), 4.00 (2H, s, H-26), 5.34 (1H, d, J = 5.85 Hz, H-11), 5.42 (1H, t, J = 7.07 Hz, H-24), 5.47 (1H, d, J = 5.90 Hz, H-7); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 13.65 (C-27), 15.49 (C-18), 15.70 (C-30), 18.23 (C-21), 22.87 (C-19), 22.90 (C-6), 24.75 (C-23), 25.10 (C-28), 27.82 (C-2), 27.95 (C-16), 28.07 (C-29), 31.83 (C-15), 35.72 (C-1), 35.75 (C-22), 36.12 (C-20), 37.30 (C-10), 38.04 (C-12), 38.73 (C-4), 44.10 (C-13), 48.9 (C-5), 50.5 (C-14), 51.09 (C-17), 69.74 (C-26), 78.98 (C-3), 115.3 (C-11), 121.9 (C-7), 125.38 (C-24), 134.28 (C-25), 143.2 (C-8), 146.0 (C-9).

**Sustancia G<sub>8</sub>:** 26-Hidroxi-5 $\alpha$ -lanosta-7,9(11),24-trien-3-ona; (ganodermenonol).

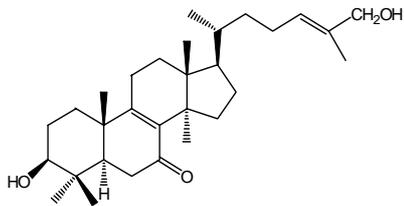
Sólido cristalino 10 mg; p.f.: 108-109 °C;  $[\alpha]_D$ : +38 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 236 (4.15), 243 (4.20), 251 (4.06) nm; IR  $\nu_{max}$  (film, KBr): 3425 (OH), 2930, 2880, 1700, 1440, 1430, 1370, 1110, 1070, 1010, 815 cm<sup>-1</sup>; EI-MS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 438.3841 [M]<sup>+</sup> (C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>, calcd 438.3498) (80), 423 (14), 420 (10), 405 (12), 309 (100), 269 (42), 199 (16), 185 (20), 157 (40), 145 (39), 119 (35), 109 (38), 95 (44), 69 (64), 55 (99); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.59 (3H, s, Me-18), 0.88 (3H, s, Me-28), 0.92 (3H, d, J = 6.2 Hz, Me-21), 1.09 (3H, s, Me-29), 1.13 (3H, s, Me-30), 1.20 (3H, s, Me-19), 1.67 (3H, s, Me-27), 4.12 (2H, s, H-26), 5.40 (1H, m, H-11), 5.40 (1H, m, H-24), 5.49 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-7); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 13.62 (C-27), 15.65 (C-18), 18.39 (C-21), 22.40 (C-19), 22.43 (C-30), 23.63 (C-6), 24.55 (C-23), 25.28 (C-29), 25.38 (C-28), 27.83 (C-16), 31.44 (C-15), 34.82 (C-2), 35.85 (C-22), 36.02 (C-20), 36.59 (C-1), 37.17 (C-10), 37.74 (C-12), 43.68 (C-13), 47.45 (C-4), 50.25 (C-14), 50.5 (C-5), 50.86 (C-17), 69.01 (C-26), 117.24 (C-11), 119.89 (C-7), 126.86 (C-24), 134.38 (C-25), 143.2 (C-8), 144.47 (C-9), 216.90 (C-3).

**Sustancia G<sub>9</sub>:** Ácido 3,7-dioxo-5 $\alpha$ -lanosta-8,24-dien-26-oico (ácido ganodérico DM).

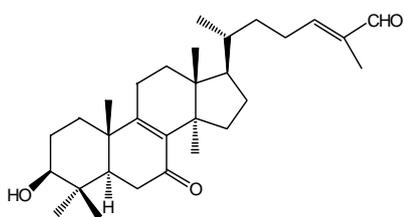
Sólido cristalino 40 mg; p.f.: 176-178 °C;  $[\alpha]_D$ : +20 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 250 (2.12) nm; IR  $\nu_{max}$  (film, KBr): 3010, 2918, 2849, 1707, 1661, 1462, 1215, 756, 667 cm<sup>-1</sup>; EI-MS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 468.3294 [M]<sup>+</sup> (C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>, calcd 468.3239) (80), 453 (100), 435 (32), 422 (14), 407 (61), 379 (15), 353 (46), 339 (43), 328 (32), 325 (25), 313 (10), 289 (10), 285 (21), 271 (19), 259 (24), 234 (19), 201 (12), 175 (11), 173 (15), 159 (10), 135 (24), 121 (27), 109 (13), 95 (29), 93 (20), 69 (17), 55 (27); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.65 (3H, s, Me-18), 0.90 (3H, s, Me-28), 0.92 (3H, d, *J* = 5.9 Hz, Me-21), 1.06 (3H, s, Me-29), 1.08 (3H, s, Me-30), 1.30 (3H, s, Me-19), 1.80 (3H, s, Me-27), 6.86 (1H, t, *J* = 7.54 Hz, H-24); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 11.9 (C-27), 15.9 (C-18), 17.9 (C-19), 18.5 (C-21), 21.3 (C-30), 23.8 (C-11), 24.9 (C-28), 25.3 (C-29), 25.8 (C-23), 28.6 (C-16), 30.1 (C-12), 31.8 (C-15), 34.0 (C-22), 34.7 (C-2), 35.3 (C-1), 36.2 (C-20), 37.1 (C-6), 39.4 (C-10), 44.9 (C-13), 47.2 (C-4), 47.8 (C-14), 49.0 (C-17), 50.4 (C-5), 126.8 (C-25), 139.5 (C-8), 145.4 (C-24), 162.7 (C-9), 173.1 (C-26), 198.1 (C-7), 214.7 (C-3).

**Metil éster de G<sub>9</sub>:**

A 10 mg de **G<sub>9</sub>** en 10 ml de éter etílico se le adicionó un exceso de diazometano recién preparado, la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente por 12 h. Se concentró a vacío rindiendo 10 mg del metil éster como un sólido amorfo;  $[\alpha]_D$ : +30 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{max}$  (film, KBr): 2918, 2850, 1737, 1708, 1664, 1457, 1375 cm<sup>-1</sup>; EI-MS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 482.3397 [M]<sup>+</sup> (C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>, calcd 482.3396) (91), 468 (22), 467 (64), 451 (16), 435 (63), 417 (23), 407 (98), 353 (56), 339 (100), 328 (42), 326 (46), 311 (21), 285 (35), 271 (30), 259 (53), 249 (22), 245 (16), 234 (21), 215 (18), 201 (25), 189 (16), 187 (27), 175 (23), 173 (25), 163 (21), 161 (24), 159 (24), 149 (33), 135 (44), 123 (38), 119 (37), 109 (37); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.69 (3H, s, Me-18), 0.89 (3H, s, Me-28), 0.90 (3H, d, *J* = 5.9 Hz, Me-21), 1.10 (3H, s, Me-29), 1.12 (3H, s, Me-30), 1.34 (3H, s, Me-19), 1.84 (3H, s, Me-27), 3.73 (3H, s, OMe), 6.75 (1H, t, *J* = 6.7 Hz, H-24); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 12.3 (C-27), 15.9 (C-18), 17.9 (C-19), 18.6 (C-21), 21.4 (C-30), 23.8 (C-11), 24.9 (C-28), 25.4 (C-29), 25.6 (C-23), 28.7 (C-16), 30.1 (C-12), 31.6 (C-15), 34.4 (C-22), 34.9 (C-2), 35.4 (C-1), 36.2 (C-20), 37.2 (C-6), 39.4 (C-10), 45.0 (C-13), 47.2 (C-4), 47.8 (C-14), 49.0 (C-17), 50.4 (C-5), 51.7 (OMe), 127.2 (C-25), 139.5 (C-8), 143.0 (C-24), 162.7 (C-9), 168.7 (C-26), 198.0 (C-7), 214.6 (C-3)

**Sustancia G<sub>10</sub>**: 3 $\beta$ ,26-Dihidroxi-5 $\alpha$ -lanosta-8,24-dien-7-ona (lucidadiol).

Sólido cristalino 20 mg; p.f.: 163-165 °C;  $[\alpha]_D$ : +80 (c 0.02, Etanol); UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 253 (3.6) nm; IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3406 (OH), 2960, 1649, 1583, 1371, 1270, 1170, 1050, 754, 665  $\text{cm}^{-1}$ ; EI-MS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 456.3611  $[\text{M}]^+$  ( $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ , calcd 456.3603) (37), 441 (25), 438 (29), 423 (69), 357 (31), 355 (23), 341 (22), 329 (35), 327 (27), 313 (18), 287 (20), 276 (76), 274 (76), 261 (100), 259 (60), 243 (15), 231 (41), 175 (20), 159 (16), 135 (21), 121 (28), 109 (51), 107 (27), 105 (21), 95 (24), 93 (22), 81 (29), 69 (36), 57 (25), 55 (47);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.63 (3H, s, Me-18), 0.85 (3H, s, Me-30), 0.89 (3H, s, Me-28), 0.91 (3H, d, J = 6.0 Hz, Me-21), 0.97 (3H, s, Me-29), 1.08 (1H, m, H<sub>b</sub>-22), 1.14 (3H, s, Me-19), 1.31 (1H, m, H-16  $\beta$ ), 1.39 (1H, m, H-1 $\alpha$ ), 1.39 (1H, m, H-20), 1.43 (1H, m, H-17 $\alpha$ ), 1.44 (1H, m, H<sub>a</sub>-22), 1.60 (1H, dd, J = 12.8, 4.4 Hz, H-5 $\alpha$ ), 1.64 (3H, s, Me-27), 1.67 (1H, m, H-2  $\beta$ ), 1.69 (1H, m, H-15  $\beta$ ), 1.70 (1H, m, H-12  $\beta$ ), 1.72 (1H, m, H-12 $\alpha$ ), 1.74 (1H, m, H-2 $\alpha$ ), 1.81 (1H, dt, J = 13.8, 3.3 Hz, H-1 $\beta$ ), 1.92 (1H, m, H-16 $\alpha$ ), 1.92 (1H, m, H<sub>b</sub>-23), 2.04 (1H, dd, J = 13.0, 2.6 Hz, H-15 $\alpha$ ), 2.10 (1H, m, H<sub>a</sub>-23), 2.25 (1H, m, H-11 $\alpha$ ), 2.28 (1H, m, H-11  $\beta$ ), 2.38 (1H, dd, J = 15.8, 3.97 Hz, H-6 $\alpha$ ), 2.40 (1H, dd, J = 15.8, 12.4 Hz, H-6  $\beta$ ), 3.25 (1H, dd, J = 11.6, 4.4 Hz, H-3 $\alpha$ ), 3.97 (2H, s, 2H-26), 5.37 (1H, t, J = 6.7 Hz, H-24);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 13.53 (C-27), 15.18 (C-30), 15.69 (C-18), 18.24 (C-19), 18.58 (C-21), 23.56 (C-11), 24.37 (C-23), 24.87 (C-28), 27.31 (C-2 y 29), 28.66 (C-16), 30.02 (C-12), 31.88 (C-15), 34.7 (C-1), 35.81 (C-22), 36.07 (C-20), 36.52 (C-6), 38.81 (C-4), 39.67 (C-10), 44.83 (C-13), 47.65 (C-14), 48.87 (C-17), 49.73 (C-5), 68.96 (C-26), 77.83 (C-3), 126.83 (C-24), 134.27 (C-25), 138.85 (C-8), 164.77 (C-9), 199.02 (C-7).

**Sustancia G<sub>11</sub>**: 3 $\beta$ -Hidroxi-7-oxo-5 $\alpha$ -lanosta-8,24-dien-26-al (lucidal)

Sólido cristalino 8 mg; p.f.: 106-108 °C;  $[\alpha]_D$ : +19 (c 0.2,  $\text{CHCl}_3$ ); UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 229 (2.0), 256 (4.7) nm; IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3500 (OH), 2927, 2880, 1685, 1660, 1580, 1370, 665  $\text{cm}^{-1}$ ; EI-MS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 454.3405  $[\text{M}]^+$  ( $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$ , calcd 454.3446) (37), 439 (100), 381 (17), 355 (11), 343 (20), 327 (25), 236 (14), 185 (10), 175 (16), 159 (10), 149 (11), 145 (11), 121 (21), 107 (23), 105 (14), 95 (20), 91 (75), 81 (16), 69 (23), 57 (10), 55 (44);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.64 (3H, s, Me-18), 0.86 (3H, s, Me-30), 0.89 (3H, s, Me-28), 0.94 (3H, d, J = 6.0 Hz, Me-21), 0.97 (3H, s, Me-29), 1.14 (3H, s, Me-19), 1.21 (1H, m, H<sub>b</sub>-22), 1.30 (1H, m, H-16  $\beta$ ), 1.42 (1H, m, H-20), 1.44 (1H, m, H-17 $\alpha$ ), 1.55 (1H, m, H<sub>a</sub>-22), 1.60 (1H, dd, J = 12.6, 4.6 Hz, H-5 $\alpha$ ), 1.60 (1H, m, H-1 $\alpha$ ), 1.64 (1H, m, H-2  $\beta$ ), 1.69 (1H, m, H-2 $\alpha$ ), 1.72 (3H, s, Me-27), 1.73 (1H, m, H-15  $\beta$ ), 1.74 (1H, m, H-12 $\alpha$ ), 1.76 (1H, m, H-12  $\beta$ ), 1.82 (1H, dt, J = 12.9, 3.5 Hz, H-1 $\beta$ ), 1.91 (1H, m, H-16 $\alpha$ ), 2.05 (1H, dd, J = 11.6, 2.4 Hz, H-15 $\alpha$ ), 2.24 (1H, m, H<sub>a</sub>-23), 2.26 (1H,

m, H-11 $\alpha$ ), 2.26 (1H, m, H-11  $\beta$ ), 2.30 (1H, m, H<sub>b</sub>-23), 2.39 (1H, dd, J = 16.0, 3.8 Hz, H-6 $\alpha$ ), 2.41 (1H, dd, J = 16.0, 12.5 Hz, H-6  $\beta$ ), 3.25 (1H, dd, J = 11.5, 4.4 Hz, H-3 $\alpha$ ), 6.45 (1H, t, J = 7.1 Hz, H-24), 9.39 (1H, s, H-26); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 9.20 (C-27), 15.15 (C-30), 15.70 (C-18), 18.24 (C-19), 18.47 (C-21), 23.50 (C-11), 24.86 (C-28), 25.88 (C-23), 27.32 (C-2 y C-29), 28.68 (C-16), 30.06 (C-12), 31.88 (C-15), 34.63 (C-1), 34.74 (C-22), 36.14 (C-20), 36.51 (C-6), 38.81 (C-4), 39.68 (C-10), 44.91 (C-13), 47.67 (C-14), 48.86 (C-17), 49.76 (C-5), 77.80 (C-3), 138.76 (C-8), 139.10 (C-25), 155.10 (C-24), 164.57 (C-9), 195.30 (C-26), 198.85 (C-7).

## **ESTUDIO DEL HONGO *GANODERMA CONCINNA***

## ***PARTE TEÓRICA***

## **AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL.**

Por medio de los procedimientos habituales de extracción y separación cromatográfica hemos aislado del extracto de acetato de etilo del hongo *Ganoderma concinna* quince sustancias  $C_1$ - $C_{15}$  (ver parte experimental), las cuales fueron estudiadas de acuerdo al orden de elución cromatográfica.

De las fracciones eluidas con n-hexano-AcOEt (9:1) se aislaron tres sustancias  $C_1$ - $C_3$  cuyas estructuras fueron determinadas por métodos espectroscópicos.

### **SUSTANCIA $C_1$**

Los datos espectrales de esta sustancia fueron idénticos a los de la ergosta-7,22-dien-3-ona, sustancia ésta aislada por nosotros del *Ganoderma australe*<sup>138</sup> y *Ganoderma lucidum* a la que hemos descrito como sustancia  $G_1$ .<sup>142</sup>

### **SUSTANCIA $C_2$**

Producto cristalino de p.f. 127-128°C, cristalizado de metanol. Da positiva la reacción de Lieberman-Burchard para triterpenos. El espectro de IR dio absorciones a  $\nu_{\max}$  1714, 1660 y 815  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a un grupo carbonilo y doble enlace. En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 23) se observó la presencia de seis metilos sobre carbonos terciarios a  $\delta$  0.60, 0.89, 1.09, 1.13, 1.21 y 1.76 ppm, este último sobre un doble enlace, un metilo secundario a  $\delta$  0.96 ppm ( $J = 6.0$  Hz) y un singulete a  $\delta$  9.40 ppm característico de un protón aldehídico. Su espectro de masas mostró el ion molecular a  $m/z$  436 de acuerdo para un  $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_2$ . Los datos espectroscópicos anteriores encajan perfectamente para la sustancia 3-oxo-5 $\alpha$ -lanosta-7,9(11),24-trien-26-al conocida como ganoderal A.<sup>143</sup>

---

<sup>142</sup> Ver la presente Tesis Doctoral, pág. 55.

<sup>143</sup> Morigiwa, A.; Kitabatake, K.; Fujimoto, Y.; Ikekawa, N. "Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*" *Chem. Pharm. Bull.* 34, **1986**, 3025-3028.

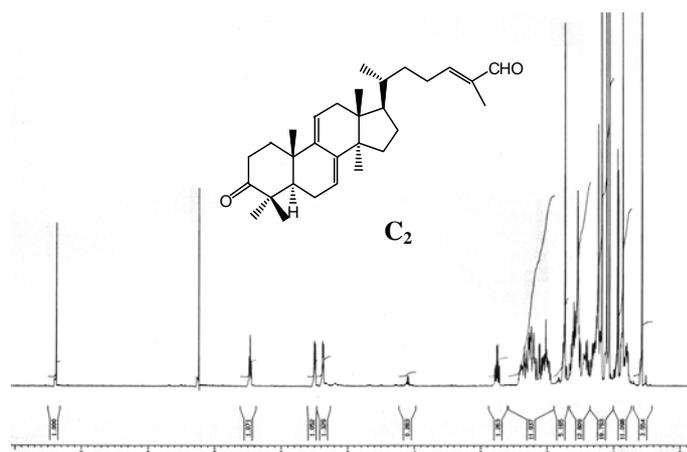


Figura 23. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia  $\text{C}_2$ .

### SUSTANCIA $\text{C}_3$

Esta sustancia resultó tener las mismas propiedades físicas y espectroscópicas que el peróxido de ergosterol  $\text{G}_5$ , aislada anteriormente por nosotros del *Ganoderma lucidum*.<sup>144</sup>

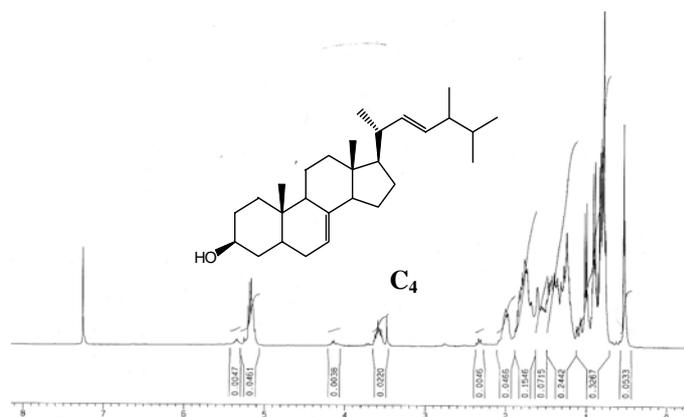
De las fracciones eluidas con n-hexano-AcOEt (4:1) (ver parte experimental) obtuvimos una mezcla de tres sustancias  $\text{C}_4$ - $\text{C}_6$ .

### SUSTANCIA $\text{C}_4$

Producto cristalino de p.f. 171-172°C, da positivo la reacción de Liebermann-Burchard para esteroides. Su espectro de IR presenta bandas de absorción a  $\nu_{\text{max}}$  3300  $\text{cm}^{-1}$  típica de grupo hidroxilo y a  $\nu_{\text{max}}$  930  $\text{cm}^{-1}$  característica de doble enlace. El examen de su espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 24) muestra las siguientes señales: dos metilos secundarios a  $\delta$  0.91 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{CH}_3$ -28) y 1.02 ppm (3H, d,  $J = 6.4$  Hz,  $\text{CH}_3$ -21), dos metilos terciarios a  $\delta$  0.55 ppm (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18) y 0.80 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -19) y un grupo isopropilo a  $\delta$  0.82 ppm (3H, d,  $J = 6.7$  Hz,  $\text{CH}_3$ -27) y 0.84 (3H, d,  $J = 5.7$  Hz,

<sup>144</sup> Ver la presente Tesis Doctoral, pág. 58.

CH<sub>3</sub>-26). Por último se observó un multiplete a  $\delta$  3.60 ppm correspondiente a un protón geminal a un grupo hidroxilo (1H, m, H-3). En el espectro de masas se observa el ion molecular a  $m/z$  398.3552 concordante con la fórmula molecular C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>O. Consultada la bibliografía pudimos observar que nuestra sustancia tiene propiedades espectroscópicas idénticas al ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol.



**Figura 24.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la sustancia C<sub>4</sub>.

### SUSTANCIA C<sub>5</sub>

Se aisló como un sólido cristalino de p. f. 108-109°C, cristalizado de metanol. Sus propiedades físicas (p.f., [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>) y espectroscópicas (IR, EM, <sup>1</sup>H RMN) son concordantes con las del ganodermenonol G<sub>8</sub>, aislado por nosotros del *Ganoderma lucidum*.<sup>145</sup>

### SUSTANCIA C<sub>6</sub>

Cristaliza en forma de agujas de hexano-AcOEt con p.f. 70-71 °C. Da positiva la reacción de Liebermann-Burchard característica de la presencia de un triterpeno penta o tetracíclico. Su espectro de IR (figura 25b) muestra bandas correspondientes a un grupo hidroxilo a  $\nu_{\max}$  3406 cm<sup>-1</sup> y aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado a  $\nu_{\max}$  1688 cm<sup>-1</sup>. En el espectro de

<sup>145</sup> Ver la presente Tesis Doctoral, págs. 61-62.

masas (figura 25a) aparece el ion molecular a  $m/z$  438 concordante con la fórmula molecular  $C_{30}H_{46}O_2$ . El espectro de  $^1H$  RMN (figura 26) muestra señales para cinco metilos terciarios a  $\delta$  0.55 (3H, s,  $CH_3$ -18), 0.86 (6H, s,  $CH_3$ -28 y  $CH_3$ -30), 0.96 (3H, s,  $CH_3$ -19) y 0.98 (3H, s,  $CH_3$ -29) y un metilo secundario a  $\delta$  0.93 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz,  $CH_3$ -21) característicos de un triterpeno con el esqueleto de lanostano. Un metilo vinílico y varias señales olefínicas fueron observadas a  $\delta$  1.73 (3H, s,  $CH_3$ -27), 5.30 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-11), 5.46 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-7) y 6.47 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-24).

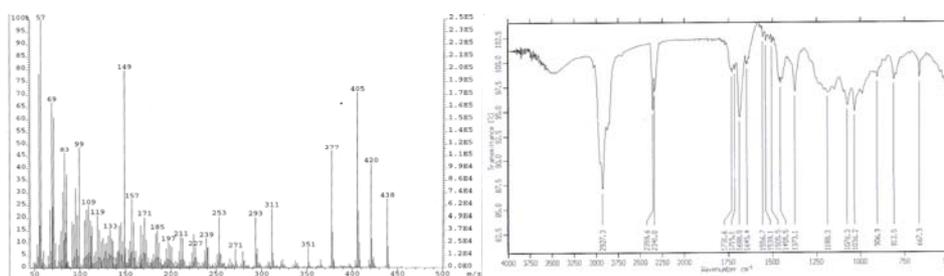


Figura 25. a) Espectro de masas, b) Espectro de IR de la sustancia  $C_6$ .

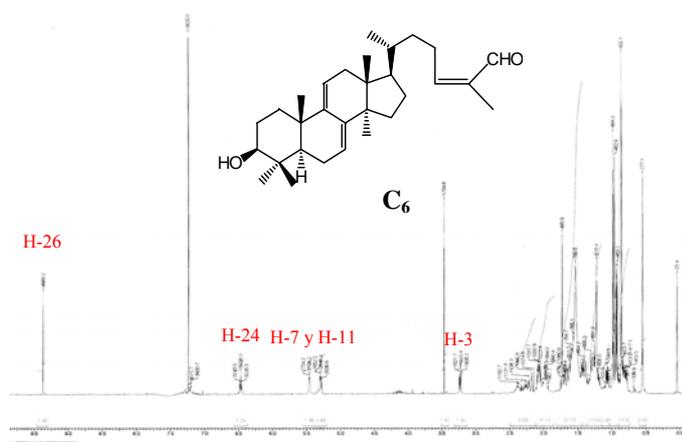
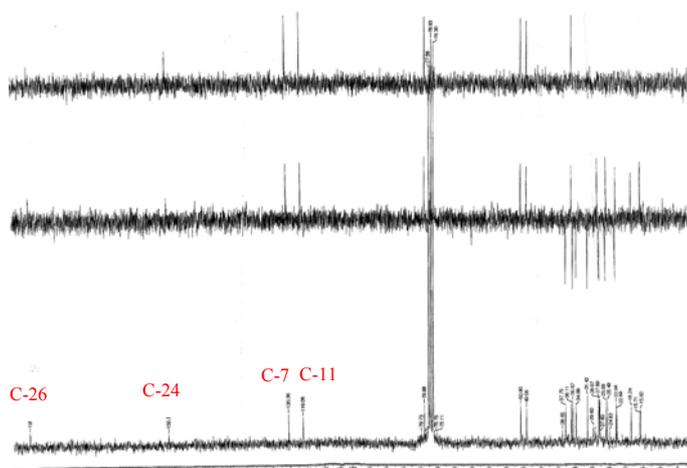


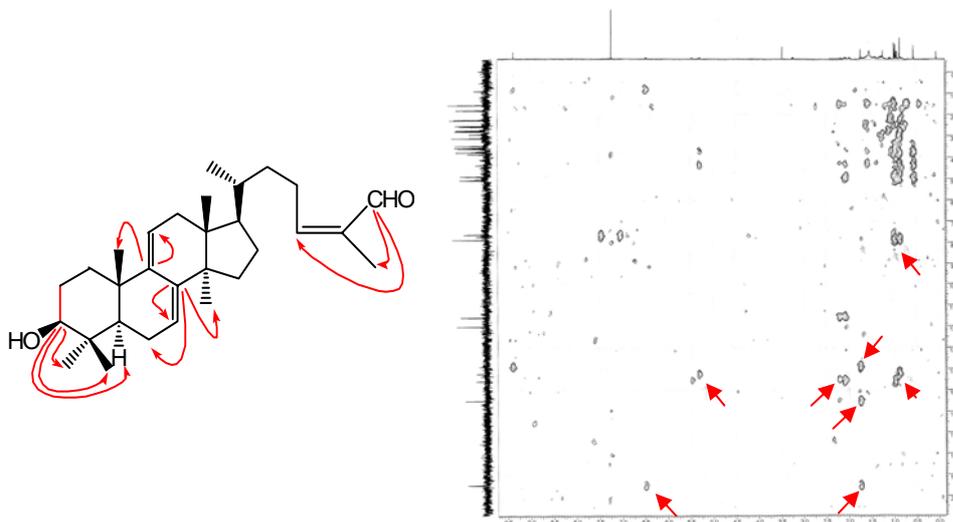
Figura 26. Espectro de  $^1H$  RMN de la sustancia  $C_6$ .

Su espectro de  $^{13}C$  RMN (figura 27) mostró señales para un dieno conjugado a  $\delta$  120.3 (d, C-7), 142.4 (s, C-8), 145.9 (s, C-9) y 116.0 (d, C-11) de acuerdo con la presencia de un dieno  $\Delta^{7,9(11)}$ .



**Figura 27.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la sustancia  $\text{C}_6$ .

Lo anterior fue confirmado con las correlaciones mostradas en el experimento HMBC (figura 28), así se observaron las siguientes correlaciones C-9 con H-11 y  $\text{CH}_3$ -19; C-8 con  $\text{H}_2$ -6, H-7 y  $\text{CH}_3$ -30; C-3 con H-5,  $\text{CH}_3$ -28 y  $\text{CH}_3$ -29; C-26 con H-24 y  $\text{CH}_3$ -27, esta última sugiere que el carbonilo del grupo aldehídico se encuentra en la posición C-26. De lo anterior se deduce que a la nueva sustancia  $\text{C}_6$  le corresponde la estructura de  $3\beta$ -hidroxi- $5\alpha$ -lanosta-7,9(11),24-triene-26-al.



**Figura 28.** Experimento HMBC (de C a H) de la sustancia  $\text{C}_6$ .

### SUSTANCIA C<sub>7</sub>

De la fracción eluida con hexano-AcOEt (7:3) se aisló una sustancia cuyas constantes físicas y espectroscópicas coinciden con las del ganodermadiol **G<sub>7</sub>** aislado por nosotros del *Ganoderma lucidum*.<sup>146</sup>

De las fracciones eluidas con hexano-AcOEt (6:4) de la cromatografía general (ver parte experimental) se obtuvieron las sustancias **C<sub>8</sub>** y **C<sub>9</sub>**.

### SUSTANCIA C<sub>8</sub>

Se obtuvo como un sólido cristalino de p.f. 203-205°C. Esta sustancia da positiva la reacción de Liebermann-Burchard. Su espectro de IR presenta, entre otras, bandas de absorción a  $\nu_{\max}$  3600, 1690 y 1647  $\text{cm}^{-1}$  debida a grupo hidroxilo, a las vibraciones (C=O, -C-O-) de un grupo carboxilo  $\alpha,\beta$ -insaturado y a doble enlace. Su espectro de masas presenta un ion molecular  $m/z$ . 454.3360 correspondiente a una fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$  así como dos fragmentos, uno debido a pérdida de metilo y el otro a la pérdida de agua. El espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 29) confirma lo dicho anteriormente, apareciendo un triplete a campo bajo a  $\delta$  6.88 ppm perteneciente a un protón olefínico sobre C-24 muy similar al que presenta el ácido ganodérico DM **G<sub>9</sub>**.<sup>147</sup> Consultada la bibliografía observamos que la sustancia **C<sub>8</sub>** se correspondía con el ácido ganodérico Y.<sup>148</sup>

---

<sup>146</sup> Ver la presente Tesis Doctoral, págs. 60-61

<sup>147</sup> Ver la presente Tesis Doctoral, págs. 62-64.

<sup>148</sup> Toth, J. O.; Luu, B.; Beck, J. P.; Ourisson, G. "Chemistry and biochemistry of Oriental drugs. Part IX. Cytotoxic triterpenes from *Ganoderma lucidum* (Polyporaceae): structures of ganoderic acids U-Z" *J. Chem. Res. (S)* 12, **1983**, 299.

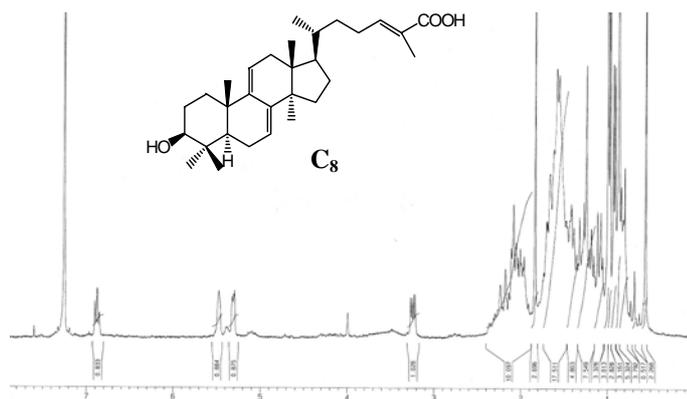


Figura 29. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia  $\text{C}_8$ .

### SUSTANCIA $\text{C}_9$

Producto de p.f. 124-125°C cristalizado de metanol. Su espectro de masas (figura 30a) de alta resolución mostró el ion molecular a  $m/z$  454.3413 (calcd. 454.3446), de acuerdo para un  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$ , además de iones a  $m/z$  436 ( $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ) y 418 ( $\text{M}^+ - 2\text{H}_2\text{O}$ ). El espectro de IR (figura 30b) dio absorciones a  $\nu_{\text{max}}$  3444 y 1703  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a grupo hidroxilo y carbonilo.

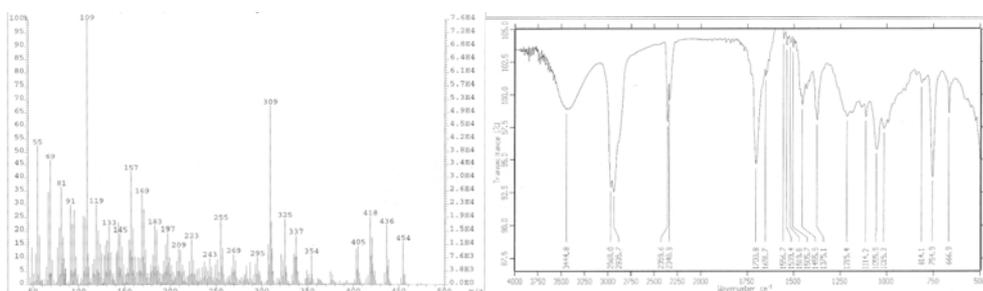
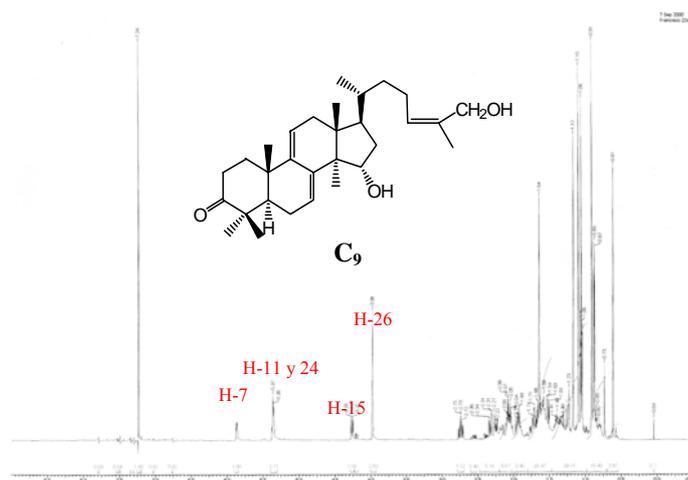


Figura 30. a) Espectro de masas y b) Espectro de IR de la sustancia  $\text{C}_8$ .

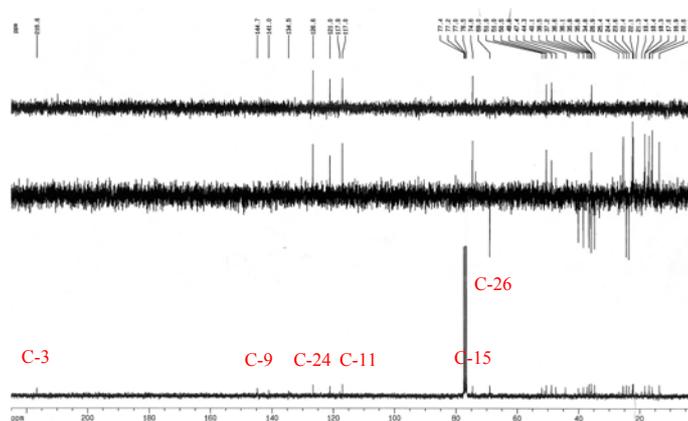
En el espectro  $^1\text{H}$  RMN (figura 31) se observó un doble doblete a  $\delta$  4.28 (1H, dd,  $J = 4.9, 9.2$  Hz) perteneciente a un protón geminal a un hidroxilo, un singlete a  $\delta$  3.98 ppm, que integra para dos protones correspondiente a un hidroximetilo. Los espectros

de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN de las sustancias  $\text{C}_6$  y  $\text{C}_9$  fueron similares sugiriendo que esta última debe tener una estructura de  $5\alpha$ -lanosta-7,9(11),24-trieno.



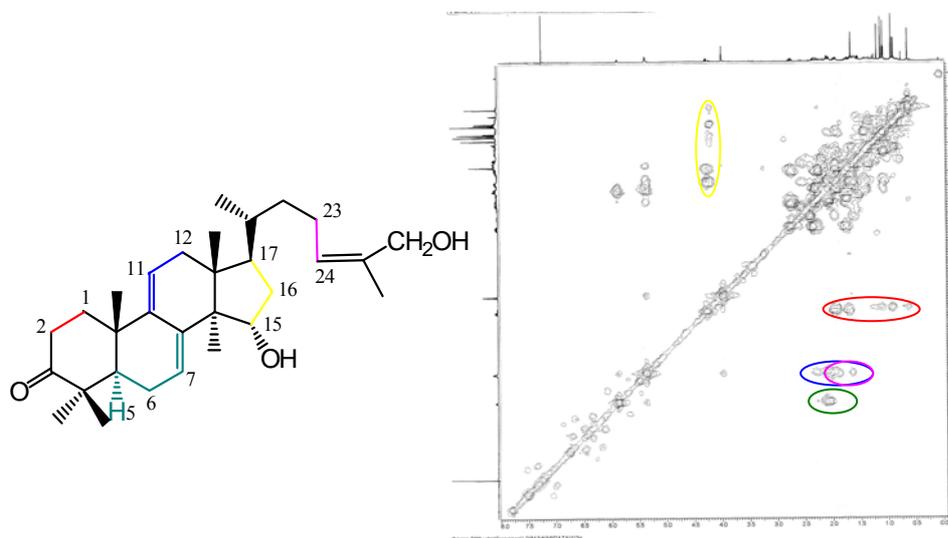
**Figura 31.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia  $\text{C}_9$ .

Sin embargo en su espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (figura 32) la señal del carbono carbonílico fue observada a  $\delta$  216.6 ppm y teniendo en cuenta que el espectro de  $^1\text{H}$  RMN no mostró ninguna señal a  $\delta$  3.23 ppm típicas de un hidroxilo en C-3, esto nos hizo pensar en la existencia de un carbonilo en el mencionado carbono.



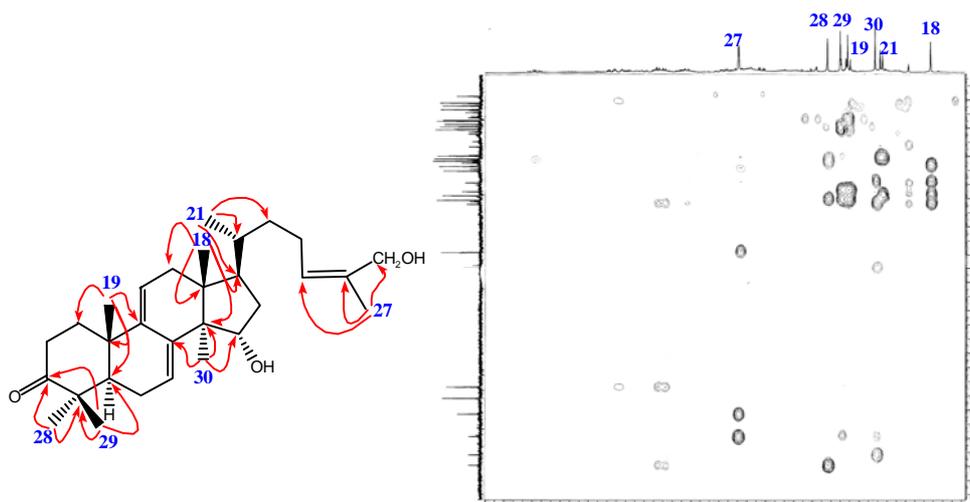
**Figura 32.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la sustancia  $\text{C}_9$ .

La estructura de **C<sub>9</sub>** fue deducida a través de experimentos COSY, HSQC, HMBC y NOESY. Su espectro de COSY (figura 33) revela conectividades entre H<sub>2</sub>-1 y H<sub>2</sub>-2; H-5, H<sub>2</sub>-6 y H-7; H-11 y H<sub>2</sub>-12; H-15, H<sub>2</sub>-16-H-17; y, por último, entre H<sub>2</sub>-23 y H-24.



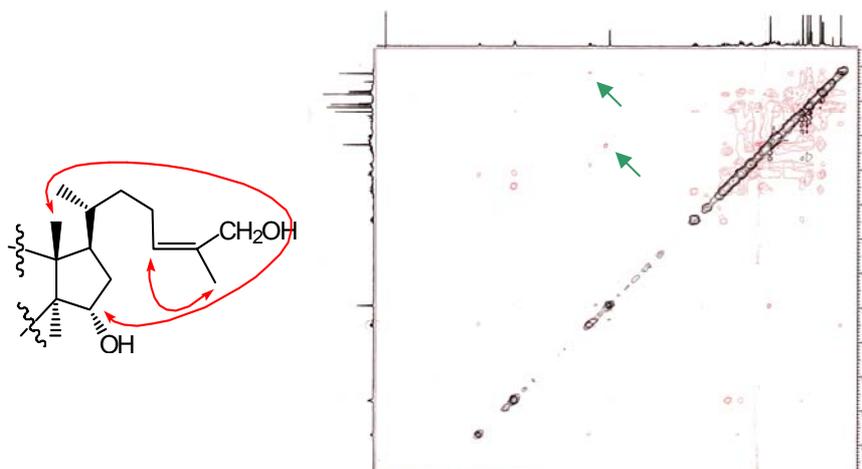
**Figura 33.** Experimento COSY de la sustancia **C<sub>9</sub>**.

Correlaciones HMBC (figura 34) de los protones pertenecientes a los siete metilos nos permite comprobar la posición de los grupos funcionales del triterpeno con esqueleto de lanostano. Así, correlaciones a larga distancia de CH<sub>3</sub>-18 con C-12, C-13, C-14 y C-17; de CH<sub>3</sub>-21 con C-17, C-20 y C-22; de CH<sub>3</sub>-30 con C-8, C-14, C-15; de CH<sub>3</sub>-28 con C-4, C-3, C-5, de C-29; CH<sub>3</sub>-29 con C-3, C-4, C-5, C-28; de CH<sub>3</sub>-19 con C-1, C-5, C-9, C-10; y de CH<sub>3</sub>-27 con C-24, C-25, C-26. Lo anterior pone de manifiesto la posición del hidroxilo secundario en C-15 y la del hidroximetilo en C-26.



**Figura 34.** Ampliación experimento HMBC (de H a C) del sustancia **C<sub>9</sub>**.

Experimento NOESY (figura 35) muestra correlaciones entre CH<sub>3</sub>-27 y H-24 indicando una configuración *E* del doble enlace en Δ<sup>24</sup>. También se observó correlación entre H-15 y CH<sub>3</sub>-18 indicando una α-orientación del hidroxilo en C-15. Lo expuesto anteriormente nos permite formular a la nueva sustancia **C<sub>9</sub>** como 15α,26-dihidroxi-5α-lanosta-7,9(11),24-trien-3-ona.

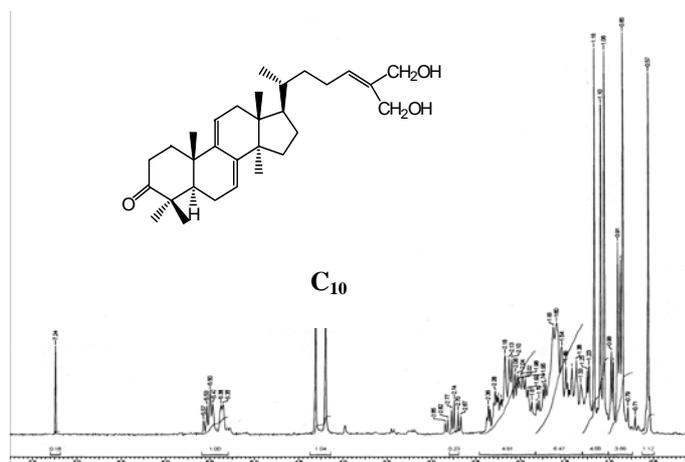


**Figura 35.** Experimento NOESY de la sustancia **C<sub>9</sub>**.

De las fracciones eluidas con n-hexano-AcOEt (1:1) (ver parte experimental) se aislaron seis sustancias **C**<sub>10</sub>-**C**<sub>15</sub> cuyo estudio describimos a continuación:

### SUSTANCIA C<sub>10</sub>

Aislada como un sólido cristalino de p.f. 124-125°C. Su espectro de IR muestra las siguientes bandas de absorción:  $\nu_{\max}$  3442, 1714 y 815  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a grupos hidroxilos, carbonilo y dobles enlaces. En el espectro de masas se observó el ion molecular a  $m/z$  454.3466 concordante con la fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$ . El espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 36) muestra seis metilos, cinco terciarios a  $\delta$  0.58 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 0.87 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -28), 1.08 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -29), 1.12 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -30) y 1.19 ppm (3H, s,  $\text{CH}_3$ -19), y uno secundario a  $\delta$  0.91 ppm (3H, d,  $J = 6.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ -21), pero no aparece metilo sobre doble enlace como en las sustancias anteriores por lo que nos hizo pensar que los metilos situados sobre los carbonos C-26 y C-27 se encuentran hidroxilados, efectivamente aparecen dos singuletes a  $\delta$  4.22 (2H, s,  $\text{H}_2$ -26) y 4.33 ppm (2H, s,  $\text{CH}_3$ -27). Consultada la bibliografía observamos que la sustancia **C**<sub>10</sub> es idéntica a la 26,27-dihidroxi-5 $\alpha$ -lanosta-7,9(11),24-trien-3-ona conocida como ganoderiol F.<sup>149</sup>

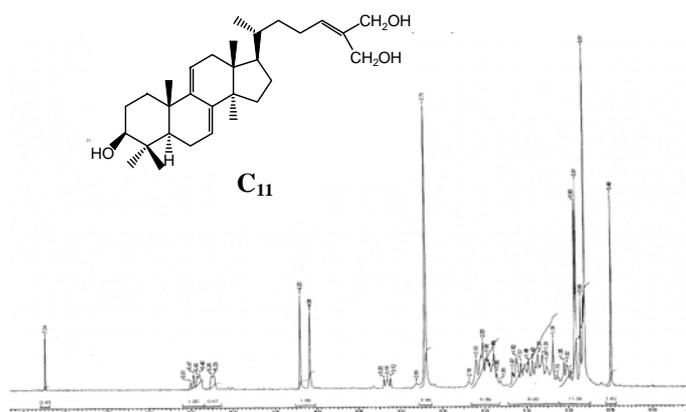


**Figura 36.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia **C**<sub>10</sub>.

<sup>149</sup> Nishitoba, T.; Oda, K.; Sato, H.; Sakamura, S. "Novel triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum*." *Agric. Biol. Chem.* 52, **1988**, 367-372.

**SUSTANCIA C<sub>11</sub>**

Se obtuvo como un sólido blanco que por cristalización de metanol dio cristales en forma de agujas con p.f. 184-186°C. Su espectro de <sup>1</sup>H RMN (figura 37) es análogo al de la sustancia C<sub>10</sub> con la diferencia de que en el C<sub>11</sub> se observa una señal a δ 3.13 ppm correspondiente a un hidrógeno geminal a un hidroxilo en C-3. Sus espectros de masas, IR <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN fueron superponibles con los del 5α-lanosta-7,9(11),24-trien-3β,26,27-triol, conocido en la literatura como ganodermatrionol.<sup>139</sup>

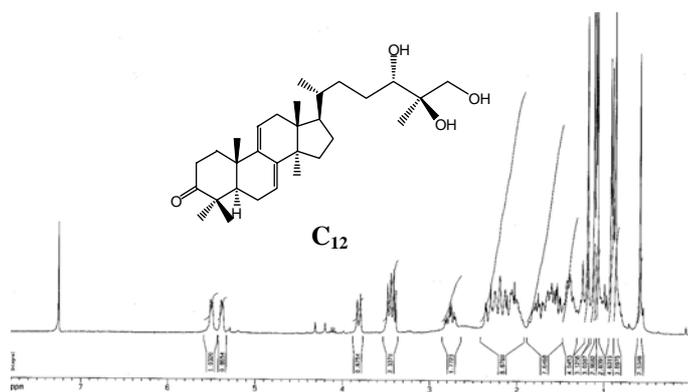


**Figura 37.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la sustancia C<sub>11</sub>.

**SUSTANCIA C<sub>12</sub>**

Este producto cristaliza de metanol dando de p.f. 169-171°C. Da como las anteriores positiva la reacción de Liebermann-Burchard. Su espectro de masas mostró un pico molecular a *m/z* 472 correspondiente a la fórmula empírica C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub> seguido de pérdida de agua. En su espectro de IR aparecen señales en  $\nu_{\max}$  3556, 1710 y 815 cm<sup>-1</sup> características de hidroxilo, cetona y dobles enlaces. Su espectro de <sup>1</sup>H RMN (figura 38) muestra dos dobletes a δ 5.39 (1H, d, J = 5.9 Hz, H-11) y 5.51 ppm (1H, d, J = 6.2 Hz, H-7) que hemos asignado a un sistema diénico Δ<sup>7,9(11)</sup> situado en los anillos B y C de un triterpeno del tipo del lanostano. La diferencia existente con las sustancias anteriores radica en la cadena lateral, al no observarse la señal del protón olefínico en C-24, en cambio si se observó a δ 3.46 ppm un triplete característico de un protón

geminal a un hidroxilo, señal ausente en las sustancias anteriores, lo que nos hizo pensar que en el doble enlace en C-24 de la sustancia **C<sub>12</sub>** se encuentran dos grupos hidroxilos. Efectivamente en el espectro de <sup>13</sup>C RMN se observa a  $\delta$  67.6 y 73.9 ppm la señal de los carbonos que soportan un hidroxilo terciario y uno secundario, respectivamente. Consultada la bibliografía vimos que nuestra sustancia se correspondía con la conocida 24,25,26-trihidroxi-5 $\alpha$ -lanosta-7,9(11)-dien-3-ona denominada ganodermanontriol.<sup>150</sup>

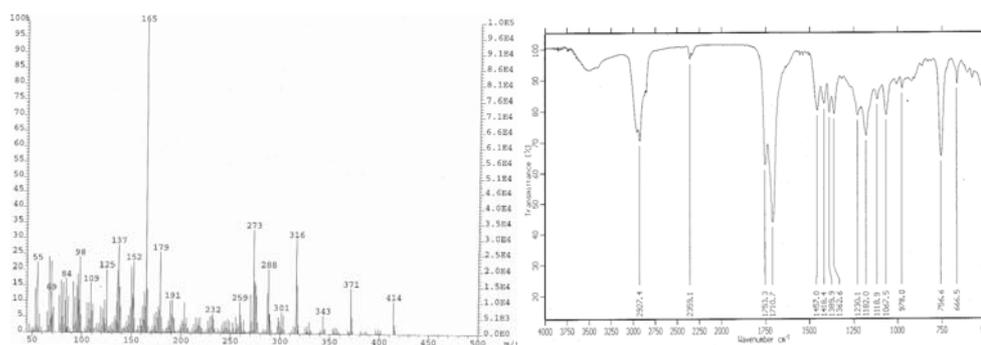


**Figura 38.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la sustancia **C<sub>12</sub>**.

### **SUSTANCIA C<sub>13</sub>**

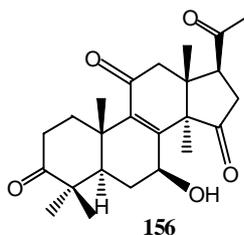
Fue obtenida como un sólido cristalino de p.f. 242-243°C. Su fórmula molecular fue determinada como C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub> por HREIMS (encontrado  $m/z$  414.1964, calculado 414.2042) (figura 39a). En su espectro de IR (figura 39 b) aparece una banda ancha entre  $\nu_{\max}$  1753-1700 cm<sup>-1</sup> característica de varios grupos carbonilos, esto fue confirmado en su espectro de UV al observarse dos máximos de absorción a  $\lambda_{\max}$  289 y 251 nm.

<sup>150</sup> Fujita, A.; Arisawa, M.; Saga, M.; Hayashi, T.; Morita, N. "Two new lanostanoids from *Ganoderma lucidum*" *J. Nat. Prod.* 49, **1986**, 1122-1125.



**Figura 39.** a) Espectro de masas y b) Espectro de IR de la sustancia **C<sub>13</sub>**.

Su espectro  $^1\text{H}$  RMN (figura 40) es semejante al de la lucidona B (**156**),<sup>151</sup> mostrando cinco metilos terciarios a  $\delta$  0.92 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18), 1.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>-22), 1.07 (3H, s, CH<sub>3</sub>-24), 1.26 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19) y 1.43 ppm (3H, s, CH<sub>3</sub>-23) y una metilcetona a  $\delta$  2.17 ppm (3H, s, CH<sub>3</sub>-21), no observándose señales de hidrógenos geminales a grupos hidroxilo ni de dobles enlaces.



El espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (figura 41) también fue similar al de la lucidona B (**156**) observándose diferencias en los desplazamientos químicos de C-7, C-8 y C-9 indicándonos la existencia de un carbonilo en C-7 y un grupo epóxido entre C-8 y C-9. Lo expuesto anteriormente fue confirmado a través de las correlaciones de HMBC (figura 42) observadas entre C-3 con H<sub>2</sub>-1, H<sub>2</sub>-2, CH<sub>3</sub>-22, CH<sub>3</sub>-23; C-7 con H-5 y H<sub>2</sub>-6; C-11 con H<sub>2</sub>-12, C-15 con H<sub>2</sub>-16, H-17, CH<sub>3</sub>-24; y C-20 con H<sub>2</sub>-16 y H-17.

<sup>151</sup> Nishitoba, T.; Sato, H.; Sakamura, S. "New terpenoids from *Ganoderma lucidum* and their bitterness" *Agric. Biol. Chem.* 49, **1985**, 1547-1549.

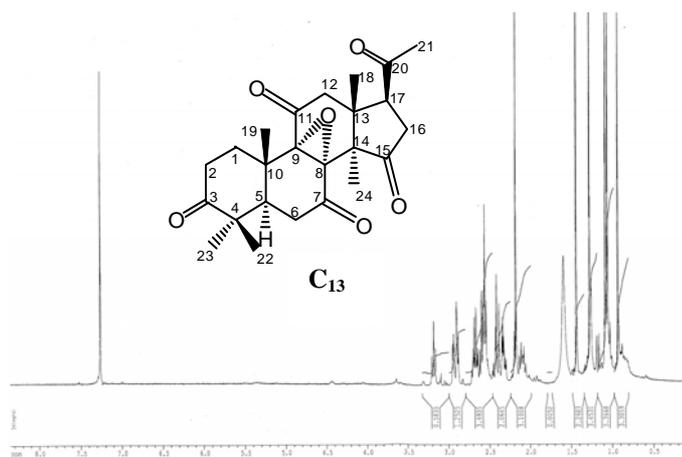


Figura 40. Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la sustancia **C<sub>13</sub>**.

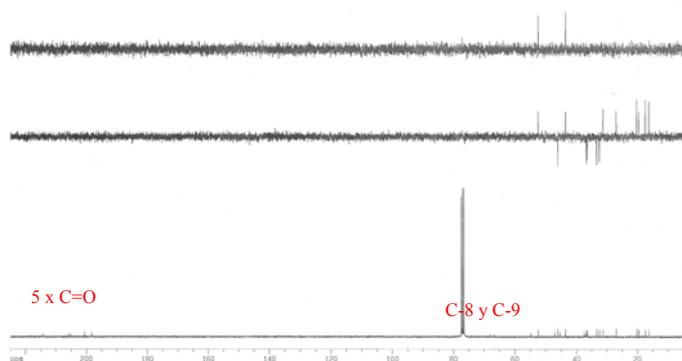


Figura 41. Espectro de <sup>13</sup>C RMN de la sustancia **C<sub>13</sub>**.

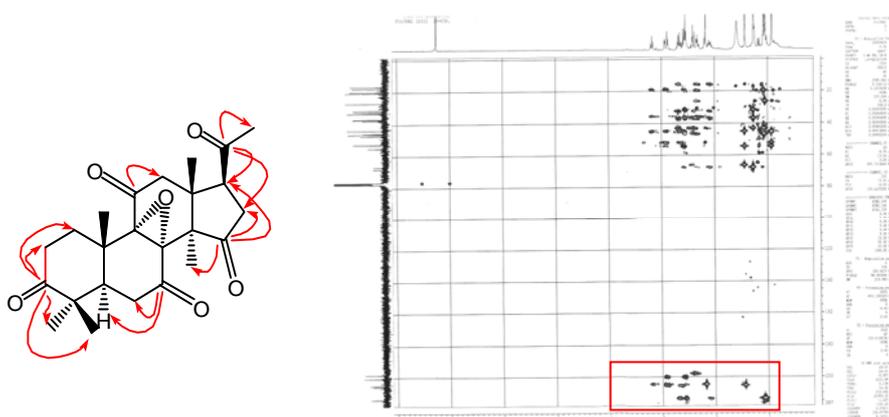
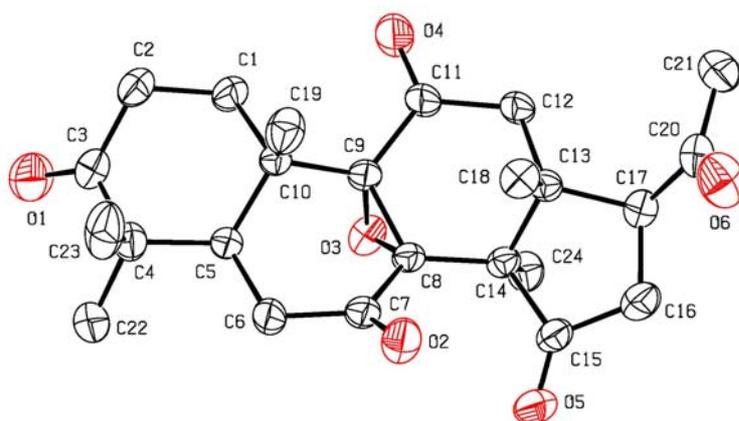


Figura 42. Experimento HMBC (de C a H) de la sustancia **C<sub>13</sub>**.

A esta nueva sustancia le hemos asignado la estructura 8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -epoxi-4,4,14 $\alpha$ -trimetil-5 $\alpha$ -pregnano-3,7,11,15,20-pentanona. La configuración de dicha sustancia, con la orientación en la cara  $\alpha$  del sistema de anillos B y C fue establecida por difracción de rayos X. Los cristales son triclinicos con  $a = 6.8691(7) \text{ \AA}$ ,  $b = 8.4093(10) \text{ \AA}$ ,  $c = 9.6369(10) \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 76.650(9)^\circ$ ,  $\beta = 78.793(9)^\circ$ ,  $\gamma = 74.977(9)^\circ$ . La unidad asimétrica contenía una molécula de composición  $C_{24}H_{30}O_6$ . Las máximas difracciones fueron recolectadas con  $2\theta < 60^\circ$ , utilizando  $\omega$ -scans. En total, 3009 reflexiones únicas fueron recogidas, y 2328 (77.4 %) fueron juzgadas observadas [ $I > 2\sigma(I)$ ] y usadas en los cálculos. La estructura fue resuelta utilizando métodos directos y refinados full-matrix least-squares sobre  $F^2$  a un índice de discrepancia final de 0.048 ( $wR_2=0.1390$ ) para los datos observados. Un esquema de la molécula con los átomos numerados se muestra en la figura 43.



**Figura 43.** Difracción de rayos X (ORTEP) de la sustancia  $C_{13}$ .

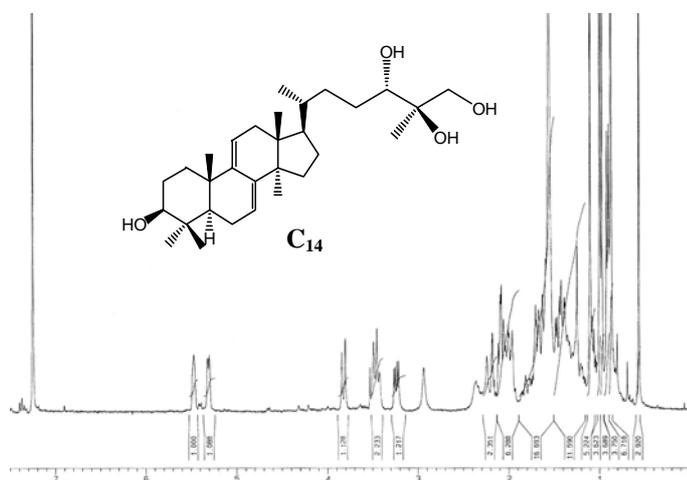
El desplazamiento elipsoide para átomos distintos de H es dibujado en un nivel de probabilidad del 50 %. El núcleo de la molécula presenta tres anillos de seis miembros

y uno de cinco, además de un grupo de epoxi en la configuración  $\alpha$ . La estructura cristalina es estabilizada por C-H O=C puentes de hidrógeno. Siendo imposible establecer la estereoquímica absoluta de la molécula.

Como podemos observar la formación de este nuevo producto implica la degradación de la cadena lateral del lanosterol.

### SUSTANCIA C<sub>14</sub>

Esta sustancia cristaliza de metanol dando un p.f. 232-233°C, da positiva la reacción de Liebermann-Burchard. Su fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>4</sub> fue confirmada por espectrometría de masas. La sustancia presenta en su espectro de IR señales a  $\nu_{\max}$  3350, 1010 y 815 cm<sup>-1</sup> que las hemos asignado a hidroxilo y dobles enlaces. Su espectro de UV presenta tres máximos de absorción a  $\lambda_{\max}$  237, 244 y 253 nm. Su espectro de <sup>1</sup>H RMN (figura 44), recuerda en parte a la sustancia C<sub>12</sub>, en ella aparecen las mismas señales más un doble doblete a  $\delta$  3.24 ppm (1H, dd, J = 4.8 y 10.8 Hz, H-3), correspondiente a un hidrógeno geminal en C-3. Esta sustancia resultó ser idéntica a 5 $\alpha$ -lanosta-7,9(11)-dien-3 $\beta$ ,24,25,26-tetraol, conocida como ganoderiol A.<sup>152</sup>

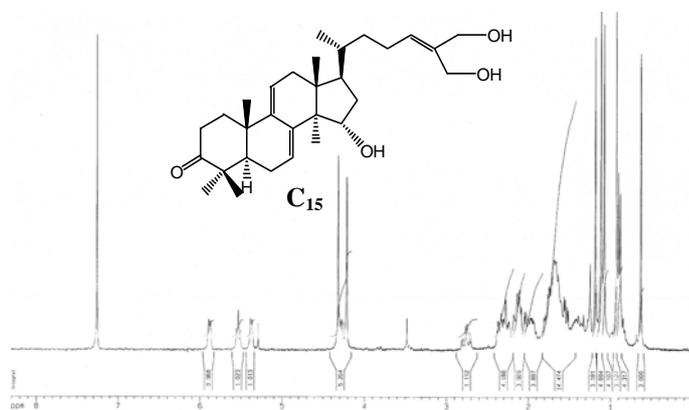


**Figura 44.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la sustancia C<sub>14</sub>.

<sup>152</sup> Sato, H.; Nishitoba, T.; Shirasu, S.; Oda, K.; Sakamura, S. "Ganoderiol A y B, New triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum* (Reishi)" *Agric. Biol. Chem.* 50, **1986**, 2887-2890.

**SUSTANCIA C<sub>15</sub>**

Esta sustancia después de purificada fue obtenida como un sólido amorfo de  $[\alpha]_D^{+24}$  (0.001, CHCl<sub>3</sub>), la cual daba positiva la reacción de Liebermann-Burchard para triterpenos. Su espectro de IR exhibe fuertes bandas a  $\nu_{\max}$  3556 cm<sup>-1</sup> (vibración de tensión del grupo OH), 1710 cm<sup>-1</sup> (vibración de tensión del grupo C=O) y 845 cm<sup>-1</sup> (vibración de tensión del doble enlace). Su espectro de UV muestra una absorción fuerte a  $\lambda_{\max}$  252 nm característica de dieno. En su espectro de <sup>1</sup>H RMN (figura 45) aparecen las siguientes señales: dos singuletes atribuidos a dos hidroxilos primarios a  $\delta$  4.23 (2H, s, H<sub>2</sub>-26) y 4.33 ppm (2H, s, H<sub>2</sub>-27), un doblete a  $\delta$  5.38 (1H, d, J = 6.6 Hz, H-11), un multiplete a  $\delta$  5.88 (1H, m, H-7) y un triplete a  $\delta$  5.54 (1H, t, J = 7.3 Hz, H-24) fueron asignados a tres protones olefínicos, dos de ellos pertenecientes a un sistema diénico y el otro aislado y situado en la cadena lateral. En el espectro de <sup>13</sup>C RMN se observa una señal a  $\delta$  215.2 ppm correspondiente a un grupo carbonilo en C-3 y de igual forma se observan una señal a  $\delta$  73.7 ppm correspondiente al carbono portador de un hidroxilo en C-15. Consultada la bibliografía química vimos que nuestra sustancia es idéntica al 15 $\alpha$ ,26,27-trihidroxi-5 $\alpha$ -lanosta-7,9(11),24-trien-3-ona conocida como ganoderiol B.<sup>152</sup>



**Figura 45.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la sustancia C<sub>15</sub>.

***PARTE EXPERIMENTAL***

El hongo *Ganoderma concinna* Ryv. Nov. Sp, fue recolectado en la región del Alto Sinú del Departamento de Córdoba, Colombia, el cual fue identificado por el profesor Jaime Uribe del Instituto de Ciencias Naturales de Universidad Nacional de Colombia, un ejemplar se encuentra en el Herbario Nacional Colombiano con el No. COL 343842.

El total del hongo, se dividió en fragmentos pequeños, que se secaron en estufa a 40°C durante 48 horas. Una vez seco, se redujo a polvo fino, el material se sometió a extracción (170 g) con EtOH del 96% durante 8 días en la oscuridad y se concentró a vacío. Se obtuvo un extracto etanólico bruto (6,3 g), que se sometió a reparto con H<sub>2</sub>O:AcOEt (1:1). Tras separar la fase orgánica, y concentrar a vacío se obtuvieron 4.5 g. Este residuo fue cromatografiado sobre una columna de gel de sílice y eluida con mezclas de n-hexano-acetato de etilo de polaridad creciente. Se tomaron fracciones de 200 ml, y se analizaron por cromatografía en capa fina para luego reagruparlas en fracciones, como se indica en la tabla 2.

Así, la fracción A, eluida con n-hexano-AcOEt (9:1) se recromatografió a través de una columna de gel de sílice eluyendo con n-hexano e incrementando la polaridad hasta el 20% de AcOEt, obteniéndose C<sub>1</sub> y una mezcla de sustancias que por posterior separación en CC con Sephadex LH-20 como fase estacionaria y eluida con n-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol (1:1:1) se pudo separar las sustancias C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>.

La fracción B (n-hexano-AcOEt, 4:1) se recromatografía en CC de gel de sílice eluyendo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y gradiente de polaridad con metanol hasta (50:1) del cual se separa la sustancia pura C<sub>4</sub> y una mezcla que por posterior cromatografía en TLC preparativa en tolueno-acetona (9:1) y Sephadex LH-20 (n-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol, 3:3:1) se consiguió purificar las sustancias C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>.

En la fracción C (150 mg) se pudo observar a través de cromatografía en placa fina que estaba formada mayoritariamente por una sustancia con pequeñas impurezas, obteniéndose posteriormente por CC de gel de sílice eluida con CHCl<sub>3</sub> la sustancia C<sub>7</sub> pura.

La fracción D (190 mg) obtenida de la cromatografía general con n-hexano-AcOEt (6:4), se recromatografió a través de una columna de Sephadex LH-20 eluyendo con n-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol (2:2:1) y posterior cromatografía en TLC preparativa eluyendo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona (9:1) con dos recorridos, de esta forma se pudo obtener en estado puro las sustancias **C<sub>8</sub>** y **C<sub>9</sub>**.

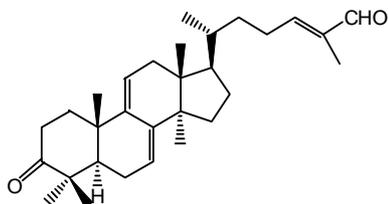
Por último la fracción E (800 mg) se recromatografió en CC en gel de sílice eluyendo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y luego con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol en polaridad creciente hasta la relación de (10:1), se recogieron cuatro subfracciones a las que hemos denominado para su estudio E-1 a E-4. La subfracción E-1 (230 mg) después de CC en Sephadex LH-20 eluyendo con n-hexano-diclorometano-metanol (2:2:1) y posterior TLC preparativa eluida con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona (8:2) y TLC CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (20:1) tres recorridos se separan las sustancias **C<sub>10</sub>** y **C<sub>11</sub>**. La subfracción E-2 (150 mg) que tras purificación en TLC preparativa usando como fase móvil CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona (8:2) se obtuvo la sustancia **C<sub>12</sub>**. La subfracción E-3 (100 mg) se sometió a CC eluyendo de manera isocrática con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol (20:1) y posterior cristalización de metanol se obtuvo la sustancia **C<sub>13</sub>** y finalmente la fracción E-4 (90 mg) se recromatografió en CC en gel de sílice eluida con AcOEt y posterior TLC preparativa eluida con éter de petróleo-AcOEt (1:1) tres recorridos se separan puras las sustancias **C<sub>14</sub>** y **C<sub>15</sub>**.

**Tabla 2.** Sustancias aisladas de *G. concinna* por orden de elución.

| Fracción | Peso   | Eluyentes             | Sustancias  |
|----------|--------|-----------------------|---|
| A        | 420 mg | n-hexano: AcOEt (9:1) | Ergosta 7,22-dien-3-ona, <b>C<sub>1</sub></b> ; ganoderal A, <b>C<sub>2</sub></b> ; Peróxido de ergosterol, <b>C<sub>3</sub></b> .  |
| B        | 200 mg | n-hexano: AcOEt (4:1) | Ergosta-7,22-dien-3β-ol, <b>C<sub>4</sub></b> ; Ganodermenonol <b>C<sub>5</sub></b> 3β-hidroxi-5α-lanosta-7,9(11),24-trien-26-al, <b>C<sub>6</sub></b>  |
| C        | 150 mg | n-hexano: AcOEt (7:3) | Ganodermadiol, <b>C<sub>7</sub></b> .   |
| D        | 190 mg | n-hexano: AcOEt (6:4) | ácido ganoderico Y, <b>C<sub>8</sub></b> ; 15α,26-dihidroxi-5α-lanosta-7,9(11),24-trien-3-ona, <b>C<sub>9</sub></b>   |
| E        | 800 mg | n-hexano: AcOEt (1:1) | Ganoderiol F, <b>C<sub>10</sub></b> ; ganodermatriol, <b>C<sub>11</sub></b> ; ganodermanontriol, <b>C<sub>12</sub></b> ; 8α,9α-epoxi-4,4,14α-trimetil-5α-pregnano-3,7,11,15,20-pentanona, <b>C<sub>13</sub></b> ; ganoderiol A, <b>C<sub>14</sub></b> ; ganoderiol B, <b>C<sub>15</sub></b> . |

**Sustancia C<sub>1</sub>:** Sólido cristalino, 100 mg, constantes físicas y espectroscópicas idénticas a la sustancia **G<sub>4</sub>** (ver página 72).

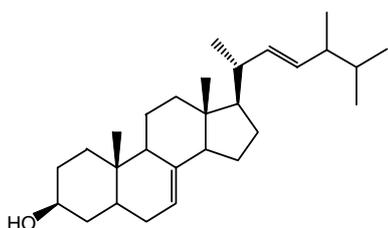
**Sustancia C<sub>2</sub>:** 3-Oxo-5 $\alpha$ -lanosta-7,9(11),24-trien-26-al (ganoderal A)



Sólido cristalino 6 mg; p.f.: 127-128 °C;  $[\alpha]_D$ : +27 (*c* 0.21, CHCl<sub>3</sub>); UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 235 (4.17) nm; IR  $\nu_{max}$  (film, KBr): 2952, 2927, 2881, 1714, 1660, 1430, 1110, 1070, 1010, 815 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 436.3366 [M]<sup>+</sup> (C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>, calcd 436.3341) (83), 421 (20), 400 (34), 398 (29), 309 (100), 271 (67), 269 (37), 255 (66), 231 (20), 213 (24), 199 (18), 185 (17), 171 (28), 157 (27), 147 (42), 145 (42), 133(42), 131 (39), 119 (46), 107 (57), 105 (56), 95 (45), 81 (70), 69 (78), 55 (98); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.60 (3H, s, Me-18), 0.89 (3H, s, Me-28), 0.96 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, Me-21), 1.09 (3H, s, Me-29), 1.13 (3H, s, Me-19), 1.21 (3H, s, Me-30), 1.76 (3H, s, Me-27), 5.40 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-11), 5.52 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-7), 6.50 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-24), 9.40 (1H, s, H-26); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 9.05 (C-27), 15.61 (C-18), 18.19 (C-21), 21.95 (C-30), 22.34 (C-19), 23.57 (C-6), 25.26 (C-28), 25.30 (C-29), 25.94 (C-23), 27.83 (C-15), 31.35 (C-16), 34.61 (C-22), 34.72 (C-2), 36.05 (C-20), 36.52 (C-1), 37.11 (C-10), 37.30 (C-12), 43.73 (C-13), 47.43 (C-4), 50.62 (C-5 y C-14), 50.75 (C-17), 117.03 (C-11), 119.97 (C-7), 139.20 (C-25), 142.62 (C-8), 144.48 (C-9), 155.19 (C-24), 195.20 (C-26), 216.70 (C-3).

**Sustancia C<sub>3</sub>:** Sólido cristalino, 150 mg, constantes físicas y espectroscópicas idénticas a la sustancia **G<sub>5</sub>** (ver página 74).

**Sustancia C<sub>4</sub>:** Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol.

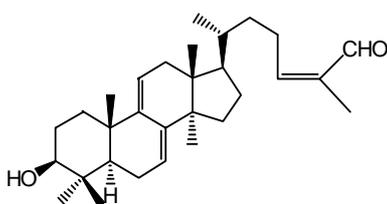


Sólido cristalino 130 mg; p.f.: 171-172°C;  $[\alpha]_D$ : -22 (*c* 0.8, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{max}$  (film, KBr): 3300, 2950, 2875, 1450, 1370, 1020, 930 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 398.3552 [M]<sup>+</sup> (C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O, calcd 398.3549) (35), 383 (5), 380 (12), 273 (30), 271 (45); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.55 (3H, s, Me-18), 0.80 (3H, s, Me-19), 0.82 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, Me-27), 0.84 (3H, d, *J* = 5.7 Hz, Me-26), 0.91 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, Me-28), 1.02 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, Me-21), 3.60 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 5.15 (1H, m, H-7), 5.19 (2H, m, H-22 y H-23); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 12.18 (C-18), 13.12 (C-19), 17.70 (C-28), 19.76 (C-26), 20.00 (C-27), 21.10 (C-21), 21.67 (C-11), 23.02 (C-15), 28.20 (C-16), 29.83 (C-6), 31.68 (C-2), 33.21 (C-25), 34.34 (C-10), 37.38 (C-1), 38.12 (C-4), 39.64 (C-12), 40.45 (C-5), 40.64 (C-20), 42.98 (C-24), 43.42 (C-13), 49.69 (C-9), 55.20

(C-14), 56.15 (C-17), 71.21 (C-3), 117.69 (C-7), 132.06 (C-23), 135.85 (C-22), 139.75 (C-8).

**Sustancia C<sub>5</sub>:** Sólido cristalino, 30 mg, constantes físicas y espectroscópicas idénticas a la sustancia **G<sub>8</sub>** (ver página 75).

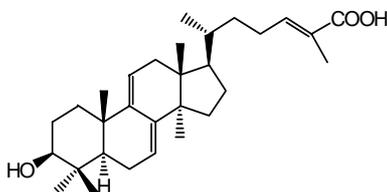
**Sustancia C<sub>6</sub>:** 3β-Hidroxi-5α-lanosta-7,9(11),24-trien-26-al



Sólido cristalino 5 mg; p.f.: 70-71 °C;  $[\alpha]_D$ : +21 (*c* 0.15, CHCl<sub>3</sub>); UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 235 (3.3), 243 (3.8), 252 (3.5) nm; IR  $\nu_{max}$  (film, KBr): 3406 (OH), 2927, 1688, 1455, 1373, 1188, 1076, 1036, 816 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 438.3426 [M]<sup>+</sup> (C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>, calcd 438.3497) (28), 420 (42), 405 (71), 377 (47), 351 (8), 311 (24), 293 (20), 253 (20), 171 (20), 157 (27), 149 (80), 57 (100); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, una gota de CD<sub>3</sub>OD): 0.55 (3H, s, Me-18), 0.86 (6H, s, Me-30 y Me-28), 0.93 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me-21), 0.96 (3H, s, Me-19), 0.98 (3H, s, Me-29), 1.07 (1H, dd, J = 11.4, 4.8 Hz, H-5 $\alpha$ ), 1.20 (2H, m, 2H-22), 1.38 (2H, m, 2H-15), 1.41 (1H, m, H-1 $\alpha$ ), 1.42 (1H, m, H-20), 1.57 (1H, m, H-17 $\alpha$ ), 1.62 (1H, m, H-16  $\beta$ ), 1.73 (3H, s, Me-27), 1.97 (1H, dt, J = 13.2, 3.6 Hz, H-1 $\beta$ ), 1.98 (1H, m, H-2 $\alpha$ ), 1.69 (1H, m, H-2  $\beta$ ), 1.91 (1H, m, H-16 $\alpha$ ), 2.06 (2H, m, 2H-6), 2.08 (1H, m, H-12  $\beta$ ), 2.18 (1H, m, H-12 $\alpha$ ), 2.26 (1H, m, H<sub>a</sub>-23), 2.37 (1H, m, H<sub>b</sub>-23), 3.23 (1H, dd, J = 11.3, 4.2 Hz, H-3 $\alpha$ ), 5.30 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-11), 5.46 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-7), 6.47 (1H, t, J = 7.2 Hz, H-24), 9.39 (1H, s, H-26); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, una gota de CD<sub>3</sub>OD): 9.05 (C-27), 15.31 (C-30), 15.66 (C-18), 18.18 (C-21), 22.62 (C-19), 22.89 (C-6), 25.44 (C-28), 25.92 (C-23), 27.84 (C-2), 27.69 (C-16), 28.01 (C-29), 31.36 (C-15), 34.61 (C-22), 35.58 (C-1), 36.04 (C-20), 37.25 (C-10), 37.69 (C-12), 38.59 (C-4), 43.71 (C-13), 48.98 (C-5), 50.19 (C-14), 50.72 (C-17), 78.83 (C-3), 116.01 (C-11), 120.30 (C-7), 139.10 (C-25), 142.39 (C-8), 145.86 (C-9), 155.35 (C-24), 195.29 (C-26).

**Sustancia C<sub>7</sub>:** Sólido cristalino, 30 mg, constantes físicas y espectroscópicas idénticas a la sustancia **G<sub>7</sub>** (ver página 75).

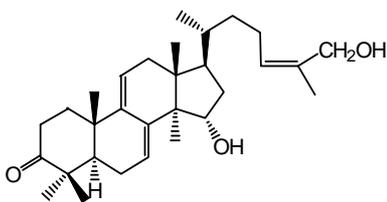
**Sustancia C<sub>8</sub>:** Ácido 3-hidroxi-5α-lanosta-7,9(11),24-trien-26-oico (ácido ganodérico Y)



Sólido cristalino 4 mg; p.f.: 203-205 °C;  $[\alpha]_D$ : +54 (*c* 0.8, Etanol); UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 235 (4.17), 253 (3.20) nm; IR  $\nu_{max}$  (film, KBr): 3600 (OH), 3440, 2952, 1690, 1647 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 454.3360 [M]<sup>+</sup> (C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>3</sub>, calcd 454.3447) (100), 439 (30), 421 (34), 185 (27), 171 (24), 157 (27), 147 (42), 145 (42), 133(44), 131 (39), 119 (46), 107 (57), 105 (56), 95 (45), 81 (72), 69 (78), 55

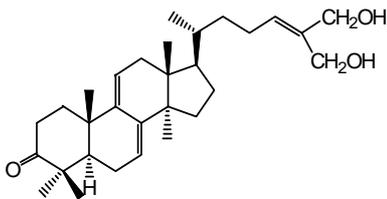
(99);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.57 (3H, s, Me-18), 0.88 (3H, s, Me-28), 0.88 (3H, s, Me-30), 0.93 (3H, d,  $J = 6.3$  Hz, Me-21), 0.98 (3H, s, Me-19), 1.00 (3H, s, Me-29), 1.84 (3H, s, Me-27), 3.24 (1H, dd,  $J = 4.9, 10.8$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 5.30 (1H, d,  $J = 5.14$  Hz, H-11), 5.47 (1H, s br, H-7), 6.88 (1H, t,  $J = 7.95$  Hz, H-24).

**Sustancia C<sub>9</sub>:** 15 $\alpha$ ,26-Dihidroxi-5 $\alpha$ -lanosta-7,9(11),24-trien-3-ona



Sólido cristalino 5 mg; p.f.: 124-125 °C;  $[\alpha]_D$ : +73 ( $c$  0.20,  $\text{CHCl}_3$ ); UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) ( $\log \epsilon$ ): 236 (3.9), 244 (3.9), 252 (3.8) nm; IR  $\nu_{\text{max}}$  (film, KBr): 3444 (OH), 2968, 2935, 1703, 1455, 1375, 12151, 1055, 816  $\text{cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 454.3413  $[\text{M}]^+$  ( $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$ , calcd 454.3446) (16), 436 (22), 418 (25), 354 (11), 337 (18), 325 (25), 309 (67), 255 (23), 223 (17), 209 (13), 197 (19), 185 (20), 171 (28), 157 (42), 147 (14), 109 (100), 57 (10);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.61 (3H, s, Me-18), 0.90 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, Me-21), 0.91 (3H, s, Me-28), 1.06 (3H, s, Me-29), 1.10 (3H, s, Me-30), 1.17 (3H, s, Me-19), 1.33 (1H, m, H-1 $\alpha$ ), 1.40 (1H, m, H-20), 1.52 (1H, dd,  $J = 12.6, 4.6$  Hz, H-5 $\alpha$ ), 1.64 (3H, s, Me-27), 1.68 (1H, m, H-17 $\alpha$ ), 1.71 (1H, m, H-16  $\beta$ ), 1.75 (2H, m, 2H-22), 1.92 (2H, m, 2H-23), 1.93 (1H, m, H-16 $\alpha$ ), 2.09 (2H, m, 2H-6), 2.24 (1H, m, H-12 $\alpha$ ), 2.25 (2H, m, H-1 $\beta$  y H-12  $\beta$ ), 2.33 (1H, m, H-2 $\alpha$ ), 2.74 (1H, dt,  $J = 14.3, 5.5$  Hz, H-2  $\beta$ ), 3.98 (2H, s, H-26), 4.28 (1H, dd,  $J = 4.9, 9.2$  Hz, H-15 $\beta$ ), 5.37 (1H, t,  $J = 6.7$  Hz, H-24), 5.38 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-11), 5.89 (1H, d,  $J = 6.1$  Hz, H-7);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 13.54 (C-27), 15.87 (C-18), 16.89 (C-28), 18.34 (C-21), 22.13 (C-19 y 30), 23.57 (C-6), 25.40 (C-23 y C-29), 34.78 (C-2), 35.78 (C-1), 35.83 (C-20), 36.59 (C-22), 37.24 (C-10), 38.48 (C-12), 40.08 (C-16), 44.30 (C-13), 47.32 (C-4), 48.84 (C-17), 50.41 (C-5), 51.92 (C-14), 68.98 (C-26), 74.60 (C-15), 117.00 (C-11), 121.03 (C-7), 126.60 (C-24), 134.56 (C-25), 142.02 (C-8), 144.69 (C-9), 216.58 (C-3).

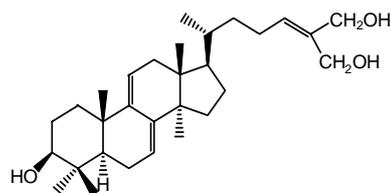
**Sustancia C<sub>10</sub>:** 26,27-Dihidroxi-5 $\alpha$ -lanosta-7,9(11),24-trien-3-ona (ganoderiol F)



Sólido cristalino 7 mg; p.f.: 124-125 °C;  $[\alpha]_D$ : +27 ( $c$  0.20,  $\text{CHCl}_3$ ); UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) ( $\log \epsilon$ ): 235 (4.17), 252 (3.8) nm; IR  $\nu_{\text{max}}$  (film, KBr): 3442, 2952, 2927, 2881, 1714, 1530, 1430, 1110, 1070, 1010, 815  $\text{cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 454.3466  $[\text{M}]^+$  ( $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$ , calcd 454.3446) (2), 436 (33), 421 (13), 439 (14), 310 (27), 309 (100), 295 (10), 269 (31), 257 (10), 255 (10), 229 (7), 211 (10), 199 (12), 185 (15), 173 (13), 171 (22), 159 (20), 157 (27), 147 (13), 145 (22), 133(22), 131 (16), 123 (16), 119 (26), 109 (31), 107 (27), 105 (25), 95 (30), 81 (36), 69 (44), 55 (62);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.58 (3H, s, Me-18), 0.87 (3H, s, Me-28), 0.91 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz, Me-21), 1.08 (3H, s, Me-29), 1.12 (3H, s, Me-30), 1.19 (3H, s, Me-19), 4.22 (2H, s, 2H-26), 4.33 (2H, s, 2H-27), 5.38 (1H, d,  $J = 5.3$  Hz, H-11), 5.50 (1H, d,  $J = 4.16$  Hz,

H-7), 5.55 (1H, t,  $J = 5.7$  Hz, H-24);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 15.7 (C-18), 18.3 (C-21), 22.0 (C-19), 22.4 (C-30), 23.6 (C-6), 24.3 (C-23), 25.4 (C-28), 25.5 (C-29), 27.9 (C-16), 31.4 (C-15), 34.9 (C-2), 36.0 (C-22), 36.1 (C-20), 36.6 (C-1), 37.2 (C-10), 37.8 (C-12), 43.8 (C-13), 47.4 (C-4), 50.3 (C-14), 50.7 (C-5), 50.8 (C-17), 60.1 (C-26), 67.7 (C-27), 117.2 (C-11), 119.9 (C-7), 131.7 (C-24), 136.8 (C-25), 142.8 (C-8), 144.5 (C-9), 216.7 (C-3).

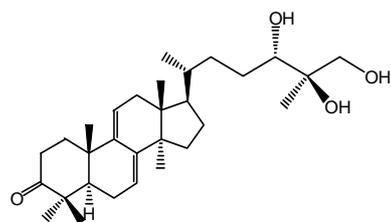
**Sustancia C<sub>11</sub>:** 5 $\alpha$ -Lanosta-7,9(11),24-trien-3 $\beta$ ,26,27-triol (ganoderatriol)



Sólido cristalino 9 mg; p.f.: 184-186 °C;  $[\alpha]_D$ : +10 ( $c$  0.04, Etanol); UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) ( $\log \epsilon$ ): 235 (4.17), 244 (3.7), 252 (3.8) nm; IR  $\nu_{\text{max}}$  (film, KBr): 3556 (OH), 2952, 2927, 1430, 1110, 1070, 1010, 815  $\text{cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 456.3812  $[\text{M}]^+$  ( $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_2$ ) (3), 436 (4), 420 (7), 405 (10), 392 (6), 376 (13), 311 (13), 309 (11), 251 (18), 249 (13), 235 (10), 211 (10),

209 (12), 195 (12), 185 (10), 171 (13), 157 (17), 149 (26), 145 (18), 133(17), 131 (17), 119 (23), 107 (32), 105 (30), 99 (12), 97 (32), 95 (47), 81 (57), 69 (95), 55 (100);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.49 (3H, s, Me-18), 0.81 (3H, s, Me-30), 0.81 (3H, s, Me-29), 0.85 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz, Me-21), 0.91 (3H, s, Me-28), 0.93 (3H, s, Me-19), 3.13 (1H, dd,  $J = 1.0, 11.0$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 4.04 (2H, s, H-26), 4.15 (2H, s, 2H-27), 5.21 (1H, d,  $J = 5.0$  Hz, H-11), 5.38 (1H, d,  $J = 5.5$  Hz, H-7), 5.44 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-24);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 16.0 (C-29), 16.6 (C-18), 18.6 (C-21), 23.0 (C-19), 23.6 (C-6), 24.7 (C-23), 25.9 (C-30), 28.1 (C-15), 28.9 (C-2 y C-28), 31.9 (C-16), 36.4 (C-1 y C-20), 36.9 (C-22), 37.9 (C-10), 38.1 (C-12), 39.4 (C-4), 44.1 (C-13), 49.8 (C-5), 50.7 (C-14), 51.2 (C-17), 58.5 (C-27), 65.2 (C-26), 78.1 (C-3), 116.5 (C-11), 121.0 (C-7), 127.7 (C-24), 140.8 (C-25), 143.0 (C-8), 146.0 (C-9).

**Sustancia C<sub>12</sub>:** 24,25,26-Trihidroxi-5 $\alpha$ -lanosta-7,9(11)-dien-3-ona (ganodermanontriol)

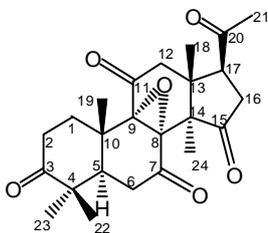


Sólido cristalino 15 mg; p.f.: 169-171 °C;  $[\alpha]_D$ : +41 ( $c$  0.2, Etanol); UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) ( $\log \epsilon$ ): 252 (3.4) nm; IR  $\nu_{\text{max}}$  (film, KBr): 3556 (OH), 2952, 2927, 1710, 1430, 1110, 1070, 1010, 815  $\text{cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 472  $[\text{M}]^+$  ( $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$ ) (3), 454 (17), 396 (46), 309 (78), 271 (18), 269 (96), 133(12), 131 (13), 105 (14), 99 (12), 97 (31), 95 (42), 81 (57), 69

(45), 55 (56), 43 (100);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.60 (3H, s, Me-18), 0.88 (3H, s, Me-30), 0.92 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, Me-21), 1.09 (3H, s, Me-29), 1.11 (3H, s, Me-27), 1.13 (3H, s, Me-28), 1.20 (3H, s, Me-19), 3.46 (1H, t,  $J = 11.0$  Hz, H-24), 3.48 (1H, d,  $J = 11.2$  Hz, H<sub>a</sub>-26), 3.83 (1H, d,  $J = 11.2$  Hz, H<sub>b</sub>-26), 5.39 (1H, d,  $J = 5.9$  Hz, H-11), 5.51 (1H, d,  $J = 6.2$  Hz, H-7);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 15.8 (C-18), 18.6 (C-21), 22.2 (C-29), 22.5 (C-19 y C-27), 23.7 (C-6), 25.2 (C-28), 25.4 (C-30), 27.9 (C-15), 28.9 (C-23), 31.5 (C-16), 33.6 (C-22), 34.8 (C-2), 36.5 (C-20), 36.6 (C-1), 37.2 (C-10), 37.9 (C-12), 43.8 (C-13),

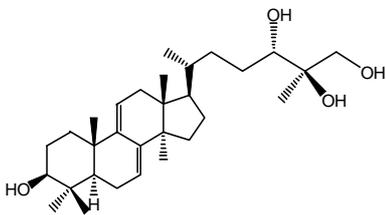
47.5 (C-4), 50.1 (C-5), 50.3 (C-14), 50.8 (C-17), 67.6 (C-26), 73.9 (C-25), 79.2 (C-24), 117.3 (C-11), 120.0 (C-7), 142.9 (C-8), 144.6 (C-9), 216.8 (C-3).

**Sustancia C<sub>13</sub>:** 8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -Epoxi-4,4,14 $\alpha$ -trimetil-5 $\alpha$ -pregnano-3,7,11,15,20-pentanona.

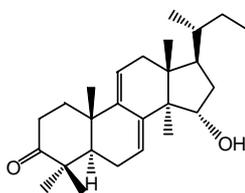


Sólido cristalino 4 mg; p.f.: 242-243 °C;  $[\alpha]_D$ : +24 (*c* 0.05, CHCl<sub>3</sub>); UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 289 (3.1), 251 (3.1) nm; IR  $\nu_{max}$  (film, KBr): 2927, 1753, 1710, 1457, 1414, 1389, 1362, 1230, 1182, 1118, 1067, 756, 666 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 414.1964 [M]<sup>+</sup> (C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub>, calcd 414.2042) (10), 371 (14), 316 (30), 288 (20), 273 (33), 260 (10), 191 (11), 179 (25), 165 (100), 152 (22), 137 (28), 125 (20), 123 (10), 109 (15), 98 (23), 96 (18), 91 (16), 81 (15), 79 (16), 69 (22), 67 (24), 55 (22); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.92 (3H, s, Me-18), 1.05 (3H, s, Me-22), 1.07 (3H, s, Me-24), 1.26 (3H, s, Me-19), 1.43 (3H, s, Me-23), 2.08 (1H, ddd, *J* = 8.2, 7.9, 13.5 Hz, H-1 $\alpha$ ), 2.17 (3H, s, Me-21), 2.35 (1H, d, *J* = 5.8 Hz, H-5 $\alpha$ ), 2.40 (2H, m, 2H-6), 2.57 (2H, m, 2H-2), 2.57 (1H, d, *J* = 14.61 Hz, H-12 $\beta$ ), 2.63 (1H, m, H-1 $\beta$ ), 2.68 (1H, m, H-16  $\beta$ ), 2.91 (1H, d, *J* = 14.61 Hz, H-12 $\alpha$ ), 2.91 (1H, dd, *J* = 8.58, 17.0 Hz, H-16 $\alpha$ ), 3.17 (1H, t, *J* = 8.58 Hz, H-17); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 16.30 (C-19), 17.47 (C-24), 19.57 (C-18), 20.26 (C-23), 26.85 (C-22), 31.16 (C-21), 32.21 (C-2), 32.36 (C-1), 36.39 (C-16), 36.71 (C-6), 37.37 (C-10), 43.53 (C-5), 45.53 (C-13), 46.01 (C-12), 47.04 (C-4), 52.43 (C-17), 54.84 (C-14), 66.78 (C-8), 68.12 (C-9), 198.3 (C-7), 200.6 (C-11), 205.2 (C-20), 205.9 (C-15), 214.10 (C-3).

**Sustancia C<sub>14</sub>:** 5 $\alpha$ -Lanosta-7,9(11)-dien-24,25,26,3 $\beta$ -tetraol (ganoderiol A).



Sólido cristalino 20 mg; p.f.: 232-233 °C;  $[\alpha]_D$ : +20 (*c* 0.1, Etanol); UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 237 (3.9), 244 nm (3.9), 253 (3.8) nm; IR  $\nu_{max}$  (film, KBr): 3350 (OH), 2950, 2900, 2850, 1430, 1430, 1360, 1060, 1010, 815 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 474 [M]<sup>+</sup> (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>4</sub>) (100), 459 (11), 456 (13), 398 (22), 311 (39), 271 (83), 105 (14), 99 (12), 95 (42), 81 (57), 69 (72), 55 (91), 43 (95); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.57 (3H, s, Me-18), 0.88 (3H, s, Me-30), 0.88 (3H, s, Me-29), 0.92 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, Me-21), 0.98 (3H, s, Me-28), 1.01 (3H, s, Me-19), 1.11 (3H, s, Me-27), 3.24 (1H, dd, *J* = 4.8, 10.8 Hz, H-3), 3.46 (1H, t, *J* = 12.1 Hz, H-24), 3.47 (1H, d, *J* = 11.1 Hz, H<sub>a</sub>-26), 3.83 (1H, d, *J* = 11.1 Hz, H<sub>b</sub>-26), 5.31 (1H, d, *J* = 5.8 Hz, H-11), 5.48 (1H, m, H-7); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 16.0 (C-29), 16.6 (C-18), 19.1 (C-21), 20.1 (C-27), 23.1 (C-19), 23.5 (C-6), 25.9 (C-30), 28.1 (C-15), 28.7 (C-2), 28.8 (C-28), 28.9 (C-23), 31.9 (C-16), 34.4 (C-22), 36.6 (C-1), 37.8 (C-10), 37.1 (C-20), 38.1 (C-12), 39.4 (C-4), 44.1 (C-13), 49.8 (C-5), 50.7 (C-14), 51.5 (C-17), 69.3 (C-26), 74.8 (C-25), 77.2 (C-24), 78.1 (C-3), 116.6 (C-11), 121.0 (C-7), 143.0 (C-8), 146.6 (C-9).

**Sustancia C<sub>15</sub>:** 15 $\alpha$ ,26,27-Trihidroxi-5 $\alpha$ -lanosta-7,9(11),24-trien-3-ona (ganoderiol B)

Sólido amorfo 17 mg;  $[\alpha]_D$ : +24 (*c* 0.04, Etanol); UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) ( $\log \epsilon$ ): 237 (3.6), 245 (3.7), 252 (3.4) nm; IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3556 (OH), 2952, 1710, 1430, 1120, 1060, 1010, 845  $\text{cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 470  $[\text{M}]^+$  ( $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$ ) (1), 352 (100), 311 (13), 309 (11), 251 (18), 249 (13), 235 (10), 211 (10), 209 (12), 195 (12), 185 (10), 171 (13), 157 (17), 149 (26), 145 (18), 133(17), 131 (17), 119 (23), 107 (32), 105 (30), 99 (12), 97 (32), 95 (47), 81 (57), 69 (95), 55 (98);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.64 (3H, s, Me-18), 0.90 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, Me-21), 0.93 (3H, s, Me-30), 1.09 (3H, s, Me-29), 1.13 (3H, s, Me-28), 1.19 (3H, s, Me-19), 4.23 (2H, s, H-26), 4.29 (1H, dd,  $J = 5.5, 9.9$  Hz, H-15 $\alpha$ ), 4.33 (2H, s, H-27), 5.38 (1H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-11), 5.54 (1H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-24), 5.88 (1H, m, H-7);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 16.5 (C-18), 18.3 (C-30), 18.7 (C-21), 22.2 (C-19), 22.4 (C-29), 23.9 (C-6), 24.7 (C-23), 25.7 (C-28), 30.0 (C-22), 35.0 (C-2), 36.3 (C-20), 36.9 (C-1), 37.6 (C-10), 38.9 (C-12), 40.5 (C-16), 44.6 (C-13), 47.5 (C-4), 49.4 (C-17), 51.0 (C-5), 52.6 (C-14), 58.6 (C-27), 65.5 (C-26), 73.7 (C-15), 117.3 (C-11), 121.7 (C-7), 127.6 (C-24), 140.8 (C-25), 142.1 (C-8), 145.4 (C-9), 215.2 (C-3).

**ESTUDIO DEL HONGO *GANODERMA AUSTRALE***

## ***PARTE TEÓRICA***

## **AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL.**

Del extracto etanólico del hongo *Ganoderma australe* y tal como se muestra en la parte experimental se aislaron tres esteroides (**A<sub>1</sub>-A<sub>3</sub>**) y seis triterpenos (**A<sub>4</sub>-A<sub>9</sub>**) dos de ellos nuevos en la bibliografía y cuyos estudios se describen a continuación:

### **SUSTANCIA A<sub>1</sub>**

Se obtuvo como un sólido cristalino de p.f. 166-168°C. Su espectro de IR muestra señales a  $\nu_{\max}$  3300 y a 1545  $\text{cm}^{-1}$  asignadas a grupo hidroxilo y dobles enlaces. En su espectro de  $^1\text{H}$  RMN entre 0.6-1.0 ppm aparecen las señales correspondientes a seis metilos. Tanto los datos espectroscópicos como las constantes físicas de la sustancia **A<sub>1</sub>** fueron coincidentes con las del ergosterol, aislado con anterioridad por nosotros del *Ganoderma lucidum*.<sup>153</sup>

### **SUSTANCIA A<sub>2</sub>**

Fue obtenida como un sólido, que después de varias cristalizaciones en metanol fijó su p.f. en 171-172°C. Da positiva la reacción de Liebermann-Burchard para esteroides. Sus propiedades físicas y espectroscópicas (IR, MS,  $^1\text{H}$  RMN) fueron idénticas a las del 5,6-dihidroergosterol, aislado por nosotros del *Ganoderma concinna*.<sup>154</sup>

### **SUSTANCIA A<sub>3</sub>**

Se muestra como un sólido cristalino de p.f. 177-179°C al igual que la sustancia anterior da positiva la reacción de Liebermann-Burchard para esteroides. Sus espectros de IR y  $^1\text{H}$  RMN fueron idénticos a los del peróxido de ergosterol, aislado por nosotros del *Ganoderma lucidum*.<sup>155</sup>

---

<sup>153</sup> Ver presente Tesis Doctoral, pág 57.

<sup>154</sup> Ver presente Tesis Doctoral, págs 84-85.

<sup>155</sup> Ver presente Tesis Doctoral, pág 58.

**SUSTANCIA A<sub>4</sub>**

Producto aislado como un sólido amorfo, con absorción en UV (figura 46a) a  $\lambda_{\max}$  275 nm. Su espectro de IR dio las bandas características de hidroxilo a  $\nu_{\max}$  3444  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\gamma$ -lactona a 1770  $\text{cm}^{-1}$  y cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada a  $\nu_{\max}$  1696  $\text{cm}^{-1}$  (figura 46b). Como en los casos anteriores, su composición elemental  $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_8$  se estableció mediante masas de alta resolución (figura 47).

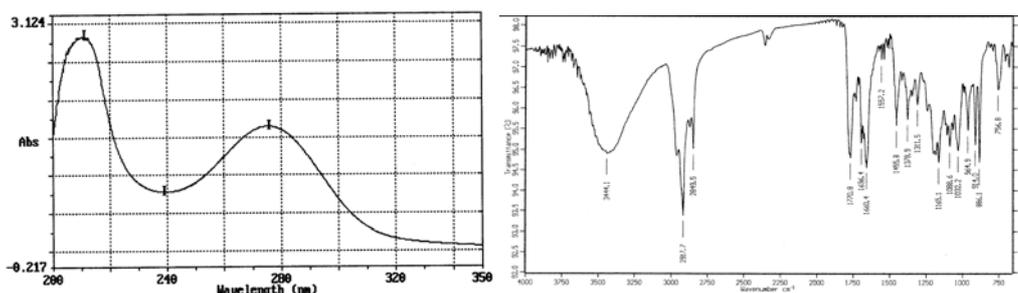


Figura 46. a) Espectro de UV, b) Espectro de IR de la sustancia A<sub>4</sub>.

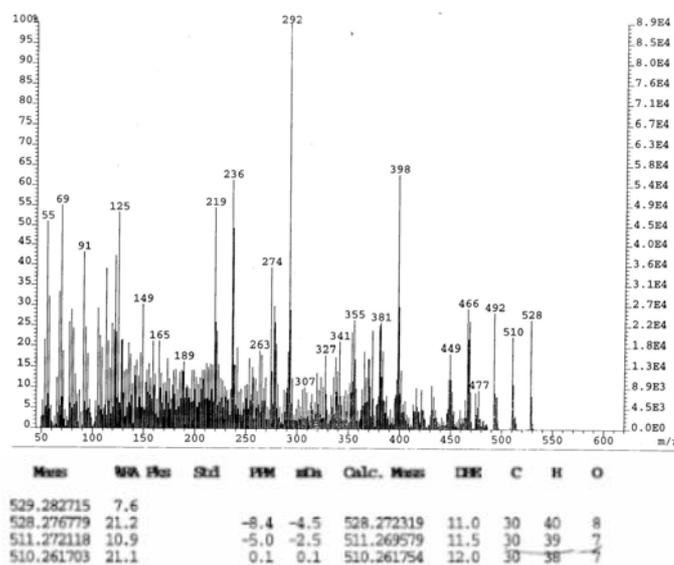


Figura 47. Espectro de masas de la sustancia A<sub>4</sub>.

El espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 48) muestra la presencia de seis singuletes a  $\delta$  0.91 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -29), 1.04 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -30), 1.05 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -28), 1.24 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -19), 1.42 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18) y 1.60 ppm (3H, s,  $\text{CH}_3$ -21) correspondientes a seis metilos, un doblete a  $\delta$  1.26 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ -27) asignado a un metilo perteneciente a un anillo  $\gamma$ -lactona, y dos señales, un doblete y la un doblete centrados en  $\delta$  3.21 (1H, dd,  $J = 4.3, 11.7$  Hz, H-3), 4.71 ppm (1H, d,  $J = 3.2$  Hz, H-15) adscritas a protones geminales a grupos hidroxilos.

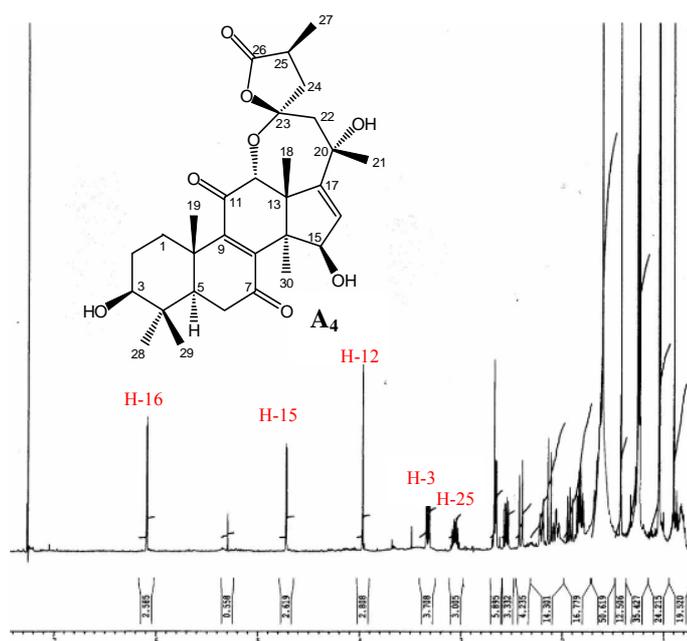
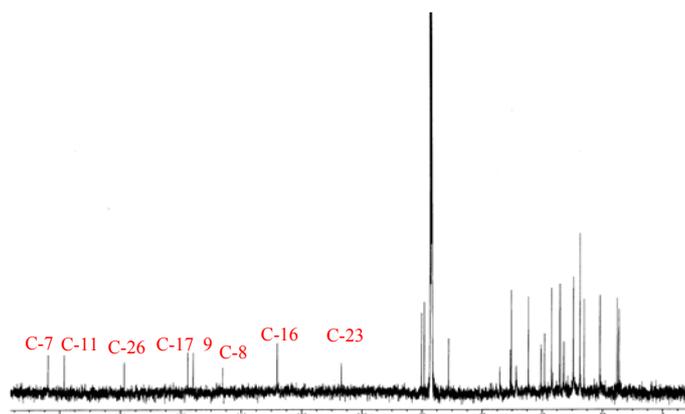


Figura 48. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia  $\text{A}_4$ .

Los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN (figura 49) y DEPT mostraron treinta señales correspondientes a treinta átomos de carbono, de acuerdo con la presencia en la molécula de siete metilos, cinco metilenos, seis metinos y doce carbonos cuaternarios.

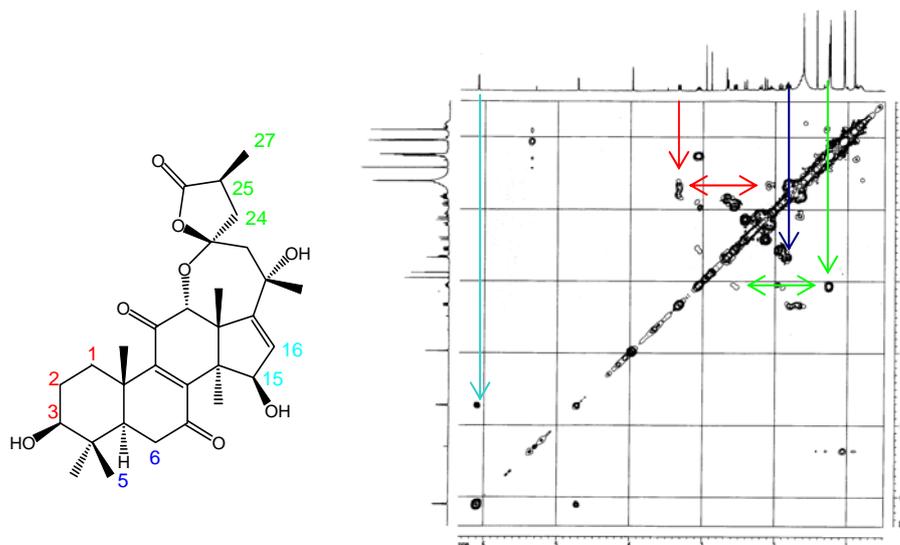


**Figura 49.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la sustancia **A<sub>4</sub>**.

También se observaron señales a  $\delta$  146.2, 155.9, 128.1 y 157.7 ppm correspondientes a dobles enlaces endocíclicos situados a  $\Delta^{8,16}$ , ambos tetra y trisustituido respectivamente. También se observó a  $\delta$  106.8 ppm una señal asignada a un átomo de carbono cuaternario correspondiente al C-23 de una espiro-lactona.

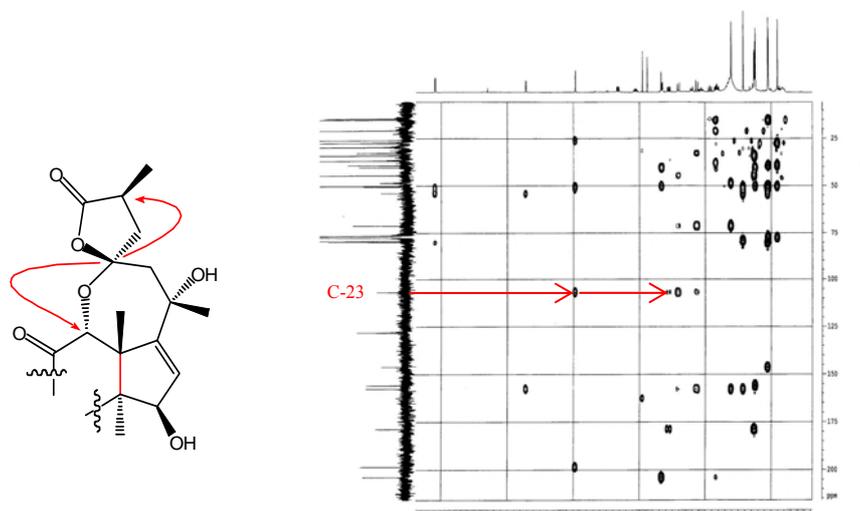
Estudios de los experimentos COSY, HSQC y HMBC nos permitió dar definitivamente la asignación de todos los hidrógenos y carbonos de la sustancia **A<sub>4</sub>**. Su espectro de COSY (figura 50) revela conectividades entre H<sub>2</sub>-1 y H<sub>2</sub>-2, estos dos últimos hidrógenos poseen también conectividad con H-3, también el H-5 muestra conectividades con H<sub>2</sub>-6, y el H-15 con H-16, por último el CH<sub>3</sub>-27 posee conectividad con el H-25 y éste con H<sub>2</sub>-24.

El experimento HMBC (figura 51) muestra correlaciones del C-23, perteneciente a la espirolactona, con el H-25, H-12 y H<sub>2</sub>-22. Esto nos permitió deducir que la formación de la mencionada espirolactona tiene lugar involucrando el átomo de oxígeno en C-12, el cual se une al C-23 y éste con el C-26 generando la formación de los anillos  $\gamma$ -lactónico y oxepánico este último poco frecuente en los triterpenos tetracíclicos estudiados hasta la actualidad.



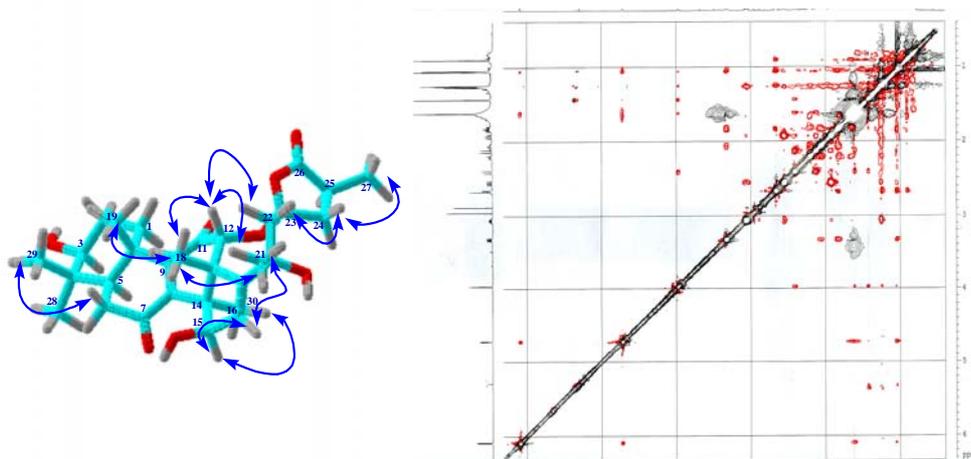
**Figura 50.** Experimento COSY de la sustancia **A<sub>4</sub>**.

La configuración relativa de la sustancia **A<sub>4</sub>** fue determinada por experimentos ROESY (figura 52), así correlaciones entre H-3 y H-5 nos permiten asegurar que el hidroxilo en C-3 es  $\beta$ . La configuración de los otros centros esterogénicos fue obtenida a partir de la correlación entre H-12 y los metilos CH<sub>3</sub>-18 y CH<sub>3</sub>-21, esto nos confirma que la unión del oxígeno en C-12 del anillo oxepánico es  $\alpha$ .



**Figura 51.** Experimento HMBC (de C a H) de la sustancia **A<sub>4</sub>**.

También se observó correlación entre el metilo en CH<sub>3</sub>-30 con el H-15 lo que nos permitió afirmar que el hidroxilo en C-15 es β. Por otro lado, H<sub>α</sub>-22 correlaciona con el metilo CH<sub>3</sub>-27 de donde se deduce que este último se encuentra en un plano distinto y le hemos asignado una configuración β. También se observó que el H<sub>β</sub>-22 no correlaciona con H<sub>2</sub>-24 de donde se deduce que la unión C-23 y C-24 es α.



**Figura 52.** Experimento NOESY de la sustancia **A<sub>4</sub>**.

De lo anterior se deduce que a la nueva sustancia **A<sub>4</sub>**, le corresponde la estructura de 12 $\alpha$ ,23-epoxi-3 $\beta$ ,15 $\beta$ ,23-trihidroxi-7,11-dioxo-5 $\alpha$ -lanosta-8,16-dien-23,26-olida, la cual hemos denominado debido a su origen austrolactona.

### SUSTANCIA A<sub>5</sub>

Al igual que la anterior, se obtuvo como un sólido amorfo. En el espectro de masas (figura 53) se observa un ion molecular a  $m/z$  554.2826 calculado para la fórmula empírica C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>O<sub>8</sub>.

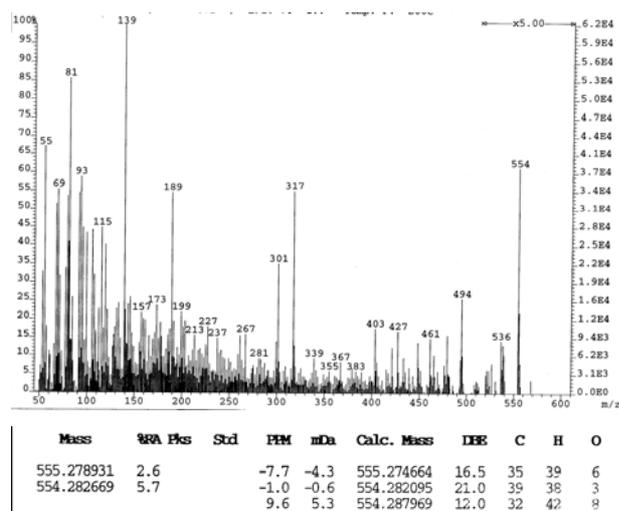


Figura 53. Espectro de masas de la sustancia A<sub>5</sub>.

La presencia en la sustancia A<sub>5</sub> de los siguientes grupos: ácido carboxílico, lactona, acetato, cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada y doble enlace se pusieron de manifiesto por las absorciones a  $\nu_{\max}$  3391, 1732, 1770, 1683, y 996  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro de IR (figura 54a). La existencia de una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada se puso también de manifiesto en su espectro de UV (figura 54b) al observarse una banda de absorción a  $\lambda_{\max}$  250 nm.

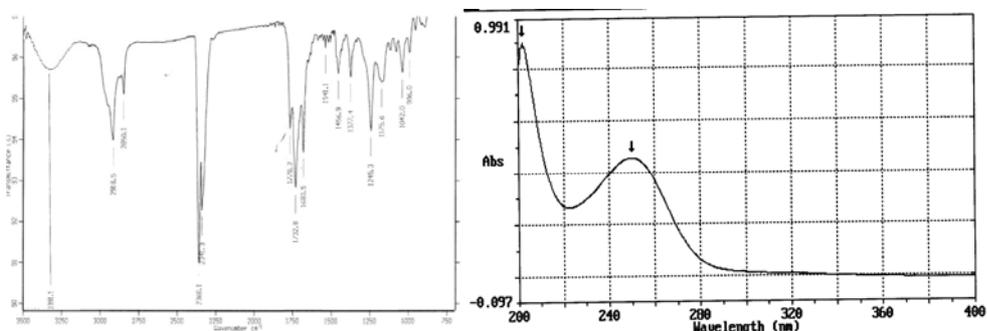
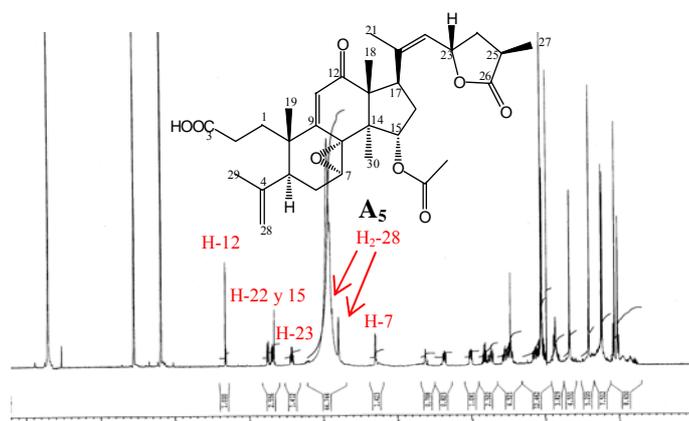


Figura 54. a) Espectro de IR y b) Espectro de UV de la sustancia A<sub>5</sub>.

En su espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 54) se observó cinco singuletes a  $\delta$  1.02 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19), 1.06 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18), 1.40 (3H, s, CH<sub>3</sub>-30), 1.67 (3H, s, CH<sub>3</sub>-29) y 1.91 ppm (3H, s, CH<sub>3</sub>-21) correspondientes a cinco metilos, estando los dos últimos sobre dobles

enlaces. También se observó un doblete a  $\delta$  1.23 ppm (3H, d,  $J = 7.3$  Hz, CH<sub>3</sub>-27) y un singulete a  $\delta$  2.05 ppm (3H, s, O-Ac) atribuidos a un metilo y a un grupo acetato respectivamente. La presencia de tres oximetinos fueron asignados a  $\delta$  4.30 (1H, d,  $J = 2.9$  Hz, H-7), 5.42 (1H, ddd,  $J = 5.1, 7.7, 12.8$  Hz, H-23) y 5.68 ppm (1H, dd,  $J = 7.0, 9.4$  Hz, H-15). A  $\delta$  4.79 y 4.88 ppm aparecen dos singuletes que integran para un hidrógeno cada uno, los cuales fueron asignados a un doble enlace metilénico en  $\Delta^{4(28)}$ . Por último se observó dos señales olefinicas a  $\delta$  5.75 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-22) y 6.32 ppm (1H, s, H-11).



**Figura 54.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la sustancia **A<sub>5</sub>**.

El espectro de <sup>13</sup>C RMN (figura 55) presentó treinta y dos átomos de carbono estando en perfecto acuerdo con la estructura en estudio. De ellas las señales a  $\delta$  75.17 (d, C-23), 36.78 (t, C-24), 34.31 (d, C-25) y 179.00 ppm (s, C-26) las hemos asignado a un anillo lactónico.

La estructura de **A<sub>5</sub>** se determinó totalmente a través de un intenso estudio de los experimentos COSY, HSQC, HMBC, y ROESY. El experimento COSY (figura 56) muestra conectividades de los protones en C-1 a C-2, C-5 a C-6 y C-6 a C-7, C-15 a C-16 y C-16 a C-17, C-22 a C-23, C-23 a C-24, C-24 a C-25 y C-25 a C-27.

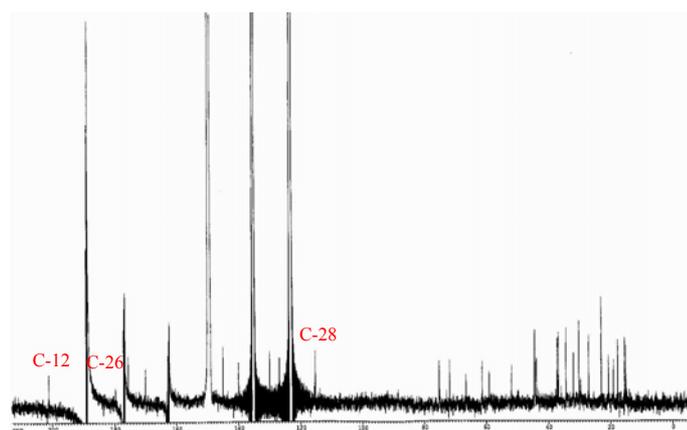


Figura 55. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la sustancia  $\text{A}_5$ .

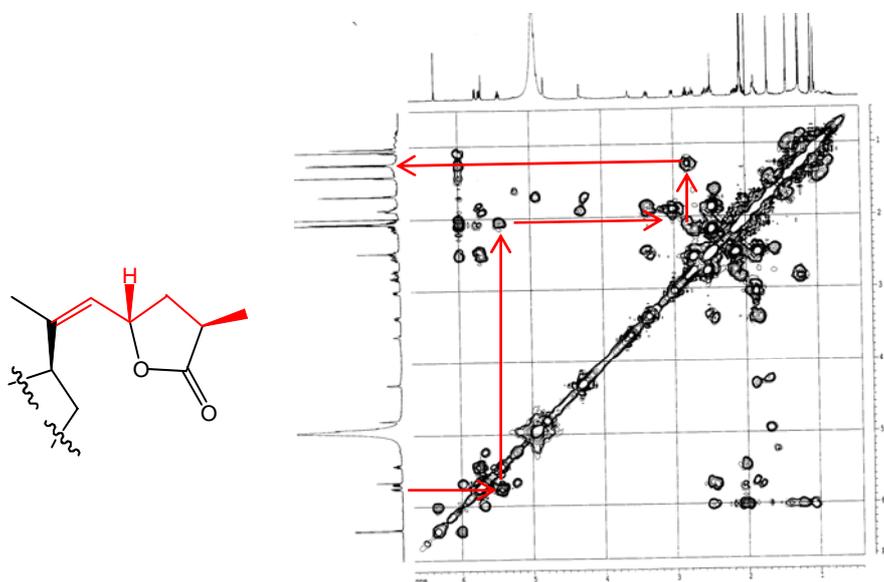
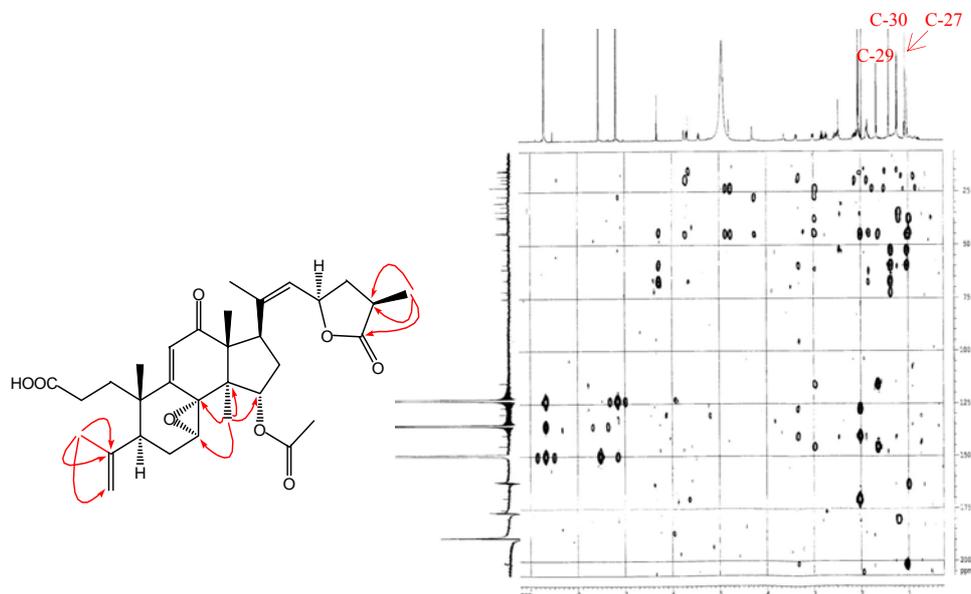


Figura 56. Experimento COSY de la sustancia  $\text{A}_5$ .

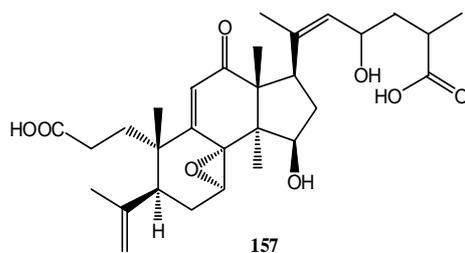
Las correlaciones HMBC (figura 57) de los protones de los grupos metilos pertenecientes a la sustancia en estudio están correlacionados con los grupos funcionales existentes pero acondicionado a un esqueleto de lanostano donde el anillo A se encuentra degradado (3,4-*seco*). Así, correlaciones de  $\text{CH}_3$ -29 ( $\delta$  1.67 ppm) con C-4, C-5 y C-28 nos confirma la apertura del anillo A en C-3 y C-4, correlaciones de  $\text{CH}_3$ -

30 ( $\delta$  1.40 ppm) con los carbonos cuaternarios C-8 y C-14 y con los terciarios C-7 y C-15 nos indica la presencia de un grupo epoxi en el anillo B. También se observó correlaciones entre el CH<sub>3</sub>-27 ( $\delta$  1.23 ppm) con el C-24, C-25 y C-26.



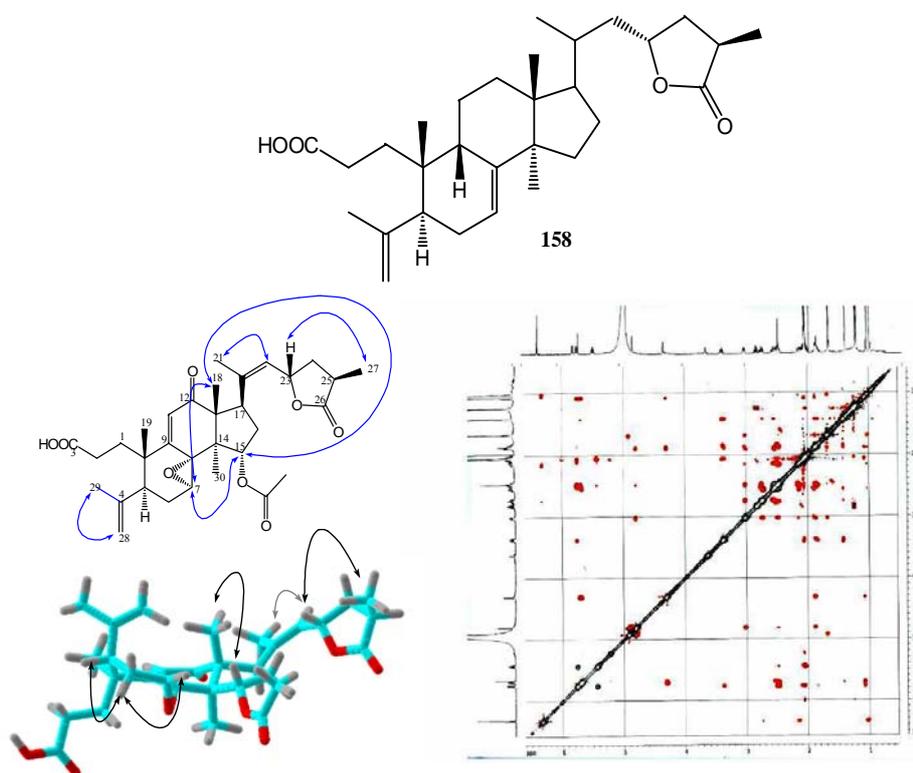
**Figura 57.** Experimento HMBC (de H a C) de la sustancia **A<sub>5</sub>**.

De lo anterior se deduce que la nueva sustancia en estudio tiene una estructura similar al conocido ácido elfvínico H (**157**).<sup>156</sup>



<sup>156</sup> Yoshikawa, K.; Nishimura, N.; Bando, S.; Arihara, S.; Matsumura, E.; Katayama, S. "New lanostanoids, Elfvingic acids A-H, from the fruit body of *Elfvingia applanata*" *J. Nat. Prod.* 65, **2002**, 548-552.

La configuración relativa de **A<sub>5</sub>** fue confirmada por correlaciones ROESY (figura 58) entre CH<sub>3</sub>-18 y H-15, las cuales indican con claridad la  $\alpha$ -orientación del grupo acetilo en C-15. La configuración del grupo epoxi resultó ser  $\alpha$  ya que se observó una correlación entre H-7, CH<sub>3</sub>-18 y H-15, también se apreció correlación entre el CH<sub>3</sub>-21 y el H-22 indicando una *Z* configuración del doble enlace en  $\Delta^{20(22)}$  y una  $\beta$  configuración del hidrógeno en C-23 y el metilo en C-27 deducido por comparación de los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN del ácido abiesolídico (**158**).<sup>157</sup>



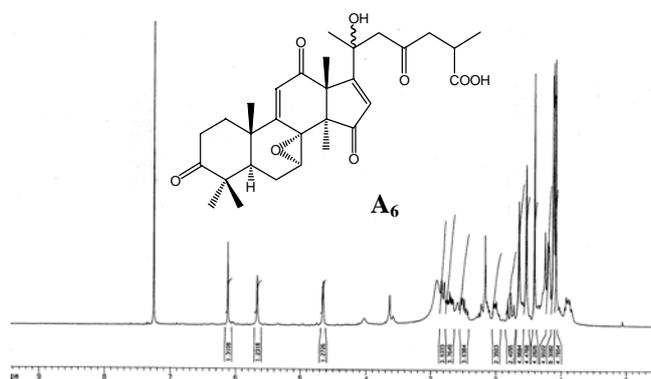
**Figura 58.** Experimento ROESY de la sustancia **A<sub>5</sub>**.

<sup>157</sup> Raldugin, V. A.; Gatilov, Yu, V.; Rybalova, T. V.; Rashkes, Ya. V. "Triterpenoids from species of *Abies* hill. II. Abiesolidic acid, a new 3,4-secolanostanoid from the resin of *Abies sibirica*." *Kim. Prir. Soedin.* 6, **1986**, 688-696.

De los datos anteriores se deduce que la nueva sustancia **A<sub>5</sub>** le corresponde la estructura del ácido 15 $\alpha$ -acetoxi-7 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epoxi-12-oxo-3,4-seco-5 $\alpha$ -lanosta-4(28),9,20(22)-trien-23-26-olida-3 oico.

### SUSTANCIA **A<sub>6</sub>**

Fue obtenida como un sólido amorfo. Su espectro de masas no muestra el ion molecular pero si una fragmentación a  $m/z$  511.2299  $[M-CH_3]^+$  de donde se deduce que posee de fórmula molecular  $C_{30}H_{38}O_8$ . La presencia de grupos hidroxilos, cetonas aislada y  $\alpha,\beta$ -insaturada se pusieron de manifiesto en el espectro de IR ya que se observaron bandas de absorción a  $\nu_{max}$  3550, 1700, 1680  $cm^{-1}$  respectivamente. En el espectro de  $^1H$  RMN (figura 59) se observa, a campo bajo señales de protones olefinicos a  $\delta$  5.67 (1H, s, H-16) y 6.12 ppm (1H, s, H-11) y un protón metino a  $\delta$  4.66 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz, H-7) situado sobre un grupo epoxi. Comparación de los datos espectroscópicos anteriores con los del ácido applanoxídico  $C^{158}$  resultaron ser iguales.



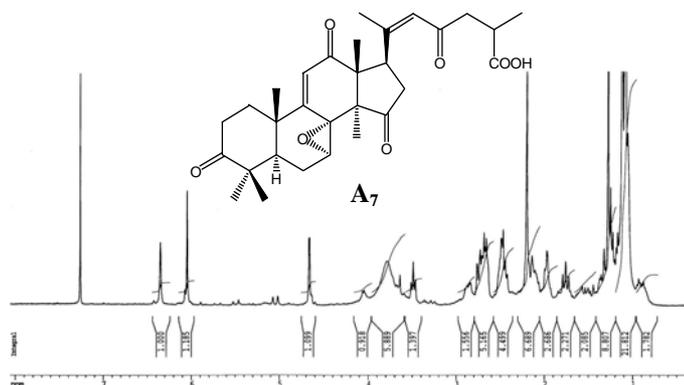
**Figura 59.** Espectro de  $^1H$  RMN de la sustancia **A<sub>6</sub>**.

<sup>158</sup> Chairul.; Tokuyama, T.; Hayashi, Y.; Nishizawa, M.; Tozuda, H.; Chairul, S. M.; Hayashi, Y. "Applanoxidic acids A, B, C and D, biologically active tetracyclic triterpenes from *Ganoderma applanatum*" *Phytochemistry* 30, **1991**, 4105-4109.

### SUSTANCIA A<sub>7</sub>

Se obtuvo como un sólido amorfo. Posee de fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>O<sub>7</sub> confirmada por espectroscopía de masas a  $m/z$  510.2357. Su espectro de IR presenta señales a  $\nu_{\max}$  3450, 1710 y 1695 cm<sup>-1</sup> que las hemos asignado a un ácido y a dos cetonas una de ellas aislada y la otra  $\alpha,\beta$ -insaturada, esta última presenta en el espectro de UV un  $\lambda_{\max}$  247 nm.

Su espectro de <sup>1</sup>H RMN (figura 60) mostró una serie de señales cuya posición y multiplicidad recuerdan a las de la sustancia A<sub>6</sub> ya descrita anteriormente, a excepción de las correspondientes al doble enlace en C-16 y C-17 y al desplazamiento químico del CH<sub>3</sub>-21. Esto, junto a las señales a  $\delta$  154.4 (s, C-20), 126.9 (d, C-22) y 199.9 ppm (s, C-23), indicaron la presencia del agrupamiento CH<sub>3</sub>-C=CH-C=O en la molécula. Los datos anteriores coinciden con los descritos para el ácido applanoxídico F.<sup>159</sup>



**Figura 60.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la sustancia A<sub>7</sub>.

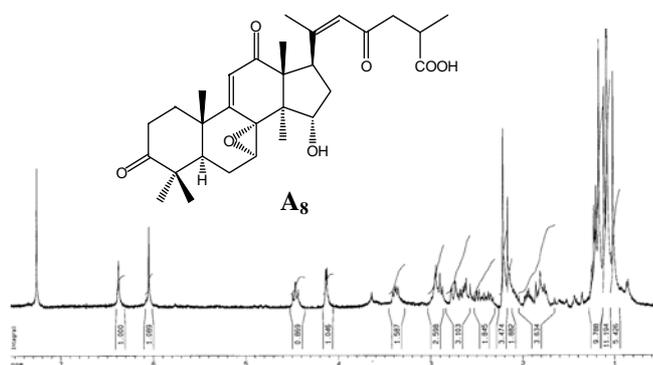
### SUSTANCIA A<sub>8</sub>

Producto aislado como un sólido amorfo cuyo espectro de UV mostró un máximo a  $\lambda_{\max}$  246 nm, así como en su espectro de IR bandas características de hidroxilo, cetona aislada y  $\alpha,\beta$ -insaturada a  $\nu_{\max}$  3550, 1700 y 1680 cm<sup>-1</sup>.

<sup>159</sup> Chairul; Chairul, S. M.; Hayashi, Y. "lanostanoid triterpenes from *Ganoderma applanatum*" *Phytochemistry* 35, **1994**, 1305-1308.

Su espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 61) mostró una serie de señales cuya posición y multiplicidad concuerdan con las de la sustancia anterior, a excepción de la correspondiente del C-15 el cual se encuentra sustituido por un grupo hidroxilo.

De los datos anteriores se deduce que la sustancia **A<sub>8</sub>** es el ácido applanoxídico **A**.<sup>158</sup>

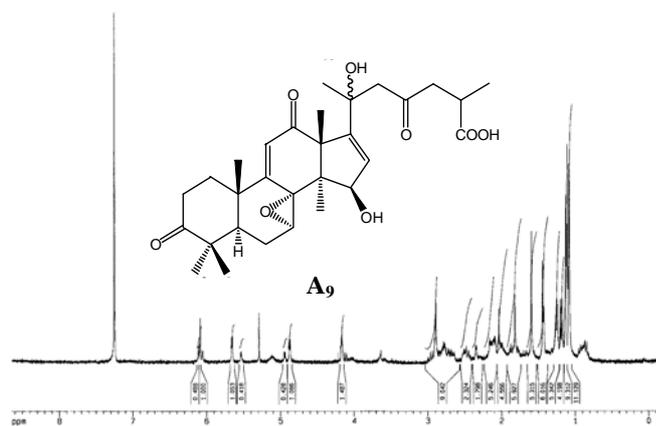


**Figura 61.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia **A<sub>8</sub>**.

### SUSTANCIA **A<sub>9</sub>**

Sustancia amorfa de punto de fusión 123-125°C. Su espectro de UV mostró la presencia de un grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado a  $\lambda_{\text{max}}$  257 nm, esta asignación fue también justificada al observarse en el espectro de IR una banda a  $\nu_{\text{max}}$  1680  $\text{cm}^{-1}$ . La presencia de un grupo carbonilo aislado se puso de manifiesto en dicho espectro a  $\nu_{\text{max}}$  1700  $\text{cm}^{-1}$ .

En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 62) aparecen las mismas señales que presentaba la sustancia **A<sub>6</sub>** a excepción del C-15 donde, en la sustancia en estudio, apareció un protón geminal a un hidroxilo a  $\delta$  4.88 (1H, t,  $J = 8.4$  Hz, H-15). Consultada la bibliografía vimos que la sustancia **A<sub>9</sub>** era idéntica al ácido applanoxídico **G**.<sup>159</sup>



**Figura 62.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la sustancia **A9**.

***PARTE EXPERIMENTAL***

El hongo *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. Bull., fue recolectado en la región de Nuquí, Departamento del Choco, Colombia, e identificado por el profesor Jaime Uribe y Luis G. Henao del Instituto de Ciencias Naturales de Universidad Nacional de Colombia. Un ejemplar se encuentra en el Herbario Nacional Colombiano con el No. COL LH-1185.

700 gramos de hongo fueron extraídos repetidas veces por maceración con 4 L de etanol del 96%, la solución etanólica se concentró a presión reducida, y fue repartida entre agua y cloroformo, obteniéndose 2,250 g de extracto clorofórmico el cual se fraccionó por cromatografía en columna (CC) empaquetada con gel de sílice (500 g), utilizando como eluyente n-hexano y mezclas de n-hexano-AcOEt de polaridad creciente.

Se recogieron fracciones de 500 ml y se agruparon según su comportamiento en TLC, tal como se indica en la tabla 3 y su purificación fue desarrollada de la siguiente forma:

La fracción A se recromatografió por CC en gel de sílice eluyendo con n-hexano-AcOEt (4:1) del cual se obtuvo la sustancia **A<sub>1</sub>** y una subfracción que se presentaba como una mezcla la cual fue recromatografiada en CC de Sephadex LH-20 eluida con n-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol (2:2:1) obteniéndose las sustancias **A<sub>2</sub>** y **A<sub>3</sub>**.

De la fracción B después de recromatografía en CC en Sephadex LH-20 eluida con n-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol (1:1:1) se obtuvo la sustancia **A<sub>4</sub>**.

La fracción C se cromatografió en CC de gel de sílice eluida con CHCl<sub>3</sub>, seguida de CC en Sephadex LH-20 eluida con n-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol (1:1:1) y finalmente por TLC preparativa eluida con CHCl<sub>3</sub>-metanol (100:1) obteniéndose pura la sustancia **A<sub>5</sub>**.

De la fracción D, después de someterla a CC en Sephadex LH-20 con n-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol (1:1:1) como eluyente y posterior cromatografía preparativa TLC eluida con CHCl<sub>3</sub>-metanol (98:2), pudimos aislar las sustancias **A<sub>6</sub>** y **A<sub>7</sub>**.

Por último, la fracción E por CC en Sephadex LH-20 eluida con n-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol (1:1:1) y posterior cromatografía preparativa TLC eluida con CHCl<sub>3</sub>-metanol (95:5) se obtuvo las sustancias **A<sub>8</sub>** y **A<sub>9</sub>**.

**Tabla 3.** Sustancias aisladas de *G. australe* por orden de elución.

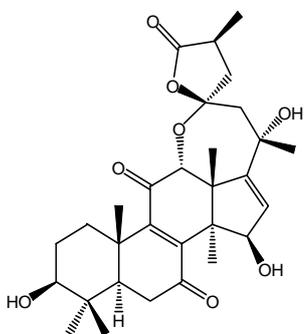
| Fracción | Peso   | Eluyentes             | Sustancias   |
|----------|--------|-----------------------|--|
| A        | 122 mg | n-hexano:AcOEt (4:1)  | Ergosterol, <b>A</b> <sub>1</sub> ; Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol, <b>A</b> <sub>2</sub> ; Peróxido de ergosterol, <b>A</b> <sub>3</sub> . |
| B        | 128 mg | n-hexano: AcOEt (7:3) | Austrolactona, <b>A</b> <sub>4</sub> .   |
| C        | 140 mg | n-hexano: AcOEt (3:2) | Ácido austrálico, <b>A</b> <sub>5</sub> .  |
| D        | 264 mg | n-hexano: AcOEt (1:1) | Ácido applanoxídico, <b>C</b> <b>A</b> <sub>6</sub> ; ácido applanoxídico F, <b>A</b> <sub>7</sub> .   |
| E        | 740 mg | n-hexano: AcOEt (2:3) | Ácido applanoxídico <b>A</b> , <b>A</b> <sub>8</sub> ; ácido applanoxídico G, <b>A</b> <sub>9</sub> .  |

**Sustancia A<sub>1</sub>:** Sólido cristalino, 11 mg, constantes físicas y espectroscópicas idénticas a la sustancia **G**<sub>4</sub>. (ver página 73).

**Sustancia A<sub>2</sub>:** Sólido cristalino, 12 mg, constantes físicas y espectroscópicas idénticas a la sustancia **C**<sub>4</sub> (ver páginas 105-106).

**Sustancia A<sub>3</sub>:** Sólido cristalino, 11 mg, constantes físicas y espectroscópicas idénticas a la sustancia **G**<sub>5</sub> (ver página 74).

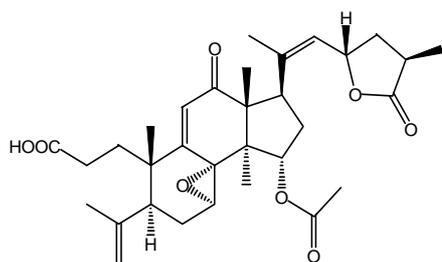
**Sustancia A<sub>4</sub>:** 12 $\alpha$ -23-Epoxi-3 $\beta$ ,15 $\beta$ ,20 $\alpha$ -trihidroxi-7,11-oxo-5 $\alpha$ -lanosta-8,16-dien-23,26-olida (austrolactona)



Sólido amorfo 1.5 mg;  $[\alpha]_D$ : -101 (*c* 0.53, CHCl<sub>3</sub>); UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 275 (3.7) nm; IR  $\nu_{max}$  (film, KBr): 3444 (OH), 2917, 2849, 1770, 1696, 1660, 1455, 1378, 1311, 1165, 1088, 1032, 964, 614, 886, 756 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 528.2767 [M]<sup>+</sup> (C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>O<sub>8</sub>, calcd 528.2723) (26), 511 (11), 510 (22), 492 (28), 477 (10), 468 (26), 466 (29), 450 (12), 449 (18), 448 (12), 431 (10), 416 (10), 401 (14), 398 (62), 381 (25), 373 (24), 369 (17), 355 (26), 341 (21), 337 (17), 327 (18), 292 (100), 274 (39), 236 (61), 219 (54), 165 (21), 149 (20), 125 (53); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.91 (3H, s, Me-29), 1.04 (3H, s, Me-30), 1.05 (3H, s, Me-28), 1.24 (3H, s, Me-19), 1.26 (3H, d, J = 7.0 Hz, Me-27), 1.42 (3H, s, Me-18), 1.60 (3H, s, H-21), 1.65 (1H, m, H-2 $\beta$ ), 1.80 (1H, m, H-2 $\alpha$ ), 1.81 (1H, dd, J = 6.8, 11.7 Hz, H-5 $\alpha$ ), 1.93 (1H, dd, J = 11.8, 12.7 Hz, H-24 $\beta$ ), 2.06 (1H, dt, J = 3.7, 13.9 Hz, H-1 $\alpha$ ), 2.12 (1H, d, J = 15.1 Hz, H-22 $\alpha$ ), 2.20 (1H, dt, J = 3.0, 13.9 Hz, H-1 $\beta$ ), 2.41 (1H, d, J = 15.1 Hz, H-22 $\beta$ ), 2.55 (1H, dd, J = 8.2, 12.7 Hz, H-24 $\alpha$ ), 2.65 (1H, d, J = 3.8 Hz, H-6 $\beta$ ), 2.67 (1H, s br, H-6 $\alpha$ ), 3.06 (1H, m, H-

25 $\alpha$ ), 3.21 (1H, dd,  $J = 4.3, 11.7$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 3.97 (1H, s, H-12 $\beta$ ), 4.71 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz, H-15 $\alpha$ ), 6.09 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz, H-16);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.50 (C-27), 15.10 (C-29), 20.82 (C-19), 26.01 (C-18), 27.43 (C-2), 29.61 (C-28), 29.67 (C-30), 32.77 (C-21), 34.07 (C-1 y C-25), 36.88 (C-6), 39.21 (C-4), 40.37 (C-10), 44.60 (C-24), 48.58 (C-22), 50.25 (C-5), 50.59 (C-14), 54.06 (C-13), 71.15 (C-20), 76.50 (C-3), 79.27 (C-12), 80.14 (C-15), 106.84 (C-23), 128.10 (C-16), 146.17 (C-8), 155.89 (C-9), 157.66 (C-17), 178.73 (C-26), 198.52 (C-11), 203.87 (C-7).

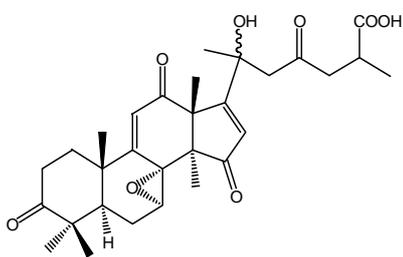
**Sustancia A<sub>5</sub>:** Ácido 15 $\alpha$ -acetil-7 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epoxi-12-oxo-3,4-seco-5 $\alpha$ -lanosta-4(28),9,20(22)-trien-23-26-olida-3 oico (ácido australico)



Sólido amorfo 2.8 mg;  $[\alpha]_D$ : + 42 ( $c$  1.4,  $\text{CHCl}_3$ ); UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) ( $\log \epsilon$ ): 250 (3.7) nm; IR  $\nu_{\text{max}}$  (film, KBr): 3391, 2918, 2850, 1770, 1732, 1683, 1456, 1377, 1245, 1175, 1042, 996  $\text{cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 554.2826  $[\text{M}]^+$  ( $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_8$ , calcd 554.2879) (12), 511 (11), 495 (11), 494 (25), 479 (15), 465 (10), 461 (14), 448 (13), 427 (16), 421 (12), 403 (17), 318 (12), 317

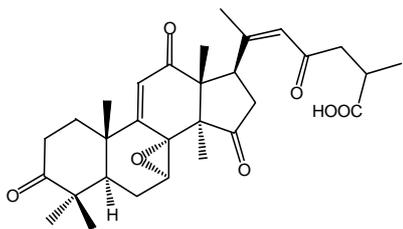
(55), 301 (35), 299 (13), 266 (16), 261 (15), 259 (10), 241 (11), 227 (18), 221 (10), 213 (15), 199 (21), 191 (19), 173 (23), 159 (20), 145 (26), 139 (100), 131 (22);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , Piridina- $d_5$ ): 1.02 (3H, s, Me-19), 1.06 (3H, s, Me-18), 1.23 (3H, d,  $J = 7.3$  Hz, Me-27), 1.40 (3H, s, Me-30), 1.67 (3H, s, Me-29), 1.82 (1H, m, H-6 $\alpha$ ), 1.84 (1H, m, H-16  $\alpha$ ), 1.91 (3H, s, Me-21), 2.00 (1H, m, H-24a), 2.01 (1H, m, H-6 $\beta$ ), 2.05 (3H, s, Me-OAc), 2.12 (1H, m, H-24b), 2.40 (2H, m, 2H-1), 2.47 (1H, m, H-16 $\beta$ ), 2.49 (H, m, H-2a), 2.73 (1H, dd,  $J = 4.3, 12.5$  Hz, H-2b), 2.82 (1H, sext,  $J = 7.4$ , Hz, H-25), 3.01 (1H, dd,  $J = 6.3, 10.5$  Hz, H-5 $\alpha$ ), 3.36 (1H, dd,  $J = 7.6, 11.2$  Hz, H-17 $\alpha$ ), 4.30 (1H, d,  $J = 2.9$  Hz, H-7  $\beta$ ), 4.79 (1H, s, H-28a), 4.88 (1H, s, H-28b), 5.42 (1H, ddd,  $J = 5.1, 7.7, 12.8$  Hz, H-23), 5.68 (1H, dd,  $J = 7.0, 9.4$ , H-15), 5.75 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-22), 6.32 (1H, s, H-11);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , Piridina- $d_5$ ): 15.07 (C-30), 15.45 (C-27), 17.65 (18), 19.04 (C-21), 20.69 (C-OAc), 23.01 (C-19 y C-29), 27.03 (C-6), 30.14 (C-2), 31.92 (C-16), 34.31 (C-25), 36.78 (C-24), 37.13 (C-1), 43.78 (C-10), 44.32 (C-17), 44.81 (C-5), 51.81 (C-14), 59.05 (C-13), 61.27 (C-7), 66.54 (C-8), 71.77 (C-15), 75.17 (C-23), 115.21 (C-28), 126.30 (C-22), 130.00 (C-11), 139.90 (21), 145.00 (C-4), 163.00 (C-9), 169.90 (C-OAc), 175.61 (C-3), 179.00 (C-26), 201.10 (C-12).

**Sustancia A<sub>6</sub>:** Ácido 7 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epoxi-20-hidroxi-3,12,15,23-tetraoxo-5 $\alpha$ -lanosta-9(11),16-dien-26 oico (ácido applanoxídico C)



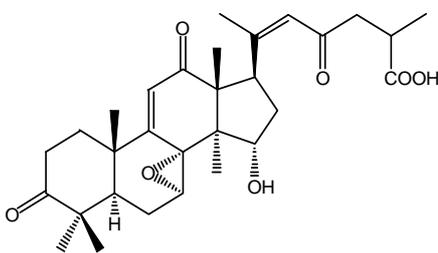
Sólido amorfo 6 mg;  $[\alpha]_D$ : +20 (*c* 0.8, CHCl<sub>3</sub>); UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 248 (4.2), nm; IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3550, 1700, 1680, 1430, 1230, 1060, 1010, 845 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 511.2299 [M-Me]<sup>+</sup> (C<sub>29</sub>H<sub>35</sub>O<sub>8</sub>) (18), 493 (14), 396 (65), 393 (10), 381 (45), 368 (14), 353 (88), 338 (35), 325 (44), 323 (42), 311 (100), 251 (22), 247 (49), 231 (21), 227 (21), 223 (22), 213 (20), 189 (30); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.09 (3H, s, Me-29), 1.12 (3H, s, Me-30), 1.19 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, Me-27), 1.25 (3H, s, Me-19), 1.42 (3H, s, Me-28), 1.54 (3H, s, Me-21), 1.63 (3H, s Me-18), 4.66 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, H-7 $\beta$ ), 5.67 (1H, s, H-16), 6.12 (1H, s, H-11); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 16.9 (C-27), 21.6 (C-29), 22.8 (C-6), 24.8 (C-19), 24.9 (C-28), 28.7 (C-30), 29.5 (C-21), 30.0 (C-18), 33.4 (C-2), 34.4 (C-25), 35.6 (C-1), 40.7 (C-5 y C-10), 45.9 (C-4), 47.7 (C-24), 52.8 (C-22), 54.5 (C-13), 59.0 (C-7), 62.0 (C-8), 62.7 (C-14), 72.9 (C-20), 125.1 (C-16), 129.7 (C-11), 167.7 (C-9), 180.0 (C-26), 181.6 (C-17), 199.8 (C-12), 202.8 (C-15), 206.2 (C-23), 216.0 (C-3).

**Sustancia A<sub>7</sub>:** Ácido 7 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epoxi-3,12,15,23-tetraoxo-5 $\alpha$ -lanosta-9(11),20-dien-26 oico (ácido applanoxídico F)



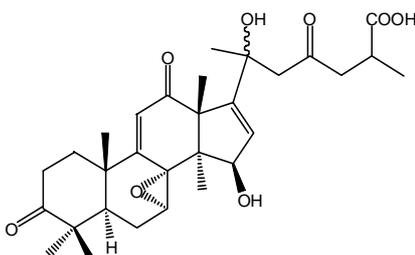
Sólido amorfo 7 mg;  $[\alpha]_D$ : +162 (*c* 0.9, CHCl<sub>3</sub>); UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 247 (4.2), nm; IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3450, 1710, 1695, 1430, 1230, 1060, 1010, 845 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 510.2357 [M]<sup>+</sup> (C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>O<sub>7</sub>) (18), 494 (47), 492 (49), 476 (47), 469 (17), 449 (25), 395 (60), 377 (69), 365 (37), 337 (25), 321 (29), 301 (17), 285 (100), 165 (19), 69 (43); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.08 (3H, s, Me-29), 1.09 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, Me-27), 1.12 (3H, s, Me-30), 1.13 (3H, s, Me-18), 1.28 (3H, s, Me-28), 1.25 (3H, s, Me-19), 2.23 (3H, s Me-21), 4.67 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, H-7 $\beta$ ), 6.05 (1H, s, H-11), 6.35 (1H, s, H-22); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 17.3 (C-27), 17.7 (C-18), 20.4 (C-21), 21.6 (C-19 y C-29), 22.6 (C-6), 24.8 (C-28), 28.6 (C-30), 33.5 (C-2 y 25), 36.0 (C-1), 38.3 (C-16), 40.3 (C-10), 40.6 (C-5), 42.8 (C-17), 45.9 (C-4), 47.7 (C-24), 55.0 (C-13), 57.6 (C-8), 58.7 (C-7 y 14), 62.6 (C-8), 126.9 (C-22), 129.7 (C-11), 154.4 (C-20), 164.4 (C-9), 180.2 (C-26), 199.9 (C-23), 200.5 (C-12), 209.6 (C-15), 216.1 (C-3).

**Sustancia A<sub>8</sub>:** Ácido 7 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epoxi-15 $\alpha$ -hidroxi-3,12,23-trioxo-5 $\alpha$ -lanosta-9(11),20-dien-26 oico (ácido applanoxídico A)



Sólido amorfo 12 mg; p.f.: 202-204°C;  $[\alpha]_D$ : +90 (*c* 1.1, CHCl<sub>3</sub>); UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 246 (4.1), nm; IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3550, 1700, 1680, 1430, 1230, 1020, 930, 845 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 512.2841 [M]<sup>+</sup> (C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>O<sub>7</sub>) (23), 496 (30), 463 (17), 409 (17), 381 (24), 367 (100), 365 (25), 349 (20), 339 (24), 327 (17), 301 (45), 285 (90), 285 (100), 165 (19), 69 (43); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.02 (3H, s, Me-18), 1.08 (3H, s, Me-30), 1.09 (3H, s, Me-19 y Me-29), 1.08 (3H, s, Me-29), 1.17 (3H, s, Me-28), 1.22 (3H, d, J = 6.9 Hz, Me-27), 2.22 (3H, s Me-21), 4.13 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-7 $\beta$ ), 4.46 (1H, t, J = 8.4 Hz, H-15 $\beta$ ), 6.07 (1H, s, H-11), 6.37 (1H, s, H-22); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 14.6 (C-28), 17.0 (C-27), 18.1 (C-18), 20.7 (C-21), 21.6 (C-19), 23.2 (C-6), 24.5 (C-29), 28.7 (C-30), 33.5 (C-2 y C-16), 34.7 (C-25), 35.9 (C-1), 40.2 (C-10), 40.7 (C-5), 45.8 (C-17), 45.9 (C-4), 47.5 (C-24), 50.3 (C-13), 59.3 (C-14), 60.5 (C-7), 66.6 (C-8), 71.6 (C-15), 125.9 (C-22), 130.9 (C-11), 157.7 (C-20), 163.2 (C-9), 180.0 (C-26), 198.8 (C-23), 201.2 (C-12), 216.2 (C-3).

**Sustancia A<sub>9</sub>:** Ácido 7 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epoxi-15 $\beta$ ,20-dihidroxi-3,12,23-trioxo-5 $\alpha$ -lanosta-9(11),16-dien-26 oico (ácido applanoxídico G)



Sólido amorfo 8 mg; p.f.: 123-125°C;  $[\alpha]_D$ : +115 (*c* 1.2, CHCl<sub>3</sub>); UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 257 (4.1), nm; IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3550, 1700, 1680, 1430, 1020, 930, 845 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 513.2513 [M-Me]<sup>+</sup> (C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>O<sub>8</sub>) (23), 510 (10), 492 (10), 398 (39), 384 (30), 365 (20), 321 (11); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.08 (3H, s, Me-18), 1.12 (3H, s, Me-30), 1.13 (3H, s, Me-29), 1.20 (3H, s, Me-28), 1.21 (3H, d, J = 6.9 Hz, Me-27), 1.44, (3H, s, Me-19), 1.60 (3H, s Me-21), 4.17 (1H, d, J = 3.4 Hz, H-7 $\beta$ ), 4.88 (1H, t, J = 8.4 Hz, H-15 $\alpha$ ), 5.66 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-16), 6.09 (1H, s, H-11); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 16.8 (C-27), 21.6 (C-29), 22.6 (C-6), 23.9 (C-28), 24.8 (C-19), 26.9 (C-30), 28.6 (C-21), 31.1 (C-18), 33.6 (C-2), 34.2 (C-25), 35.8 (C-1), 40.4 (C-5 y C-10), 45.9 (C-4), 48.1 (C-24), 50.2 (C-13), 53.8 (C-22), 62.3 (C-7), 63.5 (C-8), 64.7 (C-14), 72.2 (C-20), 78.4 (C-15), 127.1 (C-16), 129.7 (C-11), 167.9 (C-9 y C-17), 179.8 (C-26), 203.5 (C-12), 208.3 (C-23), 216.4 (C-3).

## **PARTE II**

### **ESTUDIO DEL HONGO *LAETIPORUS SULPHUREUS*.**

## ***INTRODUCCIÓN***

El género *Laetiporus* está comprendido en el orden de los *Poriales* y son encontrados, generalmente, creciendo sobre árboles muertos. De este género el *Laetiporus sulphureus*, su carpóforo o cuerpo fructífero se encuentra en forma semicircular de color amarillo a naranja con olor agradable. Vive en todo tipo de bosques de Europa, África, América y Asia, en este último continente conocido como “masutake”. Es comestible y su sabor es parecido al de la carne de pollo, por esta razón es conocido en América como “el pollo de los bosques”, no obstante se ha reportado que en sus estadios posteriores puede causar trastornos intestinales en algunas personas, siendo éste mayor al consumirlo con bebidas alcohólicas,<sup>160</sup> suele producir alucinaciones visuales.<sup>161</sup>



También es usado como fuente de citoquinina y ácido gibberélico.<sup>162</sup> Además presenta actividad antioxidante<sup>163</sup> y anticoagulante.<sup>164</sup>

Investigaciones químicas sobre especies de *Laetiporus* han puesto de manifiesto la presencia de triterpenos con esqueleto de lanostano como en el caso de *Laetiporus versisporus*.<sup>165</sup> Compuestos volátiles,<sup>166</sup> benzofuranos<sup>167</sup> como el egonol **159**,

<sup>160</sup> Moreno, G.; García, J. L.; Zugaza, A. “*La guía Incafo de los hongos de la península ibérica*” INCAFO: Madrid, **1986**, Tomo I y III.

<sup>161</sup> Appleton, R. E.; Jan, J. E.; Kroeger, P. D. “*Laetiporus sulphureus* causing visual hallucinations and ataxia in a child” *Can. Med. J.* 139, **1988**, 48-49.

<sup>162</sup> Birgul, O.; Topcuoglu, S. F. “GA3, ABA and cytokinin production by *Lentinus tigrinus* and *Laetiporus sulphureus* fungi cultured in the medium of olive oil mill waste” *Turk. J. Biol.* 25, **2001**, 453-462.

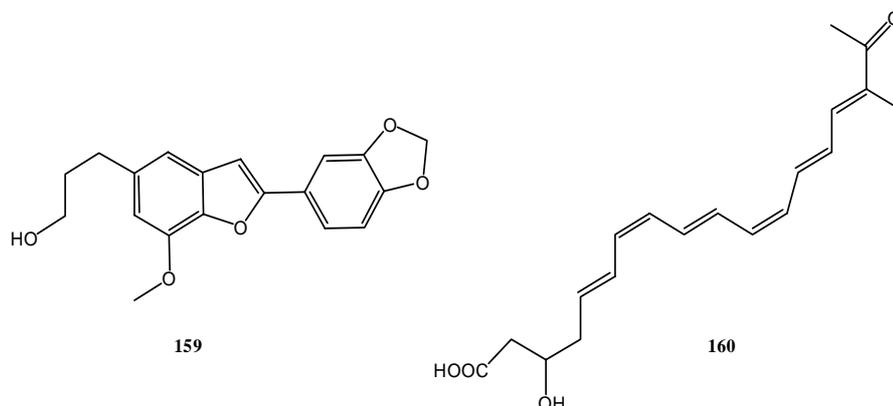
<sup>163</sup> Keller, C.; Maillard, M.; Keller, J.; Hostettmann, K. “Screening of European fungi for antibacterial, antifungal, larvicidal, molluscicidal, antioxidant and free-radical scavenging activities and subsequent isolation of bioactive compounds” *Pharm. Biol.* 40, **2002**, 518-525.

<sup>164</sup> Okamura, T.; Takeno, T.; Dohi, M.; Yasumaza, I.; Hayashi, T.; Toyoda, M.; Noda, H.; Fukuda, S.; Oiré, N.; Ohsugi, M. “Development of mushrooms for thrombosis prevention by protoplast fusion” *J. Biosci. Bioeng.* 89, **2000**, 474-478.

<sup>165</sup> Hikino, H.; Kuwano, D.; Takemoto, T. “Constituents of *Laetiporus versisporus*” *Yakugaku zasshi* 89, **1969**, 1149-1151.

<sup>166</sup> Raptor, S.; Kanska, G.; Guillot, J.; Andary, C.; Bessiere, J. M. “Volatile composition of *Laetiporus sulphureus*” *Cryptogamie Mycol.* 21, **2000**, 67-72.

ergosterol,<sup>168</sup> pigmentos como el ácido laetipórico<sup>169</sup> **160** y los ácidos sulfurénico y trametenólico han sido aislados de *Laetiporus sulphureus*.



Estos dos últimos muestran una actividad selectiva frente al receptor de la dopamina D<sub>2</sub>, importante en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.<sup>170</sup> De este mismo hongo se han aislado polisacáridos con estructura de  $\alpha$ -D-glucanos y derivados de quitina.<sup>171</sup> Igualmente se ha aislado y caracterizado una lectina la cual muestra una especificidad para residuos de *N*-acetilactosamina, esta lectina es muy útil para determinar y demostrar las modificaciones de glicoconjugados en procesos cancerosos asociados al cáncer de mama.<sup>172</sup>

<sup>167</sup> Yoshikawa, K.; Bando, S.; Arihara, S.; Matsumura, E.; Ktayaama, S. "A benzofuran glycoside and an acetylenic acid from the fungus *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*" *Chem. Pharm. Bull.* 49, **2001**, 327-329.

<sup>168</sup> Asawa, K.; Sawada, M. "Study of the components of mushroom. Part V. Fatty acids and long chain bases of ceramide from *Laetiporus sulphureus*". *Mokuzai Gakkaishi* 25, **1979**, 749-752.

<sup>169</sup> Weber, R. W. S.; Mucci, A.; Davoli, P. "Laetiporic acid, a new polyene pigment from the Wood-rotting basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Polyporales, Fungi)" *Tetrahedron Lett.* 45, **2004**, 1075-1078.

<sup>170</sup> Liu, J. "Biologically active substance from mushrooms in Yunnan, China" *Heterocycles* 57, **2002**, 157-167.

<sup>171</sup> a) Jelsma, J.; Kreger, D. R. "Observations on the cell-wall compositions of the bracket fungi *Laetiporus sulphureus* and *Piptoporus betulinus*" *Arch. Microbiol.* 119, **1978**, 249-255; b) Alquini, G.; Carbonero, E. R.; Rosado, F. R.; Cosentino, C.; Iacomini, M. "Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr. Murr)" *FEMS Microbiol. Lett.* 230, **2004**, 47-52.

<sup>172</sup> a) Kanska, G.; Guillot, J.; Dusser, M.; Damez, M.; Botton, B. "Isolation and characterization of an *N*-acetylactosamine-binding lectin from the mushrooms *Laetiporus sulphureus*" *J. Biochem.* 116, **1994**, 519-523; b) Kanska, G.; Guillot, J.; De Latour, M.; Foncky, Y. "Expression of Tn antigen and *N*-acetylactosamine residues in malignant and benign human breast tumours detected by lectins and monoclonal antibody 83D4" *Int. J. Oncol.* 12, **1998**, 361-367.

Teniendo en cuenta tanto las propiedades alimenticias como medicinales del hongo *Laetiporus sulphureus*, recolectado en la región del Tequendama-Colombia, hemos estudiado en la presente Tesis Doctoral su composición química.

## ***PARTE TEÓRICA***

## AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL.

Del extracto del hongo, tal como se muestra en la parte experimental, se aislaron un isoprenoide (**L**<sub>1</sub>), cinco triterpenos (**L**<sub>3</sub>-**L**<sub>7</sub>) y dos esteroides (**L**<sub>2</sub>, **L**<sub>8</sub>) cuyo estudio se describe a continuación:

### SUSTANCIA L<sub>1</sub>

Se presenta como un sólido amorfo de color rojo. Su espectro de IR muestra, entre otras, señales a  $\nu_{\max}$  1645 y 1610  $\text{cm}^{-1}$  asignadas a un anillo quinónico, confirmadas en su espectro de UV ya que se observó una banda de absorción a  $\lambda_{\max}$  271 nm. El espectro de masas muestra un peso molecular a  $m/z$  794.6241 correspondiente a la fórmula empírica  $\text{C}_{54}\text{H}_{82}\text{O}_4$ . En su espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 63) aparece un multiplete centrado en  $\delta$  5.09 ppm asignado a nueve protones vinílicos, dos singuletes en  $\delta$  3.97 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ) y 3.98 ppm (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ) correspondientes a dos metoxilos, un doblete a  $\delta$  3.18 ppm (2H, d,  $J = 6.9$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), y dos multipletes uno entre  $\delta$  2.07 y 1.97 ppm (32H, m, 16 x  $\text{CH}_2$ ) y el otro entre  $\delta$  1.73 y 1.59 ppm correspondientes a diez metilos sobre dobles enlaces. Los datos espectroscópicos de nuestro producto fueron coincidentes con los de la ubiquinona Q9.<sup>173</sup>

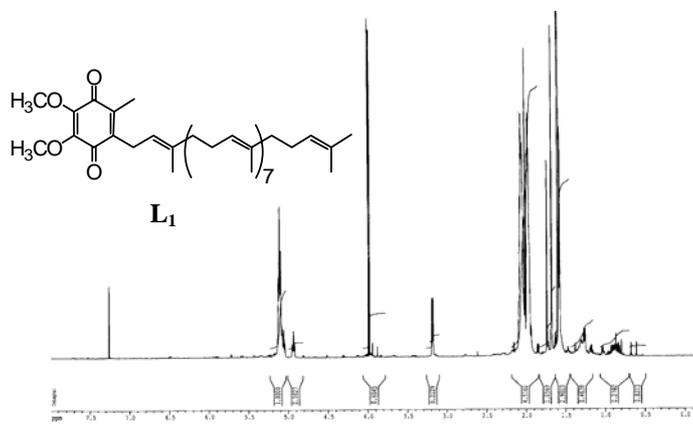


Figura 63. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia **L**<sub>1</sub>.

<sup>173</sup> Terao, S.; Kato, K.; Shiraishi, M.; Morimoto, H. "Synthesis of ubiquinones. Elongation of the heptaprenyl side-chain in ubiquinone Q-7" *J. Chem. Perkin Trans I* **1978**, 1101-1109.

### SUSTANCIA L<sub>2</sub>

Se obtuvo como un sólido que cristalizó de metanol de p.f. 177-179°C,  $[\alpha]_D^{23}$  (c 0.8, CHCl<sub>3</sub>). Su espectro de masas, está de acuerdo con un peso molecular de  $m/z$  428.3290 correspondiente a la fórmula molecular C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>. La sustancia L<sub>2</sub> fue identificada a partir de sus propiedades físicas y espectroscópicas como peróxido de ergosterol, también aislado por nosotros del *Ganoderma lucidum*.<sup>174</sup>

### SUSTANCIA L<sub>3</sub>

Esta sustancia se obtuvo como un polvo amorfo de p.f. 272-274°C, dio positiva la reacción de Liebermann-Burchard, su espectro de masas mostró un pico molecular a  $m/z$  470.3695 de acuerdo con la fórmula empírica C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>O<sub>3</sub> acompañado de otras dos señales a  $m/z$  455 y 437 correspondiente a la pérdida de un metilo y agua respectivamente. La sustancia presentó en su espectro de IR señales a  $\nu_{\max}$  3250 y 1719 cm<sup>-1</sup> asignadas a un grupo ácido. En su espectro de <sup>1</sup>H RMN (figura 64) aparecieron cuatro singuletes a  $\delta$  0.97, 1.03, 1.07 y 1.20 ppm que integran para un metilo cada uno de ellos y un multiplete centrado en  $\delta$  0.99 ppm correspondiente a tres metilos. Esto está en perfecto acuerdo con su espectro de <sup>13</sup>C RMN ya que se observaron siete señales de metilos a  $\delta$  16.0, 16.1, 18.5, 19.1, 21.0, 21.6, 24.2 ppm. Los datos anteriores coincidieron perfectamente para el ácido eburícico.<sup>175</sup>

---

<sup>174</sup> Ver presente Tesis Doctoral, pág 58.

<sup>175</sup> Lawrie, W.; Malean, J.; Watson, J. "A new triterpenoid acid from *Lenzites trabea*" *J. Chem. Soc.* **1967**, 1776-1779.

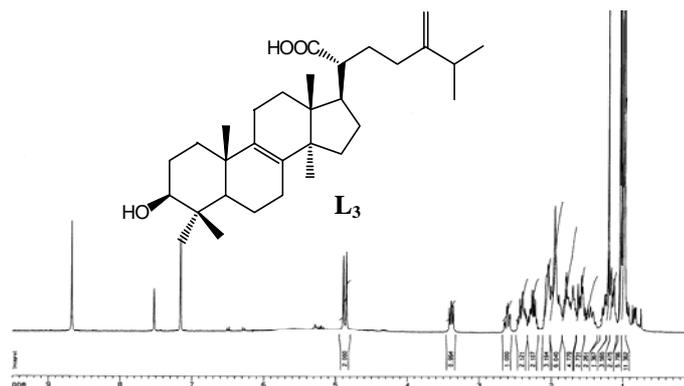


Figura 64. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia  $\text{L}_3$ .

### SUSTANCIA $\text{L}_4$

Fue aislada como un sólido amorfo de p.f. 209-210°C y dio positiva la reacción de Liebermann-Burchard. Su espectro de IR (figura 65) presenta bandas de absorción a  $\nu_{\text{max}}$  3333 y 1709  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a un grupo hidroxilo y carbonilo respectivamente.

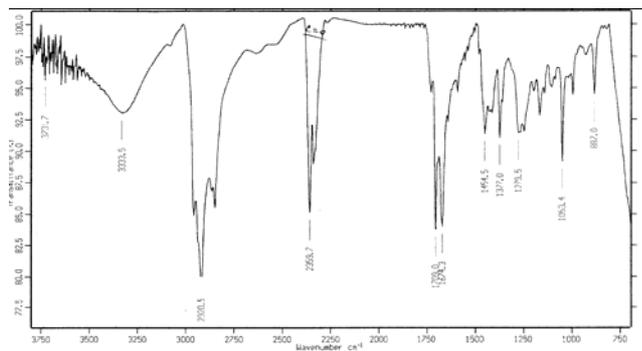


Figura 65. Espectro de IR de la sustancia  $\text{L}_4$ .

Su espectro de masas (figura 66) dio un ion molecular intenso a  $m/z$  484 (100) además de fragmentos a  $m/z$  469 (32)  $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ , 451 (66)  $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{H}_2\text{O}]^+$ , y 295  $[\text{M}-$

$\text{CH}_3\text{-H}_2\text{O-C}_9\text{H}_{16}\text{O}_2]^+$  este último nos hizo pensar en la ruptura típica de la cadena lateral de los triterpenos del tipo del lanostano (figura 67).<sup>176</sup>

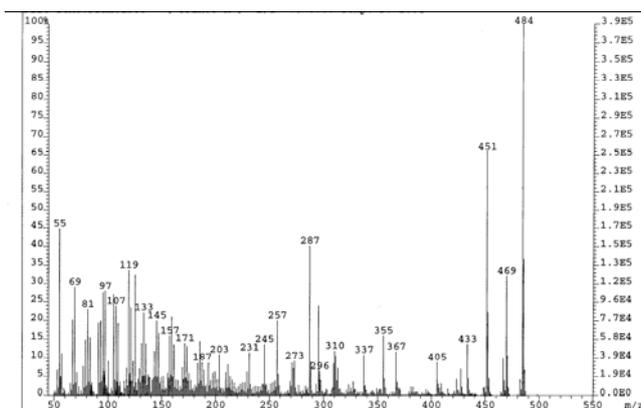


Figura 66. Espectro de masas de la sustancia L<sub>4</sub>.

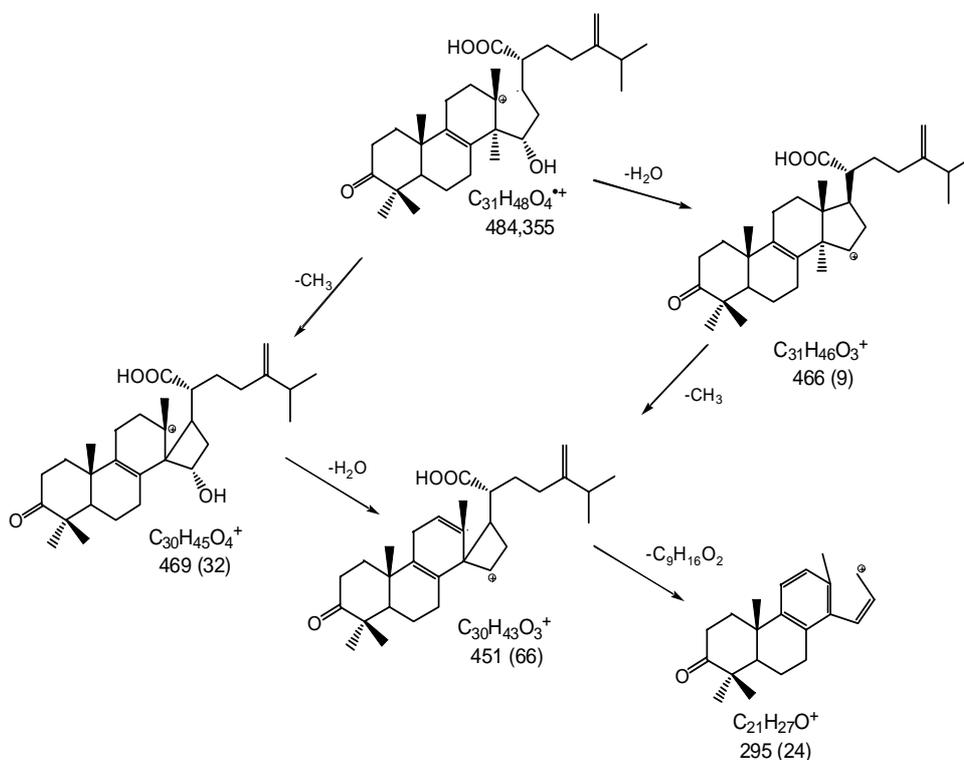


Figura 67. Fragmentaciones más importantes de la sustancia L<sub>4</sub>.

<sup>176</sup> Muccino, R. R.; Djerassi, C. "Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CCXXXIX. Elucidation of the ring D cleavage in lanostane" *J. Am. Chem. Soc.* 96, 1974, 556-570.

Los espectros de  $^1\text{H}$  (figura 68) y de  $^{13}\text{C}$  RMN (figura 69) dieron señales para un grupo metilénico, un hidroxi-metileno y siete metilos a  $\delta$  4.86 (1H, s,  $\text{H}_a$ -31) y 4.90 ppm (1H, s,  $\text{H}_b$ -31), 106.17; 4.64 (1H, dd,  $J = 5.7, 9.3$  Hz, H-15), 71.44; 1.00 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{CH}_3$ -26), 20.98; 1.01 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{CH}_3$ -27), 21.11; 1.03 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -28), 25.50; 1.04 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -19), 17.76; 1.12 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -29), 20.42; 1.19 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 16.04 y 1.30 ppm (3H, s,  $\text{CH}_3$ -30), 17.25 y un grupo carboxilo a 177.9.

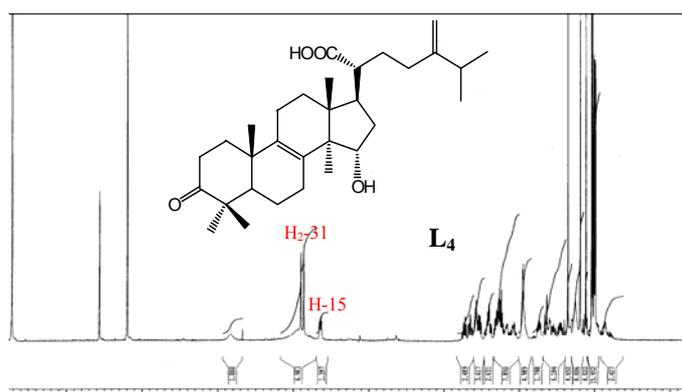


Figura 68. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia  $\text{L}_4$ .

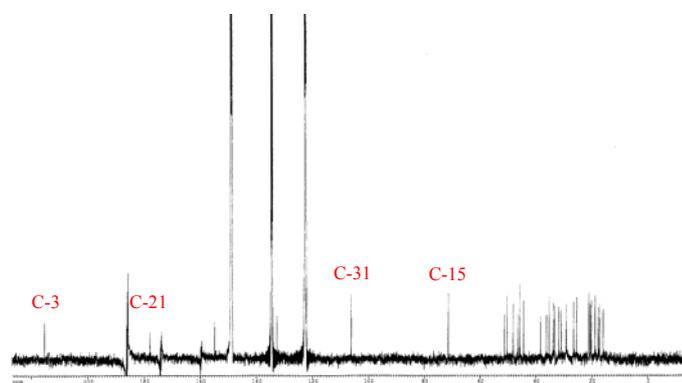
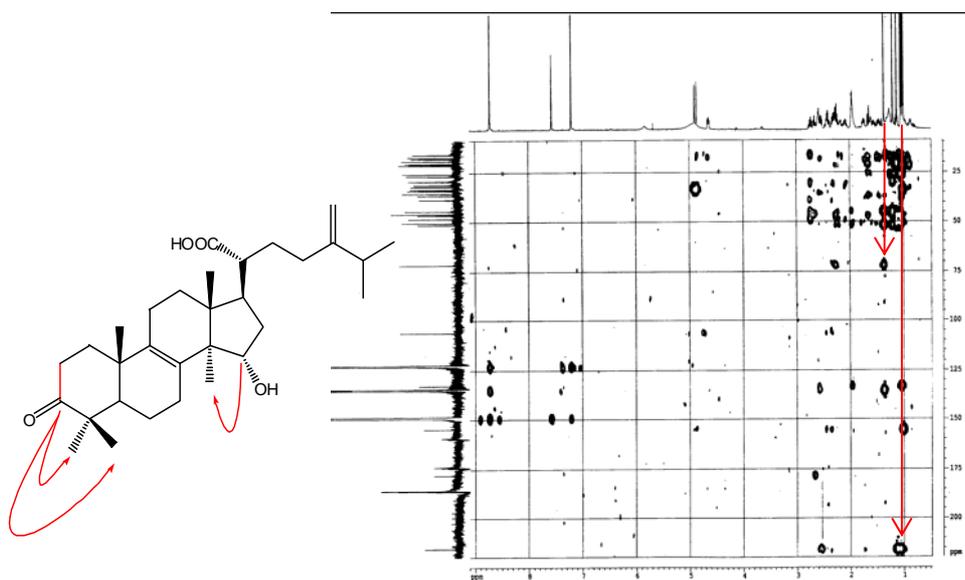


Figura 69. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la sustancia  $\text{L}_4$ .

Los dos singuletes a  $\delta$  4.86 y 4.90 ppm son característicos de un 24-metilenlanostano.<sup>177</sup> La comparación de los datos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN de nuestro triterpeno con los del ácido eburicóico, descrito anteriormente, nos permitieron fijar la posición del grupo carboxilo en C-21, las demás asignaciones fueron dadas en base a las correlaciones COSY, HSQC, HMBC, ROESY.

El experimento de HMBC (figura 70) muestra correlaciones del carbono de un grupo carbonilo a  $\delta$  215.39 ppm con los hidrógenos de los metilos en  $\text{CH}_3$ -28 y  $\text{CH}_3$ -29, de aquí se deduce que el grupo carbonilo se encuentra situado en el C-3.



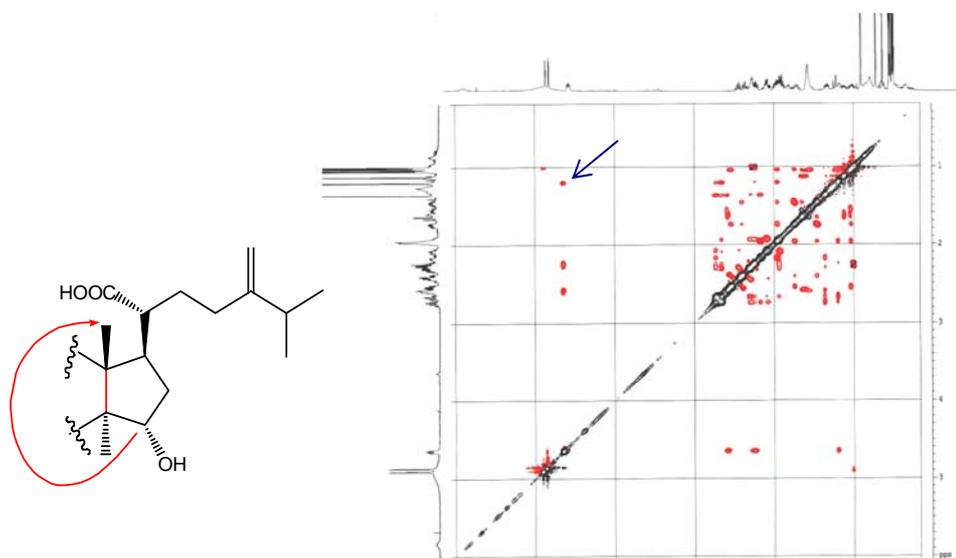
**Figura 70.** Experimento HMBC de la sustancia  $\text{L}_4$ .

También se observó correlaciones del carbono a  $\delta$  71.44 ppm con los hidrógenos del metilo en  $\text{CH}_3$ -30 lo que confirma la posición de un hidroxilo en el C-15.

Nosotros hemos dado la estereoquímica relativa del grupo hidroxilo en el anillo D mediante experimento ROESY (figura 71), así la correlación entre el hidrógeno

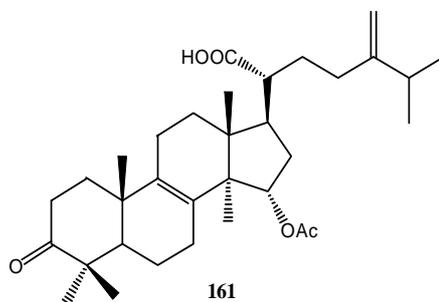
<sup>177</sup> Boonyaratavej, S.; Bates, R. B.; Caldera, S.; Suvannachut, K. "A new triterpenoid from *Bridelia tomentosa*" *J. Nat. Prod.* 53, **1990**, 209-211.

geminal del grupo hidroxilo en C-15 y el CH<sub>3</sub>-19 nos permitió asegurar que dicho hidroxilo está en disposición  $\alpha$ .



**Figura 71.** Experimento ROESY de la sustancia **L<sub>4</sub>**.

Finalmente, tratamiento de nuestro producto con Ac<sub>2</sub>O/piridina dio un acetato cuyas propiedades físicas y espectroscópicas fueron idénticas a las del ácido versispónico **C 161**.<sup>178</sup>



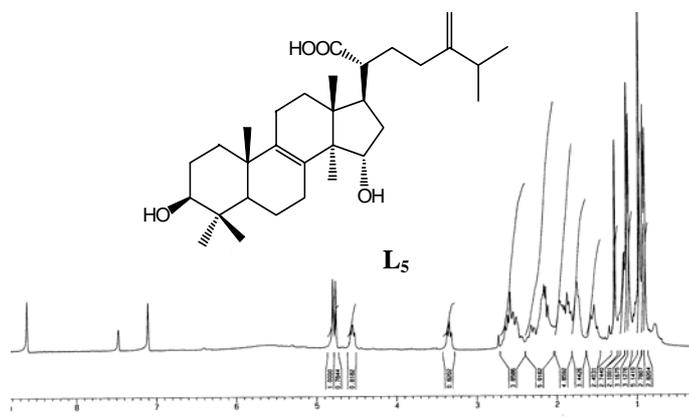
<sup>178</sup> Yoshikawa, K.; Matsumoto, K.; Mine, C.; Bando, S.; Arihara, S. "Five lanostane triterpenoids and three saponins from the fruit body of *Laetiporus versiporus*" *Chem. Pharm. Bull.* 48, **2000**, 1418-1421.

Según los datos anteriores; a nuestra sustancia, nueva en la bibliografía consultada, le hemos asignado la estructura del ácido 15 $\alpha$ -hidroxi-3-oxo-24-metilenlanosta-8-en-21-oico **L**<sub>4</sub>.

### SUSTANCIA **L**<sub>5</sub>

Sustancia aislada como un polvo amorfo,  $[\alpha]_D^{25}$  39.7° (*c* 3.3, piridina). Por espectrometría de masas se obtuvo un ion molecular a *m/z* 486.3713 (100) de acuerdo con la fórmula molecular C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>O<sub>4</sub> y fragmentos a *m/z* 471 (31) y a *m/z* 453 (89) correspondiente a la pérdida de un metilo y un grupo hidroxilo. Los espectros de <sup>1</sup>H (figura 72) y de <sup>13</sup>C RMN confirmaron la estructura de un triterpeno tipo lanostano, observándose señales para siete metilos, un metileno y protones geminales a grupos hidroxilos.

Por comparación de los datos espectroscópicos de las sustancias **L**<sub>4</sub> y **L**<sub>5</sub>, observamos que son semejantes diferenciándose solamente en que la sustancia **L**<sub>5</sub> posee un protón geminal a un hidroxilo en C-3 en lugar de un grupo carbonilo. Esto nos permitió identificar a la sustancia **L**<sub>5</sub> como el ácido sulfurénico.<sup>179</sup>



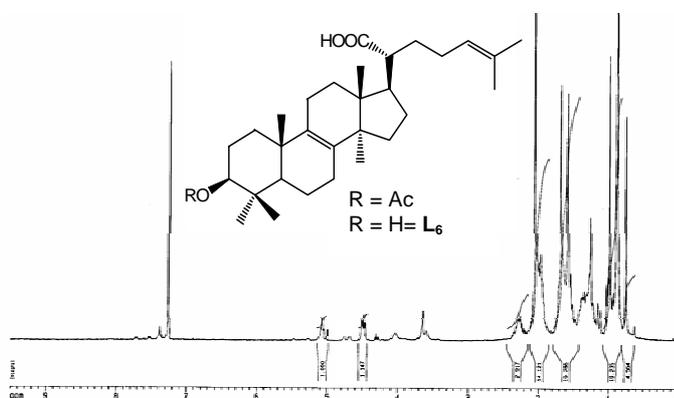
**Figura 72.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la sustancia **L**<sub>5</sub>.

<sup>179</sup> Batey, I. L.; Pinhey, J. T.; Ralph, B. J.; Simes, J. J. H. "Extractives of fungi, IV. The constituents of *Polyporus cretaceus* and *Daedalea trabea*" *Aust. J. Chem.* 25, **1979**, 2511-2515.

### SUSTANCIA L<sub>6</sub>

Aislada de la fracción E (ver parte experimental), la cual se purificó después de acetilar dando agujas de p.f. 190-194°C. Posee un ion molecular a  $m/z$  498.3666 correspondiente a la fórmula empírica C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>O<sub>4</sub> y dos fragmentos a  $m/z$  483 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> y 423 [M-CH<sub>3</sub>COOH]. Su espectro de IR presenta bandas de absorción a  $\nu_{\max}$  3280 cm<sup>-1</sup> típica de un grupo carboxílico y a  $\nu_{\max}$  1711 cm<sup>-1</sup> banda de acetato. Su espectro de <sup>1</sup>H RMN (figura 73) muestra seis singuletes a  $\delta$  0.75 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18), 0.87 (6H, s, CH<sub>3</sub>-28 y CH<sub>3</sub>-29), 0.98 (6H, s, CH<sub>3</sub>-19 y CH<sub>3</sub>-30), 1.58 (3H, s, CH<sub>3</sub>-26), 1.67 (3H, s, CH<sub>3</sub>-27) y 2.04 ppm (3H, s, OAc). También se observa un triplete a  $\delta$  5.08 (1H, t, J = 8.7 Hz, H-24) asignado a un protón vinílico situado en la cadena lateral en la posición  $\Delta^{24}$  típica de triterpenos con esqueleto de lanostano.<sup>180</sup>

Los datos anteriores concuerdan con los datos en la literatura para el ácido acetiltrametenólico, de donde se deduce que el ácido aislado por nosotros es el ácido trametenólico.<sup>181</sup>



**Figura 73.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN del acetato de la sustancia L<sub>6</sub>.

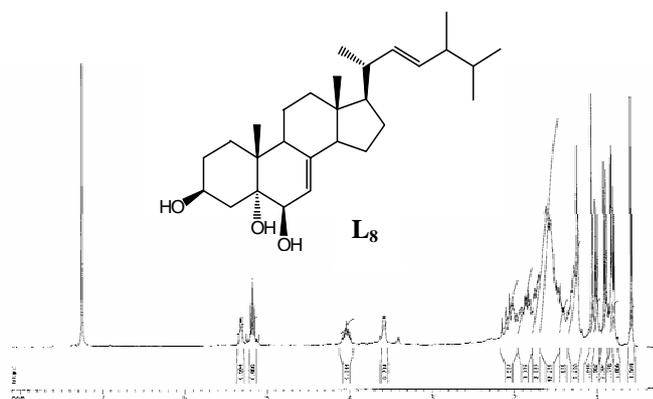
<sup>180</sup> Tai, T.; Akahori, A.; Shimgu, T. "Triterpenes of *Poria cocos*" *Phytochemistry* 32, **1993**, 1239-1244.

<sup>181</sup> Halsall, T. G.; Hodges, R.; Sayer, G. C. "The chemistry of the triterpenes and related compounds. Part XXXVI. Some constituents of *Trametes odorata* (Wulf.) Fr." *J. Chem. Soc.* **1959**, 2036-2040.



Esta sustancia se purificó por cromatografía de Sephadex LH-20 (n-hexano-CHCl<sub>3</sub>-metanol, 1:1:1) y TLC preparativa dando un sólido amorfo. Da positiva la reacción de Liebermann-Burchard para esteroides. El espectro de masas (FAB) reveló un ion molecular a  $m/z$  431.3541  $[M + H]^+$  correspondiente a la fórmula molecular C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>O<sub>3</sub>. De su espectro de IR pudimos deducir la presencia de grupos hidroxilos a  $\nu_{\max}$  3425 cm<sup>-1</sup> y dobles enlaces a  $\nu_{\max}$  1640, 815 cm<sup>-1</sup>. En el espectro de <sup>1</sup>H RMN (figura 75) se observa entre  $\delta$  0.58-1.06 ppm señales de seis metilos, a  $\delta$  3.59 ppm un doblete y a  $\delta$  4.03 ppm un multiplete característicos de los protones geminales a dos grupos hidroxilos. A  $\delta$  5.18 y 5.32 ppm se encuentran las señales correspondientes a tres protones vinílicos uno de ellos situado de acuerdo a los análisis espectroscópicos (COSY, HSQC, HMBC y NOESY) en el anillo B y los otros dos en la cadena lateral.

Los datos anteriores concuerdan con los datos en la bibliografía para el cerevisterol.<sup>184</sup>



**Figura 75.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la sustancia L<sub>8</sub>.

<sup>184</sup> Kawagishi, H.; Katsumi, R.; Sazawa, T.; Mizuno, T.; Hagiwara, T.; Nakamura, T. "Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*" *Phytochemistry* 27, **1988**, 2777-2779.

***PARTE EXPERIMENTAL***

El material analizado, *Laetiporus sulphureus* (Murr.) P. Bull.: Fr., fue recolectado en la finca “Plenilunio” en la región del Tequendama, Departamento de Cundinamarca, Colombia en Marzo de 2001, e identificado por el profesor Luís Henao del Instituto de Ciencias Naturales de Universidad Nacional de Colombia. Un ejemplar se encuentra en el Herbario Nacional Colombiano con el No. 484-328.

500 gramos de hongo seco fueron triturados hasta dar un polvo fino, el cual fue extraído con etanol (96%) hasta agotamiento durante una semana. El extracto etanólico se concentró a vacío para dar 20 gramos de un residuo que fue cromatografiado a través de una columna de gel de sílice y eluida con mezclas de n-hexano-acetato de etilometanol de polaridad creciente. Se tomaron fracciones de 2 L. Se analizaron por cromatografía en capa fina para luego reagruparlas tal como se indica en la tabla 4.

La purificación de las sustancias presentes en el hongo se llevó a cabo de la siguiente manera:

La fracción A eluida con n-hexano fue recromatografiada en CC con Sephadex LH-20 como fase estacionaria y eluida con n-hexano-CHCl<sub>3</sub>-metanol (2:2:1) rindiendo el conocido isopreno **L<sub>1</sub>**.

Las fracciones B y C, después de ser observadas en TLC analítica, resultaron tener los mismos componentes por lo que se reunieron y la mezcla resultante se cromatografió mediante sucesivas TLC preparativas eluyendo, inicialmente, con n-hexano-AcOEt (6:4) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona (9:1) obteniéndose las sustancias **L<sub>2</sub>** y **L<sub>3</sub>**.

La fracción D fue recromatografiada en CC de gel de sílice eluida con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y mezclas de polaridad creciente con acetona hasta el 10%, y posterior purificación por TLC preparativa usando como eluyente n-hexano-AcOEt (3:2, dos recorridos) rindiendo las sustancias **L<sub>4</sub>** y **L<sub>5</sub>**.

De la fracción E, después de acetilar con Ac<sub>2</sub>O/piridina y por posterior purificación mediante TLC preparativa usando como eluyente CCl<sub>4</sub>-dioxano (4:1, tres recorridos), pudimos separar en estado puro, el acetato de **L<sub>6</sub>**.

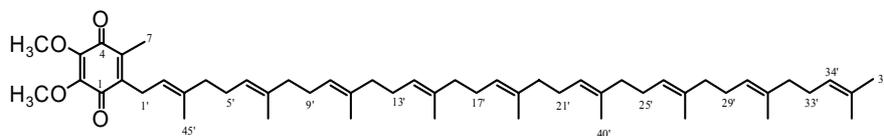
La fracción F se purificó utilizando sucesivas TLC preparativas, inicialmente con n-hexano-AcOEt (1:1) y  $\text{CHCl}_3$ - $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$  (4:1) obteniéndose en estado puro la sustancia **L**<sub>7</sub>.

Por último la fracción G fue recromatografiada en CC de Sephadex LH-20 eluida con n-hexano- $\text{CHCl}_3$ -metanol (1:1:1) y purificada mediante TLC preparativa eluida con  $\text{CHCl}_3$ -metanol (19:1, tres eluciones) pudimos obtener pura la sustancia **L**<sub>8</sub>.

**Tabla 4.** Sustancias aisladas de *L. sulphureus* por orden de elución.

| Fracción | Peso   | Eluyentes             | Sustancias   |
|----------|--------|-----------------------|--|
| A        | 220 mg | n-hexano              | Ubiquinona Q9, <b>L</b> <sub>1</sub> .   |
| B        | 800 mg | n-hexano: AcOEt (4:1) |  |
| C        | 250 mg | n-hexano: AcOEt (7:3) | Peróxido de ergosterol, <b>L</b> <sub>2</sub> ;<br>Ácido eburicoico, <b>L</b> <sub>3</sub>     |
| D        | 134 mg | n-hexano: AcOEt (3:2) | Ácido 3-oxo-sulfurénico, <b>L</b> <sub>4</sub> ;<br>ácido sulfurénico, <b>L</b> <sub>5</sub> . |
| E        | 350 mg | n-hexano: AcOEt (1:1) | Ácido trametenólico, <b>L</b> <sub>6</sub> .   |
| F        | 350 mg | AcOEt                 | Ácido 15- $\alpha$ -hidroxitrametenólico, <b>L</b> <sub>7</sub> .                              |
| G        | 200 mg | AcOEt: MeOH (4:1)     | Cerevisterol, <b>L</b> <sub>8</sub> .  |

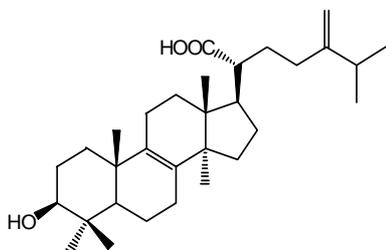
#### Sustancia **L**<sub>1</sub>: Ubiquinona Q9.



Sólido amorfo, color rojo intenso 12 mg; UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 271 (4.03), 214 (5.02) nm; IR  $\nu_{\text{max}}$  (film, KBr): 2930, 1645, 1610, 1250, 1020  $\text{cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 794.6241 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup> ( $\text{C}_{54}\text{H}_{82}\text{O}_4$ , calcd 794.6313) (8), 796 (5), 795 (5), 236 (14), 235 (100), 197 (50), 196 (11), 161 (11), 149 (12), 137 (12), 135 (24), 121 (23); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.59 (24H, br s, 7-Me-44', 43', 42', 41', 40', 39', 38'), 1.67 (6H, s, 2-Me-36', 37'), 1.73 (3H, s, Me-45'), 1.97 (16H, m, 8- $\text{CH}_2$  4', 8', 12', 16', 20', 24', 28', 32'), 2.01 (3H, s, Me-7), 2.07 (16H, m,  $\text{CH}_2$ -5', 9', 13', 17', 21', 25', 29', 33'), 3.18 (2H, d, J = 6.9 Hz,  $\text{CH}_2$ -1'), 3.97, 3.98 (6H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 4.93 (1H, t, J = 6.8 Hz, H-2'), 5.09 (8H, m, H-6', 10', 14', 18', 22', 26', 30', 34'); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 11.9 (C-7), 16.0 (C-44', 43', 42', 41', 40', 39' y 38'), 16.3 (C-45'), 23.4 (C-36' y 37'), 25.1 (C-1'), 26.6 (C-5', 9', 13', 17', 21', 25', 29' y 33'), 39.8 (C-4', 8', 12', 16', 20', 24', 28' y 32'), 61.2 (C-2- $\text{OCH}_3$ ), 118.8 (C-2'), 124.0-124.9 (C-6', 10', 14', 18', 22', 26', 30' y 34'), 131.2 (C-35'), 134.6-135.2 (C-7', 11', 15', 19', 23', 27' y 31'), 137.6 (C-3'), 138.8 (C-6), 141.7 (C-5), 144.2 (C-2), 144.3 (C-3), 183.8 (C-1), 184.7 (C-4).

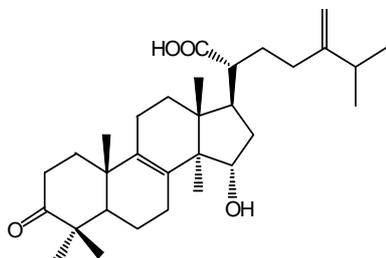
**Sustancia L<sub>2</sub>:** Sólido cristalino, 11 mg, constantes físicas y espectroscópicas idénticas a la sustancia G<sub>5</sub> (ver página 74)

**Sustancia L<sub>3</sub>:** Ácido eburicoico.



Sólido cristalino 190 mg; p.f.: 272-274°C;  $[\alpha]_D$ : +37 (c 0.9, Piridina); IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3250, 2965, 1719, 1010  $\text{cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 470.3695  $[M]^+$  ( $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_3$ , calcd 470.3759) (97), 456 (36), 455 (92), 438 (33), 437 (100), 409 (14), 341 (11) 299 (12), 281 (22), 213 (12), 187 (35), 174 (23);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , Piridina- $d_5$ ): 0.97 (3H, s, Me-18), 0.99 (9H, s, Me-26, 27, 29; solapados), 1.03 (3H, s, Me-30), 1.07 (3H, s, Me-19), 1.20 (3H, s, Me-28), 2.61 (1H, td,  $J = 3.4, 10.9$  Hz, H-20 $\alpha$ ), 3.39 (1H, t,  $J = 8.5$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 4.85 (1H, s, H<sub>a</sub>-31), 4.89 (1H, s, H<sub>b</sub>-31);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , Piridina- $d_5$ ): 16.0 (C-18), 16.1 (C-29), 18.5 (C-6), 19.1 (C-19), 21.0 (C-11), 21.6 (C-27), 21.7 (C-26), 24.2 (C-30), 26.6 (C-16), 27.2 (C-2), 28.3 (C-28), 28.4 (C-7), 29.1 (C-12), 30.6 (C-15), 31.6 (C-22), 32.5 (C-23), 34.0 (C-25), 35.9 (C-1), 37.1 (C-10), 39.3 (C-4), 44.7 (C-13), 47.5 (C-17), 48.9 (C-20), 49.6 (C-14), 50.7 (C-5), 77.8 (C-3), 106.8 (C-31), 134.0 (C-8), 135.2 (C-9), 155.7 (C-24), 178.3 (C-21).

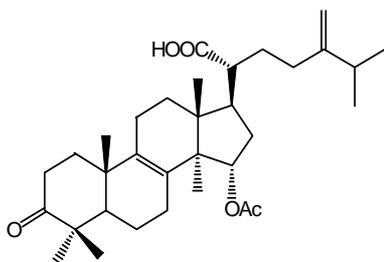
**Sustancia L<sub>4</sub>:** Ácido 3-oxo-sulfurénico



Sólido amorfo, 12 mg; p.f.: 209-211 °C;  $[\alpha]_D$ : + 15 (c 0.4, EtOH); UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 278 (2.86) nm; IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3333, 2920, 1709, 1674, 1454, 1377, 1279, 1053, 887  $\text{cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 484.3522  $[M]^+$  ( $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_4$ , calcd 484.3552) (100), 469 (32), 451 (66), 295 (24), 287 (40), 257 (20);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , Piridina- $d_5$ ): 1.00 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, Me-26), 1.01 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, Me-27), 1.03 (3H, s, Me-28), 1.04 (3H, s, Me-19), 1.12 (3H, s, Me-29), 1.19 (3H, s, Me-18), 1.30 (3H, s, Me-30), 1.45 (1H, ddd,  $J = 12.6, 11.6, 7.1$  Hz, H<sub>a</sub>-1), 1.55 (2H, m, H<sub>2</sub>-6), 1.65 (1H, dd,  $J = 12.5, 3.8$  Hz, H-5 $\alpha$ ), 1.74 (1H, ddd,  $J = 12.0, 7.2, 3.8$  Hz, H<sub>b</sub>-1), 1.90 (1H, m, H<sub>a</sub>-12), 1.95 (2H, m, H<sub>2</sub>-11), 2.11 (2H, m, H<sub>2</sub>-22), 2.20 (1H, m, H<sub>b</sub>-12), 2.25 (2H, m, H<sub>2</sub>-16), 2.30 (1H, m, H<sub>a</sub>-23), 2.31 (1H, m, H-25), 2.40 (1H, m, H<sub>b</sub>-23), 2.53 (1H, dd,  $J = 3.8, 8.6$  Hz, H-2 $\beta$ ), 2.59 (1H, m, H-2 $\alpha$ ), 2.59 (2H, m, H<sub>2</sub>-7), 2.65 (1H, dt,  $J = 3.0, 10.8$  Hz, H-20), 2.73 (1H, t,  $J = 9.4$  Hz, H-17 $\alpha$ ), 4.64 (1H, dd,  $J = 5.7, 9.3$  Hz, H-15 $\beta$ ), 4.86 (1H, s, H<sub>a</sub>-31), 4.90 (1H, s, H<sub>b</sub>-31);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , Piridina- $d_5$ ): 16.04 (C-18), 17.25 (C-30), 17.76 (C-19), 18.88 (C-6), 20.23 (C-11), 20.42 (C-29), 20.98 (C-

26), 21.11 (C-27), 25.50 (C-28), 26.52 (C-7), 29.17 (C-12), 30.92 (C-22), 31.83 (C-23), 33.29 (C-25), 33.80 (C-2), 35.30 (C-1), 36.29 (C-10), 38.36 (C-16), 44.45 (C-13), 45.82 (C-17), 46.44 (C-4), 48.22 (C-20), 50.34 (C-5), 51.32 (C-14), 71.44 (C-15), 106.17 (C-31), 132.66 (C-8), 134.00 (C-9), 154.92 (C-24), 177.90 (C-21), 215.39 (C-3).

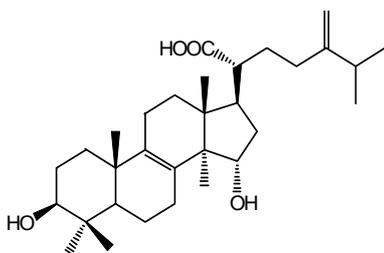
#### Acetilación de la sustancia L<sub>4</sub>.



5 mg de L<sub>4</sub> se disolvieron en piridina y se le adicionó un exceso de anhídrido acético (Ac<sub>2</sub>O), se dejó en agitación durante 24h a temperatura ambiente, al término de la reacción se concentró a vacío y se purificó empleando cromatografía preparativa de gel de sílice en el sistema n-hexano-AcOEt (8:2, dos eluciones), obteniéndose el ácido versispónico C. 5 mg;  $[\alpha]_D^{25}$ : +58, (*c* 0.07, CHCl<sub>3</sub>); EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 526.3685 [M]<sup>+</sup>

(C<sub>33</sub>H<sub>50</sub>O<sub>5</sub>, calcd 526.3658) (52), 466 (73), 451 (67), 423 (11), 383 (14), 370 (30), 367 (15), 352 (22), 311 (85), 309 (53), 295 (31), 257 (100), 244 (51), 229 (20), 185 (22); <sup>1</sup>H RMN (δ, Piridina-*d*<sub>5</sub>): 1.00 (6H, s, Me-19 y Me-28), 1.03 (6H, d, J = 6.7 Hz, Me-26 y Me-27), 1.13 (3H, s, Me-18), 1.15 (3H, s, Me-29), 1.21 (3H, s, Me-30), 2.18 (3H, s, Me-OAc), 4.88 (1H, s, H<sub>a</sub>-31), 4.91 (1H, s, H<sub>b</sub>-31), 5.41 (1H, dd, J = 5.4, 9.2 Hz, H-15β); <sup>13</sup>C RMN (δ, Piridina-*d*<sub>5</sub>): 17.5 (C-18), 19.3 (C-19 y C-30), 19.4 (C-6), 20.4 (C-11), 22.1 (C-26), 22.2 (C-27), 22.7 (C-OAc), 22.8 (C-29), 27.2 (C-28), 27.4 (C-7), 30.3 (C-12), 32.6 (C-22), 33.5 (C-23), 35.1 (C-25), 35.5 (C-2), 36.8 (C-1), 36.9 (C-16), 38.0 (C-10), 46.0 (C-13), 47.4 (C-17), 48.2 (C-4), 49.7 (C-20), 51.9 (C-14), 52.1 (C-5), 76.7 (C-15), 107.9 (C-31), 134.7 (C-8), 135.6 (C-9), 156.6 (C-24), 171.7 (C-OAc), 179.3 (C-21), 216.9 (C-3).

#### Sustancia L<sub>5</sub>: Ácido sulfurénico.



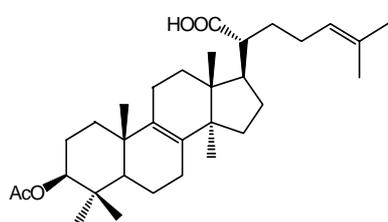
Sólido amorfo, 30 mg;  $[\alpha]_D^{25}$ : +39.7°, (*c* 3.3, Py); IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3560, 3280, 1710, 1265 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 486.3713 [M]<sup>+</sup> (C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>O<sub>4</sub>, calcd 486.3709) (100), 471 (31), 468 (23), 454 (30), 453 (89), 435 (52), 297 (14), 289 (22), 279 (18), 258 (13), 241 (17), 215 (14), 199 (12), 187 (63), 185 (21), 173 (29), 171 (20); <sup>1</sup>H RMN (δ, Piridina-*d*<sub>5</sub>): 0.91 (6H, d, J = 6.8 Hz, Me-26 y Me-27), 0.97 (3H, s, Me-29 y Me-19), 1.10 (3H, s, Me-28), 1.13 (3H, s, Me-18), 1.27 (3H, s, Me-30), 3.34 (1H, t, J = 7.4 Hz, H-3α), 4.55 (1H, t, J = 7.8 Hz, H-15β), 4.76 (1H, s, H<sub>a</sub>-31), 4.80 (1H, s, H<sub>b</sub>-31); <sup>13</sup>C RMN (δ, Piridina-*d*<sub>5</sub>): 17.6 (C-29), 18.1 (C-18), 19.4 (C-30), 20.1 (C-6), 20.6 (C-19), 22.4 (C-11), 23.1 (C-26), 23.2 (C-27), 28.9 (C-7), 29.8 (C-28), 30.0 (C-2), 31.4 (C-12), 33.1 (C-22), 33.9 (C-23), 35.4 (C-25), 37.4 (C-1), 38.8 (C-10), 40.5 (C-16), 40.7

(C-4), 46.7 (C-13), 47.9 (C-17), 50.3 (C-20), 52.1 (C-5), 53.4 (C-14), 73.7 (C-15), 79.3 (C-3), 108.3 (C-31), 136.2 (C-8), 138.4 (C-9), 157.1 (C-24), 180.0 (C-21).

### Acetilación de la fracción E.

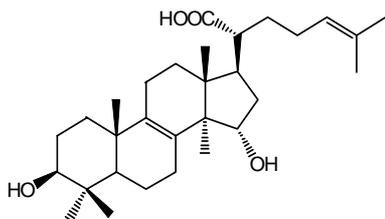
350 mg se disolvieron en piridina y se le adicionó un exceso de  $\text{Ac}_2\text{O}$  a  $25^\circ\text{C}$ , después de 10 h de reacción, se le adicionó una solución diluida de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ). El exceso de piridina fue eliminado con una disolución acuosa de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), extracción con cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) y posterior purificación por cromatografía preparativa TLC utilizando como eluyente  $\text{CCl}_4$ -dioxano (4:1, tres eluciones) se obtuvo pura la sustancia **L<sub>6</sub>**.

### Acetato de **L<sub>6</sub>**: Acetil trametenólico.



Sólido cristalino 10 mg; p.f.:  $190\text{-}194^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha]_D$ :  $+61$  (*c* 0.9,  $\text{CHCl}_3$ ); IR  $\nu_{\text{max}}$  (film, KBr): 3280, 1735, 1711, 1649,  $1265\text{ cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 498.3666  $[\text{M}]^+$  ( $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$ , calcd 498.3709) (38), 483 (30), 481 (26), 437 (61), 423 (100), 353 (11), 281 (36), 227 (15), 187 (42), 173 (28), 159 (46);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.75 (3H, s, Me-18), 0.87 (6H, s, Me-28 y Me-29), 0.98 (6H, s, Me-19 y 30), 1.58 (3H, s, Me-26), 1.67 (3H, s, Me-27), 2.04 (3H, s, OAc), 4.48 (1H, dd,  $J = 4.5, 10.6$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 5.08 (1H, t,  $J = 8.7$  Hz, H-24);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 16.0 (C-18), 16.5 (C-29), 17.6 (C-26), 18.1 (C-6), 19.2 (C-19), 20.9 (C-11), 21.3 (OAc), 24.3 (C-2 y C-30), 25.7 (C-27), 26.0 (C-23), 26.3 (C-7), 27.1 (C-15), 27.9 (C-28), 28.9 (C-16), 30.3 (C-12), 32.5 (C-22), 35.4 (C-1), 36.9 (C-10), 37.8 (C-4), 44.3 (C-13), 47.2 (C-17), 47.5 (C-20), 49.5 (C-14), 50.5 (C-5), 80.7 (C-3), 123.6 (C-24), 132.2 (C-25), 134.1 (C-8), 134.3 (C-9), 169 (OAc), 182.0 (C-21).

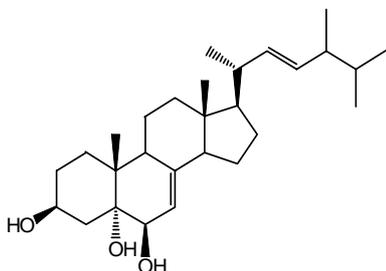
### Sustancia **L<sub>7</sub>**: Ácido 15- $\alpha$ -hidroxitrametenólico



Sólido cristalino 9 mg; p.f.:  $248\text{-}249^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha]_D$ :  $+37.1^\circ$  (*c* 0.05, Piridina); IR  $\nu_{\text{max}}$  (film, KBr): 3413, 2930, 1740, 1415, 1070,  $1010\text{ cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 472.3558  $[\text{M}]^+$  ( $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$ , calcd 472.3552) (89), 457 (27), 454 (23), 439 (87), 436 (31), 421 (100), 418 (54), 403 (79), 375 (28), 294 (86), 289 (24), 279 (83), 241 (27), 225 (22), 209 (24);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , Piridina- $d_5$ ): 1.00 (3H, s, Me-19), 1.03 (3H, s, Me-18), 1.07 (3H, s, Me-29), 1.22 (3H, s, Me-30), 1.37 (3H, s, Me-28), 1.60 (3H, s, Me-27), 1.62 (3H, s, Me-26), 3.44 (1H, t,  $J = 8.1$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 4.63 (1H, dd,  $J = 6.0, 9.5$  Hz, H-15 $\beta$ ), 5.28 (1H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-24);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 16.2 (C-29), 16.7 (C-18), 18.1 (C-27 y C-30), 18.7 (C-6), 19.3 (C-19), 21.0 (C-11), 25.6 (C-26), 26.7

(C-23), 27.6 (C-7), 28.6 (C-2), 30.0 (C-12), 33.2 (C-22), 36.1 (C-1), 37.4 (C-10), 39.2 (C-16), 39.4 (C-4), 45.3 (C-13), 46.6 (C-17), 48.9 (C-20), 50.8 (C-5), 52.0 (C-14), 72.4 (C-15), 78.0 (C-3), 124.8 (C-24), 131.7 (C-25), 135.0 (C-8 y C-9), 178.9 (C-21).

**Sustancia L<sub>8</sub>:** Cerevisterol



Sólido amorfo 9 mg;  $[\alpha]_D$ : -59 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3425, 2930, 2880, 1640, 1410, 1070, 1010, 815 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 412 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (72), 397 (20), 394 (47), 383 (48), 379 (77), 337 (11), 285 (5), 287 (7), 267 (9), 269 (35), 251 (44), 197 (16), 175 (17), 159 (14), 145 (17), 133 (18), 125 (18), 69 (100); HRFABMS 431.3541 [M+ H]<sup>+</sup> (C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>O<sub>3</sub>, calcd 431.3525); <sup>1</sup>H

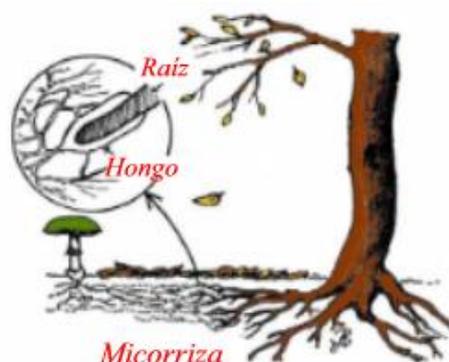
RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD): 0.58 (3H, s, Me-18), 0.81 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, Me-27), 0.82 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, Me-26), 0.90 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, Me-28), 1.01 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, Me-21), 1.06 (3H, s, Me-19), 3.59 (1H, d, *J* = 5.1 Hz, H-6 $\alpha$ ), 4.03 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 5.18 (2H, t, *J* = 7.1 Hz, H-22 y H-23), 5.32 (1H, t, *J* = 2.5 Hz, H-7); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD): 12.3 (C-18), 17.5 (C-28), 18.7 (C-19), 19.6 (C-21), 19.9 (C-26), 21.1 (C-27), 22.0 (C-11), 22.9 (C-15), 27.8 (C-16), 30.7 (C-2), 33.0 (C-1 y C-25), 37.1 (C-10), 39.2 (C-4 y C-12), 40.3 (C-20), 42.8 (C-24), 43.4 (C-9), 43.7 (C-13), 54.7 (C-14), 56.0 (C-17), 67.6 (C-3), 73.5 (C-6), 76.1 (C-5), 117.5 (C-7), 132.2 (C-22), 135.4 (C-23), 143.8 (C-8).

**PARTE III**

**ESTUDIO DEL HONGO *SUILLUS LUTEUS*.**

## ***INTRODUCCIÓN***

Como sabemos, en los ecosistemas terrestres, los hongos son un componente de la mayoría de los ciclos biogeoquímicos.<sup>185</sup> La mayoría de los hongos superiores son saprofitos y degradan macromoléculas orgánicas (lignina, celulosa, etc...), mientras que los hongos micorrizos, simbioses con las raíces de plantas, buscan activamente nutrientes para ellas.<sup>186</sup> Por tal razón, las poblaciones de basidiomicetos ectomicorrizos constituyen un factor determinante en la salud de los bosques.<sup>187</sup> Esto les lleva a tener implicaciones económicas importantes en el cultivo de especies de árboles maderables (eucaliptos y pinos entre otros) para ello se selecciona el hongo adecuado y es inoculado a cada tipo de árbol.<sup>188</sup>



Entre los órdenes más comunes de basidiomicetos ectomicorrizos podemos encontrar, entre otros, los Boletales, Agaricales y Russulales. Una de las familias pertenecientes al primer orden mencionado es la denominada Suillaceae, de la que podemos destacar un género cosmopolita que presenta diversos usos y aplicaciones. Este género es el *Suillus* que, debido a su amplia distribución en el mundo, ha sido utilizado como modelo en la interacción simbiótica exclusiva con pinos,<sup>189</sup> mostrando además, un

<sup>185</sup> Hogberg, P.; Plamboeck, A. H.; Taylor, A. F. S.; Fransson, P. M. A. "Natural <sup>13</sup>C abundance reveals trophic status of fungi and host-origin of carbon in mycorrhizal fungi in mixed forest" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, **1999**, 8543-8539.

<sup>186</sup> Smith, S. E.; Read, D. J. "Mycorrhizal Symbiosis" Academic press, San Diego, **1997**.

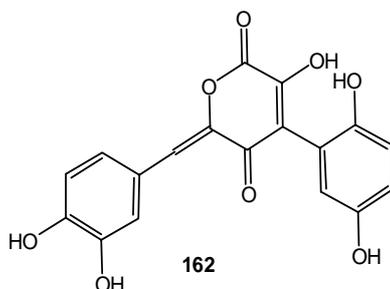
<sup>187</sup> Dahlberg, A.; Jonson, L.; Nylund, J. E. "Specie diversity and distribution of biomass above and below ground among ectomycorrhizal fungi in an old-growth Norway spruce forest in south Sweden" *Can. J. Bot.* 75, **1997**, 1323-1335.

<sup>188</sup> Selosse, M. A.; Jacquot, D.; Bouchard, D.; Martín, F.; Le Tacon, F. "Temporal persistente and spatial distribution of an american inoculant strain of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* in European forest plantation" *Mol. Ecol.* 7, **1998**, 561-573.

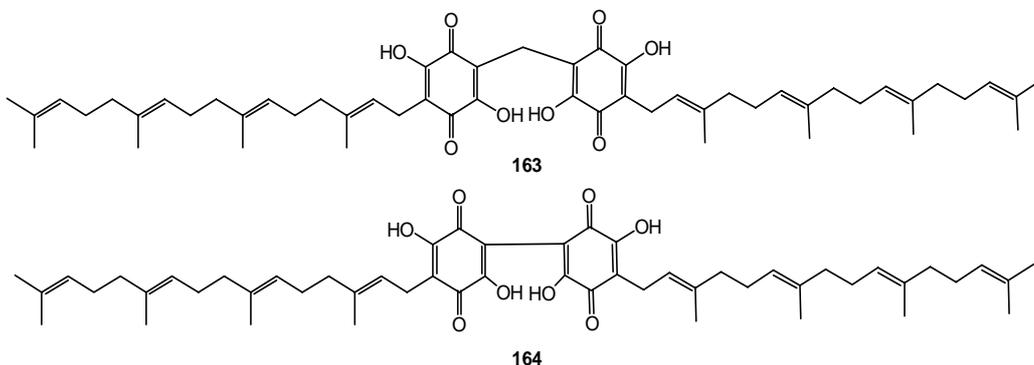
<sup>189</sup> Bonfante, P.; Balestrini, R.; Martino, E.; Perotto, S.; Plassard, C.; Mousain, D. "Morphological analysis of early contacts between pine roots and two ectomycorrhizal *Suillus* strain" *Mycorrhiza* 8, **1998**, 1-10.

poder de degradación de contaminantes en el suelo tanto para hidrocarburos aromáticos policíclicos<sup>190</sup> como frente a metales pesados.<sup>191</sup>

En cuanto a las investigaciones químicas de este género se tienen precedentes de compuestos quinónicos como la grevillina D **162** aislada de *Suillus granulatus*, *S. luteus* y *S. placidus*, su origen biogénico fue establecido a través de la ruta del acetato.<sup>192</sup>



Del *Suillus bovinus* se han aislado quinonas como la ametinona **163**<sup>193</sup> y la diboviquinona 4,4 **164**, esta última sustancia presenta en su forma emulsificada una alta actividad antioxidante.<sup>194</sup>



<sup>190</sup> Braun-Lulleman, A.; Huttermann, A.; Majcherczyk, A. "Screening of ectomycorrhizal fungi for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, **1999**, 127-132.

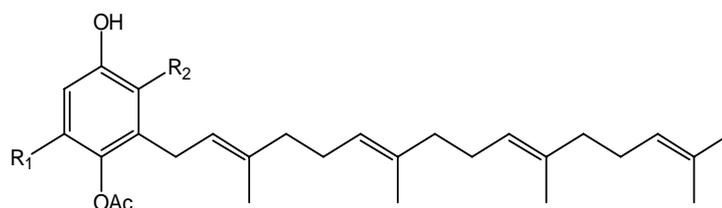
<sup>191</sup> Grazzioti, P. H.; Siquiera, J. O.; Moreira, F. M.; Carvalho, D. "Tolerance of ectomycorrhizal fungi to heavy metals in culture with contaminated soil" *Rev. Bras. Ciencia Solo* 25, **2001**, 839-848.

<sup>192</sup> Besl, H.; Michler, I.; Preuss, R.; Steglich, W. "Pigments of fungi. XXII. Grevillin D, the main pigment of *Suillus granulatus*, *S. luteus*, and *S. placidus* (Boletales)" *Z. Naturforsch. B.* 29, **1974**, 784-786.

<sup>193</sup> Minami, K.; Asawa, K.; Sawada, M. "Structure of amitenone" *Tetrahedron* 49, **1968**, 5067-5070.

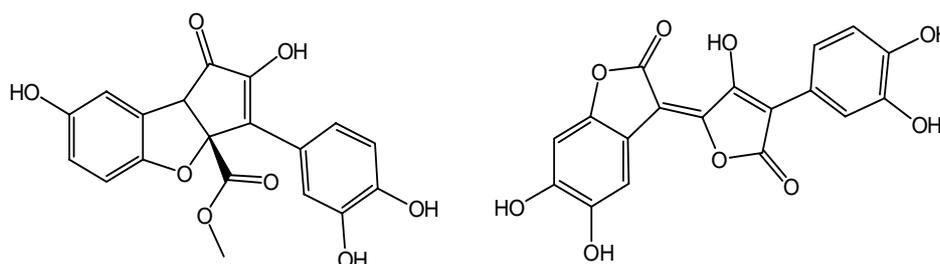
<sup>194</sup> Guenther, T.; Perner, B.; Gramos, G. "Antioxidant activity of fungus *Suillus bovinus* (L:Fr.) O. Kuntze" *J. Food Sci.* 60, **1995**, 1113-1115.

También se han obtenido compuestos con estructura de tetraprenilfenol como el bolegrevilol **165**, aislado de *Suillus grevillei* y la suillina **166** aislada de *S. granulatus* y *S. bovinus*, este compuesto presenta actividades inmunosupresora,<sup>195</sup> antibacterial y citotóxica frente a células KB.<sup>196</sup>



**165:** R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = H  
**166:** R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = OH

También podemos encontrar benzofuranos como el suillusina **167** aislado de *Suillus granulatus*<sup>197</sup> y el pigmento variegatorubina **168** aislado de *Suillus piperatus*.<sup>198</sup>



**167**

**168**

<sup>195</sup> Shirata, K.; Kato, T.; Niwano, M. "Selective supresión of the mitogenic response of murine lymphocytes by suillin from *Suillus bovinus*" *Mycologia* **87**, **1995**, 360-361.

<sup>196</sup> Tringali, C.; Geraci, C.; Nicolosi, G.; Verbist, J. F.; Roussakis, C. "An antitumor principle from *Suillus granulatus*" *J. Nat. Prod.* **52**, **1989**, 844-845.

<sup>197</sup> Yun, B. S.; Kang, H. C.; Koshino, H.; Yu, S. H.; Yoo, I. D. "Suillusin, a unique benzofuran from the mushroom *Suillus granulatus*" *J. Nat. Prod.* **64**, **2001**, 1230-1231.

<sup>198</sup> Steglisch, W.; Furtner W.; Prox, A. "Fungi pigments. V. Variegatorubin, an oxidation product of variegatic acid from *Suillus piperatus* and other Boletaceae" *Z. Naturforsch. B.* **25**, **1970**, 557-558.

Como continuación de nuestras investigaciones químicas sobre los metabolitos aislados de hongos, en la presente Tesis Doctoral hemos estudiado el basidiomicete *Suillus luteus*.

## ***PARTE TEÓRICA***

## **AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL.**

Del extracto del hongo y tal como describimos en la parte experimental, se aislaron las siguientes sustancias: seis esteroides **S**<sub>1-3</sub>, **S**<sub>7</sub>, **S**<sub>9</sub> y **S**<sub>10</sub>, un tetraprenilfenol **S**<sub>4</sub>, un derivado del ácido cinámico **S**<sub>5</sub>, una nueva ceramida **S**<sub>6</sub>, un glicérido **S**<sub>8</sub> y un derivado del ácido benzoico **S**<sub>11</sub>.

### **SUSTANCIA S<sub>1</sub>**

Se obtuvo como un sólido cristalino de p.f. 104-107°C. Da positiva la reacción de Liebermann-Burchard para esteroides. Su espectro de IR muestra señales a  $\nu_{\max}$  1663 y a 880  $\text{cm}^{-1}$  asignadas a una cetona insaturada y dobles enlaces. Tanto las constantes físicas como espectroscópicas de la sustancia **S**<sub>1</sub> fueron coincidentes con las del ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona aislada por nosotros del *Ganoderma lucidum*.<sup>199</sup>

### **SUSTANCIA S<sub>2</sub>**

Se presenta como un sólido cristalino de p.f. 166-168°C. Da positiva la reacción de Liebermann-Burchard para esteroides. Su espectro de masas da un peso molecular de  $m/z$  396 correspondiente a la fórmula empírica  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$ , así como las rupturas típicas del ergosterol. La sustancia **S**<sub>2</sub> fue identificada como el ergosterol, aislada por nosotros del *Ganoderma lucidum*.<sup>200</sup>

### **SUSTANCIA S<sub>3</sub>**

Sustancia pura por capa fina, posee un p.f. 177-179°C. Su espectro de masas muestra un pico molecular a  $m/z$  428 correspondiente a la fórmula empírica  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ . En dicho espectro se observan también las rupturas típicas de la cadena del ergosterol.

---

<sup>199</sup> Ver presente Tesis Doctoral, págs 58-60.

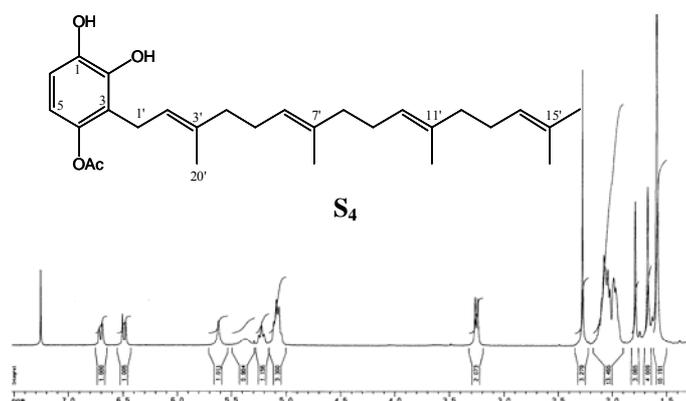
<sup>200</sup> Ver presente Tesis Doctoral, pág. 57.

Consultada la bibliografía, identificamos la sustancia **S<sub>3</sub>** como peróxido de ergosterol aislado por nosotros del *Ganoderma lucidum*.<sup>201</sup>

### SUSTANCIA S<sub>4</sub>

Se obtuvo como un aceite, su espectro de masas muestra un pico molecular a  $m/z$  440.2554 correspondiente a la fórmula molecular  $C_{28}H_{40}O_4$  y una fragmentación a  $m/z$  398 típica de la pérdida de acetato. En su espectro de IR se observan bandas a  $\nu_{\max}$  3460, 1744, 1615 y 845  $cm^{-1}$  asignadas a hidroxilos, acetato, aromático y dobles enlaces.

En su espectro de  $^1H$  RMN (figura 76) aparecen entre  $\delta$  1.59-1.79 ppm señales correspondientes a cinco grupos metilos sobre dobles enlaces, un singlete a  $\delta$  2.27 ppm asignado a un grupo acetato y dos dobletes a  $\delta$  6.49 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-5) y 6.70 ppm (1H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-6) correspondientes a protones aromáticos. Tanto los espectros de masas como el de IR,  $^1H$ - $^{13}C$  RMN de la sustancia **S<sub>4</sub>** fueron superponibles con los de la suillina aislada con anterioridad del hongo *Suillus granulatus*.<sup>196</sup>

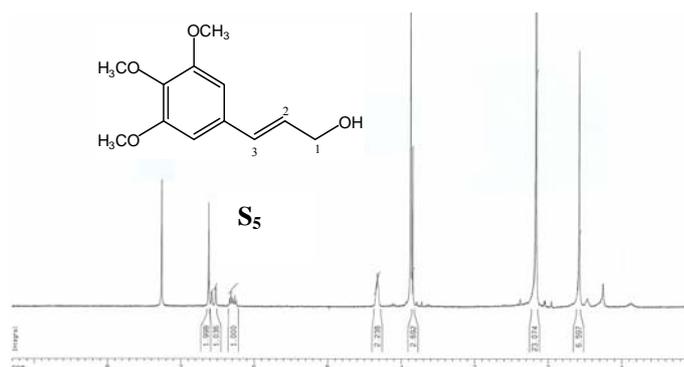


**Figura 76.** Espectro de  $^1H$  RMN de la sustancia **S<sub>4</sub>**.

<sup>201</sup> Ver presente Tesis Doctoral, pág. 58.

**SUSTANCIA S<sub>5</sub>**

Se obtuvo al igual que S<sub>4</sub> como un aceite, con un peso molecular de  $m/z$  224 correspondiéndole una fórmula molecular C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>. Su espectro de IR presenta una banda de absorción a  $\nu_{\max}$  3460 cm<sup>-1</sup> característica de un grupo hidroxilo y otra a  $\nu_{\max}$  1640 cm<sup>-1</sup> típica de un anillo aromático. El espectro de <sup>1</sup>H RMN (figura 77) muestra en la región de los protones olefinicos señales a  $\delta$  6.32 (1H, dt, J = 5.2, 15.8 Hz, H-2) y 6.52 ppm (1H, dd, J = 1.7 y 15.8 Hz, H-3) correspondientes al doble enlace  $\Delta^2$  de la cadena lateral del alcohol *trans* cinámico y otras señales a  $\delta$  6.72 (2H, s, H-2' y H-6'), 3.70 (3H, s, OMe) y 3.82 ppm (6H, s, 2 x OMe) asignadas a dos protones y tres metoxilos situados en un anillo aromático. De lo anterior se pone de manifiesto que la sustancia S<sub>5</sub> es el [3-(3',4',5'-trimetoxifenil)-2-propen-1-ol].<sup>202</sup>



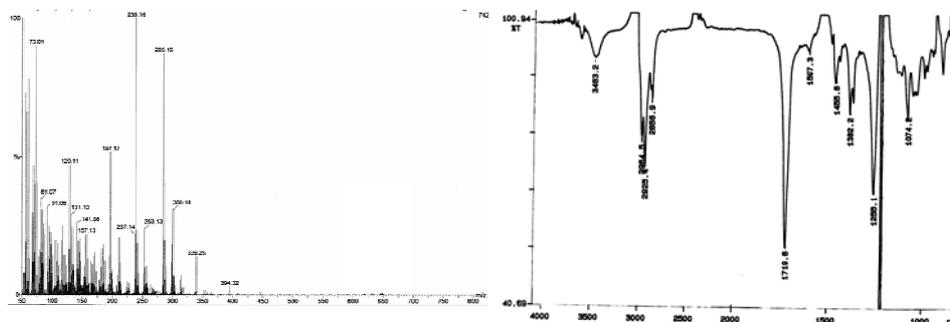
**Figura 77.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la sustancia S<sub>5</sub>.

**SUSTANCIA S<sub>6</sub>**

Se aisló de la fracción D de la cromatografía general como un sólido amorfo que no logramos cristalizar. En el espectro de masas (figura 78a) no aparece el ion molecular pero si se observan dos fragmentaciones una a  $m/z$  285 (C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>2</sub>) y otra a  $m/z$  255

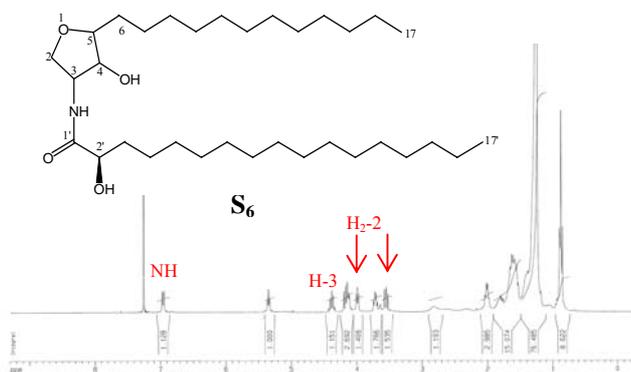
<sup>202</sup> Hattori, M.; Yang, X. W.; Shu, Y. Z.; Kakiuchi, N.; Tezuka, Y.; Kikuchi, T.; Namba, T. "Constituents of mace. Part IV. New constituents of the aril of *Myristica fragrans*" *Chem. Pharm. Bull.* 36, **1988**, 648-653.

(C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub>). Su espectro de IR (figura 78b) presenta una banda de absorción a  $\nu_{\max}$  3463 cm<sup>-1</sup> correspondiente a grupos hidroxilos y otras a  $\nu_{\max}$  1074 y 912 cm<sup>-1</sup> típicas de un anillo tetrahydrofuránico.<sup>203</sup>



**Figura 78.** a) Espectro de masas; b) espectro de IR de la sustancia S<sub>6</sub>.

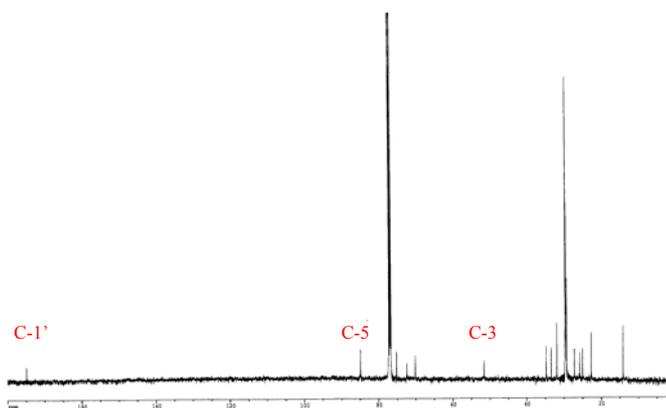
En el espectro de <sup>1</sup>H RMN (figura 79) aparece un doblete a  $\delta$  6.98 ppm correspondiente al protón de un grupo amida secundaria, esto fue confirmado al observar el espectro de <sup>13</sup>C RMN (figura 80) donde aparece dos señales a  $\delta$  51.56 y 174.94 ppm. También se observaron señales entre  $\delta$  3.55-4.17 ppm y cuatro carbonos oxigenados a  $\delta$  70.11, 72.40, 77.40, 84.94 confirmando la presencia de grupos hidroxilos además de otros grupos oxigenados.



<sup>203</sup> ApSimon, J. W.; Hannaford, A. J.; Whalley, W. B. "The chemistry of fungi. Part XLIX. Aliphatic amides from ergot" *J. Chem. Soc.* **1965**, 4164-4169.

**Figura 79.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia  $\text{S}_6$ .

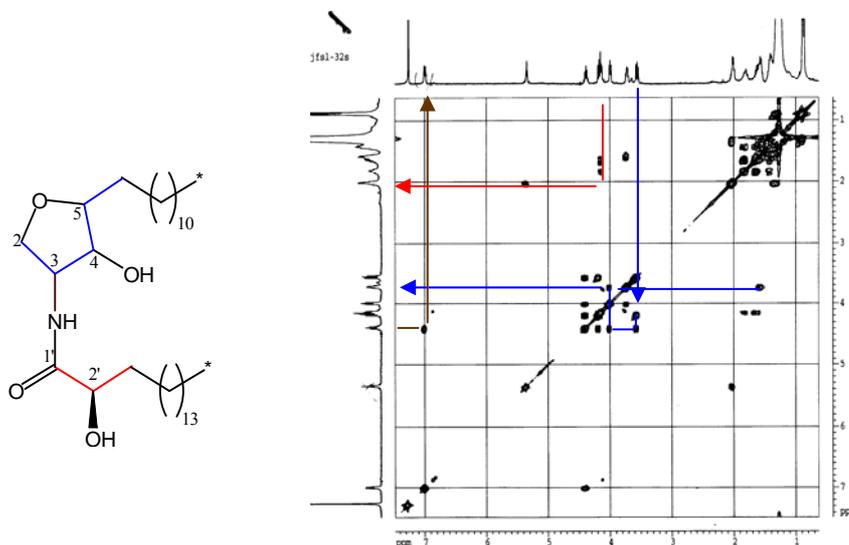
La señal de los protones entre  $\delta$  1.27-1.41 ppm en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN y las de los carbonos entre  $\delta$  22.67-31.91 ppm en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la sustancia en estudio pone de manifiesto la existencia de una cadena alifática larga tal como se encuentran en sustancias tipo ceramidas.

**Figura 80.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la sustancia  $\text{S}_6$ .

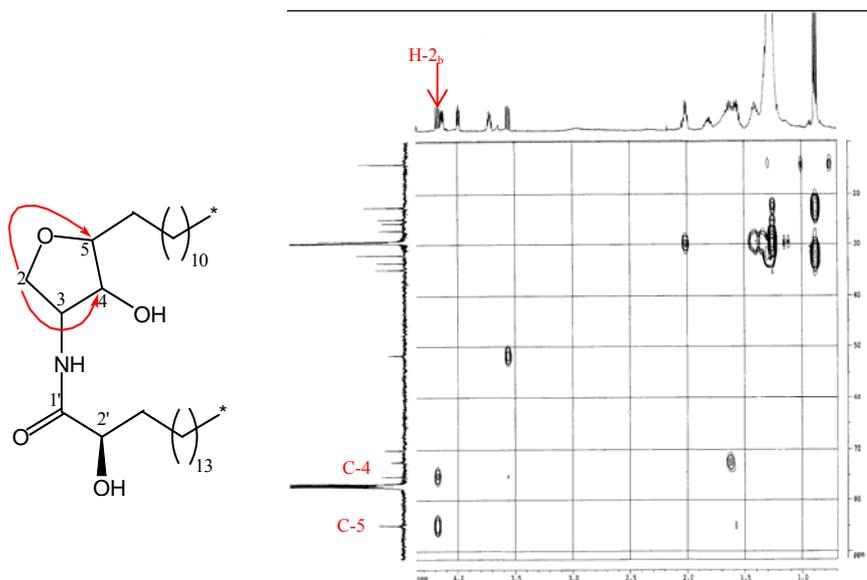
La elucidación estructural y la total asignación de las señales en los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN fueron llevadas a cabo mediante técnicas de 2D RMN y transformaciones químicas.

En el experimento COSY (figura 81) se observa, poniendo como punto de partida los protones  $\text{H}_{\alpha-2}$  y  $\text{H}_{\beta-2}$  ambos correlacionan con H-3. H-3 entra a formar parte como geminal con el nitrógeno del grupo amida secundario y correlaciona también con H-4. H-4 correlaciona con H-5, ambos protones son geminales a grupos funcionales oxigenados. H-5 correlaciona con  $\text{H}_{2-6}$  y así sucesivamente. Por último, se observa una correlación de las señales comprendidas entre  $\delta$  1.27-1.41 ppm con la señal de los metilos en  $\delta$  0.87 ppm (6H, t,  $J = 6.7$  Hz). Del estudio del experimento COSY realizado pudimos establecer los siguientes fragmentos estructurales  $-\text{OCH}_2-\text{CH}(\text{NH}-)-\text{CH}(\text{O})-\text{CH}(\text{O})-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ . y  $(-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3)$ . Lo anterior indica la presencia de dos largas cadenas alifáticas en la sustancia  $\text{S}_6$  y un anillo tetrahydrofurano sustituido con dos grupos funcionales uno hidroxilo y otro amino. Esto se confirmó a

través de un experimento HMBC (figura 82) el cual revela correlaciones entre H-2 y C-5 y entre H-2 y C-4.

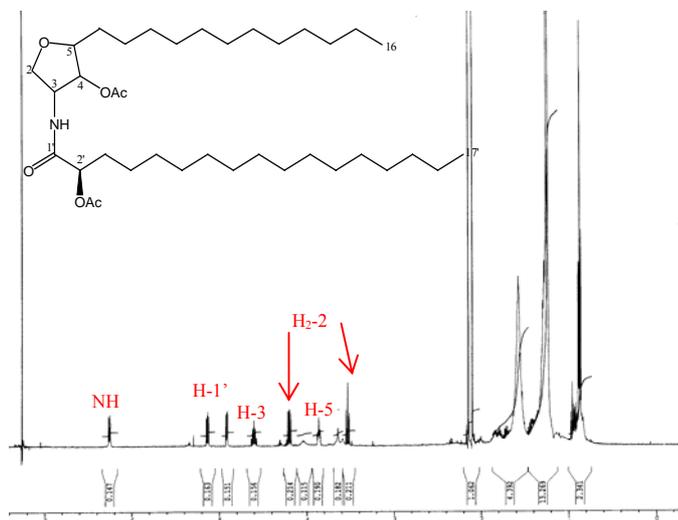


**Figura 81.** Experimento COSY de la sustancia S<sub>6</sub>.



**Figura 82.** Ampliación del experimento HMBC de la sustancia S<sub>6</sub>.

La existencia de dos hidroxilos en la molécula se puso de manifiesto a partir de su derivado acetilado así, tratamiento de **S**<sub>6</sub> con anhídrido acético y piridina dio un diacetato en cuyo espectro de <sup>1</sup>H RMN (figura 83) aparecen dos señales a δ 2.10 (3H, s, OAc) y 2.15 ppm (3H, s, OAc) características de grupos acetato.



**Figura 83.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN del acetato de **S**<sub>6</sub>.

Hidrólisis básica de **S**<sub>6</sub> seguida de acetilación nos condujo a una amina **S**<sub>6-1</sub> en cuyo espectro de masas (figura 84) aparece un ion molecular a  $m/z$  355.2756 correspondiente a la fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>4</sub> y un derivado acilo **S**<sub>6-2</sub> de fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub> (figura 85). Las estructuras de **S**<sub>6-1</sub> y **S**<sub>6-2</sub> fueron determinadas en base a sus espectros de masas y <sup>1</sup>H RMN así como la longitud de la cadena tanto del amino alcohol como del grupo acilo. Por comparación con los datos de la literatura consultada,<sup>204</sup> la rotación óptica  $[\alpha]_D^{20} = -2.53^\circ$  de **S**<sub>6-2</sub> indica una configuración *R*.

<sup>204</sup> Jin, W.; Rinehart, K. L.; Jares-Erijman, A. "Ophidiacerebrosides: Cytotoxic glycosphingolipids containing a novel sphingosine from a sea star" *J. Org. Chem.* 59, **1994**, 144-147.

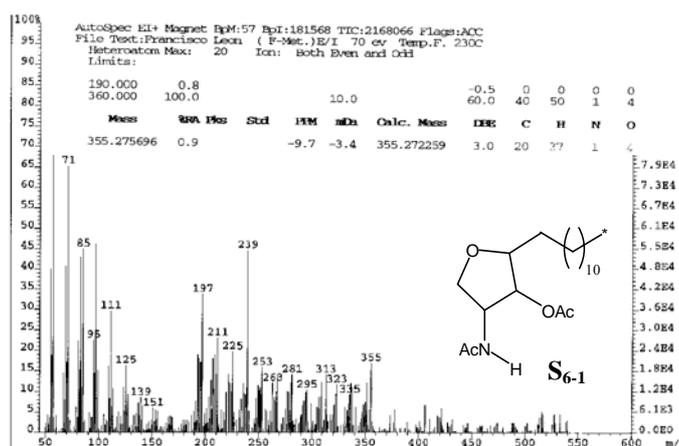


Figura 84. Espectro de masas de S<sub>6-1</sub>.

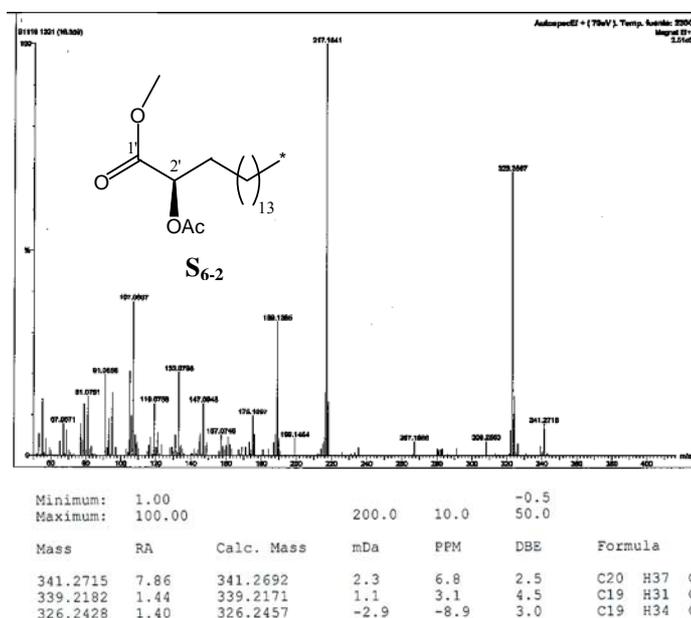
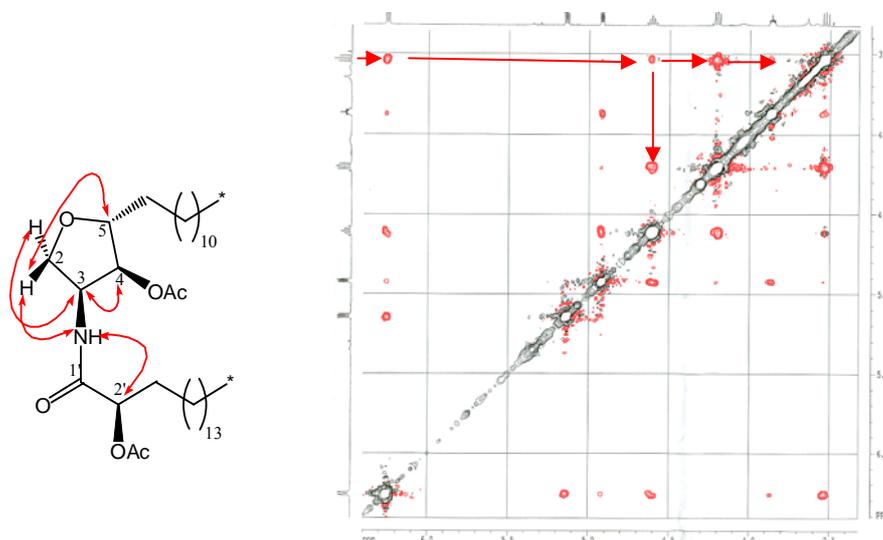


Figura 85. Espectro de masas de S<sub>6-2</sub>

La configuración relativa de S<sub>6</sub> fue determinada mediante experimento NOESY de su acetato (figura 86), así se observan correlaciones entre H<sub>α</sub>-2 y H-3, entre H-3 y H-4,

y entre H<sub>β</sub>-2 y H-5, lo cual indica una *cis* configuración entre los sustituyentes de los carbonos 3 y 4 del anillo tetrahidrofuran. <sup>205</sup>



**Figura 86.** Experimento NOESY del acetato de la sustancia **S<sub>6</sub>**.

La estructura de la nueva ceramida **S<sub>6</sub>**, basándonos en el estudio anterior, la hemos asignado como (2'*R*)-*N*-(5-dodeciltetrahydro-4-hidroxi-3-furil)-2'-hidroxiheptadecana mida denominada debido a su origen suillumida.

### SUSTANCIA **S<sub>7</sub>**

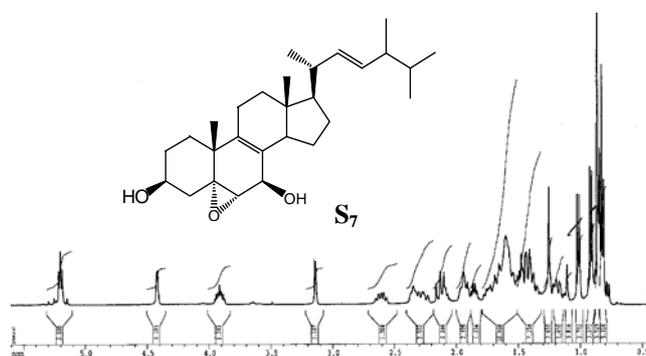
Se obtuvo en la fracción E de la cromatografía general como un sólido amorfo que se comporta en capa fina como una especie química pura. En su espectro de masas no se aprecia el ion molecular en cambio si se observa, entre otras, una fragmentación a  $m/z$  410.3146  $[M - H_2O]^+$  correspondiéndole, por lo tanto, una fórmula molecular de  $C_{28}H_{44}O_3$ . Su espectro de IR presenta bandas de absorción a  $\nu_{max}$  3415  $cm^{-1}$  atribuidas a

<sup>205</sup> Sudhakar, N.; Kumar, A. R.; Prabhakar, A.; Jagadeesh, B.; Rao, B. V. "The first synthesis of the anhydrophytosphingosine pachastrissamine (jaspine B) from Garner's aldehyde" *Tetrahedron Lett.* 46, 2005, 325-327.

grupos hidroxilos,  $\nu_{\max}$  1010  $\text{cm}^{-1}$  típicas de un anillo epoxi<sup>206</sup> y  $\nu_{\max}$  815  $\text{cm}^{-1}$  característica de doble enlace.

El estudio del espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 87) nos da una clara información de su estructura. Así, podemos apreciar, un triplete a  $\delta$  5.21 ppm típico de los protones vinílicos perteneciente a la cadena lateral del ergosterol, un multiplete a  $\delta$  3.91 ppm, dos dobletes a  $\delta$  4.41 y 3.14 ppm correspondiente a los protones geminales a dos grupos hidroxilos y un epóxido respectivamente. En la región de los metilos aparecen cuatro dobletes y dos singuletes a  $\delta$  0.81, 0.83, 0.92, 1.01, 0.89 y 1.25 ppm correspondiente a los seis metilos de un esteroide del tipo ergosterol.

Consultada la bibliografía pudimos observar que la sustancia **S<sub>7</sub>** posee propiedades espectroscópicas (IR,  $^1\text{H}$  NMR, MS) concordantes con el 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxi-(22E, 24R)-ergosta-8,22-dien-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol aislada por Yasunori y col. del hongo *Lactarius piperatus*.<sup>207</sup>



**Figura 87.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia **S<sub>7</sub>**.

### SUSTANCIA S<sub>8</sub>

Se obtuvo como un sólido amorfo de p.f. 69-70°C de la fracción E de la cromatografía general (ver parte experimental). Posee de fórmula molecular  $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_4$  confirmado por espectrometría de masas.

<sup>206</sup> Gunthard, Hs. H.; Heusser, H.; Furst, A. "Steroids and sex hormones. CXCIV. Infrared spectra of stereoisomeric steroid epoxides" *Helvetica Chim. Acta* 36, **1953**, 1900-1907.

<sup>207</sup> Yasunori, Y.; Makiko, E.; Yoshino, T.; Kaori, M.; Keiko, A.; Katsuyuki, F.; Masao, K. "Sterol constituents from seven mushrooms" *Chem. Pharm. Bull.* 47, **1999**, 847-851.

Del estudio del espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 88) se deduce que se trata de un derivado del glicerol, observándose dos dobles dobletes uno a  $\delta$  3.70 y el otro a  $\delta$  3.59 ppm correspondiente a un hidroxilo primario, un multiplete a  $\delta$  3.93 ppm de intensidad un hidrógeno, el cual, lo hemos asignado al protón geminal de un hidroxilo secundario. También se aprecia un triplete a  $\delta$  0.88 ppm de intensidad tres protones perteneciente a un metilo terminal y un multiplete a  $\delta$  4.17 ppm asignado al oximetileno que forma parte del puente de unión con el ácido graso.

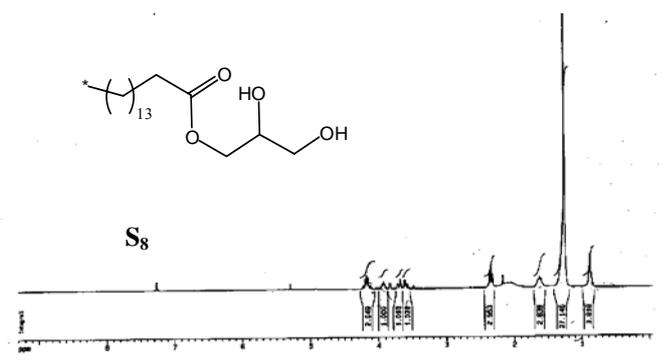
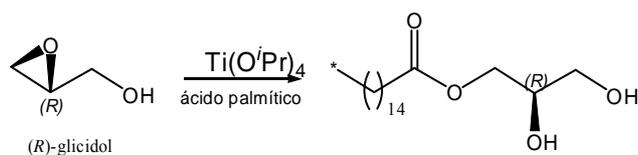


Figura 88. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia  $\text{S}_8$ .

De lo anterior se deduce que la sustancia  $\text{S}_8$  es la palmitina, sustancia esta aislada con anterioridad de *Paspalum scrobiculatum*.<sup>208</sup> Con la finalidad de dar la estereoquímica absoluta del hidroxilo secundario en C-2, y compararlo con el de la bibliografía, hemos realizado la siguiente síntesis: tratamiento del ácido palmítico con el (*R*)-glicidol en presencia de isopropóxido de titanio<sup>209</sup> (figura 89), obtuvimos el (*R*)-(-)-1-palmitoil-glicerol, sustancia ésta, cuyas propiedades físicas (pf.,  $[\alpha]_D$ ) y espectroscópicas (Ms,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  RMN), fueron idénticas a las de nuestro producto natural.

<sup>208</sup> Misra, L.; Siddiqui, S. A. "n-Alkanes and  $\alpha$ -palmitin from *Paspalum scrobiculatum* seeds" *Z. Naturforsch.* 55C, **2000**, 500-502.

<sup>209</sup> Burgos, C. E.; Ayer, D. E.; Jonson, R. A. "A new, asymmetric of lipids and phospholipids" *J. Org. Chem.* 52, **1987**, 4973-4977.



**Figura 89.** Apertura de epóxido regioselectiva

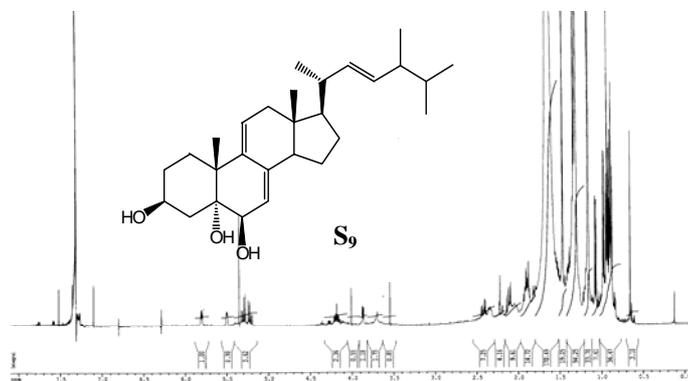
### SUSTANCIA S<sub>9</sub>

Se obtuvo en la fracción F de la cromatografía general como un polvo amorfo. Da positiva la reacción de Liebermann-Burchard para esteroides. Tiene de peso molecular  $m/z$  428.3319 correspondiéndole una fórmula molecular  $C_{28}H_{44}O_3$ . En el espectro de masas también se pudieron observar las rupturas típicas de la cadena del ergosterol y la pérdida de tres grupos hidroxilos.

En el espectro de IR aparece una señal ancha entre  $\nu_{\max}$  3300  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a grupos hidroxilos y otra en  $\nu_{\max}$  1598  $\text{cm}^{-1}$  que confirma la presencia de un dieno.

En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 90) se observa dos dobles dobletes a  $\delta$  5.21 y 5.29 ppm característicos de un doble enlace en  $\Delta^{22}$  sobre la cadena lateral del esteroide y dos sistemas AB centrados en  $\delta$  5.50 y 5.80 ppm, respectivamente, con  $J = 5.7$  y  $6.7$  Hz.

Consultada la bibliografía, identificamos la sustancia S<sub>9</sub> como el ergosta-7,9(11),22-trien-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol.<sup>210</sup>



**Figura 90.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia S<sub>9</sub>.

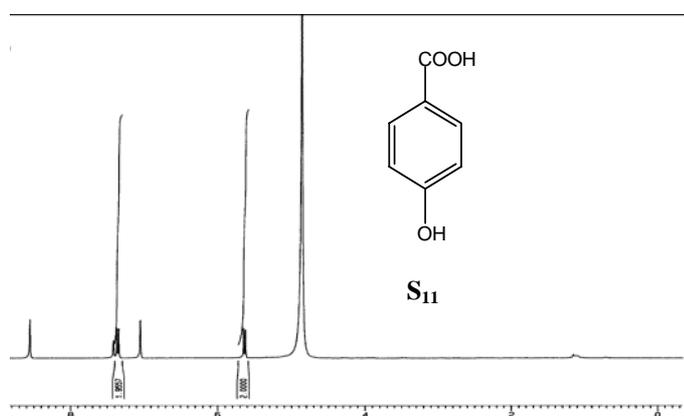
<sup>210</sup> Ishizuka, T.; Yapita, Y.; Kikuchi, M. "Sterol constituents from the fruit bodies of *Grifola frondosa* (Fr.) S. F. Gray" *Chem. Pharm. Bull.* 45, **1997**, 1756-1760.

### SUSTANCIA S<sub>10</sub>

Fue obtenida como un sólido amorfo junto con la S<sub>9</sub> en la fracción F de la cromatografía general. Su espectro de masas (FAB) muestra un pico molecular a  $m/z$  431.3541 correspondiente a C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>O<sub>3</sub>, acompañado de pérdida de agua y metilo. Sus espectros de masas, IR y <sup>1</sup>H RMN fueron superponibles con los del producto L<sub>8</sub> obtenido por nosotros del hongo *Laetiporus sulphureus*<sup>211</sup> por lo que identificamos la sustancia S<sub>10</sub> como cerevisterol.

### SUSTANCIA S<sub>11</sub>

Se obtuvo como un sólido que cristalizó de metanol en forma de placas de p.f. 213-215°C. En su espectro de IR se observan bandas de ácido a  $\nu_{\max}$  3445 y 1738 cm<sup>-1</sup> y una señal en  $\nu_{\max}$  1660 cm<sup>-1</sup> asignada a un anillo aromático. Su espectro de <sup>1</sup>H RMN (figura 91) muestra dos sistemas AB centrados en  $\delta$  5.64 y 7.35 ppm respectivamente con J = 7.6 Hz para ambos. Esta sustancia fue identificada en base a sus datos físicos y espectroscópicos como el ácido p-hidroxibenzoico.<sup>212</sup>



**Figura 91.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la sustancia S<sub>11</sub>.

<sup>211</sup> Ver presente Tesis Doctoral, pág. 159.

<sup>212</sup> Cain, R. B.; Bilton, R. F.; Darrah, Josephine A. "Metabolism of aromatic acids by micro organisms. Metabolic pathways in the fungi" *Biochem. J.* 108, **1968**, 797-828.

***PARTE EXPERIMENTAL***

El hongo *Suillus luteus* (L) S. F. Gray. fue recolectado en mayo del año 2000 en el bosque de coníferas (*Pinus silvestre*) del Parque Nacional Natural del embalse del Neusa a 40 Km al norte de Bogotá y situado a 3000 metros sobre el nivel del mar. Fue identificado por el profesor Luis Henao del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia. Un ejemplar se encuentra en el Herbario Nacional Colombiano con el No. Col-444.

117 gramos de hongo seco fueron triturados hasta un polvo fino, el cual fue extraído en frío con etanol (96%) hasta agotamiento. El extracto se concentró a vacío dando 48 gramos los cuales se redisolviéron en MeOH-H<sub>2</sub>O 5% separándose un precipitado y el líquido sobrenadante se concentró para dar 30 gramos, los cuales se disolvieron en metanol, se le añadió gel de sílice, se eliminó el disolvente y se colocó en la parte superior de una columna cromatográfica, empaquetada con gel de sílice y eluida con mezclas de n-hexano-acetato de etilo-metanol de polaridad creciente. Se tomaron fracciones de 100 ml y se analizaron por cromatografía en capa fina para luego reagruparlas como se indica en la tabla 5.

La fracción A después de recromatografiarla en CC usando como eluyente benceno-éter etílico (48:2) seguido de CC de Sephadex LH-20 eluida con n-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol (1:1:1) obtuvimos las sustancias **S<sub>1</sub>** y **S<sub>2</sub>**.

La fracción B mostró una única sustancia mayoritaria que se purificó mediante CC de gel de sílice eluyendo con una mezcla de n-hexano-AcOEt (8:2) obteniéndose pura la sustancia **S<sub>3</sub>**.

La fracción C se purificó mediante CC de gel de sílice eluida con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona (48:2), CC de Sephadex LH-20 eluida con n-hexano-AcOEt-metanol (1:1:1) obteniéndose puras las sustancias **S<sub>4</sub>** y **S<sub>5</sub>**.

La fracción D obtenida de la cromatografía general con n-hexano-AcOEt (1:1) se concentró y se recromatografió en TLC preparativa utilizando como eluyente n-hexano-AcOEt (6:4, dos eluciones) obteniéndose pura la sustancia **S<sub>6</sub>**.

De la fracción E después de recromatografiarla en CC de gel de sílice usando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona con polaridad creciente, seguida de CC de Sephadex LH-20 eluida con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol (1:1) obtuvimos las sustancias **S<sub>7</sub>** y **S<sub>8</sub>**.

La fracción F se recromatografió usando CC preparativa utilizando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol de polaridad creciente hasta el 10% y posterior TLC preparativa usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol (9:1, dos recorridos) obteniéndose las sustancias **S<sub>9</sub>** y **S<sub>10</sub>** puras.

De la fracción G se obtuvo pura la sustancia **S<sub>11</sub>** por CC de gel de sílice utilizando como eluyente CHCl<sub>3</sub>-metanol con polaridad creciente hasta alcanzar el 20%, CC de Sephadex LH-20 eluida con CHCl<sub>3</sub>-metanol (2:1) y posterior TLC preparativa usando como eluyente la mezcla n-hexano-AcOEt (10:1, cuatro recorridos).

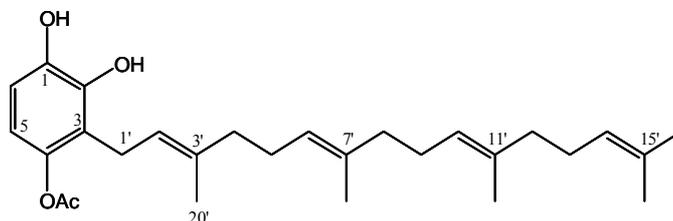
Tabla 5. Sustancias aisladas de *S. luteus* por orden de elución

| Fracción | Eluyentes             | Peso   | Sustancias  |
|----------|-----------------------|--------|---|
| A        | n-hexano: AcOEt (9:1) | 1.2 g  | Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona, <b>S<sub>1</sub></b> ; Ergosterol, <b>S<sub>2</sub></b>   |
| B        | n-hexano: AcOEt (4:1) | 300 mg | Peróxido de ergosterol, <b>S<sub>3</sub></b>  |
| C        | n-hexano: AcOEt (7:3) | 400 mg | Suillina, <b>S<sub>4</sub></b> ; el alcohol trimetoxi cinámico, <b>S<sub>5</sub></b> .  |
| D        | n-hexano: AcOEt (1:1) | 150 mg | Suillumida, <b>S<sub>6</sub></b>  |
| E        | n-hexano: AcOEt (2:3) | 1.0 g  | 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxi-(22E, 24R)-ergosta-8,22-dien-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol, <b>S<sub>7</sub></b> ; 1-palmitoil glicerol <b>S<sub>8</sub></b> . |
| F        | AcOEt                 | 1.2 g  | Ergosta-7,9(11),22-trien-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol, <b>S<sub>9</sub></b> ; cerevisterol <b>S<sub>10</sub></b> ;                             |
| G        | AcOEt: MeOH (9:1)     | 1.3 g  | Ácido p-hidroxi benzoico, <b>S<sub>11</sub></b> .   |

**Sustancia S<sub>1</sub>**: Sólido cristalino, 20 mg, constantes físicas y espectroscópicas idénticas a la sustancia **G<sub>6</sub>** (ver página 74).

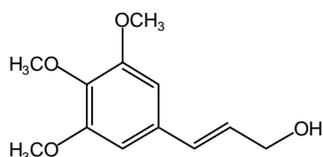
**Sustancia S<sub>2</sub>**: Sólido cristalino, 900 mg, constantes físicas y espectroscópicas idénticas a la sustancia **G<sub>4</sub>** (ver página 73).

**Sustancia S<sub>3</sub>**: Sólido cristalino, 30 mg, constantes físicas y espectroscópicas idénticas a la sustancia **G<sub>5</sub>** (ver página 74).

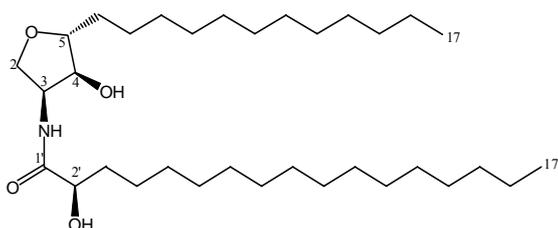
**Sustancia S<sub>4</sub>:** Suillina (4-acetoxi, 3, geranylgeranil-1,2-dihidroxi-benceno)

Aceite, 12 mg; IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3460, 2930, 1744, 1615, 1464, 1102, 1048, 936, 845 724  $\text{cm}^{-1}$ ; HREIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 440.2554  $[\text{M}]^+$  ( $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_4$ , calcd 440.2732) (15), 398 (25), 371 (5), 285 (7), 262 (15), 259 (14), 219 (23), 194 (27), 177 (74), 139 (81), 123 (22), 121 (27), 109 (27), 95 (32), 81 (45), 69 (100);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.59 (9H, s, Me-17', 18', 19'),\* 1.67 (3H, s, Me-16'),\* 1.79 (3H, s, Me-20'), 1.87-2.09 (12H, m,  $\text{CH}_2$ -4', 5', 8', 9', 12', 13'), 2.27 (3H, s, Me-OAc), 3.25 (2H, d,  $J$  = 6.9 Hz,  $\text{CH}_2$ -1'), 5.09 (3H, m, H-6', H-10', H-14'), 5.22 (1H, t,  $J$  = 14 Hz, H-2'), 6.49 (1H, d,  $J$  = 8.6 Hz, H-5), 6.70 (1H, d,  $J$  = 8.6 Hz, H-6);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 16.0 (C-17' y C-18'),\* 16.2 (C-20'),\* 17.6 (C-19'),\* 20.8 (C-OAc), 24.0 (C-1'), 25.6 (C-16'), 26.3, 26.6, 26.7 (C-5', C-9' y C-13'),\* 39.6, 39.7 (C-4', C-8' y C-12'),\* 112.8, 113.8 (C-5 y C-6), 120.1, 120.7, 123.5, 124.1, 124.1, 124.4, 131.2, 135.0, 135.8, 139.2, 142.0, 142.2, 142.8, 158.2, 170.0.

\* La asignación puede ser intercambiable.

**Sustancia S<sub>5</sub>:** Alcohol 3,4,5-trimetoxi cinámico, ([3-(3',4',5'-trimetoxi-fenil)-2-propen-1-ol])

Aceite, 5 mg; IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3460, 2930, 1744, 1640, 1464, 1102, 1048, 936, 724  $\text{cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 224.2348  $[\text{M}]^+$  ( $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$ , calcd 224.2530) (100), 195 (29), 193 (19), 181 (44), 168 (11), 149 (15);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , Acetona- $d_6$ ): 3.70 (3H, s, OMe), 3.82 (6H, s, 2-OMe), 4.21 (2H, td,  $J$  = 1.5, 5.4 Hz, H<sub>2</sub>-1), 6.32 (1H, dt,  $J$  = 5.2, 15.8 Hz, H-2), 6.52 (1H, dd,  $J$  = 1.7, 15.8 Hz, H-3), 6.72 (2H, s, H-2' y H-6');  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 62.0 (2-C-OMe), 66.2 (C-OMe), 68.8 (C-1), 110.3 (C-2' y C-6'), 135.8 (C-2), 136.0 (C-3), 139.6 (C-1'), 149.0 (C-4'), 160.1 (C-3' y C-5').

**Sustancia S<sub>6</sub>: Suillumida**

Sólido amorfo, 20 mg;  $[\alpha]_D$ : +16.3 (*c* 0.1, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3463, 2964, 2925, 2856, 1719, 1597, 1455, 1382, 1255, 1074, 912 cm<sup>-1</sup>; EI-MS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 539 [M]<sup>+</sup> (ausente), 339 (14), 300 (30), 299 (17), 286 (19), 285 (82), 283 (10), 253 (21),

241 (16), 240 (23), 239 (100), 237 (21), 211 (21), 197 (48); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.87 (6H, t, *J* = 6.7 Hz, Me-17 y Me-17'), 1.27-1.41 (46H, br s, 22-CH<sub>2</sub>), 1.56 (3H, m, H<sub>a</sub>-3' y CH<sub>2</sub>-6), 1.80 (1H, H<sub>b</sub>-3'), 3.55 (1H, dd, *J* = 7.3, 9.0 Hz, H <sub>$\alpha$</sub> -2), 3.71 (1H, dd, *J* = 5.1, 12.2 Hz, H-5), 3.99 (1H, t, *J* = 4.8 Hz, H-4), 4.13 (1H, dd, *J* = 3.6, 8.1 Hz, H-1'), 4.17 (1H, dd, *J* = 7.0, 9.0 Hz, H <sub>$\beta$</sub> -2), 4.38 (1H, q, *J* = 6.9 Hz, H-3), 6.98 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, N-H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 14.10 (C-17 y C-17'), 22.67-31.91 [(CH<sub>2</sub>)<sub>20</sub>], 33.42 (C-6), 34.77 (C-3'), 51.56 (C-3), 70.11 (C-2), 72.40 (C-1'), 77.40 (C-4), 84.93 (C-5), 174.94 (C-1').

**Acetilación de S<sub>6</sub>.**

14 mg de S<sub>6</sub> se disolvieron en piridina y se le adicionó un exceso de Ac<sub>2</sub>O a 25°C, después de 24h de reacción, se vertió sobre una disolución diluida de bicarbonato de sodio y la piridina fue eliminada con una solución acuosa de sulfato de cobre. Extracción con cloroformo y posterior purificación utilizando TLC preparativa con *n*-hexano-AcOEt (9:1, dos eluciones), se obtuvo el acetato de S<sub>6</sub>.

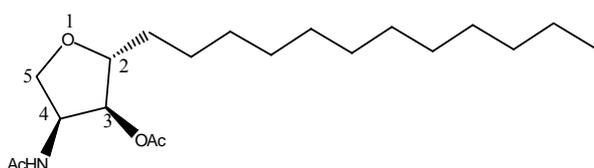
Sólido amorfo, 12 mg; p.f.: 96-98 °C;  $[\alpha]_D$ : +19.4 (*c* 0.09, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3285, 2918, 2850, 1740, 1665, 1577, 1464, 1234, 1071, 721 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 623 [M]<sup>+</sup> (ausente), 441 (18), 399 (8), 326 (4), 300 (13), 285 (35), 266 (14), 264 (10), 256 (11), 253 (27), 251 (20), 239 (45), 237 (36), 209 (11), 197 (31); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.87 (6H, t, *J* = 6.7 Hz, Me-176 y Me-17'), 1.27-1.41 (52H, br s, 26-CH<sub>2</sub>), 1.74 (3H, m, H<sub>a</sub>-3' y CH<sub>2</sub>-6), 2.10 (3H, OAc), 2.15 (3H, OAc), 3.53 (1H, dd, *J* = 8.5 y 8.4 Hz, H <sub>$\beta$</sub> -2), 3.86 (1H, ddd, *J* = 3.0, 5.2 y 8.0 Hz, H-5), 4.20 (1H, dd, *J* = 7.0, 8.5 Hz, H <sub>$\alpha$</sub> -2), 4.60 (1H, dddd, *J* = 6.1, 7.0, 8.4 y 8.5 Hz, H-3), 4.91 (1H, dd, *J* = 3.0, 6.1 Hz, H-4), 5.13 (1H, dd, *J* = 4.7, 7.4 Hz, H-1'), 6.25 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, N-H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 14.06 (C-17 y C-17'), 20.70 (OAc), 2.85 (OAc), 22.63-33.74 [(CH<sub>2</sub>)<sub>24</sub>], 49.67 (C-3), 69.90 (C-2), 74.11 (C-1'), 77.20 (C-4), 83.77 (C-5), 169.8 (2 x OAc), 174.94 (C-1').

**Hidrólisis alcalina de la sustancia S<sub>6</sub>.**

3 mg de S<sub>6</sub> se disolvieron en metanol-agua (9:1) y se le adicionaron 5 ml de KOH 1N con agitación durante 2 h. Al cabo de este tiempo se extrae con diclorometano, la fase orgánica se trata después de llevar a sequedad con Ac<sub>2</sub>O/piridina y se purifica en TLC

con cloroformo-metanol (5:1) como eluyente, separándose **S<sub>6-1</sub>** (0.6 mg). La fase acuosa se acidifica con ácido sulfúrico al 5%, luego se extrae nuevamente con diclorometano, se concentra a sequedad se disuelve en éter etílico y se le adiciona diazometano, se recupera el metil éster y luego se le añade Ac<sub>2</sub>O/piridina, obteniéndose **S<sub>6-2</sub>** (0.6 mg)

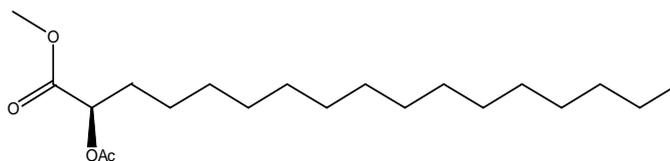
**Sustancia S<sub>6-1</sub>:** Acetato de 4β-(acetilamino)-2α-dodecil-3β-tetrahidrofuranilo



Aceite,  $[\alpha]_D$ : +8.0 (*c* 0.007, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): 0.97 (3H, t, *J* = 6.26, Me), 1.80-1.25 (br s, -CH<sub>2</sub>-), 2.11 (3H, m, OAc), 2.14 (3H, s, OAc), 3.62 (1H, m, H-5α), 3.86 (1H, m, H-

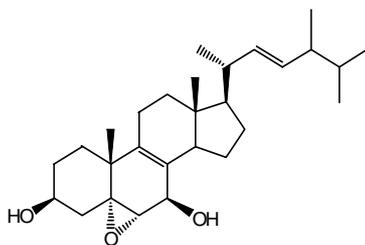
2), 4.17 (1H, m, H-5β), 4.90 (1H, m, H-4), 5.40 (1H, m, H-3), 5.54 (1H, m, NH); HREIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 355.2756 [M]<sup>+</sup> (C<sub>20</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>4</sub>, calcd 355.2722) (2), 239 (4), 111 (29).

**Sustancia S<sub>6-2</sub>:** 2-(Acetiloxi)heptadecanoato de metilo



Aceite,  $[\alpha]_D$ : -2.53 (*c* 0.009, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): 0.80 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.25 (s br, -CH<sub>2</sub>-), 1.60 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.04 (3H, s, OAc), 3.58 (3H, s, OMe), 4.98 (1H, t, *J* = 6.7 Hz, H-2'), 1.71 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.42 (2H, m, CH<sub>2</sub>); HREIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 342.2489 [M]<sup>+</sup> (C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>, calcd 342.2770) (7), 341 (6), 323 (35), 217 (100), 189 (14).

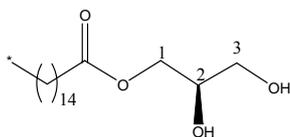
**Sustancia S<sub>7</sub>:** 5α,6α-Epoxi-ergosta-8,22-dien-3β,7β-diol.



Sólido amorfo, 9 mg;  $[\alpha]_D$ : -40 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3415, 2930, 2880, 1405, 1070, 1010, 815 cm<sup>-1</sup>; EI-MS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 410.3146 [M - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>, calcd 410.3184) (7), 392 (21), 376 (31), 374 (64), 372 (10), 359 (30), 275 (24), 266 (25), 250 (100), 235 (28), 221 (14), 219 (21), 209 (20), 203 (15), 193 (23); <sup>1</sup>H RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): 0.81 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, Me-26), 0.83 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, Me-27), 0.89 (3H, s, Me-18), 0.92 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, Me-28), 1.01 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, Me-21), 1.25 (3H, s, Me-19), 3.14 (1H, d, *J* = 3.5 Hz, H-6β), 3.91 (1H, m, H-3α), 4.41 (1H, d, *J* = 3.1 Hz, H-7α), 5.21 (2H, t, *J* = 8.1 Hz, H-22 y H-23); <sup>13</sup>C RMN (δ, piridina-*d*<sub>5</sub>): 16.38 (C-18), 17.52 (C-28), 18.10 (C-19),

19.29 (C-21), 19.56 (C-26), 19.86 (C-27), 21.20 (C-11), 24.85 (C-15), 27.56 (C-16), 29.70 (C-2) 31.21 (C-1), 33.05 (C-25), 36.17 (C-10), 36.76 (C-12), 39.38 (C-20), 39.79 (C-24), 40.56 (C-9), 43.7 (C-13), 54.7 (C-14), 56.91 (C-17), 62.23 (C-6), 64.89 (C-7), 66.64 (C-5), 79.49 (C-3), 132.2 (C-22), 134.23 (C-9), 135.4 (C-23), 143.8 (C-8).

**Sustancia S<sub>8</sub>:** 1-Palmitoil glicerol.

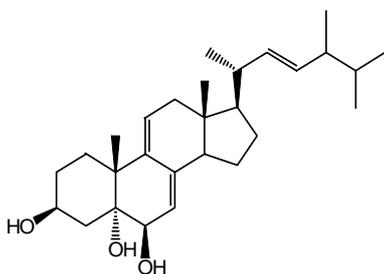


Sólido amorfo, 20 mg;  $[\alpha]_D$ : -3.19 (*c* 0.004, CHCl<sub>3</sub>); p.f.: 69-70°C; IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3151, 2944, 2871, 1733, 1455, 1368, 1245, 1027, 979, 916, 732, 647 cm<sup>-1</sup>; EI-MS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 330.2790 [M]<sup>+</sup> (C<sub>19</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>, calcd 330.2770) (1), 392 (21), 376 (31), 374 (64), 372 (10), 359 (30), 275 (24), 266 312 (5), 299 (29), 270 (15), 257 (30), 256 (22), 240 (14), 239 (88), 225 (6), 185 (5), 182 (9), 168 (6), 154 (12), 147 (9), 134 (57), 129 (17), 116 (22), 112 (32), 98 (100), 85 (23); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.88 (3H, t, J = 6.6 Hz, Me-16'), 1.25 (24H, s br, (CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>), 1.62 (2H, m, C-3'), 2.34 (2H, m, C-2'), 3.59 (1H, dd, J = 5.7, 13.0 Hz, H-3a), 3.70 (1H, dd, J = 4.0, 13.0 Hz, H-3b), 3.93 (1H, m, H-2), 4.17 (2H, m, H<sub>2</sub>-1); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 14.1 (C-16'), 22.6 (CH<sub>2</sub>), 24.9-31.9 ((-CH<sub>2</sub>-)<sub>13</sub>), 34.1 (C-2'), 63.3 (C-3), 65.1 (C-1), 70.3 (C-2), 174.3 (C-1').

**Síntesis enantioselectiva de la sustancia S<sub>8</sub>.**

90 mg, 0.35 mmoles, de ácido palmítico fueron disueltos en diclorometano seco a temperatura ambiente, la disolución se enfrió a 0°C y se le añadió isopropóxido de titanio (0.30 mmoles), luego se le adicionó gota a gota (*R*)-(-)-glicidol (17.76 mg, 0.24 mmoles, 66  $\mu$ l) durante 1 h. Por TLC (n-hexano-AcOEt 1:1, 0.5% de ácido acético) se observó la formación de un producto, se adicionó ácido tartárico al 15% agitando la mezcla de reacción durante 30 min, se decantó la fase orgánica y la acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El combinado orgánico se lavó con una disolución de bicarbonato sódico y NaCl, se secó sobre sulfato de sodio, se percoló a través de celita y se concentró, el residuo se purificó mediante cromatografía preparativa utilizando como eluyente n-hexano-AcOEt (7:3). De esta manera se obtuvo la (*R*)-(-)-1-palmitoil-glicerol, p.f. 69-71°C y  $[\alpha]_D$ : -2.27 (*c* 0.02, CHCl<sub>3</sub>), idéntica a la sustancia S<sub>8</sub>.

**Sustancia S<sub>9</sub>:** Ergosta-7,9(11),22-trien-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol.

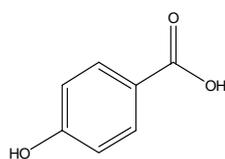


Sólido amorfo, 3 mg;  $[\alpha]_D$ : -5.0 (*c* 0.06, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3300, 2960, 2927, 2851, 1598, 1457, 1372, 1289, 1130, 1092, 1060, 1035, 768, 672, 597, 584 cm<sup>-1</sup>; EI-MS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 428.3319 [M]<sup>+</sup> (C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>, calcd 428.3290) (5), 410 (6), 392 (21), 374 (31), 249 (64), 207 (30), 203 (11), 193 (35); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.65 (3H, s, Me-18), 0.84 (3H, d, J = 6.5 Hz, Me-27), 0.90 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me-

26), 0.98 (3H, d, J = 6.8 Hz, Me-28), 1.06 (3H, d, J = 6.7 Hz, Me-21), 1.31 (3H, s, Me-19), 3.86 (1H, dd, J = 2.1, 5.7 Hz, H-6 $\alpha$ ), 4.16 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 5.21 (1H, dd, J = 8.3, 15.3 Hz, H-22), 5.29 (1H, dd, J = 7.5, 15.3 Hz, H-23), 5.50 (1H, d br, J = 5.7 Hz, H-7) 5.80 (1H, d br, J = 6.8 Hz, H-11);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 11.6 (C-18), 17.7 (C-28), 19.6 (C-26), 19.9 (C-27), 20.5 (C-21), 23.4 (C-15), 26.5 (C-19), 28.7 (C-16), 29.8 (C-1), 30.8 (C-2), 33.0 (C-25), 40.1 (C-20), 40.8 (C-10), 42.2 (C-4), 42.5 (C-12), 42.6 (C-13), 42.8 (C-24), 51.4 (C-14), 55.8 (C-17), 67.6 (C-3), 74.1 (C-6), 75.4 (C-5), 118.3 (C-7), 126.5 (C-11), 132.4 (C-23), 135.3 (C-22), 138.8 (C-8), 140.1 (C-9).

**Sustancia S<sub>10</sub>**: Sólido cristalino, 20 mg, constantes físicas y espectroscópicas idénticas a la sustancia L<sub>8</sub> (ver página 168).

**Sustancia S<sub>11</sub>**: Ácido p-hidroxibenzoico



Sólido cristalino, 15 mg; pf. 213-215°C; IR  $\nu_{\text{max}}$  (film, KBr): 3445, 2926, 2854, 1738, 1660, 1462, 1376, 1170, 757  $\text{cm}^{-1}$ ; EI-MS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 138.0317 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup> (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>, calcd 138.0316) (72), 121 (100), 93 (29), 53 (5), 71 (7), 65 (22), 57 (15);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , piridina-*d*<sub>5</sub>): 5.64 (2H, d, J = 7.6 Hz, H-2 y H-6), 7.35 (2H, d, J = 7.6 Hz, H-3 y H-5);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , piridina-*d*<sub>5</sub>): 102.1 (C-3 y C-5), 123.6 (C-1), 142.9 (C-2 y C-6), 154.0 (C-4), 166.5 (COOH).

**PARTE IV**

**ESTUDIO DEL HONGO *TRAMETES MENZIESII*.**

## ***INTRODUCCIÓN***

El género *Trametes* está ampliamente representado en las zonas tropicales y subtropicales, debido a su amplio rango de árboles que parasita y a la tolerancia a los cambios climático, además, presentan una alta adaptabilidad y por consiguiente un sistema enzimático muy heterogéneo. Es común en los bosques primarios y secundarios del norte de Sudamérica y Centroamérica, incluida Colombia.<sup>213</sup>

Pertencen a los hongos de putrefacción blanca, es decir, que tienen un sistema enzimático que permite degradar los componentes de las paredes celulares de la madera, especialmente lignina<sup>214</sup> así, podemos citar al *Trametes versicolor*, el cual ha servido como organismo modelo para elucidar el mecanismo general de degradación de lignina.<sup>215</sup>



Este género es además muy rico en enzimas fenol-oxidadas (lacasas), estas son de gran importancia en la biorremediación del medio ambiente, ya que oxidan algunos compuestos fenólicos (considerados altamente cancerígenos), llegando incluso a polimerizarlos, provocando así su precipitación, eliminándolos de las aguas contaminadas por la industria petroquímica,<sup>216</sup> textilera, de colorantes y pinturas.<sup>217</sup>

En cuanto a las investigaciones químicas relacionadas con este género se han aislado algunos monoterpenos y compuestos aromáticos volátiles de *Trametes*

---

<sup>213</sup> Setliff, E. C.; Ryvardeen, L. "Los hongos de Colombia VII: Some apylophoraceous word-inhabiting fungi" *Mycotaxon* 28, **1983**, 509-525.

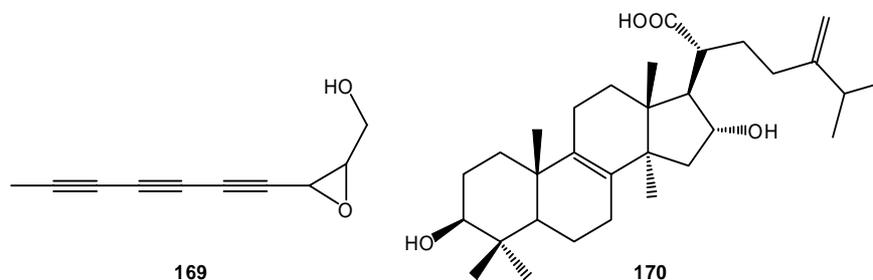
<sup>214</sup> Mswaka, A. Y. Magan, N. "Word degradation, and cellulase and ligninase production, by *Trametes* and other Word-inhabiting basidiomycetes from indigenous forest of Zimbabwe" *Mycol. Res.* 102, **1998**, 1399-1404.

<sup>215</sup> Leonowicz, A.; Matuszewska, A.; Luterek, J.; Ziegenhagen, D.; Wojtas-Wasilewska, M.; Cho, N. S.; Hofrichter, M.; Rogalski, J. "Biodegradation of lignin by white rot fungi" *Fungal Genet. Biol.* 27, **1999**, 175-185.

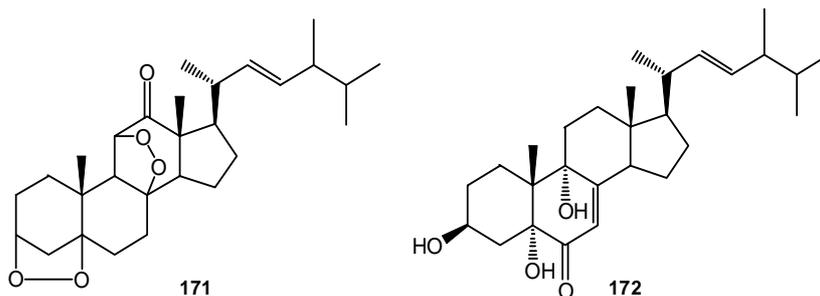
<sup>216</sup> Van Hamme, J. D.; Wong, E. T.; Dettman, H.; Gray, M. R.; Pickard, M. A. "Dibenzyl sulfide metabolism by white rot fungi" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, **2003**, 1320-1324.

<sup>217</sup> a) Couto, S. R.; Rosales, E.; Gundin, M.; Sanromán, M. A. "Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* species" *J. Food Engineer.* 64, **2004**, 423-428; b) Blanquez, P.; Casas, N.; Font, X.; Gabarrell, X.; Sarra, M.; Caminal, G.; Vicent, T. "Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*" *Water Res.* 38, **2004**, 2166-2172.

*suavelons*,<sup>218</sup> un compuesto poliacetilénico **169** de *Trametes pubescens*,<sup>219</sup> triterpenos, todos del tipo del lanosterol, por ejemplo el ácido tumulósico **170** aislado de *Trametes lilacino-gilva*.<sup>220</sup>



Los *Trametes orientalis*<sup>221</sup> y *T. versicolor* son ricos en esteroides polihidroxiados como **171** y **172** este último presenta una alta actividad antitumoral.<sup>222</sup>



<sup>218</sup> Rosecke, J.; Pietsch, M.; König, W. A. "Volatile constituent of Wood-rotting basidiomycetes" *Phytochemistry* 54, **2000**, 747-750.

<sup>219</sup> Dagne, E.; Asmellash, S.; Abate, D. "An antifungal polyacetylenic compound from the culture filtrate of the fungus *Trametes pubescens*" *J. Nat. Prod.* 57, **1994**, 390-392.

<sup>220</sup> Christopher, R. K.; Duffield, A. M.; Ralph, B. J.; Simes, J. J. H. "Extractives of fungi. VI. Gas chromatographic-mass spectrometric investigations of the lipids of *Trametes lilacino-gilva* (Berk.) Lloyd" *Aust. J. Biol. Sci.* 34, **1981**, 115-124.

<sup>221</sup> Chen, H. L.; Chiang, H. C. "Constituents of fruit bodies of *Trametes orientalis*" *J. Chin. Chem. Soc.* 42, **1995**, 97-100.

<sup>222</sup> Valisolalao, J.; Luu, B.; Ourisson, G. "Chemical and biochemical study of chinese drugs. Cytotoxic steroids of *Polyporus versicolor*" *Tetrahedron* 39, **1983**, 2779-2785.

También del *Trametes gibosa* se han aislado polisacáridos con alta actividad vasoprotectora y antiinflamatoria.<sup>223</sup>

Nosotros estudiamos por primera vez en la presente Tesis Doctoral la composición química de los metabolitos secundarios obtenidos del hongo *Trametes menziesii*.

---

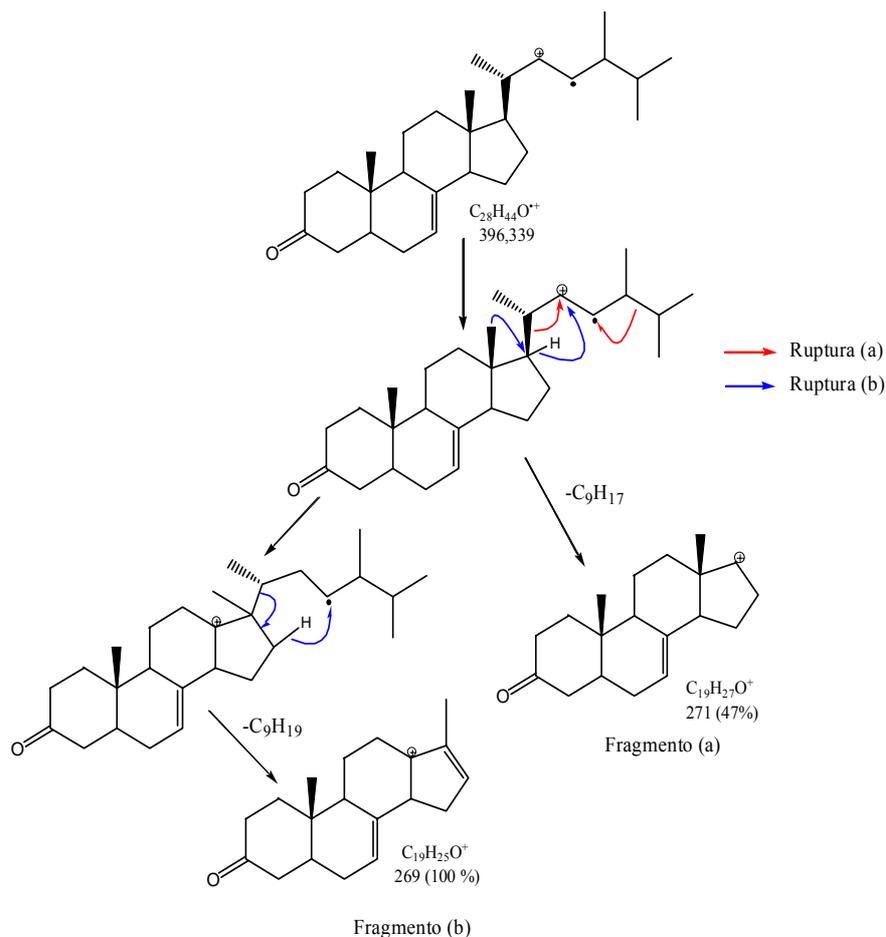
<sup>223</sup> Czarnecki, R.; Grzybek, J. "Antiinflammatory and vasoprotective activities of polysaccharides isolated from fruit bodies of higher fungi. Polysaccharides from *Trametes gibbosa* (pers, fr) fr (polyporaceae). *Phytother. Res.* 9, **1995**, 123-127.

## ***PARTE TEÓRICA***



**SUSTANCIA T<sub>2</sub>**

Se aisló como un sólido que cristalizó de metanol en forma de agujas de p.f. 165-167°C. Su espectro de masas da un peso molecular de  $m/z$  396.3384 de acuerdo a la fórmula empírica  $C_{28}H_{44}O$ , el espectro presenta además las rupturas típicas (a) y (b) de la cadena del ergosterol<sup>225</sup> como se muestra a continuación (figura 93).



**Figura 93.** Fragmentaciones típicas de la cadena lateral de los esteroides del tipo ergosterol.

<sup>225</sup> González, A. G.; Bermejo, J.; Mediavilla, M. J.; Toledo, F. J. "Espectrometría de masas de esteroides de origen natural y sintético" *Rev. Latinoamer. Quim.* 15, **1984**, 107-110.

En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN se observa un multiplete centrado en  $\delta$  5.21 ppm correspondiente a tres protones vinílicos. La sustancia **T<sub>2</sub>** fue identificada a partir de sus propiedades físicas y espectroscópicas como ergosta-7,22-dien-3-ona aislada anteriormente por nosotros del *Ganoderma lucidum* y denominada **G<sub>1</sub>**.<sup>226</sup>

### **SUSTANCIA T<sub>3</sub>**

Fue obtenida como un sólido que cristalizó de metanol en forma de agujas de p.f. 171-172°C, da positiva la reacción de Liebermann-Burchard para esteroides. En su espectro de masas aparece el ión molecular a  $m/z$  398.3552 correspondiente a la fórmula molecular  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}$ , observándose también pérdida de agua  $m/z$  380, metilo  $m/z$  383 y las rupturas típicas de la cadena del ergosterol tal como indicamos en la sustancia anterior. El espectro de IR presenta bandas entre otras a  $\nu_{\text{max}}$  3300 y 930  $\text{cm}^{-1}$  debidas a grupo hidroxilo y doble enlace. En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN se observa un multiplete a  $\delta$  3.6 ppm característico de un protón geminal a un hidroxilo. Este producto fue identificado en base a sus datos físicos y espectroscópicos como ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol aislado anteriormente por nosotros del *Ganoderma concinna*.<sup>227</sup>

### **SUSTANCIA T<sub>4</sub>**

Se obtuvo como un sólido que después de varias cristalizaciones en metanol fijó su p.f. 177-179°C. Su espectro de masas muestra un pico molecular a  $m/z$  428.3289 correspondiente a la fórmula empírica  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ , también se observan en dicho espectro las rupturas típicas (a) y (b) de la cadena lateral del ergosterol, la pérdida de dos átomos de oxígeno y agua. En el espectro de IR aparece una señal a  $\nu_{\text{max}}$  3250  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a un grupo hidroxilo y otra a  $\nu_{\text{max}}$  967  $\text{cm}^{-1}$  que teniendo en cuenta la pérdida de oxígeno en su espectro de masas, confirma la existencia en la molécula de un puente peróxido. El espectro de  $^1\text{H}$  RMN muestra un multiplete centrado en  $\delta$  5.18

<sup>226</sup> Ver presente Tesis Doctoral, pág. 55.

<sup>227</sup> Ver presente Tesis Doctoral, págs. 84-85.

ppm característico de un doble enlace en C-22 en la cadena lateral. Consultada la bibliografía, identificamos la sustancia **T<sub>4</sub>** como peróxido de ergosterol, también aislada por nosotros del *Ganoderma lucidum* y denominada **G<sub>5</sub>**.<sup>228</sup>

#### **SUSTANCIA T<sub>5</sub>**

Se aisló como un sólido amorfo de color blanco, en su espectro de masas (FAB) se observó un ión molecular a  $m/z$  431.3541  $[M + H]^+$  correspondiente a la fórmula molecular  $C_{28}H_{47}O_3$  y las rupturas (a) y (b) de la cadena lateral del ergosterol, comentadas anteriormente, así como la pérdida de dos moléculas de agua. Su espectro de IR presenta bandas de absorción a  $\nu_{max}$  3425, 1640 y  $815\text{ cm}^{-1}$  típicas de hidroxilo y dobles enlaces. El examen de su espectro de  $^1\text{H}$  RMN muestra las siguientes señales: dos tripletes a  $\delta$  5.18 y 5.32 ppm correspondientes a protones olefinicos, un multiplete a  $\delta$  4.03 ppm y un doblete a  $\delta$  3.59 ppm características de protones geminales a grupos hidroxilos. Consultada la bibliografía pudimos observar que nuestra sustancia posee propiedades espectroscópicas idénticas al cerevisterol aislado por nosotros del *Laetiporus sulphureus* y denominada **L<sub>8</sub>**.<sup>229</sup>

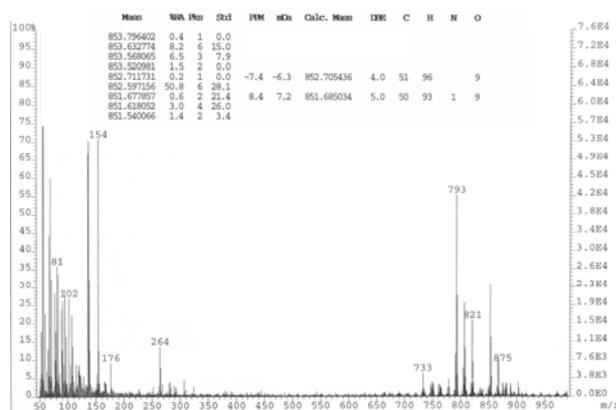
#### **SUSTANCIA T<sub>6</sub>**

Obtenida en forma de acetato (10 mg) como un sólido amorfo, homogéneo en capa fina,  $[\alpha]_D +17$  ( $c$  0.08,  $\text{CHCl}_3$ ). Su fórmula molecular fue de  $C_{50}H_{93}NO_9$ , determinada por HRFABMS (figura 94) en el cual aparece un pico molecular a  $m/z$  851  $[M]^+$ .

---

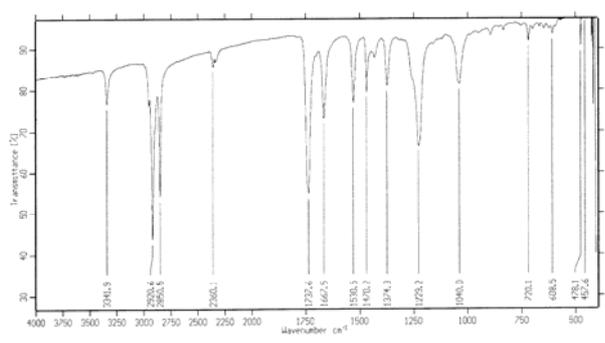
<sup>228</sup> Ver presente Tesis Doctoral, pág. 58.

<sup>229</sup> Ver presente Tesis Doctoral, pág. 159.



**Figura 94.** Espectro de masas de la sustancia **T<sub>6</sub>**.

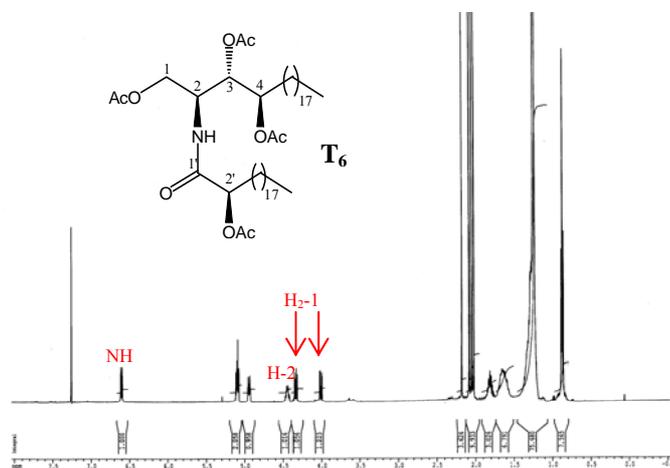
En el espectro IR (figura 95) aparece una señal a  $\nu_{\max}$  1737  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a grupos acetatos y otras dos a  $\nu_{\max}$  1667 y 1530  $\text{cm}^{-1}$  características de una amida funcionalizada.



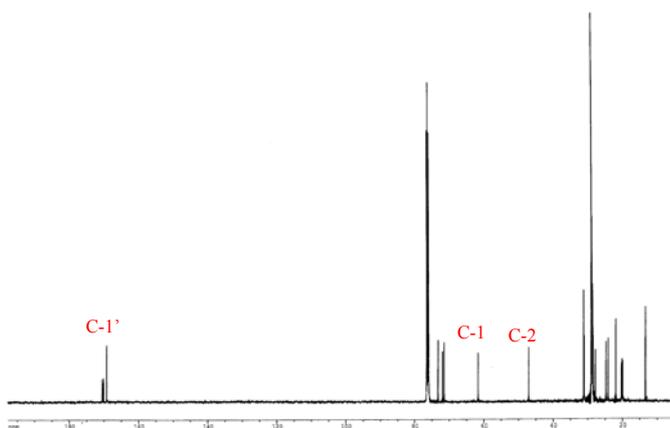
**Figura 95.** Espectro de IR de la sustancia **T<sub>6</sub>**.

El espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 96) muestra señales debidas a dos grupos metilos terminales a  $\delta$  0.87 ppm (6H, t,  $J = 7.1$  Hz), cuatro singuletes a  $\delta$  2.02, 2.05, 2.08 y 2.18 ppm que los hemos asignado a cuatro grupos acetatos y a  $\delta$  4.00 (1H, dd,  $J = 3.2, 11.8$  Hz), 4.33 (1H, dd,  $J = 6.4, 11.2$  Hz) 4.94 (1H, dd,  $J = 3.3, 10.0$  Hz) y 5.09 ppm (2H, m) las señales típicas de sus hidrógenos geminales. El espectro  $^1\text{H}$  RMN también confirma la presencia de una amida con una señal a  $\delta$  6.60 ppm (1H, d,  $J = 9.1$  Hz, NH), así como

una señal a  $\delta$  4.44 ppm (1H, ddd,  $J = 3.2, 7.3, 9.7$  Hz) la cual fue indicativa de un protón metino vecinal al átomo de nitrógeno del grupo amida.



**Figura 96.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia  $\text{T}_6$ .

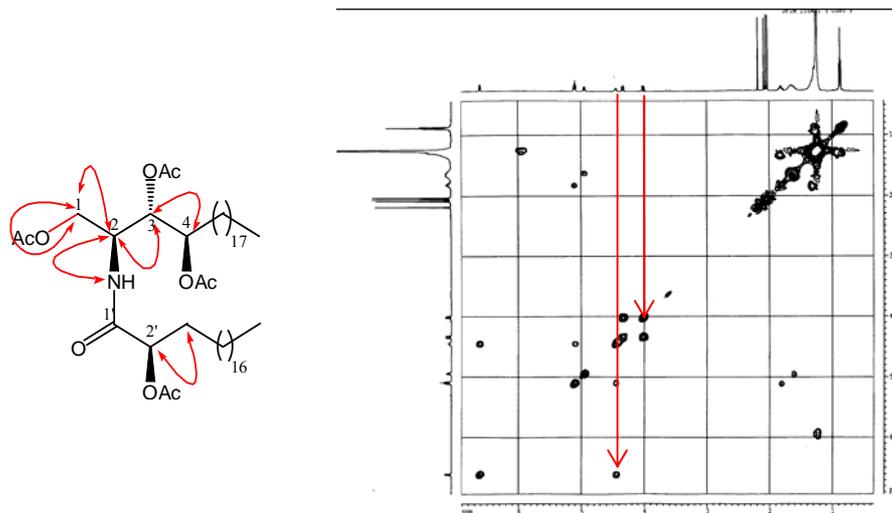


**Figura 97.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la sustancia  $\text{T}_6$ .

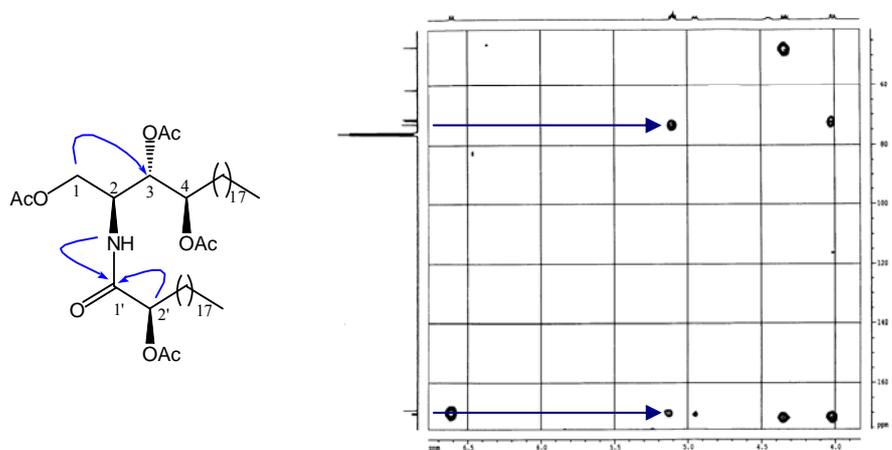
El espectro  $^{13}\text{C}$  RMN (figura 97) muestra señales características debida al carbonilo de una amida a  $\delta$  170.45 ppm y un carbono metino unido al nitrógeno de la amida a  $\delta$

46.99 ppm.<sup>230</sup> De los datos espectrales anteriores y de su fórmula molecular se desprende que la sustancia **T<sub>6</sub>** es una ceramida.

El experimento COSY (figura 98) implica conectividades para H<sub>2</sub>-1 con H-2, H-2 con H-3, H-3 con H-4 y H-2' con H<sub>2</sub>-3' y también se observa conectividad de H-2 con el protón de la amida. El espectro de HMBC (figura 99) nos pone de manifiesto las siguientes correlaciones H-2' con C-1', H-1 con C-3, y el protón de la amida con C-1'.



**Figura 98.** Experimento COSY de la sustancia **T<sub>6</sub>**.



**Figura 99.** Ampliación del experimento HMBC de la sustancia **T<sub>6</sub>**.

<sup>230</sup> Chebaane, K.; Guyot, M. "Occurrence of *erythro*-docosaphinga-4,8-dienine, as an ester, in *Anemonia sulcata*" *Tetrahedron Lett.* 27, 1986, 1495-1496.

Por otra parte la longitud de la cadena base y la del ácido graso (figura 100) fueron determinadas a través de una hidrólisis alcalina (ver parte experimental), así tratamiento de **T<sub>6</sub>** con una disolución de KOH 1N dio los fragmentos **T<sub>6-1</sub>** y **T<sub>6-2</sub>**, el primero de ellos mostró en el espectro de HRFABMS (figura 101a) un ion molecular a *m/z* 396.33 [CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)CH(NH<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>OH + Na]<sup>+</sup> y el segundo (figura 101b) un pico a *m/z* 366 [CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH(OH)COOCH<sub>3</sub> + Na + H]<sup>+</sup>.

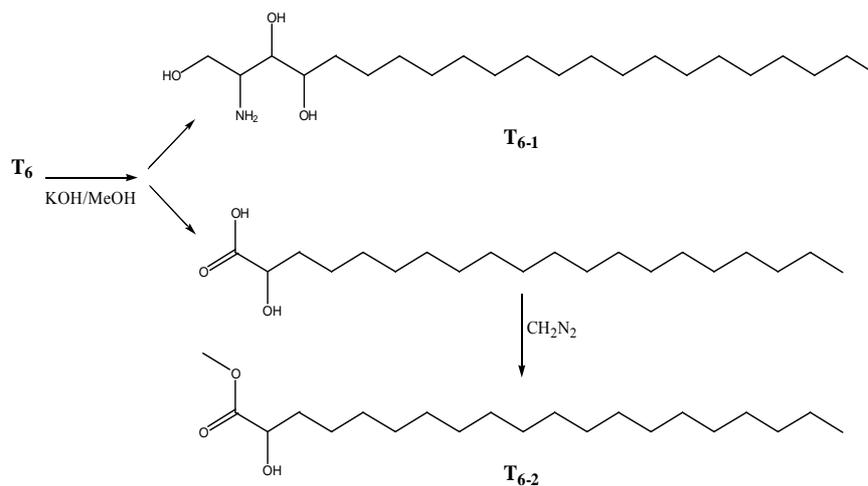


Figura 100. Hidrólisis básica de la sustancia **T<sub>6</sub>**.

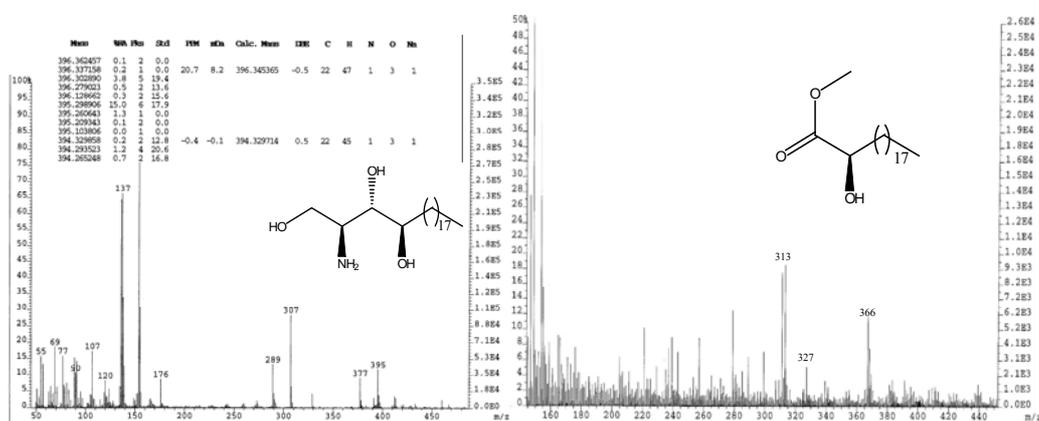
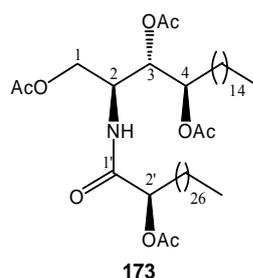


Figura 101. Espectros de masas de a) **T<sub>6-1</sub>** y b) **T<sub>6-2</sub>**.

De lo anterior se deduce que la longitud de la cadena base, denominada fitoesfingosina es un aminoalcohol con C<sub>22</sub> átomos de carbono conteniendo tres hidroxilos y un grupo amino. El metil éster del ácido graso fue identificado como 2-hidroxi-eicosanoato de metilo.

La estereoquímica relativa en C-2, C-3, C-4 y C-2' fue propuesta como 2*S*, 3*S*, 4*R*, 2'*R* al observar que los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento de los hidrógenos de **T<sub>6</sub>** fueron análogos al tetra-acetil derivado **173** descrito por Lourenço y col.<sup>231</sup> (tabla 6)



**Tabla 6.** Datos de <sup>1</sup>H RMN para el sustancia **T<sub>6</sub>** y **173**; J en Hz

|                                  | <b>T<sub>6</sub></b>     | <b>173<sup>a</sup></b> |
|----------------------------------|--------------------------|------------------------|
| H <sub>a</sub> -1                | 4.00 dd (3.2, 11.8)      | 4.01 m                 |
| H <sub>b</sub> -1                | 4.33 dd (6.4, 11.2)      | 4.34 m                 |
| H-2                              | 4.44 ddd (3.2, 7.3, 9.7) | 4.43 m                 |
| H-3                              | 5.09 m                   | 5.11 m                 |
| H-4                              | 5.09 m                   | 5.11 m                 |
| H-2'                             | 4.94 dd (3.3, 10.0)      | 4.94 m                 |
| N-H                              | 6.60 d (9.1)             | 6.58 d (9.0)           |
| Rotación óptica [α] <sub>D</sub> | + 17                     | + 19.2                 |

<sup>a</sup> Datos tomados de la ref. 231

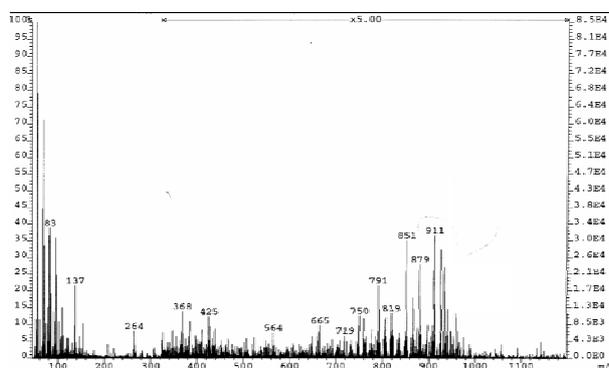
Los datos anteriores junto con las rotaciones ópticas (ver tabla 6) sugiere que **T<sub>6</sub>** tiene la misma configuración relativa que **173** lo que nos permite asegurar la estructura

<sup>231</sup> Lourenço, A.; Lobo, A. M.; Rodríguez, B.; Jimeno, M. L. "Ceramide from the fungus *Phellinus pini*" *Phytochemistry* 43, **1996**, 617-620.

de la nueva ceramida **T<sub>6</sub>** como (2*S*, 3*S*, 4*R*, 2'*R*)-2-(2'-hidroxieicosanoilamino) docosano-1,3,4-triol denominada trametenamida A.

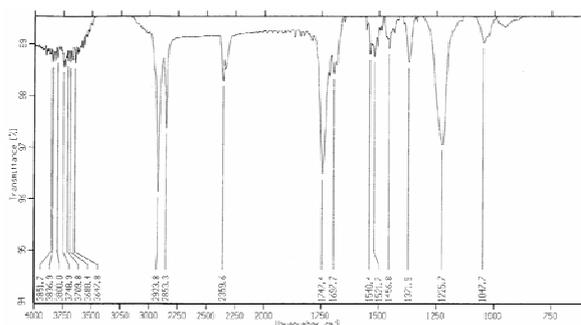
### SUSTANCIA T<sub>7</sub>

Fue obtenida al igual que **T<sub>6</sub>** por acetilación y posterior purificación, obteniéndose un polvo amorfo,  $[\alpha]_D^{20} +2$  (c 0.002, CHCl<sub>3</sub>). Su espectro de FABMS (figura 102)  $m/z$   $[M + Na]^+$  muestra un pico molecular a 932.8060 de acuerdo a la fórmula molecular C<sub>52</sub>H<sub>95</sub>NO<sub>11</sub>.



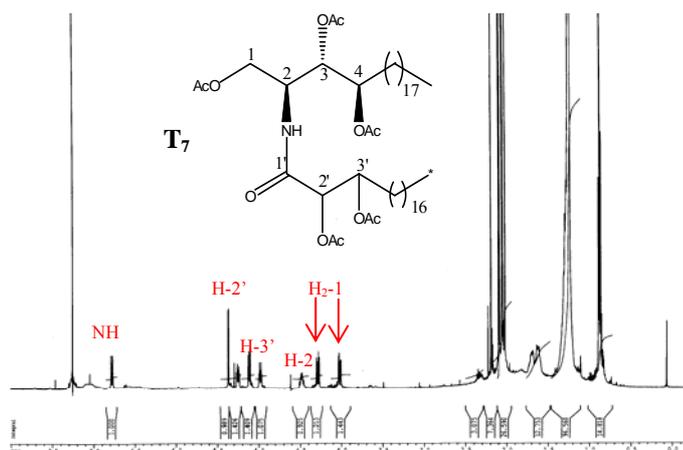
**Figura 102.** Espectro de masas de la sustancia **T<sub>7</sub>**.

Su espectro de IR (figura 103) presenta una banda a  $\nu_{\max}$  1747 cm<sup>-1</sup> correspondiente a grupos acetatos y una señal débil a  $\nu_{\max}$  1660 cm<sup>-1</sup> asignada a un grupo amida.



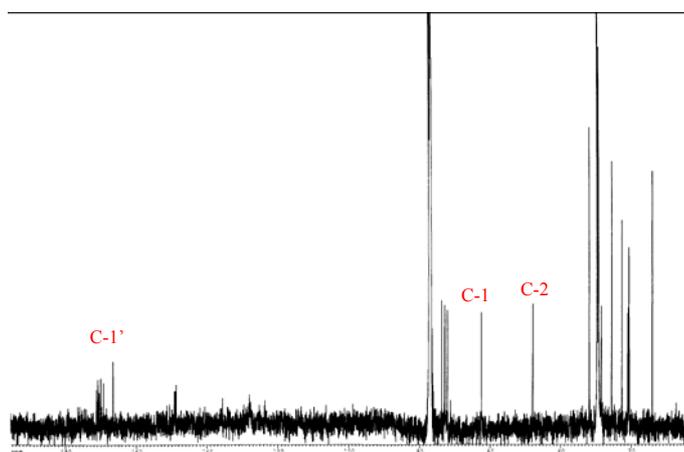
**Figura 103.** Espectro de IR de la sustancia **T<sub>7</sub>**.

Su espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 104) confirma la presencia de una amida al aparecer la señal de un protón a  $\delta$  6.78 ppm (1H, d,  $J = 9.2$  Hz). También se observa señales para seis protones geminales a grupos acetatos a  $\delta$  4.02 (1H, dd,  $J = 3.4, 11.8$  Hz,  $\text{H}_a\text{-1}$ ), 4.28 (1H, dd,  $J = 6.4, 11.8$  Hz,  $\text{H}_b\text{-1}$ ), 4.98 (1H, dt,  $J = 3.2, 6.6$  Hz, H-4), 5.11 (1H, dd,  $J = 4.0, 7.4$  Hz, H-3), 5.25 (1H, dt,  $J = 4.0, 7.4$  Hz, H-3') y 5.36 ppm (1H, d,  $J = 3.2$  Hz, H-2'), así como una señal a  $\delta$  4.82 ppm la cual fue asignada a un protón metino vecinal al átomo de nitrógeno de un grupo amida.



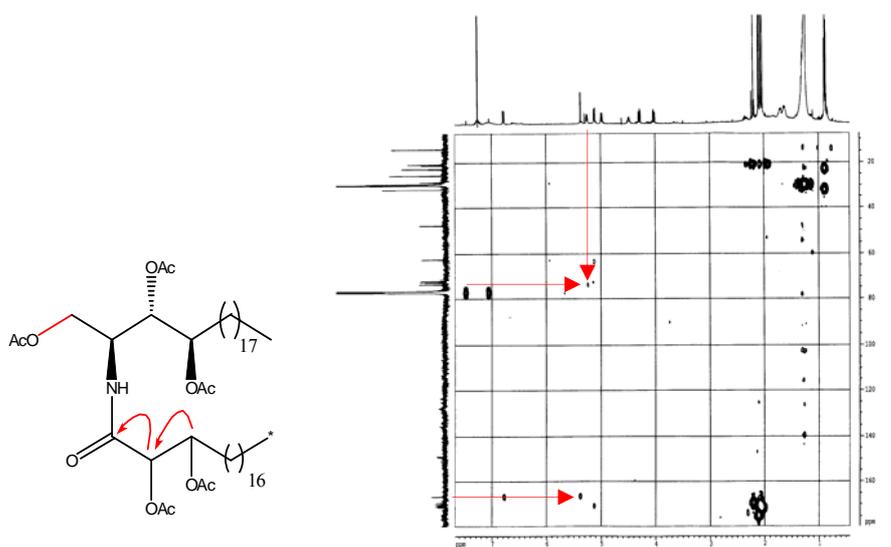
**Figura 104.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia  $\mathbf{T}_7$ .

Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN (figuras 104 y 105) de la unidad acetilsefingosina de  $\mathbf{T}_7$  son prácticamente superponibles con la parte correspondiente en  $\mathbf{T}_6$ , esto sugiere la presencia de tres grupos hidroxilos y de un carbono portador de un grupo NH. Lo anterior pone de manifiesto que la acetilsefingosina base de  $\mathbf{T}_7$  posee 22 átomos de carbono, tres grupos acetatos y un grupo amina. La presencia de dos acetatos adicionales nos hizo pensar en la existencia de dos hidroxilos en la otra cadena carbonada existente en el producto en estudio.

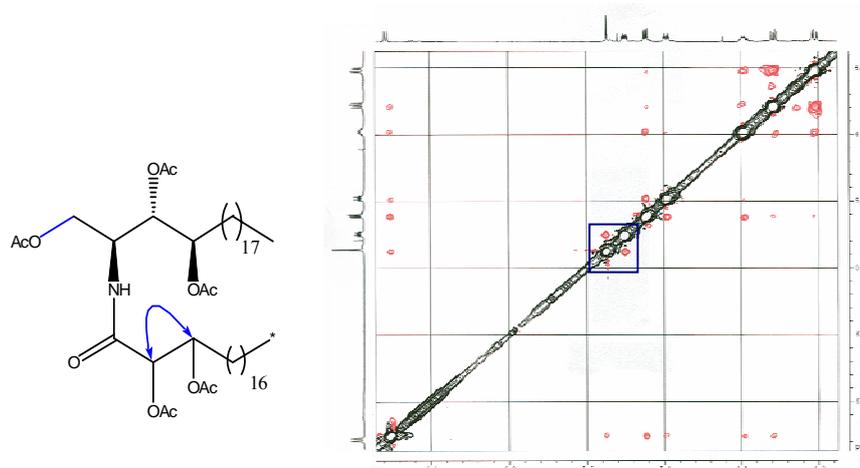


**Figura 105.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la sustancia **T<sub>7</sub>**.

Nosotros hemos situado los mencionados acetatos sobre los carbonos C-2' y C-3' respectivamente, basándonos en un experimento HMBC (figura 106), observándose las siguientes correlaciones H-2' con C-1' y H-3' con C-2'. Esto también se confirmó a través de un estudio NOESY (figura 107) donde se muestra con claridad entre otras la conectividad entre H-2' y el H-3'.



**Figura 106.** Experimento HMBC de la sustancia **T<sub>7</sub>**.



**Figura 107.** Experimento NOESY de la sustancia T<sub>7</sub>.

Al no existir en la bibliografía consultada modelos de esfingolipidos con un ácido graso hidroxilado en C-2' y C-3' no pudimos establecer la configuración absoluta con los datos de que disponemos. Por lo tanto la estructura de la nueva sustancia T<sub>7</sub> fue asignada como (2*S*, 3*S*, 4*R*)-2-(2', 3'-dihidroxi-eicosanoilamino) docosano-1,3,4-triol denominada trametenamida B.

***PARTE EXPERIMENTAL***

El hongo *Trametes menziesii* (Berk) Ryv. fue recolectado en un bosque maderable en la finca Nueva Lucía (vereda Santa María) jurisdicción del municipio de Valencia (Córdoba-Colombia) en mayo del 2000. El material fúngico fresco (cuerpo fructífero) se encuentra descomponiendo el tronco de el árbol *Brownea ariza* denominado popularmente “florisanto”. El hongo fue identificado por el profesor Luís Henao del Instituto de Ciencias Naturales de Universidad Nacional de Colombia y un ejemplar se encuentra en el Herbario Nacional Colombiano con el No. Col-344005.

380 gramos de hongo se secaron, molieron y se extrajeron con etanol (96%) hasta agotamiento. El extracto etanólico se concentró a vacío dando 3.62 gramos, éste se disolvió en MeOH, se le añadió gel de sílice, se eliminó el disolvente y se colocó en la parte superior de una columna cromatografica, empaquetada con gel de sílice y eluida con mezclas de n-hexano-acetato de etilo de polaridad creciente. Se tomaron 150 fracciones de 150 ml cada una, y se analizaron por cromatografía en capa fina para luego reagruparlas en seis, como se muestra en la tabla 7. La purificación de dichas fracciones se realizaron de la siguiente manera:

La fracción A contiene una sustancia mayoritaria que se purificó mediante CC de gel de sílice eluyendo con una mezcla de n-hexano-AcOEt (9:1) obteniéndose la sustancia **T<sub>1</sub>** pura.

Las fracciones B y C eluidas de la columna general con mezclas de n-hexano-AcOEt (9:1) y (4:1), respectivamente, mostraban por TLC analítica los mismos componentes, por tanto se unieron y purificaron mediante CC de gel de sílice eluida con n-hexano y mezclas de n-hexano-AcOEt, CC de Sephadex LH-20 eluida con n-hexano-AcOEt-metanol (3:3:1) y finalmente por cromatografía TLC preparativa eluyendo con tolueno-acetona (9:1) obteniéndose las sustancias **T<sub>2</sub>** y **T<sub>3</sub>**.

La fracción D después de recromatografiarla en TLC preparativa usando como eluyente n-hexano-AcOEt (8:2) se obtuvo en estado puro la sustancia **T<sub>4</sub>**.

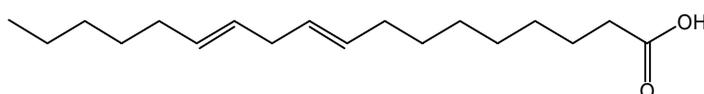
De la fracción E se obtuvo la sustancia **T<sub>5</sub>** por CC de gel de sílice utilizando como eluyente CHCl<sub>3</sub>-metanol con polaridad creciente hasta alcanzar el 10% y posterior TLC preparativa usando como eluyente la mezcla n-hexano-AcOEt (7:3) con tres recorridos.

La fracción F obtenida de la cromatografía general con AcOEt se concentró obteniéndose una masa que en parte era insoluble en  $\text{CHCl}_3$ . Esta masa insoluble a la hemos denominado  $\mathbf{T}_m$  se acetiló con  $\text{Ac}_2\text{O}$ /piridina dando dos productos en TLC, los cuales fueron separados por TLC preparativa utilizando como eluyente n-hexano-AcOEt (8:2), a estas dos sustancias las denominaremos para su estudio  $\mathbf{T}_6$  y  $\mathbf{T}_7$ .

**Tabla 7.** Sustancias aisladas de *T. menziesii* por orden de elución

| Fracción | Peso   | Eluyentes             | Sustancias  |
|----------|--------|-----------------------|---|
| A        | 150 mg | n-hexano              | Ácido linoleico, $\mathbf{T}_1$ .                                 |
| B        | 200 mg | n-hexano: AcOEt (9:1) | Ergosta 7,22-dien-3-ona, $\mathbf{T}_2$ ;                         |
| C        | 500 mg | n-hexano: AcOEt (4:1) | Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol, $\mathbf{T}_3$ ;                 |
| D        | 200 mg | n-hexano: AcOEt (7:3) | Peróxido de ergosterol, $\mathbf{T}_4$                            |
| E        | 150 mg | n-hexano: AcOEt (1:1) | Cervisterol, $\mathbf{T}_5$                                       |
| F        | 300 mg | AcOEt                 | Trametenamida A, $\mathbf{T}_6$ ; Trametenamida B, $\mathbf{T}_7$ |

**Sustancia  $\mathbf{T}_1$ :** Ácido linoleico (ácido 9,12-otadecadienoico)



Aceite 50 mg; IR  $\nu_{\text{max}}$  (film, KBr): 3460, 2930, 1744, 1464, 1102, 1048, 936, 724  $\text{cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 280  $[\text{M}]^+$  ( $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ ) (10), 179 (2), 109 (18), 95 (48), 81 (80), 67 (100);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.88 (3H, s, Me-18), 1.31 (16H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1.60 (4H, t,  $J = 6.7$  Hz,  $2\text{CH}_2$ ), 2.03 (4H, t,  $J = 6.5$  Hz,  $2\text{CH}_2$ ), 2.34 (4H, t,  $J = 7.4$  Hz,  $2\text{CH}_2$ ), 2.77 (2H, t,  $J = 5.7$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 5.34 (4H, m,  $(\text{CH}=\text{CH})_2$ );  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.1 (C-18), 21.3, 22.5, 24.6, 25.6, 27.2, 29.2, 31.5, 34.0 (12- $\text{CH}_2$ ), 127.9, 128.0, 129.7, 130.0 (C- $(\text{CH}=\text{CH})_2$ ), 179.9 (C-1).

**Sustancia  $\mathbf{T}_2$ :** Sólido cristalino, 90 mg, constantes físicas y espectroscópicas idénticas a la sustancia  $\mathbf{G}_1$  (ver página 72).

**Sustancia  $\mathbf{T}_3$ :** Sólido cristalino, 130 mg, constantes físicas y espectroscópicas idénticas a la sustancia  $\mathbf{C}_4$  (ver páginas 105-106).

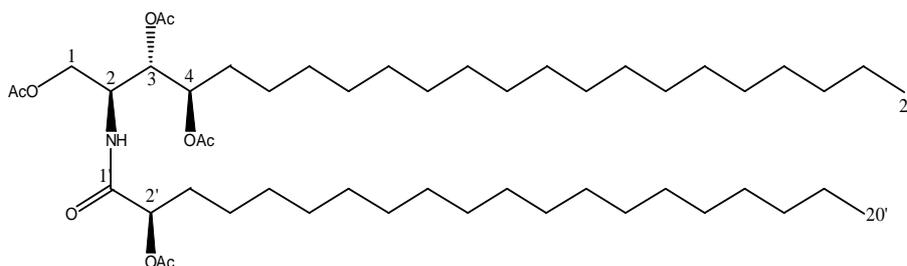
**Sustancia  $\mathbf{T}_4$ :** Sólido cristalino, 70 mg, constantes físicas y espectroscópicas idénticas a la sustancia  $\mathbf{G}_5$  (ver página 74).

**Sustancia  $\mathbf{T}_5$ :** Sólido amorfo, 2 mg, constantes físicas y espectroscópicas idénticas a la sustancia  $\mathbf{L}_8$ . (ver página 168).

### Acetilación de $T_m$ .

17 mg de la mezcla  $T_m$  se disolvieron en piridina y se le adicionó un exceso de  $Ac_2O$  a  $25^\circ C$ , después de 24h de reacción, se vertió sobre una disolución diluida de bicarbonato de sodio y la piridina fue eliminada con una disolución acuosa de sulfato de cobre. Extracción con cloroformo y posterior purificación utilizando cromatografía TLC preparativa con n-hexano- $AcOEt$  (8:2, tres eluciones), se separaron los acetatos  $T_6$  y  $T_7$ .

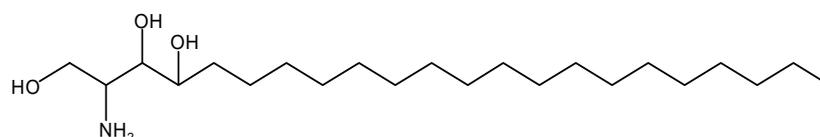
**Acetato de  $T_6$ :** Acetato de trametenamida A, (2*S*,3*S*,4*R*,2'*R*)-2-[2'-acetiloxieicosanoi lamino]-1,3,4-triacetiloxidocosano.



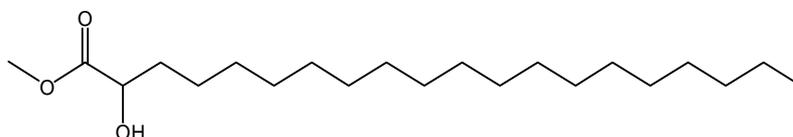
Sólido amorfo, 10 mg,  $[\alpha]_D$ : +17 (*c* 0.08,  $CHCl_3$ ); IR  $\nu_{max}$  (film, KBr): 3341, 2920, 2850, 1737, 1667, 1530, 1470, 1374, 1229, 1040  $cm^{-1}$ ; FABMS (pos.) (NBA/NaCl) *m/z* (i. rel.): 875  $[M + Na]^+$  (9), 852  $[M + H]^+$  (30), 851  $[M]^+$  (1), 820 (20), 806 (25), 792 (55), 790 (11), 264 (13), 154 (70), 137 (70), 107 (22), 69 (60), 54 (100); HRFABMS: 851.6778 ( $C_{50}H_{93}NO_9$ , calcd 851.6850);  $^1H$  RMN ( $\delta$ ,  $CDCl_3$ ): 0.87 (6H, t, *J* = 7.1 Hz, Me-22 y Me-20'), 1.27-1.41 (64H, br s, 32- $CH_2$ ), 1.60 (4H, m,  $CH_2$ -5 y  $CH_2$ -3'), 2.02 (3H, s, OAc), 2.05 (3H, s, OAc), 2.08 (3H, s, OAc), 2.18 (3H, s, OAc), 4.00 (1H, dd, *J* = 3.2, 11.8 Hz,  $H_a$ -1), 4.33 (1H, dd, *J* = 6.4, 11.2 Hz,  $H_b$ -1), 4.44 (1H, ddd, *J* = 3.2, 7.3, 9.7 Hz, H-2), 4.94 (1H, dd, *J* = 3.3, 10.0 Hz, H-2'), 5.09 (1H, m, H-3), 5.09 (1H, m, H-4), 6.60 (1H, d, *J* = 9.1 Hz, N-H);  $^{13}C$  RMN ( $\delta$ ,  $CDCl_3$ ): 13.27 (C-22 y C-20'), 19.84 (OAc), 19.91 (OAc), 20.03 (OAc), 20.18 (OAc), 21.85-31.08 [C-(5-21) y C-(3'-19')], 46.99 (C-2), 61.56 (C-1), 71.42 (C-3), 71.88 (C-2'), 73.17 (C-4), 169.15 (C-1'), 169.19 (2C=O), 170.09 (C=O), 170.45 (C=O).

### Hidrólisis básica de la sustancia $T_6$ :

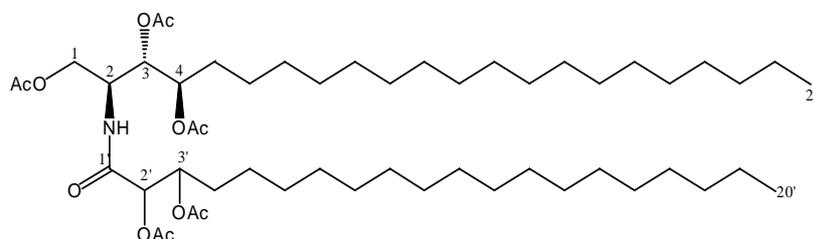
4 mg de  $T_6$  disueltos en metanol-agua (9:1) se adicionaron a una solución de KOH 1N (5 ml), en atmósfera de argón y con agitación a  $80^\circ C$  durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se extrajo con diclorometano y la capa orgánica se secó, concentró y purificó a través de TLC utilizando cloroformo-metanol (5:1) como eluyente obteniéndose  $T_{6-1}$  (1.0 mg). La fase acuosa se acidifica con ácido sulfúrico al 5%, se extrae con diclorometano se concentra y se le añade diazometano en éter etílico, obteniéndose  $T_{6-2}$  (0.6 mg).

**Sustancia T<sub>6.1</sub>:** (2*S*, 3*S*, 4*R*)-2-amino-1,3,4-docosanotriol

Aceite, FABMS (NBA/NaCl)  $m/z$  (I. rel.): 396  $[M+Na]^+$  (11), 377  $[M + Na - H_2O]^+$  (9), 307 (28), 289 (13), 176 (8), 154 (100), 137 (66), 107 (17); HRFABMS: 396.3371 (calcd, para  $C_{22}H_{47}NO_3Na$  396.3453;  $^1H$  RMN ( $\delta$ , piridina- $d_5$ ): 0.85 (3H, t,  $J = 5.5$  Hz,  $CH_3$ -22), 1.1-1.3 (28H, s a, 14 $CH_2$  (7-21)), 1.61 (1H, m,  $H_b$ -6), 1.82 (2H, m,  $H_a$ -6,  $H_b$ -5), 2.20 (1H, m,  $H_a$ -5), 4.03 (1H, d,  $J = 4.7$  Hz, H-2), 4.18 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-4), 4.33 (1H, dd,  $J = 5.4, 7.6$  Hz, H-3), 4.49 (2H, m,  $H_2$ -1).

**Sustancia T<sub>6.2</sub>:** (2*R*)-2-Hidroieicosanoato de metilo

Aceite, FABMS: (NBA/NaCl)  $m/z$  (I. rel.): 366.2540 (calcd. Para  $C_{21}H_{43}O_3Na$ )  $[M+Na+H]^+$  (11), 327 (5), 313 (18), 311 (17), 299 (7), 284 (5);  $^1H$  RMN ( $\delta$ ,  $CDCl_3$ ): 0.96 (3H, t,  $J = 7.4$  Hz), 1.25 (30H, s br, 15- $CH_2$ ), 1.42 (2H, m,  $CH_2$ ), 1.71 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.66 (3H, s, OMe), 4.10 (1H, dd,  $J = 6.8, 10.1$  Hz).

**Acetato de T<sub>7</sub>:** Acetato de trametenamida B, (2*S*,3*S*,4*R*)-2-[2',3'-diacetiloxieicosanoilamino]-1,3,4-triacetiloxidocosano.

Sólido amorfo, 3 mg,  $[\alpha]_D$ : +2 ( $c$  0.002,  $CHCl_3$ ); IR  $\nu_{max}$  (film, KBr): 2923, 2853, 1747, 1697, 1660, 1546, 1371, 1225, 1047  $cm^{-1}$ ; FABMS (pos.) (NBA/NaCl)  $m/z$  (I. rel.): 932.8060  $[M + Na]^+$  (5), 911  $[M + H]^+$  (3), 910  $[M]^+$  (7), 864 (3 850 (7), 790 (4), 308 (3), 264 (8), 154 (10), 137 (22), 107 (22), 69 (60), 54 (100);  $^1H$  RMN ( $\delta$ ,  $CDCl_3$ ): 0.87 (6H, t,  $J = 6.8$  Hz, Me-22 y Me-20'), 1.20-1.50 (62H, br s, 31- $CH_2$ ), 1.60 (4H, m,  $CH_2$ -5 y  $CH_2$ -4'), 2.02 (3H, s, OAc), 2.05 (3H, s, OAc), 2.06 (3H, s, OAc), 2.08 (3H, s, OAc), 2.09 (3H, s, OAc), 4.02 (1H, dd,  $J = 3.4, 11.8$  Hz,  $H_a$ -1), 4.28 (1H, dd,  $J = 6.4, 11.8$  Hz,  $H_b$ -1), 4.82 (1H, ddd,  $J = 3.2, 6.8, 9.6$  Hz, H-2), 4.98 (1H, dt,  $J = 3.2, 6.6$  Hz,

H-4), 5.11 (1H, dd, J = 4.0, 7.4 Hz, H-3), 5.25 (1H, dt, J = 4.0, 7.4 Hz, H-3'), 5.36 (1H, d, J = 3.2 Hz, H-2'), 6.78 (1H, d, J = 9.2 Hz, N-H); <sup>13</sup>C RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): 14.10 (C-22 y C-20'), 20.54 (OAc), 20.65 (OAc), 20.73 (OAc), 20.87 (OAc), 20.99 (OAc), 25.55-31.91 [C-(5-21) y C-(4'-19')], 47.90 (C-2), 62.51 (C-1), 72.09 (C-3), 72.79 (C-3'), 72.91 (C-4), 73.72 (C-2'), 166.61 (C-1'), 169.30 (C=O), 170.05 (C=O), 173.49 (C=O), 170.86 (C=O), 171.24 (C=O).

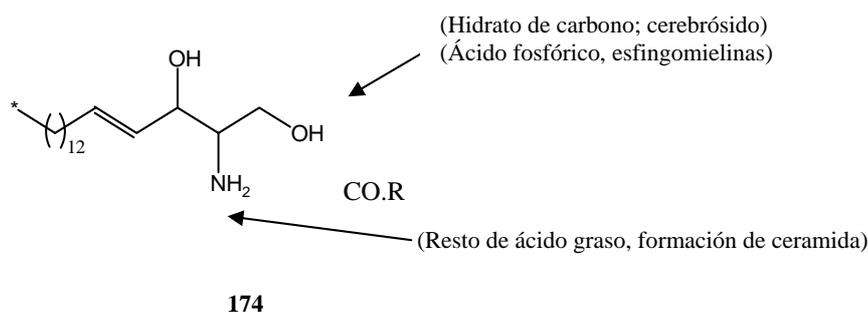
## **PARTE V**

### **SÍNTESIS DE CERAMIDAS**

## ***INTRODUCCIÓN***

Como sabemos, el conjunto de los esfingolípidos es relativamente heterogéneo y tiene, como unidad básica estructural al esfingol (esfingosina). Algunas de ellas contienen ácido fosfórico y pueden considerarse relacionadas con los glicofosfátidos, mientras que otros no tienen ácido fosfórico, pero en cambio contienen una o más moléculas de hidratos de carbono y otras unidades estructurales.

El esfingol (esfingosina), es la unidad característica de este grupo de lípidos. Es un dialcohol etilénico, de estructura *trans*, que tiene un grupo amino adicional. Está constituido por una cadena lineal de 18 átomos de carbonos, que tiene una función alcohólica primaria y una secundaria en el C-3; una función amina en el C-2 y un doble enlace en los carbonos C-4 y C-5. Su estructura **174**, corresponde a la *D-eritro-1,3-dihidroxi-2-amino-4-trans-octadeceno*.



La designación de *D-eritro*-esfingol nos pone de manifiesto que el hidroxilo en C-3 y la amina en C-2 tienen la configuración que corresponde a la *D-eritrosa*.

El esfingol ha sido sintetizado y se ha obtenido también su isómero, el *treo* (configuración *L-treosa*), que no tiene las propiedades del producto natural.<sup>232</sup>

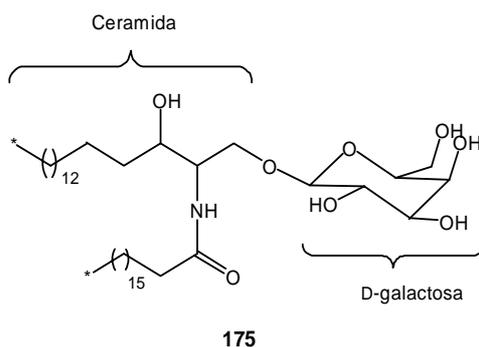
Además del esfingol, se ha aislado de los tejidos su producto de reducción, el dihidroesfingol, que también tiene la configuración de la *D-eritrosa* y, por lo tanto, es el

<sup>232</sup> Olofsson, B.; Somfai, P. "Divergent synthesis of *D-erythro* sphingosine, *L-threo* sphingosine, and their regioisomers" *J. Org. Chem.* 68, **2003**, 2514-2517.

D-eritro-dihidroesfingol. Otros esfingoles con una cadena de 20 carbonos han sido identificados en los tejidos.

Cuando el esfingol se condensa solamente con una molécula de ácido graso, lo hace sobre el grupo amino, produciendo una amida. Este compuesto recibe el nombre de ceramida y se encuentra como tal en algunos tejidos. La estructura de ceramida se halla en la mayor parte de los esfingolípidos aislados y constituyen la unidad estructural de los mismos. Muchos estudios publicados indican que las ceramidas de origen natural son compuestos de una extraordinaria importancia ya que indican la muerte de células terminales vía apoptosis.<sup>233</sup> Debido a que las ceramidas y sus homólogos de cadenas cortas no se metabolizan muy rápidamente podrían ser drogas anticancerígenas.<sup>234</sup>

En la naturaleza se han encontrado, en pequeña cantidad, algunos glicosfingolípidos que contienen dihidroesfingol **175**.<sup>235</sup> Su hidrólisis, conduce a la formación de una molécula de ácido graso, una de dihidroesfingol y una de D-galactosa.<sup>236</sup>



<sup>233</sup> a) Pettus, B. J.; Chalfant, C. E.; Hannun, Y. A. "Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives" *Biochim. Biophys. Acta* 1585, **2002**, 114-125; b) Mimeault, M. "New advances on structural and biological functions of ceramide in apoptotic/necrotic cell death and cancer" *FEBS Lett.* 530, **2002**, 9-16.

<sup>234</sup> Reynolds, C. P.; Maurer, B. J.; Kolesnick, R. N. "Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy" *Cancer Lett.* 206, **2004**, 169-180.

<sup>235</sup> Munesada, K.; Yuasa, M.; Suga, T. "Cerebrosides of frog brain. Structure of the ceramide part of the cerebrosides" *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1991**, 189-194.

<sup>236</sup> Dumoulin, F.; Lafont, D.; Boullanger, P.; Mackenzie, G.; Mehl, G. H.; Goodby, J. W. "Self-Organizing Properties of Natural and Related Synthetic Glycolipids" *J. Am. Chem. Soc.* 124, **2002**, 13737-13748.

La fitoesfingosina **174** es uno de los componentes mayoritarios de los glicosfingolípidos de cadena larga, fue aislada por primera vez de hongos en 1911<sup>237</sup> y se observó que estaba ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y en tejidos de muchos mamíferos (cerebro, pelo, riñón, piel, hígado, útero, intestino y plasma sanguíneo). Su estructura fue caracterizada por Oda<sup>238</sup> y por Carter y Hendricksson.<sup>239</sup> La mayoría de las cadenas carbonadas de los esfingolípidos están formadas por 18 carbonos aunque también se encuentran cadenas de otras longitudes especialmente de 20 dependiendo de la fuente de origen. Además de su función estructural en membrana, la fitoesfingosina **174** es un lípido bioactivo actuando potencialmente como una señal *heat stress* en célula de levadura y algunos de sus derivados muestran actividad fisiológica importante como potente inhibidor tumoral. Debido a que el aislamiento y purificación de estas sustancias (esfingolípidos, ceramidas, etc) para la obtención de material homogéneo es un proceso altamente costoso se ha optado por diseñar rutas sintéticas que permitan obtener dichas sustancias en buen rendimiento y alto grado de pureza para realizar ensayos biológicos, bioquímicos, biomédicos y farmacológicos.<sup>240</sup> Algunas de las sustancias son problemáticas debido a que los productos de partida no son directamente accesibles y no poseen elevada pureza enantiomérica, por lo tanto el diseño de nuevas rutas sintéticas eficaces, es aún necesario para la preparación de fitoesfingosinas y ceramidas. De aquí que nosotros hayamos realizado la síntesis de la nueva ceramida (2*S*, 3*S*, 4*R*)-2-(2', 3'-dihidroxi-eicosanoilamino)-1,3,4-docosanotriol **T<sub>7</sub>** obtenida por nosotros durante la realización de la presente Tesis Doctoral.<sup>241</sup>

---

<sup>237</sup> Zellner, J. "The Chemistry of the Mushroom. (*Amanita muscaria*) IV" *Monatsch. Chem.* 32, **1911**, 133-142

<sup>238</sup> Oda, T. "Components of penicillin-producing molds. IV. Fungus cerebrin" *Yakugaku Zasshi* 72, **1952**, 142-145.

<sup>239</sup> Carter, H.; Hendrickson, H. S. "Biochemistry of the sphingolipids. XV. Structure of phytosphingosine and dehydrophytosphingosine" *Biochemistry* 2, **1963**, 389-393.

<sup>240</sup> Hoewll, A. R.; So, R. C.; Richardson, S. K. "Approaches to the preparation of sphingannines" *Tetrahedron* 60, **2004**, 11327-11347.

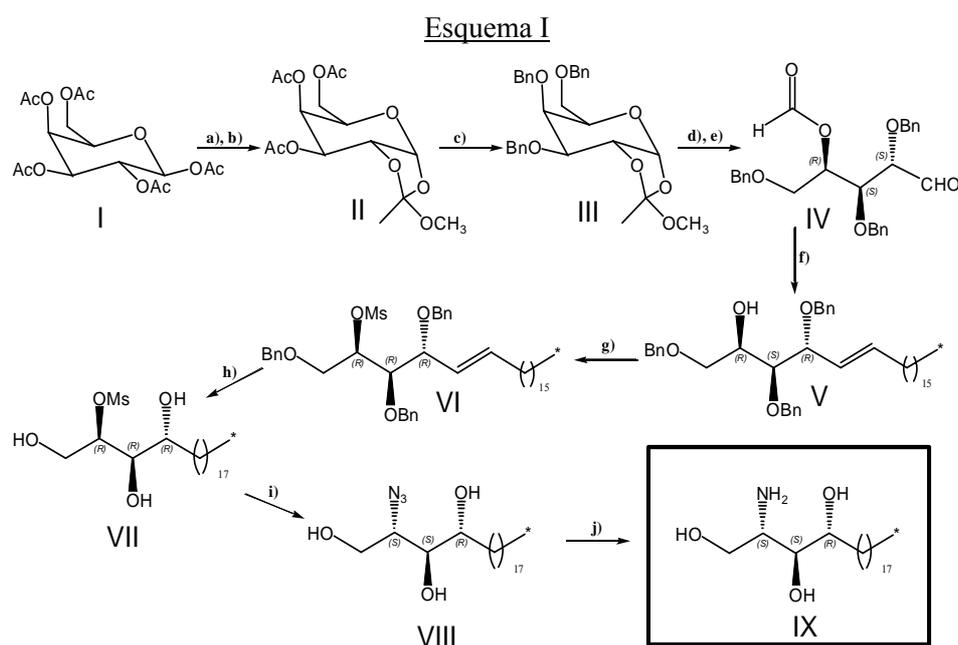
<sup>241</sup> Ver presente Tesis Doctoral, págs 222-225.

## ***PARTE TEÓRICA***

**Síntesis de (2*S*, 3*S*, 4*R*)-2-(2', 3'-dihidroxiieicosanoilamino)-1,3,4-docosanotriol (T<sub>7</sub>)**

Como comentamos anteriormente, las ceramidas de origen natural poseen gran importancia ya que se comportan como una prominente sustancia en la inducción de muerte de tumores vía apoptosis. Esto ha estimulado el interés por esta molécula como potencial agente farmacológico. Últimamente ha llamado la atención el desarrollo de su síntesis.<sup>242</sup>

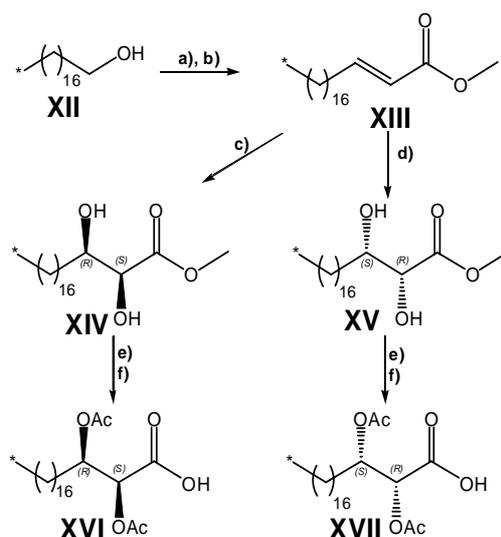
Para ello hemos usado el sintón (IX) en el que podríamos esperar vía acilación con (XVI, XVII) según los siguientes esquemas:



Reactivos y condiciones: a) HBr/AcOH al 30%; b) Metanol, 1,2-dicloroetano, trietilamina, bromuro de n-tetrabutilamonio; c) KOH, bromuro de bencilo, tolueno; d) Dioxano, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M; e) metaperyodato sódico, EtOH/H<sub>2</sub>O; f) Bromuro de heptadeciltrifenilfosfina (XI), n-butillitio, THF; g) Cloruro de mesilo, piridina; h) H<sub>2</sub>, Pd/C (10%), EtOH; i) Azida sódica, DMF; j) H<sub>2</sub>, Pd/C (10%), EtOH.

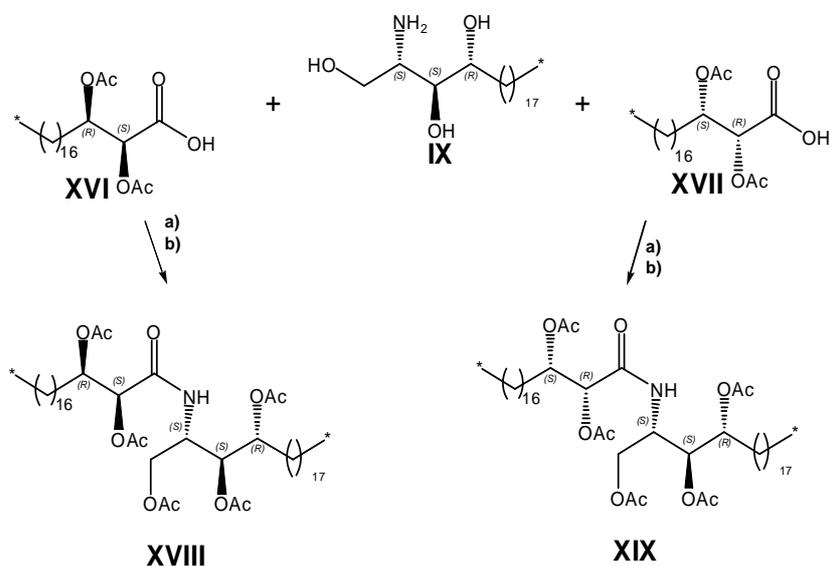
<sup>242</sup> a) Chang, Y. T.; Choi, J.; Ding, S.; Prieschl, E. E.; Baumruker, T.; Lee, J. M.; Ghung, S. C.; Schultz, P. G. "The synthesis and biological characterization of a ceramide library" *J. Am. Chem. Soc.* 124, **2002**, 1856-1857; b) Chun, J.; Byun, H. S.; Arthur, G.; Bittman, R. "Synthesis and growth inhibitory activity of chiral 5-hydroxy-2-N-acyl-(3*E*)-sphinganine: ceramides with an unusual sphingoid backbone" *J. Org. Chem.* 68, **2003**, 355-359; c) Chen, G.; Schmieg, J.; Tsuji, M.; Franck, R. W. "Efficient synthesis of  $\alpha$ -C-galactosyl ceramide immunostimulants: use of ethylene-promoted olefin cross-metathesis" *Org. Lett.* 6, **2004**, 4077-4080.

**Esquema II**



Reactivos y condiciones: a) Clorocromato de piridinium (PCC),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; b) Dimetil fosonoacetato de metilo, hidruro de sodio, benceno ; c) AD-mix- $\beta$ , t-BuOH/ $\text{H}_2\text{O}$ , metanosulfanamida,  $0^\circ\text{C}$ ; d) AD-mix- $\alpha$ , t-BuOH/ $\text{H}_2\text{O}$ , metanosulfanamida,  $0^\circ\text{C}$ ; e) NaOH(2 eq)/ $\text{H}_2\text{O}$ , THF ; f) Anhídrido acético, piridina.

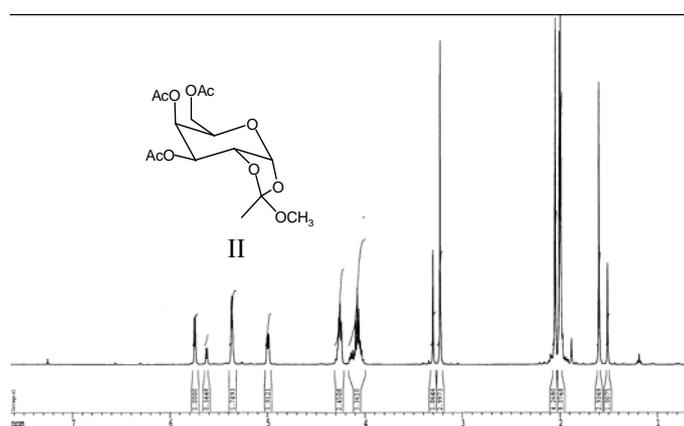
**Esquema III**



Reactivos y condiciones: a) 1-Hidroxi benzotriazol (HOBt), hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida; b) Anhídrido acético, piridina.

**Obtención de IX.-**

Por reacción de la penta-acetil galactosa (**I**) con ácido bromhídrico en ácido acético nos condujo al derivado bromado<sup>243</sup> que, por posterior tratamiento con bromuro de tetrabutilamonio, dicloroetano y metanol,<sup>244</sup> rindió **II** cuyo espectro de masas está de acuerdo con la fórmula molecular  $C_{15}H_{23}O_{10}$ . En el espectro de  $^1H$  RMN (figura 108) podemos apreciar un singlete a  $\delta$  1.60 ppm correspondiente a un metilo, tres acetatos a  $\delta$  1.99, 2.00 y 2.04 ppm y un singlete a  $\delta$  3.22 ppm típico de un metoxilo.



**Figura 108.** Espectro de  $^1H$  RMN de la sustancia **II**.

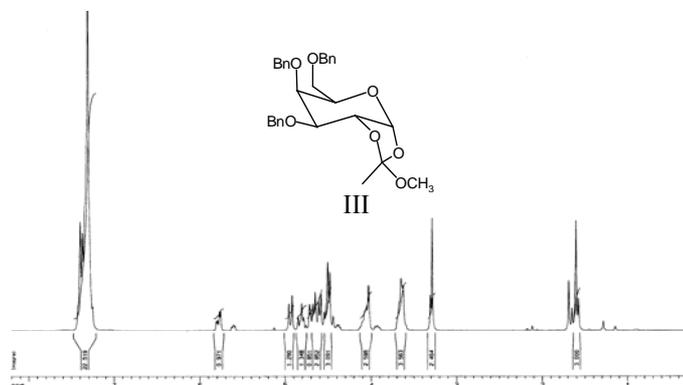
Cuando **II** se trata con hidróxido de sodio, tolueno y bromuro de bencilo nos condujo a **III**.<sup>245</sup> En el espectro de masas no se observa el ion molecular en cambio sí se aprecia un ion a  $m/z$  475 correspondiente a  $[M-OCH_3]^+$ , de aquí se deduce que posee de fórmula molecular  $C_{30}H_{34}O_7$ . En su espectro de  $^1H$  RMN (figura 109) se observa, entre otras, las siguientes señales: dos singletes a  $\delta$  1.60 y 3.29 correspondientes a un metilo

<sup>243</sup> Halazy, S.; Berges, V.; Ehrhard, A.; Danzin, C. "Ortho- and para-(difluoromethyl)aryl- $\beta$ -D-glucosides: a new class of enzyme-activated irreversible inhibitors of  $\beta$ -glucosidases" *Bioorg. Chem.* 18, **1990**, 330-344.

<sup>244</sup> Vernay, H. F.; Rachaman, E. S.; Eby, R.; Schuerch, C. "The use of 2-O-acyl-1-O-sulfonyl-D-galactopyranose derivatives in  $\beta$ -D-galactopyranoside synthesis" *Carbohydr. Res.* 78, **1980**, 267-273.

<sup>245</sup> Asai, N.; Fusetani, N.; Matsunaga, S. "Sex pheromones of the hair crab *Erimacrus isenbeckii*. II. Synthesis of ceramides" *J. Nat. Prod.* 64, **2001**, 1210-1215.

y un metoxilo respectivamente. Entre  $\delta$  7.31 y 7.40 ppm aparece un multiplete correspondiente a quince protones aromáticos.



**Figura 109.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia **III**.

La oxidación de **III** con metaperyodato sódico<sup>246</sup> nos condujo al aldehído **IV** en cuyo espectro de masas no aparece el ion molecular pero sí se observa un pico a  $m/z$  327  $[\text{M}-\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}]^+$  de donde se deduce que la fórmula molecular es  $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_6$ . En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 110) se apreció la presencia de un protón aldehídico a  $\delta$  9.64 ppm y otro correspondiente a un protón de un grupo formiloxi a  $\delta$  8.03 ppm. También se observa entre 4.47-4.76 ppm tres metilenos bencílicos y quince protones aromáticos entre 7.28-7.41 ppm.

<sup>246</sup> a) Koike, K.; Mori, M.; Ito, Y.; Nakahara, Y.; Ogawa, T. "Stereoselective total synthesis of wheat flour ceramide dihexoside" *Agric. Biol. Chem.* 54, **1990**, 2931-2939; b) Akimoto, K.; Natori, T.; Morita, M. "Synthesis and stereochemistry of acelasphin-9b" *Tetrahedron Lett.* 34, **1993**, 5593-5596.

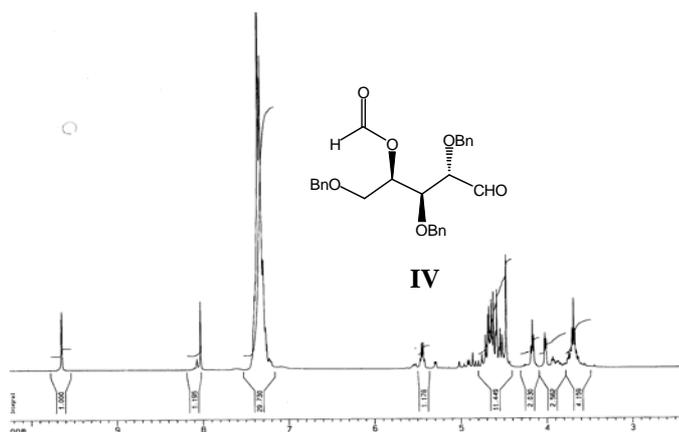


Figura 110. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia IV.

La sustancia IV fue sujeta a una reacción de Wittig<sup>247</sup> por tratamiento con la sal de fosfonio XI preparada a partir de heptadecanol<sup>248</sup> (ver parte experimental) para obtener V, en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 111) de esta sustancia, se observan las siguientes señales: un multiplete a  $\delta$  4.17 ppm correspondiente a un hidrógeno geminal a un grupo hidroxilo, un doble doblete a  $\delta$  5.52 ppm y un multiplete a  $\delta$  5.80 ppm típico de un doble enlace y una señal ancha entre  $\delta$  7.26-7.36 ppm correspondiente a quince hidrógenos aromáticos.

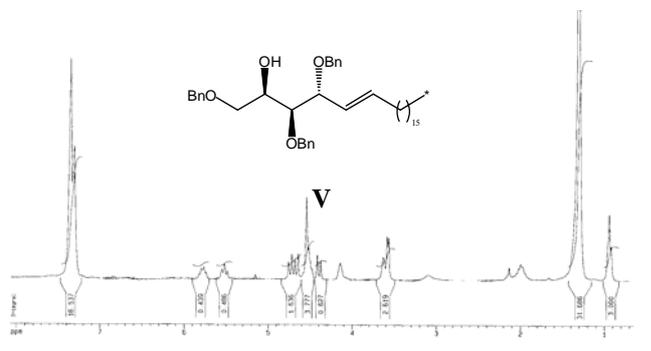
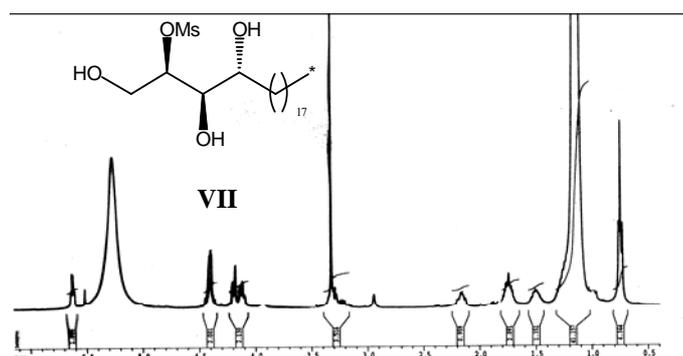


Figura 111. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia V.

<sup>247</sup> Ohashi, K.; Kosai, S.; Arizuka, M.; Watanabe, T.; Yamagiwa, Y.; Kamikawa, T.; Kates, M. "Synthesis of D-erythro-1-deoxydihydroceramide-1-sulfonic acid and phosphosphingoglycolipid found in marine organism via a common precursor" *Tetrahedron* 45, **1989**, 2557-2570.

<sup>248</sup> Duclos, R. I. Jr. "The total syntheses of D-erythro-sphingosine, N-palmitoylsphingosine (ceramide), and glucosylceramide (cerebroside) via an azidosphingosine analog" *Chem. Phys. Lipids* 111, **2001**, 111-138.

Mesilación<sup>249</sup> de **V** seguida por hidrogenación con carbono paladiado al 10% nos dio el mesilato **VII** cuyo espectro de <sup>1</sup>H RMN (figura 112) nos pone de manifiesto la presencia de un singulete a  $\delta$  2.94 ppm característico del metilo de un grupo mesilo, un multiplete a  $\delta$  4.40 ppm perteneciente a los dos hidrógenos de un hidroxilo primario y a  $\delta$  4.11, 4.18 y 5.62 ppm los hidrógenos geminales de dos hidroxilos secundarios y el hidrógeno del carbono portador del grupo mesilo indicado anteriormente.



**Figura 112.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la sustancia **VII**.

El tratamiento del mesilato **VII** con azida sódica<sup>250</sup> nos dio la azida **VIII** cuyo espectro de <sup>1</sup>H RMN (figura 113) es análogo al de **VII** con la diferencia de que los protones geminales a los grupos hidroxilos secundarios aparecen a  $\delta$  4.08 y 4.16 ppm. También se pudo observar que el hidrógeno geminal al radical mesilo en **VII** ha sido sustituido por el hidrógeno en  $\delta$  4.26 ppm del grupo azida.

<sup>249</sup> Ohashi, K.; Yamagiwa, Y.; Kamikawa, T.; Kates, M. "Synthesis of D-erythro-1-deoxydihydroceramide-1-sulfonic acid" *Tetrahedron Lett.* 45, **1988**, 1185-1188.

<sup>250</sup> a) Schmidt, R. R.; Zimmerman, P. "Synthesis of D-erythro-sphingosines" *Tetrahedron Lett.* 27, **1986**, 481-484; b) Yadav, J. S.; Vidyanand, D.; Rajagopal, D. "Stereoselective synthesis of D-erythro and L-threo sphingosines from carbohydrates" *Tetrahedron Lett.* 34, **1993**, 1191-1194.

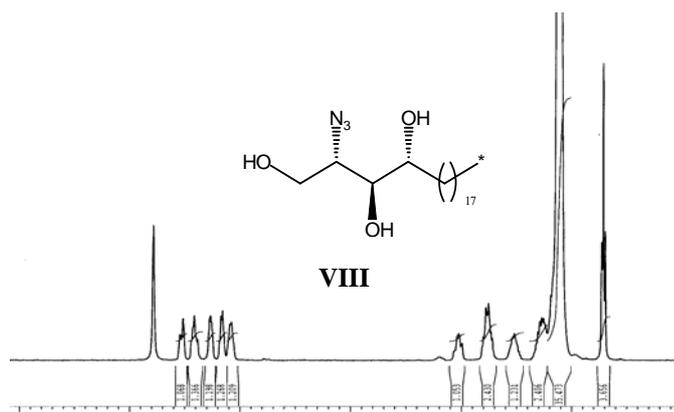


Figura 113. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la sustancia **VIII**.

Como podemos observar en **VIII** tuvo lugar una inversión de configuración a través del intermediario mesilado **VII**.

Finalmente la hidrogenación de la azida **VIII** nos proporcionó la esfingosina **IX**. Su espectro de masas presenta un pico a  $m/z$  342.3383  $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$  correspondiéndole una fórmula molecular  $\text{C}_{22}\text{H}_{47}\text{NO}_3$ . El espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 114a) posee las señales típicas de las esfingosinas: señal de un hidroxilo primario como un multiplete a  $\delta$  4.47 ppm, dos protones geminales a hidroxilo secundario, uno como triplete a  $\delta$  4.16 ppm y el otro como doblete a  $\delta$  4.31 ppm y un protón geminal a un grupo amino como doblete a  $\delta$  4.01 ppm.

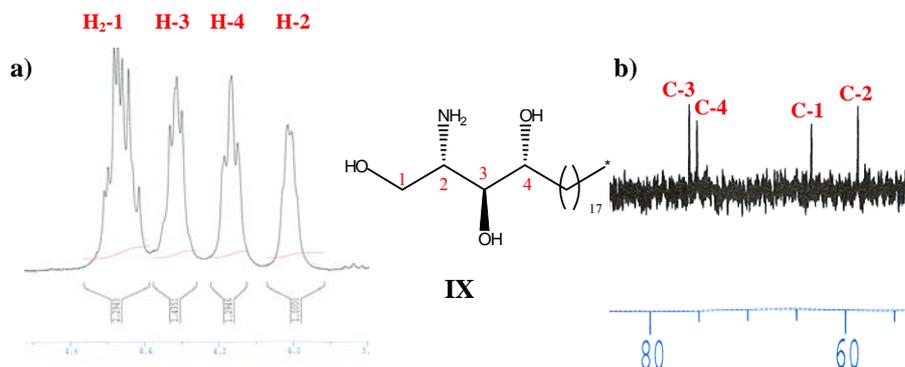


Figura 114. Ampliaciones de los Espectros a)  $^1\text{H}$  RMN; b)  $^{13}\text{C}$  RMN de la sustancia **IX**.

El espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (figura 114b) también fue consistente con la estructura de una esfingosina así, el carbono portador del hidroxilo primario se encuentra en  $\delta_{\text{C}}$  63.6 ppm y los de los dos hidroxilos secundarios a  $\delta_{\text{C}}$  75.2 y 76.0 ppm. El carbono portador del grupo amino aparece a  $\delta_{\text{C}}$  58.7 ppm.

Por último, para la obtención de la ceramida **XVIII** y **XIX** nos proponemos sintetizar los ácidos grasos **XVI** y **XVII** para ello hemos seguido la siguiente ruta sintética:

### **Obtención de XVI.-**

Oxidación del octadecanol **XII** con clorocromato de piridinium (PCC)<sup>251</sup> en diclorometano nos dio el aldehído correspondiente, el cual fue usado para la siguiente reacción sin purificar, puesto que suele oxidarse a ácido por contacto con el aire. La obtención del éster  $\alpha,\beta$ -insaturado **XIII** fue realizada mediante la reacción de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE)<sup>252</sup> con dimetil fosfonoacetato de metilo. El producto final posee de peso molecular  $[\text{M}]^+ m/z$  324.3011 correspondiente a la fórmula molecular  $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_2$ . El espectro de  $^1\text{H}$  RMN (figura 115) muestra las siguientes señales: un singulete a  $\delta$  3.68 ppm correspondiente a un éster metílico, un doblete a  $\delta$  5.78 ppm y un doble doblete a  $\delta$  6.93 ppm característico de un doble enlace.

---

<sup>251</sup> Corey, E. J.; Suggs, W. "Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds" *Tetrahedron Lett.* 31, **1975**, 2647-2650.

<sup>252</sup> a) Wadsworth, W. S. Jr.; Emmons, W. D. "The utility of phosphonate carbanions in olefin synthesis" *J. Am. Chem. Soc.* 83, **1961**, 1733-1738; b) Maryanoff, B. E.; Reitz, A. "The Wittig olefination reaction and modifications involving phosphoryl-stabilized carbanions. Stereochemistry, mechanism, and selected synthetic aspects" *Chem. Rev.* 89, **1989**, 863-927.

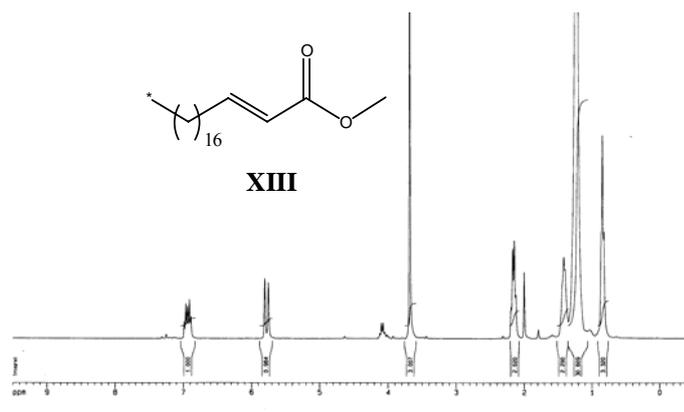


Figura 115. Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la sustancia XIII.

Una dihidroxilación asimétrica<sup>253</sup> de XIII fue llevada a cabo con AD-mix-β obteniéndose el diol XIV que, por posterior hidrólisis seguida de acetilación, nos condujo a XVI, en cuyo espectro de masas de alta resolución se observó el ion molecular a  $m/z$  428.3144 de acuerdo con la fórmula molecular C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>O<sub>6</sub>, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>+16.0 ( $c$  0.002, CHCl<sub>3</sub>). El espectro de <sup>1</sup>H RMN (figura 116a) muestra las siguientes señales: cuatro singuletes a  $\delta$  2.09, 2.21, 5.19 y 5.39 ppm correspondientes a dos grupos acetatos y a sus dos protones geminales.

### Obtención de XVII.-

Reacción de XIII con AD-mix-α se obtuvo el diol XV y por posterior tratamiento de igual manera que la sustancia XIV nos condujo a XVII, sustancia ésta con [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>-12.0 ( $c$  0.003, CHCl<sub>3</sub>) y propiedades espectroscópicas iguales a XVI (figura 116b).

<sup>253</sup> a) Sharpless, K. B.; Amberg, W.; Bennani, Y. L.; Crispino, G. A.; Hartung, J.; Jeong, K. S.; Kwong, H. L.; Morikawa, K.; Wang, Z. M.; Xu, D.; Zhang, X. L. "The osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation: A new ligand class and a process improvement" *J. Org. Chem.* 57, **1992**, 2768-2771; b) Kolb, H. C.; VanNieuwenhze, M. S.; Sharpless, K. B. "Catalytic asymmetric dihydroxylation" *Chem. Rev.* 94, **1994**, 2483-2547.

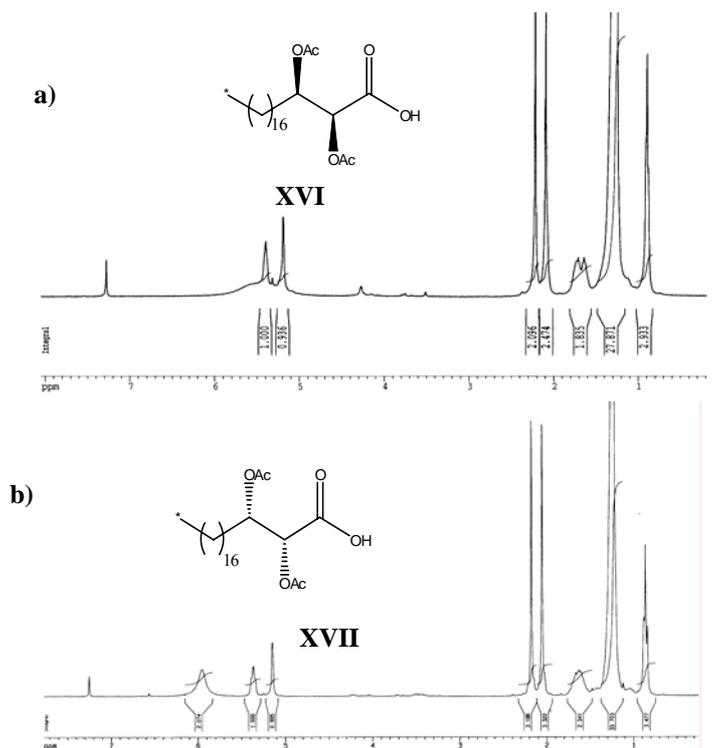


Figura 116. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de las sustancias a) **XVI**; b) **XVII**.

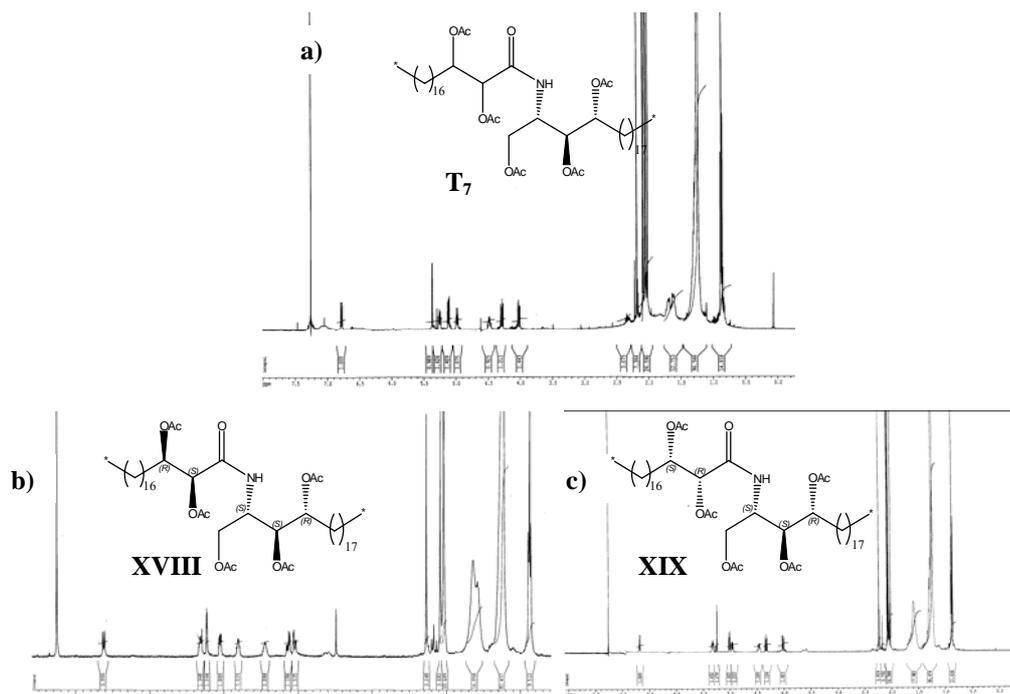
### Obtención de las ceramidas **XVIII** y **XIX**.

Acilación<sup>254</sup> de **IX** con el ácido **XVI** empleando hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) seguido de una acetilación con anhídrido acético y piridina nos condujo a **XVIII**.

Por otra vía, acilación de **IX** con el ácido **XVII** en las mismas condiciones realizadas anteriormente nos condujo a **XIX**.

Las propiedades espectroscópicas ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  RMN) tanto de **XVIII** como de **XIX** no coincidieron con las del producto natural **T<sub>7</sub>** (figura 117).

<sup>254</sup> Masuda, Y.; Yoshida, M.; Mori, K. "Synthesis of (2*S*, 2'*R*, 3*S*, 4*R*)-2(2'-hydroxy-21'-methyl-docosanoylamino)-1,3,4-pentadecanetriol, the ceramide sex pheromone of the female hair crack, *Erimacrus isenbeckii*" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, **2002**, 1531-1537.

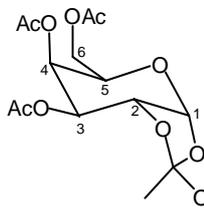


**Figura 117.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de las sustancias a) **T<sub>7</sub>**; b) **XVIII**; c) **XIX**.

En cuanto a la síntesis del otro par de enantiómeros posible en la estructura del ácido graso, y posteriores ceramidas, no se pudo realizar exitosamente. La conclusión que hemos llegado en la realización de esta síntesis es que el uso de elementos de control en el ácido graso para la estereoquímica de los hidroxilos en C-2' y C-3' no son buenos, pues introducen hechos estructurales que provocan reacciones laterales indeseadas, en este punto nuestro plan de síntesis quedó dependiendo del control de la estereoquímica en los carbonos indicados anteriormente.

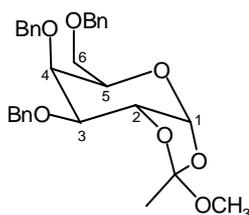
## ***PARTE EXPERIMENTAL***

### Obtención de 3,4,6-tri-*O*-acetil-1,2-*O*-(1-metoxietiliden)- $\alpha$ -D-galactopiranosas (II).



A 16 g (41.0 mmoles) de penta-*O*-acetil- $\beta$ -D-galactosa **I** se le adicionó HBr/AcOH al 30% (30 ml), la mezcla de reacción fue agitada durante 3 h a temperatura ambiente, al cabo de este tiempo se añadió tolueno y se evaporó a presión reducida para rendir el derivado bromado. (~ 90%).  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.97 (3H, s, OAc), 2.01 (3H, s, OAc), 2.07 (3H, s, OAc), 2.11 (3H, s, OAc), 4.07 (1H, dd,  $J = 6.8, 11.4$  Hz, H-6a), 4.15 (1H, dd,  $J = 6.3, 11.4$  Hz, H-6b), 4.45 (1H, t,  $J = 6.6$  Hz, H-5), 5.00 (1H, dd,  $J = 3.9, 10.6$  Hz, H-2), 5.36 (1H, dd,  $J = 3.2, 10.6$  Hz, H-3), 5.48 (1H, dd,  $J = 1.1, 3.2$  Hz, H-4), 6.66 (1H, d,  $J = 3.9$  Hz, H-1);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 20.4-20.6 (4 x OAc), 60.7 (C-6), 66.9 (C-4), 67.6 (C-2), 67.9 (C-3), 70.9 (C-5), 88.0 (C-1), 169.7-170.3 (4 x OAc). Éste, sin purificación previa se disolvió en 1,2-dicloroetano (150 ml) y se le adicionó trietil amina (12 ml, 86.0 mmoles), MeOH (1.82 ml, 45.0 mmoles) y bromuro de tetrabutil amonio (6.8 g, 21.2 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 20 h a 45°C, al cabo de este tiempo se formó un precipitado que se filtró y las aguas madres se lavaron con una disolución saturada de NaCl y se concentraron a presión reducida, el residuo se cromatografió en columna de gel de sílice eluyendo con mezclas de *n*-hexano-AcOEt hasta el 30%, rindiendo **II** (12 g, 33.0 mmoles, rdt: 80%) como: aceite; IR  $\nu_{\text{max}}$  (film, KBr). 2923, 1731, 1454, 1370, 1239, 1067, 736, 698  $\text{cm}^{-1}$ ; FABMS  $m/z$  (I. rel.): 363.1279 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  ( $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}_{10}$ , calcd 363.1291) (2), 331 (10), 289 (19);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.60 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.99 (3H, s, OAc), 2.00 (3H, s, OAc), 2.04 (3H, s, OAc), 3.22 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 4.09 (2H, m, H<sub>2</sub>-6), 4.27 (2H, m, H-2, H-5), 4.99 (1H, dd,  $J = 3.3, 6.7$  Hz, H-3), 5.35 (1H, d,  $J = 4.5$  Hz, H-4), 5.74 (1H, d,  $J = 4.7$  Hz, H-1);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 20.4-20.6 (3 x OAc), 23.27 ( $\text{CH}_3$ ), 50.02 ( $\text{OCH}_3$ ), 61.4 (C-6), 65.9 (C-4), 68.9 (C-5), 71.3 (C-3), 73.9 (C-2), 97.4 (C-1), 121.4 (cuaternario), 169.7-170.3 (3 x OAc).

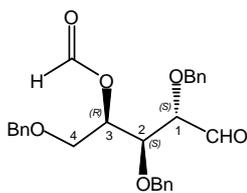
### Obtención de 3,4,6-tri-*O*-bencil-1,2-*O*-(1-metoxietiliden)- $\alpha$ -D-galactopiranosas (III).



A una disolución de **II** (11 g, 30.3 mmoles) en tolueno 40 ml y con agitación, se le añadió KOH (17.5 g, 310 mmoles) y bromuro de bencilo (25 ml, 35.9 g, 210.2 mmoles), la mezcla de reacción fue lentamente calentada y se mantuvo a ebullición durante 4 h, al término de este tiempo, la mezcla de reacción se diluyó con tolueno, se lavó con agua y con una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se concentró a vacío y se cromatografió usando una columna empaquetada con gel de sílice, eluida con *n*-hexano-AcOEt al 80%, obteniéndose **III** (9.96 g, 19.69 mmoles, rdt: 65%) como aceite; IR  $\nu_{\text{max}}$  (film, KBr). 2928, 1531, 1454, 1372, 1230, 1067, 921, 736, 693  $\text{cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.):

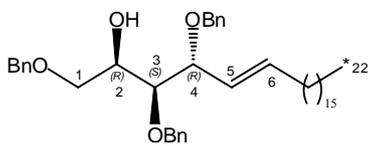
475.1944  $[M - OCH_3]^+$  ( $C_{29}H_{31}O_6$ , calcd 475.2115) (3), 383 (1), 295 (1), 277 (2), 181 (22), 154 (5);  $^1H$  RMN ( $\delta$ ,  $CDCl_3$ ): 1.60 (3H, s,  $CH_3$ ), 3.29 (3H, s,  $OCH_3$ ), 4.07 (2H, m,  $H_{2-6}$ ), 4.50 (4H, m, H-2, H-5, 2H-bencílico), 4.79 (3H, m, H-3 y 2H-bencílicos), 4.86 (2H, m, H-4 y 1H-bencílico), 4.93 (1H, d,  $J = 11.4$  Hz, 1H-bencílico) 5.74 (1H, d,  $J = 4.2$ , Hz, H-1), 7.31-7.40 (15H, m, aromáticos);  $^{13}C$  RMN ( $\delta$ ,  $CDCl_3$ ): 23.2 ( $CH_3$ ), 50.0 ( $OCH_3$ ), 68.05 (C-6), 71.4 ( $CH_2$ -bencílico), 73.0 (C-5), 73.2 (C-4), 73.5 ( $CH_2$ -bencílico), 74.5 ( $CH_2$ -bencílico), 79.77 (C-3), 80.23 (C-2), 97.8 (C-1), 122.1 (cuaternario), 127.0-128.6 (15C-aromáticos), 137.9, 138.1, 138.5 (3C-aromáticos).

#### Obtención de (2*S*, 3*S*, 4*R*)-2,3,5-tribenciloxi-4-formiloxipentanal (IV).



A 9 g (17.78 mmoles) de **III** disueltos en 1,4-dioxano (200 ml) se le adicionó  $H_2SO_4$  1M (40 ml). La mezcla de reacción se llevó a ebullición durante 3 h, se enfrió y se le añadió con agitación  $NaHCO_3$  hasta pH neutro. Se formó una sal, se filtró y el filtrado se llevó a sequedad dando un residuo que fue extraído con  $CHCl_3$ . La fase orgánica se lavó con una disolución saturada de  $NaCl$  y se concentró. Se obtuvo un residuo, el cual fue disuelto en una mezcla de EtOH/agua (4:1, 80 ml) y se le adicionó metaperyodato de sodio (7.5 g, 35.34 mmoles) la mezcla de reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente y luego se extrajo con éter etílico. La fase orgánica se lavó varias veces con una disolución saturada de  $NaCl$ , se secó sobre  $MgSO_4$ , se filtró y concentró para dar un aceite **IV** (6.52 g, 14.57 mmoles, rdto: 82%) como: Aceite;  $[\alpha]_D$ : -3.2 ( $c$  0.06,  $CHCl_3$ ); IR  $\nu_{max}$  (film, KBr). 3429, 3063, 2927, 1790, 1734, 1698, 1501, 1496, 1454, 1250, 738, 698  $cm^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.):  $[M]^+$  (ausente), 327.1215  $[M-C_8H_{10}O]^+$  ( $C_{19}H_{19}O_5$ , calcd 327.1232) (3), 253 (8), 181 (7), 122 (5), 107 (7), 105 (15), 91 (100), 77 (9);  $^1H$  RMN ( $\delta$ ,  $CDCl_3$ ): 3.70 (2H, m,  $H_{2-4}$ ), 4.02 (1H, dd,  $J = 1.7, 4.5$  Hz, H-1), 4.17 (1H, dd,  $J = 4.6, 4.7$  Hz, H-2), 4.47-4.76 (6H, m, 3 $CH_2$ -bencílicos), 5.44 (1H, dd,  $J = 5.0, 10.1$  Hz, H-3), 7.28-7.41 (15H, m, 15 $CH$ -aromáticos), 8.03 (1H, s, OCHO), 9.64 (1H, s, CHO);  $^{13}C$  RMN ( $\delta$ ,  $CDCl_3$ ): 67.8 (C-4), 71.8 (C-3), 73.0 ( $CH_2$ -bencílico), 73.2 ( $CH_2$ -bencílico), 74.2 ( $CH_2$ -bencílico), 77.5 (C-2), 82.6 (C-1), 127.0-128.6 (15C-aromáticos), 136.8, 137.2, 137.5 (3C-aromáticos), 160.3 (OCHO), 200.9 (CHO); Análisis elemental C 73.12%, H 6.42% (calcd. C 72.30%, H 6.29%).

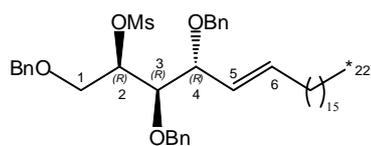
#### Obtención de (2*R*, 3*S*, 4*R*)-1,3,4-tribenciloxi-5-docosen-2-ol (V).



A una suspensión de bromuro de heptadeciltrifenilfosfina **XI** (23.35 g, 40.2 mmoles) en THF seco (160 ml) se enfrió a  $0^\circ C$  con agitación. Se le adicionó gota a gota 14 ml de butil-litio (2.0 M en ciclohexano). La disolución resultante fue agitada durante 30 min y luego se le añadió

gota a gota **IV** (6 g, 13.4 mmoles) disueltos previamente en THF seco (30 ml). La mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente y se mantuvo en agitación durante 1h. Se le adicionó agua y se extrajo con éter etílico, la fase orgánica fue secada sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y concentrada a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluida con n-hexano-AcOEt al 80% para rendir **V** (4.39 g, 6.83 mmoles, rdto: 51%). Aceite;  $[\alpha]_{\text{D}}$ : -13.3 (c 0.08,  $\text{CHCl}_3$ ); IR  $\nu_{\text{max}}$  (film, KBr). 3446, 3031, 2922, 2853, 1723, 1604, 1496, 1454, 1270, 1091, 1027, 734, 697  $\text{cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.):  $[\text{M}]^+$  (ausente), 491.3937  $[\text{M}-\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_2]^+$  ( $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{O}_2$ , calcd 491.3889) (1), 443 (1), 384 (2), 371 (3), 293 (2), 279 (3), 181 (7), 108 (4), 91 (100), 79 (6);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.94 (3H, t, J = 6.3 Hz,  $\text{CH}_3$ -22), 1.2-1.4 (28H, s a, 15 $\text{CH}_2$  (8-21)), 2.00 (2H, m,  $\text{H}_2$ -7), 3.58 (2H, d, J = 5.8 Hz,  $\text{H}_2$ -1), 3.63 (1H, dd, J = 2.8, 5.5 Hz, H-3), 4.17 (1H, m, H-2), 4.40 (2H, d, J = 11.7 Hz, 1H-bencílicos), 4.51 (4H, m, 3H-bencílicos, H-4), 4.69 (1H, d, J = 11.3 Hz, 1H-bencílico), 4.77 (1H, d, J = 10.6 Hz, 1H-bencílico), 5.52 (1H, dd, J = 9.4, 10.5 Hz, H-5), 5.80 (1H, m, H-6), 7.26-7.36 (15H, m, 15CH-aromáticos);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.1 (C-22), 22.7, 28.0, 29.3, 29.6, 29.7, 32.0 (C-7-C-21), 69.9 (C-2), 70.2 ( $\text{CH}_2$ -bencílico), 71.1 (C-1), 73.3 ( $\text{CH}_2$ -bencílico), 73.8 ( $\text{CH}_2$ -bencílico), 74.6 (C-4), 80.2 (C-3), 127.0 (C-5), 127.6-128.4 (15C-aromáticos), 136.3 (C-6), 136.9, 138.2, 138.3 (3C-aromáticos).

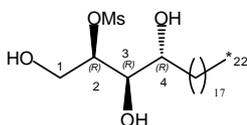
#### Obtención de (2R, 3R, 4R)-1,3,4-tribenciloxi-2-metanosufoniloxi-5-docoseno (VI).



4.2 g (6.53 mmoles) de **V** fueron disueltos en 10 ml de piridina a  $0^\circ\text{C}$  y se le adicionó cloruro de mesilo (1.05 ml, 1.55 g, 13.57 mmoles). La mezcla de reacción fue agitada durante 8 h a temperatura ambiente, al término de la reacción se le adicionó tolueno y se concentró. El residuo resultante se le añadió éter etílico y se lavó sucesivamente con una disolución saturada de  $\text{NaCl}$  y agua. La fase orgánica fue secada sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrada, llevada a sequedad y el residuo resultante fue cromatografiado en columna de gel de sílice eluida con n-hexano-AcOEt al 10% para obtener **VI** (4.6 g, 6.38 mmoles, rdto: 97%) como un aceite;  $[\alpha]_{\text{D}}$ : +3.3 (c 0.008,  $\text{CHCl}_3$ ); IR  $\nu_{\text{max}}$  (film, KBr). 2924, 2853, 1454, 1359, 1174, 1092, 971, 920, 803, 736, 698, 526  $\text{cm}^{-1}$ ; EI-MS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 720  $[\text{M}]^+$  (ausente), 371 (3), 279 (3), 253 (36), 181 (6), 91 (100);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.88 (3H, t, J = 6.4 Hz,  $\text{CH}_3$ -22), 1.2-1.4 (28H, s a, 15 $\text{CH}_2$  (8-21)), 2.00 (2H, m,  $\text{H}_2$ -7), 2.94 (3H, s,  $\text{SO}_3\text{CH}_3$ ), 3.51 (1H, dd, J = 3.6, 10.9 Hz, H-1a), 3.67 (1H, dd, J = 4.0, 7.0 Hz, H-1b), 3.78 (1H, dd, J = 4.1, 6.4 Hz, H-3), 4.17 (3H, m, 2 x bencílicos, H-4), 4.51 (3H, m, bencílicos), 4.77 (1H, d, J = 11.2 Hz, 1 x bencílico), 5.06 (1H, ddd, J = 3.8, 7.0, 7.4 Hz, H-2), 5.50 (1H, dd, J = 9.6, 10.9 Hz, H-5), 5.81 (1H, ddd, J = 7.2, 10.8, 11.2 Hz, H-6), 7.26-7.36 (15H, m, 15CH-aromáticos);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.1 (C-22), 22.7, 28.0, 29.3, 29.6, 29.7, 31.9 (C-7-C-21), 38.6 (C- $\text{SO}_3\text{CH}_3$ ), 69.5 (C-1), 70.0 ( $\text{CH}_2$ -bencílico), 73.4 (C-4), 73.4 ( $\text{CH}_2$ -bencílico), 74.8 ( $\text{CH}_2$ -bencílico), 79.3 (C-3), 80.8 (C-2), 126.3 (C-5), 127.5-128.4 (15C-

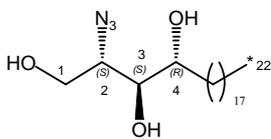
aromáticos), 137.4 (C-aromático), 137.8 (C-aromático), 138.3 (C-aromático), 155.2 (C-6).

#### Obtención de (2*R*, 3*R*, 4*R*)-2-metanosufoniloxi-1,3,4-docosanotriol (VII).

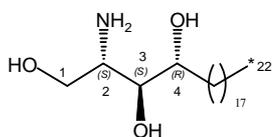


A una disolución de **VI** (4.34 g, 6.02 mmoles) en EtOH (40 ml), se le adicionó a temperatura ambiente y en atmósfera de hidrógeno 0.5 g de Pd/C al 10%, con agitación durante 24 h. Al término de este tiempo, se filtró a través de celita y el filtrado fue concentrado para obtener **VII** (2.6 g, 5.70 mmoles, rdt: 95%). Como un sólido amorfo,  $[\alpha]_D$ : +16.8 (*c* 0.006, piridina); IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr). 3367, 3209, 2915, 2849, 1166, 1020, 950, 920, 483  $\text{cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.):  $[M]^+$  (ausente), 356.3282  $[M-\text{OMs}]^+$  ( $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}_3$ , calcd 356.3290) (3), 338 (21), 325 (13), 320 (47), 281 (100), 264 (15), 151 (16), 137 (12), 123 (28), 113 (13);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , piridina- $d_5$ ): 0.74 (3H, t, *J* = 6.4 Hz,  $\text{CH}_3$ -22), 1.1-1.3 (32H, s a, 16 $\text{CH}_2$  (6-21)), 1.82 (2H, m,  $\text{H}_2$ -5), 3.32 (3H, s,  $\text{SO}_3\text{CH}_3$ ), 4.11 (1H, ddd, *J* = 2.1, 8.2, 10.5 Hz, H-4), 4.18 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz, H-3), 4.40 (2H, m,  $\text{H}_2$ -1), 5.62 (1H, dt, *J* = 1.9, 5.9 Hz, H-2);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , piridina- $d_5$ ): 15.2 (C-22), 23.8, 26.9, 30.5, 30.9, 31.1, 33.0, 35.5 (C-7-C-21), 39.4 (C- $\text{SO}_3\text{CH}_3$ ), 63.2 (C-1), 71.7 (C-4), 74.9 (C-3), 85.7 (C-2).

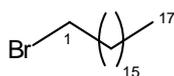
#### Obtención de (2*S*, 3*S*, 4*R*)-2-azido-1,3,4-docosanotriol (VIII).



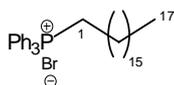
A una disolución de **VII** (2.49 g, 5.51 mmoles) en DMF (65 ml), se le adicionó azida sódica (81.91 g, 29.38 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue calentada lentamente hasta 100°C, manteniéndose durante 3h. Al cabo de este tiempo se le añadió AcOEt y se lavó con agua y una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró a alto vacío, el residuo resultante fue cromatografiado en columna de gel de sílice eluida con  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (9:1) para rendir **VIII** (1.45 g, 3.65 mmoles, rdt: 66%) como un sólido amorfo,  $[\alpha]_D$ : +26.6 (*c* 0.01, piridina); IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr). 3339, 2915, 2848, 2113, 1463, 1350, 1200  $\text{cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.):  $[M]^+$  (ausente), 340.3352  $[M-\text{OHN}_3]^+$  ( $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}_2^+$ , calcd 340.3341) (11), 322 (10), 313 (18), 283 (15), 281 (88), 264, 137 (8), 123 (14), 109 (26);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , piridina- $d_5$ ): 0.71 (3H, t, *J* = 6.5 Hz,  $\text{CH}_3$ -22), 1.1-1.3 (28H, m, 14 $\text{CH}_2$  (7-21)), 1.51 (1H, m,  $\text{H}_b$ -6), 1.75 (2H, m,  $\text{H}_a$ -6,  $\text{H}_b$ -5), 2.02 (1H, m,  $\text{H}_a$ -5), 4.08 (1H, d a, *J* = 6.0 Hz, H-4), 4.16 (1H, d a, *J* = 5.4 Hz, H-3), 4.26 (1H, t a, *J* = 2.5 Hz, H-2), 4.40 (1H, m,  $\text{H}_b$ -1), 4.52 (1H, m,  $\text{H}_a$ -1);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , piridina- $d_5$ ): 15.5 (C-22), 24.2, 27.6, 30.8, 31.3, 31.5, 33.3 (C-6-C-21), 35.4 (C-5), 63.2 (C-1), 67.9 (C-2), 73.6 (C-4), 77.3 (C-3); Análisis elemental C 66.16%, H 12.13%, N 10.50% (calcd. C 66.12%, H 11.80%, N 10.52%).

**Obtención de (2S, 3S, 4R)-2-amino-1,3,4-docosanotriol (IX).**

A una disolución de **VIII** (1.30 g, 3.25 mmoles) en EtOH (100 ml) se le adicionó Pd/C al 10% (0.30 g), la mezcla fue agitada durante 24 h, bajo atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente. Al término de la reacción, se filtró, se concentró y el residuo se cromatografió en gel de sílice bajo condiciones básicas CHCl<sub>3</sub>-MeOH-agua-25% amoniaco (8:2:0.15:0.05) para obtener **IX** (0.95 g, 2.54 mmoles, rdto: 78%). Sólido amorfo;  $[\alpha]_D$ : +10.6 (c 0.01, piridina); IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr). 3250, 3019, 2916, 2846, 1216, 757, 658 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.):  $[M]^+$  (ausente), 342.3383  $[M-CO_2H_3]^+$  (C<sub>21</sub>H<sub>44</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup>, calcd 342.3372) (6), 324 (8), 308 (8), 90 (10), 60 (100); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , piridina-*d*<sub>5</sub>): 0.82 (3H, t, J = 5.5 Hz, CH<sub>3</sub>-22), 1.1-1.3 (28H, s a, 14CH<sub>2</sub> (7-21)), 1.61 (1H, m, H<sub>b</sub>-6), 1.80 (2H, m, H<sub>a</sub>-6, H<sub>b</sub>-5), 2.23 (1H, m, H<sub>a</sub>-5), 4.01 (1H, d, J = 4.5 Hz, H-2), 4.16 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-4), 4.31 (1H, dd, J = 5.3, 7.6 Hz, H-3), 4.47 (2H, m, H<sub>2</sub>-1); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , piridina-*d*<sub>5</sub>): 15.5 (C-22), 24.2, 27.3, 30.8, 31.2, 31.5, 33.4 (C-6-C-21), 36.1 (C-5), 58.7 (C-2), 63.6 (C-1), 75.2 (C-4), 76.0 (C-3); Análisis elemental C 70.45%, H 13.80%, N 3.74% (calcd. C 70.45%, H 12.70%, N 3.75%).

**Obtención de bromuro de 1-heptadecilo (X).**

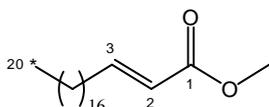
A una disolución de trifenilfosfina (22.5 g, 85.77 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, se le adicionó gota a gota Br<sub>2</sub> (13.70 g, 85.77 mmoles, 4.40 ml) hasta que la disolución tomó color naranja, luego se le añadió 1-heptadecanol (20 g, 77.97 mmoles) previamente disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min. Al cabo de este tiempo se le adicionó agua y se lavó con una disolución saturada de NaCl, la fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró. El residuo obtenido se pasó por una columna cromatográfica eluida con n-hexano para rendir **X** (25.03 g, 78.71 mmoles, rdto: 91%) como un aceite, IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr). 2919, 2849, 1471, 1462, 1370, 1259, 1218, 760, 750, 720, 653, 585 cm<sup>-1</sup>; FABMS  $m/z$  (I. rel.): 319.1768  $[M - H]^+$  (C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>Br<sup>81</sup>, calcd 319.1823) (17), 317.1804  $[M - H]^+$  (C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>Br<sup>79</sup>, calcd 317.1843) (14), 97 (18), 85 (32), 71 (55), 57 (100); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.88 (3H, t, J = 7.5 Hz, CH<sub>3</sub>-17), 1.2-1.4 (28H, s a, 15CH<sub>2</sub> (3-17)), 1.85 (2H, m, H<sub>2</sub>-2), 3.40 (2H, t, J = 6.8 Hz, H<sub>2</sub>-1); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 14.1 (C-17), 22.7, 28.0, 29.3, 29.6, 29.7, 32.0 (C-3-C-16), 32.9 (C-1), 33.9 (C-2).

**Obtención de bromuro de heptadeciltrifenilfosfina (XI).**

Una mezcla de **X** (24.2 g, 75.7 mmoles) y trifenilfosfina (19.8 g, 75.7 mmoles) fue calentada a 170°C durante 48 h. Al cabo de este tiempo se

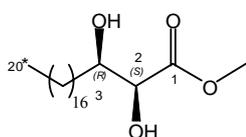
adicionó 250 ml de acetona y el producto precipitado fue cristalizado de éter etílico y luego recristalizado de acetona/éter etílico, para dar **XI** (30.1 g, 51.8 mmoles, rdt: 68%) sólido amorfo; IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr). 2922, 2852, 1437, 1113, 950, 722, 691  $\text{cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 501.3600  $[\text{M}]^+$  ( $\text{C}_{35}\text{H}_{50}\text{P}^+$ , calcd 501.3650) (2), 423 (3), 289 (34), 262 (100), 183 (46), 135 (8);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.87 (3H, t,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{CH}_3$ -17), 1.2-1.4 (28H, s a,  $15\text{CH}_2$  (3-17)), 1.62 (4H, m,  $\text{H}_2$ -16 y 15), 1.90 (2H, s,  $\text{H}_2$ -2), 3.75 (2H, m,  $\text{H}_2$ -1), 7.28-7.87 (15H, m, fenólicos);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.1 (C-17), 22.6, 23.0, 29.2, 29.3, 29.5, 29.6, 30.3, 30.5, (C-3-C-16), 31.9 (C-1), 118.0, 118.8 (C-aromáticos cuaternarios), 130.4, 130.5, 133.6, 133.7, 135.0 (C-aromáticos).

### Obtención de 2E-eicosanoato de metilo (**XIII**).



A 17 g (83.24 mmoles) de clorocromato de piridinium (PCC) suspendidos en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco, se le adicionó 1-octadecanol comercial **XII** (15 g, 55.49 mmoles) disuelto previamente en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco. Después de 40 min, se añadió éter etílico seco formándose un precipitado que, después de filtrarlo, se lavó varias veces con éter etílico, los extractos etéreos se concentraron para rendir el aldehído que luego se utilizó sin previa purificación.  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.85 (3H, t,  $J = 6.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ -18), 1.2-1.4 (30H, s a,  $15\text{CH}_2$  (3-17)), 2.35 (2H, m,  $\text{H}_2$ -2), 9.75 (1H, s, H-1). 20.19 g (110.98 mmoles, 17.95 ml) de dimetil fosonoacetato de metilo fueron adicionados gota a gota a  $0^\circ\text{C}$  a una suspensión de NaH (1.33 g, 110.98 mmoles) en benceno seco (250 ml) en atmósfera inerte y con agitación durante 30 min. A continuación se le adicionó el aldehído obtenido anteriormente (~ 15 g, 55.5 mmoles), la mezcla de reacción se agitó durante 3h a temperatura ambiente hasta que el éster fue formado. Al cabo de este tiempo se adicionó AcOEt y se lavó con una disolución saturada de NaCl y agua, la fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró, dando un residuo el cual fue purificado en cromatografía en columna de gel de sílice eluida con n-hexano-AcOEt (19:1) obteniéndose **XIII** (10.48 g, 32.334 mmoles, rdt: 58%) como un sólido amorfo; IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr). 2916, 2850, 1722, 1656, 1471, 1436, 1266, 975, 716  $\text{cm}^{-1}$ ; EIMS (70 eV)  $m/z$  (I. rel.): 324.3011  $[\text{M}]^+$  ( $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_2$ , calcd 324.3028) (20), 311 (21), 292 (100), 250 (21), 227 (28), 113 (18), 97 (14), 87 (32);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.84 (3H, t,  $J = 6.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ -20), 1.2-1.4 (30H, s a,  $15\text{CH}_2$  (6-19)), 2.17 (2H, m,  $\text{H}_2$ -6), 3.68 (3H, s, OMe), 5.78 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-2), 6.93 (1H, ddd,  $J = 6.9$ , 14.4, 15.6 Hz, H-3);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.1 (C-20), 22.6, 29.1, 29.3, 29.5, 29.7, 31.9, 32.2 (C-5-19), 51.2 (OMe), 120.8 (C-2), 149.7 (C-3), 167.0 (C-1).

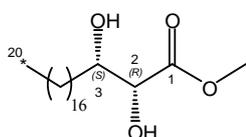
### Obtención de (2*S*,3*R*)-2,3-dihidroieicosanoato de metilo (XIV).



Una disolución de AD-mix- $\beta$  (0.8802 g) en 50 ml de *t*-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1) agitada vigorosamente durante 30 min a temperatura ambiente se le adicionó 73,4 mg de metanosulfonamida manteniéndose con agitación durante 10 min.

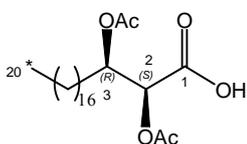
La mezcla de reacción se llevó a 0°C y se le adicionó **XIII** (215 mg, 0.66 mmoles). La reacción se agitó durante 4 días hasta que no se observó ningún cambio por TLC. Una disolución de sulfito de sodio fue añadida a la mezcla y se agitó durante 30 min, y se extrajo con AcOEt, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró dando un residuo que fue purificado mediante columna cromatográfica de gel de sílice para obtener **XIV** (92.40 mg, 0.25 mmoles, rdto: 37%, conversión: 63%) Sólido amorfo;  $[\alpha]_D$ : +6.0 (*c* 0.004, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr). 3382, 2916, 2848, 1731, 1454, 1278, 1116, 1071, 721, 495, 479 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 358.3054 [M]<sup>+</sup> (C<sub>21</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>, calcd 358.3083) (0.1), 340 (6), 299 (6), 281 (11), 269 (3), 125 (2), 119 (2), 111 (4), 97 (8), 90 (100), 83 (9), 71 (5), 69 (8); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.90 (3H, t, J = 5.5 Hz, CH<sub>3</sub>-20), 1.1-1.3 (28H, s a, 14CH<sub>2</sub> (4-19)), 1.63 (3H, m, H<sub>2</sub>-19, H<sub>a</sub>-4), 1.91 (1H, d, J = 8.3 Hz, H<sub>b</sub>-4), 3.85 (3H, s, OMe), 3.89 (1H, m, H-3), 4.12 (1H, dd, J = 1.9, 5.2 Hz, H-2); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 14.1 (C-20), 22.7, 25.7, 29.3, 29.4, 29.5, 29.7, 31.9, 33.7 (C-4-C-19), 52.8 (OMe), 72.4 (C-3), 73.0 (C-2), 174.1 (C-1).

### Obtención de (2*R*,3*S*)-2,3-dihidroieicosanoato de metilo (XV).

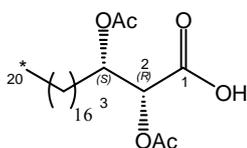


Una disolución de AD-mix- $\alpha$  (0.9078 g) en 50 ml de *t*-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1) agitada vigorosamente durante 30 min a temperatura ambiente se le adicionó 76,7 mg de metanosulfonamida, y manteniéndose con agitación durante 10 min.

La mezcla de reacción se llevó a 0°C y se le adicionó **XIII** (208 mg, 0.64 mmoles). La reacción se agitó durante 4 días hasta que no se observó ningún cambio por TLC. Una disolución de sulfito de sodio fue añadida a la mezcla y se agitó durante 30 min, y se extrajo con AcOEt, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró dando un residuo que fue purificado mediante columna cromatográfica de gel de sílice para obtener **XV** (49.20 mg, 0.13 mmoles, rdto: 20%, conversión: 60%) Sólido amorfo;  $[\alpha]_D$ : -4.4 (*c* 0.006, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr). 3376, 2916, 2848, 1728, 1467, 1278, 1208, 1115, 1071, 863, 721, 504 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 358.3054 [M]<sup>+</sup> (C<sub>21</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>, calcd 358.3083) (0.1), 340 (6), 299 (6), 281 (11), 269 (3), 125 (2), 119 (2), 111 (4), 97 (8), 90 (100), 83 (9), 71 (5), 69 (8); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.90 (3H, t, J = 5.5 Hz, CH<sub>3</sub>-20), 1.1-1.3 (28H, s a, 14CH<sub>2</sub> (4-19)), 1.63 (3H, m, H<sub>2</sub>-19, H<sub>a</sub>-4), 1.91 (1H, d, J = 8.3 Hz, H<sub>b</sub>-4), 3.85 (3H, s, OMe), 3.89 (1H, m, H-3), 4.12 (1H, dd, J = 1.9, 5.2 Hz, H-2); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 14.1 (C-20), 22.7, 25.7, 29.3, 29.4, 29.5, 29.7, 31.9, 33.7 (C-4-C-19), 52.8 (OMe), 72.4 (C-3), 73.0 (C-2), 174.1 (C-1).

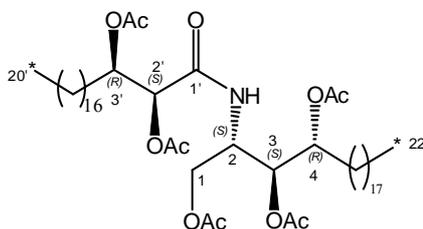
**Obtención de ácido (2*S*,3*R*)-2,3-diacetoxi-eicosanoico (XVI).**

A 90 mg (0.25 mmoles) de **XIV** disueltos en THF (12 ml) se le adició una disolución de NaOH (0.25 mmoles) en agua (5 ml) a 50°C con agitación durante 24 h. Después de llevarla a temperatura ambiente, se acidificó con HCl y se extrajo con éter etílico. Se lavó varias veces con una disolución saturada de NaCl y agua, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró dando un residuo que se disolvió en piridina y anhídrido acético obteniéndose **XVI** (95 mg, 0.22 mmoles, rdt: 88%), solido amorfo; [α]<sub>D</sub>: +16.0 (*c* 0.002, CHCl<sub>3</sub>); IR ν<sub>max</sub> (film, KBr). 3417, 3063, 2919, 2872, 1722, 1651, 1496, 1459, 1362, 1275, 1207, 1071, 1026, 737, 698 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 428.3144 [M]<sup>+</sup> (C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>O<sub>6</sub>, calcd 428.3138) (0.2), 383 (10), 369 (4), 354 (3), 350 (7), 341 (11), 326 (52), 325 (4), 311 (8), 308 (72), 295 (9), 290 (10), 281 (36), 264 (8), 135 (9), 125(11), 118 (17), 100 (100); <sup>1</sup>H RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): 0.86 (3H, t, J = 6.8 Hz, CH<sub>3</sub>-20), 1.1-1.3 (28H, s a, 14CH<sub>2</sub> (4-19)), 1.64 (1H, m, H<sub>a</sub>-4), 1.70 (1H, m, H<sub>b</sub>-4), 2.09 (OAc), 2.21 (OAc), 5.19 (1H, s, H-2), 5.39 (1H, s a, H-3); <sup>13</sup>C RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): 14.1 (C-20), 20.4 (OAc), 20.8 (OAc), 22.7, 25.2, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.7, 30.3, 31.9 (C-4-C-19), 72.0 (C-3), 72.1 (C-2), 170.3 (OAc), 170.6 (OAc), 171.7 (C-1).

**Obtención de ácido (2*R*,3*S*)-2,3-diacetoxi-eicosanoico (XVII).**

A 36.6 mg (0.102 mmoles) de **XV** disueltos en THF (12 ml) se le adició una disolución de NaOH (0.12 mmoles) en agua (5 ml) a 50°C con agitación durante 24 h. Después de llevarla a temperatura ambiente, se acidificó con HCl y se extrajo con éter etílico. Se lavó varias veces con una disolución saturada de NaCl y agua, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró dando un residuo que se disolvió en piridina y anhídrido acético obteniéndose **XVI** (32.4 mg, 0.079 mmoles, rdt: 77%), solido amorfo; [α]<sub>D</sub>: -12.0 (*c* 0.003, CHCl<sub>3</sub>); IR ν<sub>max</sub> (film, KBr). 3412, 3068, 2923, 2875, 1729, 1650, 1487, 1463, 1368, 1274, 1200, 1077, 1028, 735, 698 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): 428.3144 [M]<sup>+</sup> (C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>O<sub>6</sub>, calcd 428.3138) (0.2), 383 (10), 369 (4), 354 (3), 350 (7), 341 (11), 326 (52), 325 (4), 311 (8), 308 (72), 295 (9), 290 (10), 281 (36), 264 (8), 135 (9), 125(11), 118 (17), 100 (100); <sup>1</sup>H RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): 0.86 (3H, t, J = 6.8 Hz, CH<sub>3</sub>-20), 1.1-1.3 (28H, s a, 14CH<sub>2</sub> (4-19)), 1.64 (1H, m, H<sub>a</sub>-4), 1.70 (1H, m, H<sub>b</sub>-4), 2.09 (OAc), 2.21 (OAc), 5.19 (1H, s, H-2), 5.39 (1H, s a, H-3); <sup>13</sup>C RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): 14.1 (C-20), 20.4 (OAc), 20.8 (OAc), 22.7, 25.2, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.7, 30.3, 31.9 (C-4-C-19), 72.0 (C-3), 72.1 (C-2), 170.3 (OAc), 170.6 (OAc), 171.7 (C-1).

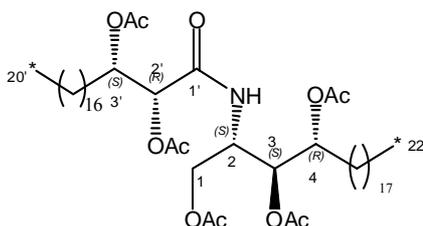
**Obtención de (2*S*,3*S*,4*R*,2'*S*,3'*R*)-2-(2',3'-diacetoxi-ecosanoilamino)-1,3,4-triacetoxi-docosano (XVIII).**



A una mezcla formada por 4.8 mg (0.0128 mmoles) de **IX**, 5.5 mg (0.0128 mmoles) de **XVI** y 5 mg (0.037 mmoles) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), disuelta en 10 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, se le adicionaron 3.68 mg (0.0192 mmoles) de hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC). La mezcla de reacción se

mantuvo a temperatura ambiente con agitación durante 2 días. Al cabo de este tiempo fue extraída con AcOEt y la fase orgánica se lavó sucesivamente con una disolución saturada de NaCl y agua, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró bajo presión reducida rindiendo **XVIII** (6.8 mg, 0.0074 mmoles, rdt: 58%) como un sólido amorfo; [α]<sub>D</sub>: +8.5 (c 0.02, CHCl<sub>3</sub>); IR ν<sub>max</sub> (film, KBr): 3285, 2918, 2850, 1746, 1698, 1469, 1372, 1220, 1044 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): [M]<sup>+</sup> (ausente), 790.6172 [M-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (C<sub>47</sub>H<sub>84</sub>NO<sub>8</sub><sup>+</sup>, calcd 790.6197) (83), 776 (42), 747 (36), 730 (26), 687 (13), 669 (26); 656 (27), 627 (18), 599 (11), 512.3546 (C<sub>28</sub>H<sub>50</sub>NO<sub>7</sub><sup>+</sup>, calcd 512.3587) (86), 484.3729 (C<sub>28</sub>H<sub>52</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>, calcd 484.3764) (75), 452 (44), 428 (24), 424 (19), 411.3085 (C<sub>24</sub>H<sub>43</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>, calcd 411.3110) (46), 392 (100), 383 (33), 369 (42), 364 (12), 341 (39), 320 (20); <sup>1</sup>H RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 0.87 (6H, t, J = 6.5 Hz, Me-22 y Me-20'), 1.20-1.40 (62H, br s, 31-CH<sub>2</sub>), 1.60 (4H, m, CH<sub>2</sub>-5 y CH<sub>2</sub>-4'), 2.03 (3H, s, OAc), 2.04 (6H, s, OAc), 2.08 (3H, s, OAc), 2.27 (3H, s, OAc), 4.04 (1H, dd, J = 3.1, 11.6 Hz, H<sub>a</sub>-1), 4.13 (1H, dd, J = 5.4, 11.7 Hz, H<sub>b</sub>-1), 4.45 (1H, m, H-2), 4.80 (1H, dd, J = 6.7, 9.7 Hz, H-4), 5.05 (1H, dd, J = 3.4, 7.9 Hz, H-3), 5.23 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-3'), 5.31 (1H, m, H-2'), 6.62 (1H, d, J = 9.4 Hz, N-H); <sup>13</sup>C RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): 14.08 (C-22 y C-20'), 20.58 (2OAc), 20.68 (OAc), 20.98 (2OAc), 25.09-31.89 [C-(5-21) y C-(4'-19')], 47.58 (C-2), 62.72 (C-1), 72.01 (C-3), 73.32 (C-3'), 72.82 (C-4), 74.02 (C-2'), 167.38 (C-1'), 169.30 (C=O), 169.78 (C=O), 170.29 (C=O), 170.75 (C=O), 171.07 (C=O); Análisis elemental C 68.58%, H 11.0%, N 1.48% (calcd. C 68.61%, H 10.52%, N 1.54%).

**Obtención de (2*S*,3*S*,4*R*,2'*R*,3'*S*)-2-(2',3'-diacetoxi-ecosanoilamino)-1,3,4-triacetoxi-docosano (XIX).**



A una mezcla 6.3 mg (0.0168 mmoles) de **IX**, 7.2 mg (0.0168 mmoles) de **XVII** y 6.9 mg (0.051 mmoles) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) disuelta en 10 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (10 ml) se le adicionaron 4.85 mg (0.0253 mmoles) de hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura

ambiente con agitación durante 2 días. Al cabo de este tiempo fue extraída con AcOEt y la fase orgánica se lavó sucesivamente con una disolución saturada de NaCl y agua, se

secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró bajo presión reducida rindiendo **XIX** (7.1 mg, 0.0074 mmoles, rdto: 44%) como un sólido amorfo [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>: +15.3 (c 0.004, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (film, KBr): 3286, 2917, 2852, 1744, 1699, 1470, 1370, 1220, 1044 cm<sup>-1</sup>; EIMS (70 eV) *m/z* (I. rel.): [M]<sup>+</sup> (ausente), 792 (14), 790 (84), 777 (22), 776 (41), 748 (21), 747 (36), 730 (26), 729 (23), 716 (7), 687 (12), 669 (23); 657 (12), 599 (12), 424 (19), 411 (46), 392 (100), 383 (33), 369 (43); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 500MHz): 0.86 (6H, t, J = 6.5 Hz, Me-22 y Me-20'), 1.20-1.40 (62H, br s, 31-CH<sub>2</sub>), 1.59 (4H, m, CH<sub>2</sub>-5 y CH<sub>2</sub>-4'), 2.00 (3H, s, OAc), 2.06 (3H, s, OAc), 2.07 (3H, s, OAc), 2.08 (3H, s, OAc), 2.27 (3H, s, OAc), 4.01 (1H, dd, J = 3.6, 11.7 Hz, H<sub>a</sub>-1), 4.33 (1H, dd, J = 7.1, 11.7 Hz, H<sub>b</sub>-1), 4.46 (1H, m, H-2), 4.95 (1H, td, J = 3.4, 7.5 Hz, H-4), 5.01 (1H, dd, J = 4.3, 6.0 Hz, H-3), 5.24 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-3'), 5.33 (1H, m, H-2'), 6.68 (1H, d, J = 9.1 Hz, N-H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 14.10 (C-22 y C-20'), 20.63 (2OAc), 20.68 (OAc), 20.83 (OAc), 21.02 (OAc), 25.11-31.93 [C-(5-21) y C-(4'-19')], 48.44 (C-2), 62.11 (C-1), 72.26 (C-3), 72.60 (C-3'), 72.88 (C-4), 73.70 (C-2'), 167.38 (C-1'), 169.35 (C=O), 169.72 (C=O), 170.27 (C=O), 170.65 (C=O), 171.10 (C=O); Análisis elemental C 68.60%, H 10.50%, N 1.49% (calcd. C 68.61%, H 10.52%, N 1.54%).

## **PARTE VI**

### **ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LOS HONGOS GANODERMA LUCIDUM, G. CONCINNA, G. AUSTRALE Y LAETIPORUS SULPHUREUS.**

## ***INTRODUCCIÓN***

El cáncer es una palabra que abarca todas aquellas enfermedades que tienen en común la proliferación anormal de células. Esta reproducción celular anormal va más allá de las necesidades de reposición de las células de un organismo y las células cancerosas también pierden la cualidad de subdivisión controlada que tienen las células normales. Esta enfermedad es, actualmente una de las causas de mortalidad más altas en los países desarrollados, donde una de cada cuatro personas fallece debido a procesos cancerosos. En España, según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) en el año 2002, el 12% del total de fallecimientos fueron como consecuencia del cáncer.<sup>255</sup>

El crecimiento en importancia del cáncer como enfermedad comenzó en el Siglo XX cuando la longevidad humana superó las limitaciones debidas a las deficientes condiciones sanitarias y al envejecimiento de la población. De esta forma, al desaparecer o disminuir la incidencia de muchas de las enfermedades habituales hasta ese momento, en una población mayor, se comenzó a hacer notorio que las células, al reproducirse, van perdiendo su capacidad de hacerlo en la forma correcta. Los pequeños errores de replicación se van acumulando y finalmente, algunas células pierden el control sobre su capacidad de replicación correcta y ordenada. De esta forma, en algún tejido aparece un “tumor”, un grupo de células poco diferenciadas que se reproducen sin mantener la correcta estructura del tejido y van haciendo que el órgano o tejido pierda su normal funcionamiento. Muchos de estos tejidos anormales no representan peligros graves a la salud ya que no tienen la capacidad de metástasis (i.e. invasión de otros tejidos) o son de un crecimiento muy lento.

Las células normales inician su división cuando un factor de crecimiento se une a su receptor. Las células cancerosas son diferentes, algunas porque tienen un exceso de receptores, otras porque producen su propio factor de crecimiento, otras tienen ambas características. El receptor estimulado activa las proteínas de señalización dentro de la célula, una de ellas, la proteína *ras* transmite la señal de crecimiento al núcleo, utilizando otras proteínas de señalización. En algunas células cancerosas la proteína *ras* es

---

<sup>255</sup> Notas de prensa del Instituto Nacional de Estadística (INE) del 23/12/2004, ver, [www.ine.es/prensa/np357.pdf](http://www.ine.es/prensa/np357.pdf).

defectuosa y está siempre activa, aún en ausencia de factor de crecimiento. Cuando el mensaje llega al núcleo, otras proteínas comienzan a replicar el ADN celular, desencadenando una división celular anormal. El hecho de que todas las células de un tumor provengan de una sola célula afectada implica que esta anomalía inicial se transmita de una célula a sus descendientes. Existen dos posibilidades de herencia de dichas aberraciones: por un cambio genético en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) de los genes o por un cambio epigenético, es decir, por una alteración en el modo de expresarse los genes. Aunque en principio es posible la aparición de tumores por cambios epigenéticos, la evidencia de que una célula cancerosa siempre da lugar a nuevas células cancerosas y nunca a células normales indica que la mayoría de los cánceres son consecuencia de cambios en el ADN de las células (mutaciones). En definitiva, el cáncer es una enfermedad que implica a los genes, que sufren alteraciones en una célula inicial y que son heredables por sus células progenie, provocando que ese grupo de células escape al control normal de crecimiento, dañe a otras células sanas y acabe por impedir el funcionamiento del organismo.<sup>256</sup>

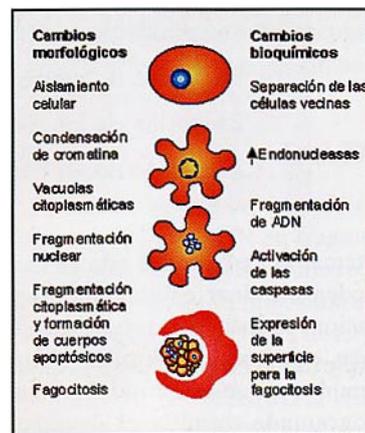
Una de las principales características de las células cancerosas es que no presentan mecanismos de muerte celular programada o apoptosis (en griego “la caída de las hojas en otoño”), que sí presentan las células normales, y que constituye un mecanismo vital y fisiológico de los seres vivos. Su participación desde la ovulación, el ciclo menstrual (la menstruación es el síntoma de un suicidio celular colectivo del epitelio uterino que esperaba albergar un óvulo fecundado por un espermatozoide), el desarrollo y modelación del embrión, la renovación constante de los epitelios en la vida adulta, constituyen ejemplos claros de procesos replicativos y apoptóticos asociados. El nombre de apoptosis fue definitivamente acuñado por Kerr,<sup>257</sup> quien diferenció a las células que morían naturalmente de las que lo hacían por infecciones, traumas, isquemia y tóxicos. En estos últimos casos, el proceso se llama necrosis. Ambos procesos son patológicos aunque en el caso de la necrosis ésta transcurre con inflamación, la apoptosis nunca conlleva procesos

---

<sup>256</sup> Muñoz, A. “Cáncer genes y nuevas terapias” Ed. Hélice, Madrid, **1997**.

<sup>257</sup> Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. “Apoptosis: a basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics” *British J. Can.* 26, **1972**, 239-257.

inflamatorios. Es una forma de muerte celular caracterizada por hipereosinofilia y retracción citoplasmáticas con fragmentación nuclear (cariorrhexis) desencadenada por señales celulares controladas genéticamente. Estas señales pueden originarse en la célula misma o por la interacción con otras células. La apoptosis (figura 118) tiene un significado biológico muy importante, que es opuesto al de la mitosis en la regulación del volumen tisular. La apoptosis contribuye a dar la forma a los órganos durante la morfogénesis y elimina células inmunológicamente autorreactivas, las células infectadas y las genéticamente dañadas cuya existencia es potencialmente dañina para el huésped.



**Figura 118.** Alteraciones morfológicas durante la apoptosis.

En la apoptosis, las alteraciones nucleares representan los cambios más significativos e importantes de la célula muerta y los orgánulos permanecen inalterados incluso hasta la fase en que aparecen los cuerpos apoptóticos. Destacan las alteraciones morfológicas del núcleo frente a las del citoplasma, a la inversa de lo que ocurre en la necrosis. En general la apoptosis es un fenómeno biológico fundamental, permanente, dinámico e interactivo.

Entre los tratamientos utilizados para atacar el cáncer encontramos, como el más antiguo, el uso de la cirugía (tratamiento local) conjugado con una terapia hormonal. Otro método utilizado en más del 50% de los casos y, que a menudo, se usa en conjunción con los anteriores es la radioterapia en la cual se usan radiaciones ionizantes para eliminar o impedir el crecimiento de los tumores localizados.

La quimioterapia es conocida como el uso de un fármaco o una combinación de ellos que, a diferencia de la cirugía y la radioterapia, es sistémica, es decir que trabaja en todas partes del cuerpo, también es utilizada en general después de la cirugía para terminar con vestigios de células cancerosas. Los agentes quimioterapéuticos que encontramos en el mercado son de origen sintético, de procedencia natural o derivados de este último.

### **Productos Naturales y Quimioterapia.**

La quimioterapia es una de las armas más efectivas en la lucha contra el cáncer. La mayoría de los fármacos quimioterápicos son citotóxicos, es decir, que eliminan células. El único problema radica en que estos agentes no discriminan entre células normales y cancerosas. Además, aunque estos dos tipos de células tienen un comportamiento biológico y procesos químicos similares, la diferencia radica en que las células cancerosas no tienen control sobre su crecimiento y reproducción. El hecho de que las células cancerosas sean el producto de mutaciones genéticas puede inducir a que sean más vulnerables a ciertos ataques terapéuticos, explicando algunas observaciones en las cuales muchas células tumorales son destruidas más fácilmente que las normales.<sup>258</sup> Cuando evaluamos un fármaco potencialmente anticancerígeno es importante entender el propio ciclo celular.<sup>259</sup> (figura 119)

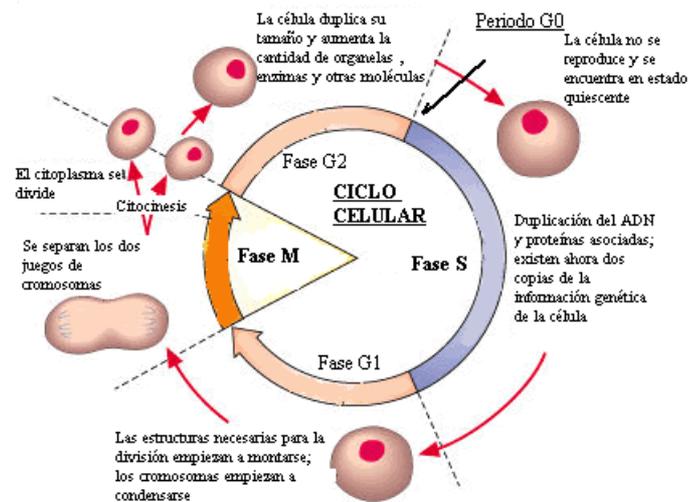
Las etapas, mostradas, son G1-S-G2-M.

Después de la división celular, las células entran en un estado G1 quiere decir "GAP 1"(Intervalo 1) un período de 6-12 h que es previo a la síntesis o replicación del ADN. Durante este tiempo, la célula dobla su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular.

---

<sup>258</sup> Baloglu, E. "Synthesis and biological evaluation of paclitaxel analogs" Virginia Polytechnic Institute and State University, Thesis, **2001**.

<sup>259</sup> Gringauz, A. "Introduction to medicinal chemistry: how drugs act and why" Ed. Wiley-VCH, New York, **1997**.



**Figura 119.** Ciclo celular

Hay células que pueden parar su progresión hacia la división en este estadio y permanecer durante días, meses o años en estado de reposo sin aumento de masa, en lo que se ha denominado fase G0. En la fase G1 existe un punto de control llamado el punto de restricción R en el que la célula comprueba que ha generado la masa necesaria para seguir adelante y comenzar la síntesis de ADN.

La fase S es la de "Síntesis". En esta fase tiene lugar la replicación del ADN, donde cada cromosoma pasa a tener dos cromátidas, es decir, dos moléculas de ADN de cadena doble que son copia una de la otra.

La fase G2 representa "GAP 2"(Intervalo 2) durante ésta, las células se preparan para la escisión en dos células hijas. En esta fase existe un segundo punto de control G2-M, en el que la célula debe comprobar dos condiciones antes de dividirse: que ha duplicado la masa de modo que puede dar lugar a dos células hijas, y que ha completado la replicación del ADN, y sólo lo ha hecho una vez.

La fase M es la de "mitosis", durante la cual tiene lugar la división nuclear (los cromosomas se separan) y citoplasmática (citocinesis) para dar lugar a las células hijas.

El estudio del ciclo celular puede proveer información acerca de la proporción de células presentes en cada una de estas fases y para los diferentes cánceres. Algunas

aproximaciones del porcentaje de células se pueden hacer diseñando una vía de ataque a las células en cada una de estas fases.

Los fármacos quimioterápicos están agrupados en seis clases basados en su mecanismo de acción:

1. Antimetabolitos: Esta clase de compuestos inhiben la biosíntesis de ácidos nucleicos por la sustitución o inhibición en los precursores biosintéticos del ADN y ARN. Se incluyen en este grupo compuestos antagonistas del ácido fólico, purina y pirimidinas como por ejemplo la gemcitabina (Gemzar®) usado en cánceres de pulmón y páncreas.<sup>260</sup>
2. Antibióticos carcinolíticos: Son compuestos que poseen una fuerte actividad antibiótica, y además son usados en la actualidad para algunos tipos de cáncer, tal es el caso de las actinomicinas, aisladas inicialmente de actinomycetos<sup>261</sup> como ejemplo la dactinomicina (Cosmogen Lyovac®) que es usada en el tratamiento de los tumores de Wilm's, Ewing's<sup>262</sup> y frente al sarcoma de Kaposi.<sup>263</sup>
3. Agentes hormonales: Los tumores de ovario, mama y próstata, entre otros, son dependientes de estrógenos/andrógenos, asociados con un aumento en la producción de éstos. Recientemente, se están usando sustancias con actividad antiestrogénica<sup>264</sup> que poseen la ventaja de inhibir al receptor de estrógenos.

---

<sup>260</sup> Volker, H. "Role of Gemcitabine in the Treatment of Advanced and Metastatic Breast Cancer" *Oncology* 64, **2003**, 191-206.

<sup>261</sup> Brockmann, H.; Manegold, J. H. "Actinomycins. XXIII. Antibiotics from actinomycetes. XLV. Conversion of actinomycin X2 to the actinomycins C1, X0β, and X0δ" *Chem. Ber.* 93, **1960**, 2971-2981

<sup>262</sup> Aparicio, J.; Segura, A.; Garcera, S.; Montalar, J.; Badal, M. D.; Santaballa, A.; Calatayud, E.; Reynes, G. "Multimodal therapy for localized Ewing's sarcoma of bone: results of the T-9 protocol" *Cancer J.* 11, **1998**, 306-308.

<sup>263</sup> Terenteva, T. G.; Egorov, L. V.; Perevodchikova, N. I. "Importance of dactinomycin in the current therapy of tumors" *Antibiotics and medical biotechnology* 30, **1985**, 619-630.

<sup>264</sup> a) Gulley, J. L.; Dahut, W. L. "Novel schedules of hormone therapy for prostate cancer" *Progress in Oncol.* **2004**, 236-253; b) Schally, A. V.; Nagy, A. "Chemotherapy targeted to cancers through tumoral hormone receptors" *Trends Endocrinol. Metabolism* 15, **2004**, 300-310.

Podemos encontrar compuestos como la doxorubicina y bombesina, éste último aislado de la piel de algunas ranas asiáticas.<sup>265</sup>

4. Inhibidores mitóticos: Esta clase de compuestos quizás es la más utilizada hoy en día ya que interrumpen la división celular bloqueando o intercalándose en la formación de los microtúbulos, especialmente, en la metafase y anafase.<sup>266</sup> Como ejemplos podemos encontrar la vinblastina (Velbe®) aislada de la *Vinca rosea*<sup>267</sup> y usada principalmente en cánceres de mama, leucemia y algunos linfomas;<sup>268</sup> la camptotecina aislada de *Camptotheca acuminata*<sup>269</sup> tiene muy buena actividad frente a muchas líneas celulares *in vitro*, pero es muy baja la solubilidad para aplicaciones clínicas; un análogo de ésta, el topotecan (Hycamtin®), es efectivo contra muchos tipos de cánceres, en especial, con el cáncer de ovario.<sup>270</sup> Pero en este momento el más importante agente anticancerígeno aislado de una fuente natural es el conocido como taxol®, el cual fue encontrado en la corteza del árbol *Taxus brevifolia*.<sup>271</sup>
5. Agentes alquilantes: La mayor parte de los agentes empleados en quimioterapia anticancerosa basan su acción en la producción de roturas y/o alteraciones en el DNA de las células. De este modo, inducen apoptosis y la muerte de las células tumorales. Ejemplos son las “mostazas” nitrogenadas (mecloretamina, el melfalan (Alteran®), la ciclofosfamida (Endosana®), el

---

<sup>265</sup> Lai, R.; Liu, H.; Lee, W. H.; Zhang, Y. “A novel proline rich bombesin-related peptide (PR-bombesin) from toad *Bombina maxima*” *Peptides* 23, **2002**, 437-442.

<sup>266</sup> a) Mani, S.; Macapinlac, M.; Goel, S.; Verdier-Pinard, D.; Fojo, T.; Rothenberg, M.; Colevas, D. “The clinical development of new mitotic inhibitors that stabilize the microtubule” *Anti-Cancer drugs* 15, **2004**, 553-558; b) Kirsch-Volders, M.; Parry, E. M. “Genetic toxicology of mitotic spindle inhibitors used as anticancer drugs” *Mutation Res.* 355, **1996**, 103-128.

<sup>267</sup> Andreeva, T. I.; Bereznegovskaya, L. N. “Indole alkaloids of a callus culture of *Vinca rosea*” *Khimiya Prirodnykh Soedinenii* 3, **1977**, 429.

<sup>268</sup> <http://www.cancerbacup.org.uk/Treatments/Chemotherapy/Individualdrugs>

<sup>269</sup> Wall, M. E.; Wani, M. C.; Cook, C. E.; Palmer, K. H.; McPhail, A. T.; Sim, G. A. “Plant antitumor agents: The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloid leukaemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*” *J. Am. Chem. Soc.* 88, **1966**, 3888-3890.

<sup>270</sup> Guichard, S.; Montazeri, A.; Chatelut, E.; Hennebelle, I.; Bugat, R.; Canal, P. 2 “Schedule-dependent activity of topotecan in OVCAR-3 ovarian carcinoma xenograft: Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation” *Clin. Cancer Res.* 7, **2001**, 3222-3228.

<sup>271</sup> Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. “Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*” *J. Am. Chem. Soc.* 93, **1971**, 2325-2327.

clorambucil (Leukeran®), las aziridinas (tiotepa), los ésteres del ácido metansulfónico (busulfan (Myleran®), treosufan).<sup>272</sup> Desgraciadamente, una de las causas de fallo de los tratamientos quimioterápicos es la aparición de resistencias a la muerte apoptótica de las células tumorales como consecuencia de la mutación de genes como p53, siendo este último un gen supresor que produce apoptosis. Por ello, el estudio de los agentes, genes, y mecanismos implicados en la apoptosis y su regulación es otra de las líneas de investigación de obvio interés.<sup>273</sup>

6. Agentes quimioterapéuticos misceláneos: son aquellos que no forman parte de ninguna de las cinco clases anteriores ejemplo, la procarbazina utilizada en especial en los linfomas de Hodgkin.

El descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos para tratar este complejo problema es de vital importancia. En la búsqueda de ellos se deben involucrar investigadores con grupos multidisciplinarios entre los que podemos enumerar los investigadores de productos naturales,<sup>274</sup> esto, debido a que la naturaleza juega un importante papel en proveer posibles agentes terapéuticos así como compuestos diana que pueden servir para el tratamiento de muchas enfermedades en especial el cáncer.<sup>275</sup>

Entre las clases de compuestos que inducen apoptosis en las células tumorales se encuentran los triterpenos, entre los cuales podemos mencionar el ácido maslínico **176**, el uvaol **177**, el eritrodiol **178** que junto con algunas sales derivadas de ellos presentan una

---

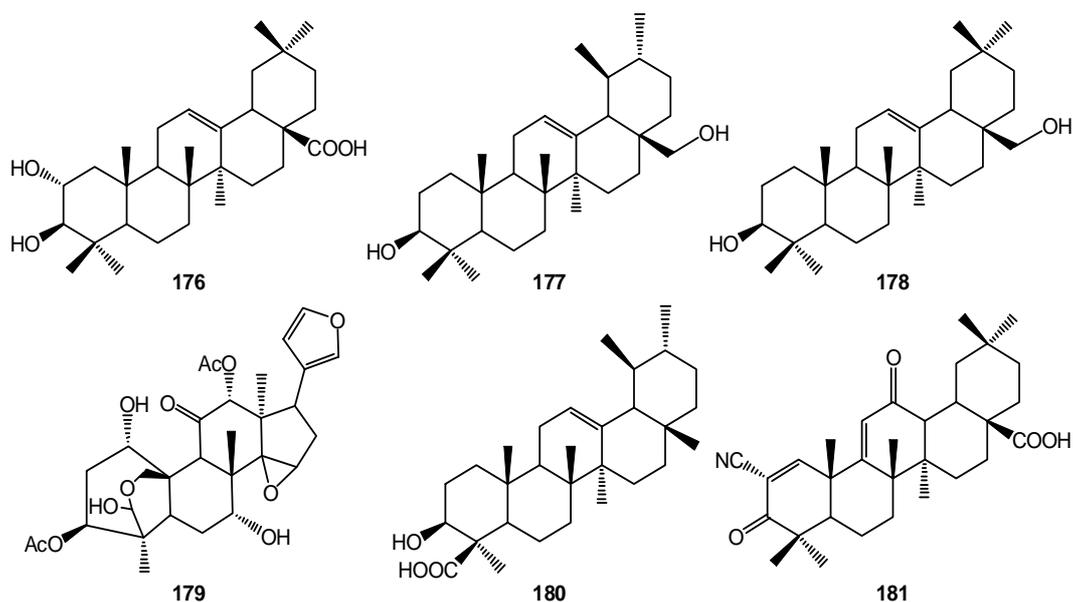
<sup>272</sup> Nieto, Y.; Jones, R. B. "DNA-binding agents" *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers* 20, **2002**, 197-225.

<sup>273</sup> Shi-Yong, S.; Numsen, H. Jr.; Reuben, L. "Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention" *J. Nat. Cancer Institute* 96, **2004**, 662-672.

<sup>274</sup> a) Vuorela, P.; Leinonen, M.; Saikku, P.; Tammela, P.; Rauha, J.-P.; Wennberg, T.; Vuorela, H. "Natural products in the process of finding new drug candidates" *Curr. Med. Chem.* 11, **2004**, 1375-1389; b) Butler, M. S. "The role of natural product chemistry in drug discovery" *J. Nat. Prod.* 67, **2004**, 2141-2153.

<sup>275</sup> a) Mann, J. "Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future" *Nat. Review Cancer* 2, **2002**, 143-148; b) Reddy, L.; Odhav, B.; Bhoola, K. D. "Natural products for cancer prevention: a global perspective" *Pharmacol. Therap.* 99, **2003**, 1-13; c) Tsuda, H.; Ohsima, Y.; Nomoto, H.; Fujita, K. I.; Matsuda, E.; Iigo, M.; Takasuka, N.; Moore, M. A. "Cancer prevention by natural compounds" *Drug Metab. Pharmacokin.* 19, **2004**, 245-263.

fuerte inducción de apoptosis. Éste es un preparado farmacéutico probado inicialmente con mucho éxito en la línea celular de A7r5.<sup>276</sup> Otro compuesto es la tosendanina **179**, triterpeno tetracíclico, que es efectivo porque induce muerte celular programada en la línea celular PC-12.<sup>277</sup> El ácido boswélico **180** que presenta una probada actividad antiinflamatoria, recientemente se ha demostrado que es muy eficaz como antiproliferativo e inductor de apoptosis en células humanas de cáncer de colon HT-29.<sup>278</sup> El derivado sintético CDDO **181** es un potente inductor de apoptosis en células de leucemia humana ML-1.<sup>279</sup>



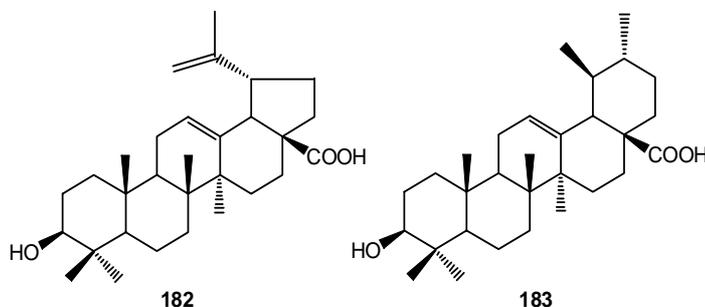
<sup>276</sup> Shinohara, H.; Shinohara, G.; Kuno, N. "Apoptosis inductor containing maslinic acid, erythrodiol, uvaol, and betulin derivatives" Patent PCT WO 2003057272, **2003**, pp 86.

<sup>277</sup> Tang, M. Z.; Wang, Z. F.; Shi, Y. L. "Involvement of cytochrome *c* release and caspase activation in toosendanin-induced PC-12 cell apoptosis" *Toxicology* 201, **2004**, 31-38.

<sup>278</sup> Liu, J. J.; Nilsson, A.; Oredsson, S.; Badmaev, V.; Zhao, W. Z.; Duan, R. D. "Boswellic acids trigger apoptosis via a pathway dependent on caspase-8 activation but independent on Fas/Fas ligand interaction in colon cancer HT-29 cells" *Carcinogenesis* 23, **2002**, 2087-2093.

<sup>279</sup> Stadheim, T. A.; Suh, N.; Ganju, N.; Sporn, M. B.; Eastman, A. "The novel triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid (CDDO) potently enhances apoptosis induced by tumor necrosis factor in human leukaemia cells" *J. Biol. Chem.* 277, **2002**, 16448-16455.

Finalmente podemos encontrar algunos tan conocidos para los investigadores de productos naturales como el ácido betulínico **182**<sup>280</sup> y el ácido ursólico **183**<sup>281</sup> que son inductores potentes de apoptosis en células de leucemia humana HL-60.



El hecho de encontrar en la literatura triterpenos activos en diversas líneas celulares tumorales nos ha planteado la búsqueda de nuevas estructuras de triterpenos que presenten actividad.

<sup>280</sup> Poon, K. H.; Zhang, J.; Wang, C.; Tse, A. K. W.; Wan, C. K.; Fong, W. F. "Betulinic acid enhances  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced differentiation in human HL-60 promyelocytic leukaemia cells" *Anti-Cancer Drugs* 15, **2004**, 619-624.

<sup>281</sup> Baek, J. H.; Lee, Y. S.; Kang, C. M.; Kim, J. A.; Kwon, K. S.; Son, H. C.; Kim, K. W. "Intracellular  $\text{Ca}^{+2}$  release mediates ursolic acid-induced apoptosis in human leukemia HL-60" *Int. J. Cancer* 73, **1997**, 725-728.

## ***PARTE TEÓRICA***

Como hemos mencionado anteriormente, algunos triterpenos pentacíclicos presentan cierta actividad frente a distintas líneas celulares. Con el objeto de buscar estructuras o tipos estructurales que tenga buena actividad citotóxica, se han ensayado algunos de los triterpenos aislados en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

Se evaluó la actividad citotóxica de diversas sustancias aisladas frente a células mieloides de leucemia humana (HL-60). Estos experimentos se han dividido en dos partes: la primera, triterpenos aislados de basidiomicetos del género *Ganoderma* y la segunda los aislados del género *Laetiporus*. A su vez, hemos probado si alguno de nuestros triterpenos era efectivo inhibiendo la biosíntesis de proteínas.

### **Evaluación de la citotoxicidad de los triterpenos aislados en basidiomicetos del género *Ganoderma***

Se admite que la muerte celular por apoptosis en las células HL-60 se caracteriza por la pérdida de la capacidad proliferativa, por el daño en el ADN y por profundas alteraciones de la morfología celular.

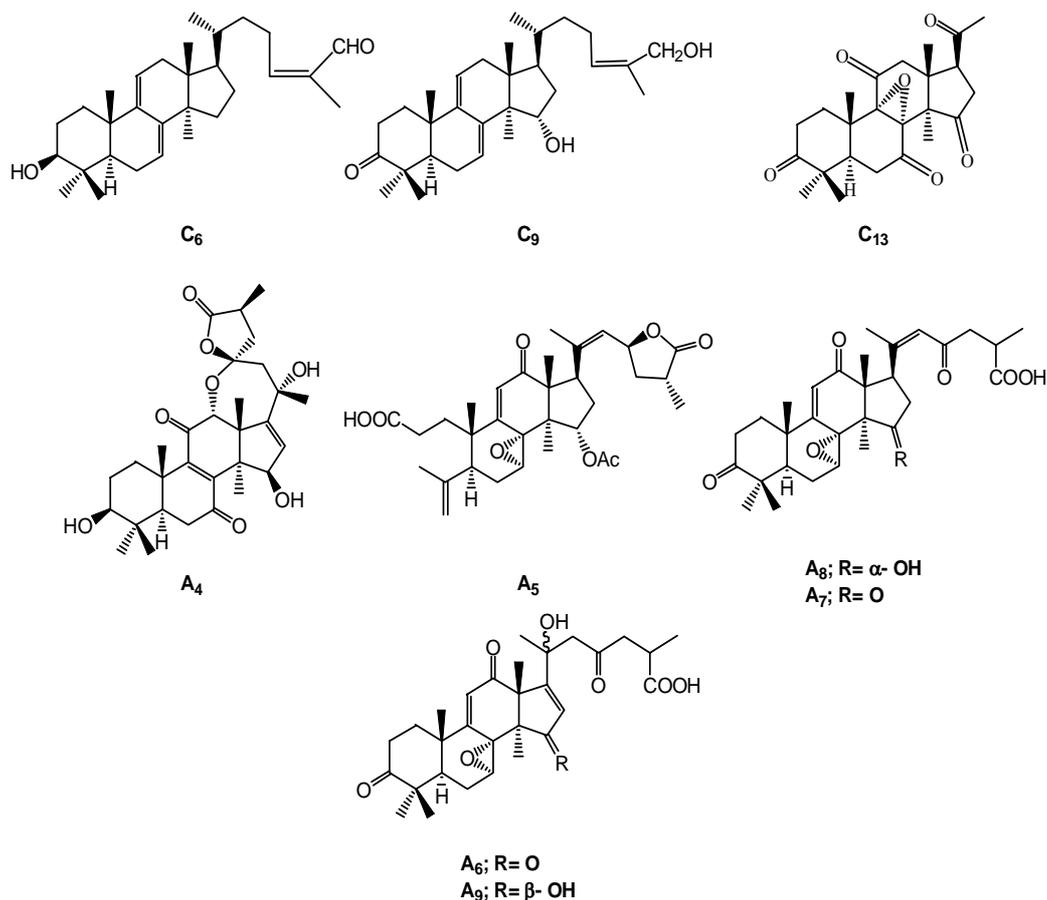
**Tabla 8.** Efecto de los triterpenos ensayados sobre la viabilidad de las células HL-60<sup>a</sup>

| Compuestos   | IC <sub>50</sub> (μM)   |
|--|-------------------------|
| C <sub>6</sub> (5α-lanosta-7,9(11),24-trien-3β-ol-26-al).                          | >500 <sup>b</sup>       |
| C <sub>9</sub> (5α-lanosta-7,9(11),24-trien-15α,26-diol-3-ona).                    | 15,7 ± 4,6 <sup>b</sup> |
| C <sub>13</sub> (8α,9α-epoxi-4,4,14α-trimetil-5α-pregnano-3,7,11,15,20-pentanona). | >500 <sup>b</sup>       |
| A <sub>4</sub> (austrolactona)   | 483 ± 83 <sup>c</sup>   |
| A <sub>5</sub> (ácido austrálico)  | 94 ± 6 <sup>c</sup>     |
| A <sub>6</sub> (ácido applanoxídico C)   | 334 ± 90 <sup>c</sup>   |
| A <sub>7</sub> (ácido applanoxídico F)   | 315 ± 52 <sup>c</sup>   |
| A <sub>8</sub> (ácido applanoxídico A)   | 132 ± 22 <sup>c</sup>   |
| A <sub>9</sub> (ácido applanoxídico G)   | 404 ± 80 <sup>c</sup>   |

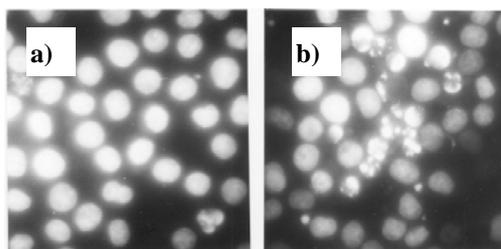
<sup>a</sup>Los datos mostrados representan el promedio de dos experimentos independientes con tres determinaciones cada uno. <sup>b</sup> a 24h. <sup>c</sup> a 96 h.

En nuestros ensayos de citotoxicidad hemos evaluado si alguno de los triterpenos C<sub>6</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>13</sub>, A<sub>4</sub>-A<sub>9</sub> inhibían la viabilidad y el crecimiento en este tipo de células y

hemos observado que este efecto inhibitorio es evidente después de 24 h de tratamiento. Para el triterpeno **C<sub>9</sub>**, la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) determinada por el ensayo del MTT fue de  $15,7 \pm 4,6 \mu\text{M}$  después de 24 h de tratamiento. En cambio, los demás triterpenos ensayados mostraron poco efecto (Tabla 8).

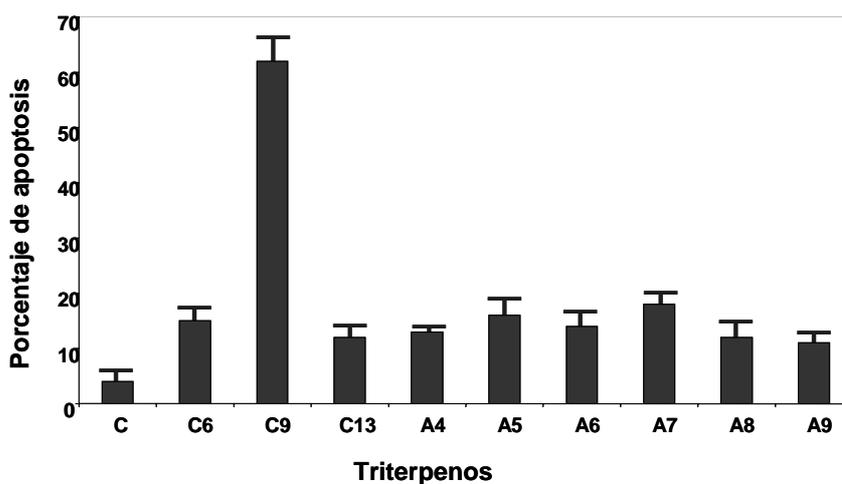


Para determinar si nuestros triterpenos inducen apoptosis, tratamos las células HL-60 con estos agentes (10-30  $\mu\text{M}$ ) durante 12 y 24 h. Este tratamiento indujo la aparición de los cambios morfológicos típicos de la apoptosis: condensación de cromatina y segmentación nuclear. Utilizando la tinción del trihidrocloruro de bis-bencimida (Hoechst 33258) pudimos observar dichos cambios para la sustancia **C<sub>9</sub>** (figura 120).



**Figura 120.** Aspectos morfológicos de células teñidas con Hoechst 33258. (a) células no tratadas; (b) células tratadas durante 24 h con 30 $\mu$ M de C<sub>9</sub>.

Como se muestra en la figura 121, todos los compuestos inducen moderados niveles de apoptosis ( $P < 0,05$ ). El porcentaje de células apoptóticas es del 18 % para A<sub>7</sub> y del 11% para A<sub>9</sub>, (valores superiores al control C 4%). En cambio, el tratamiento de las células HL-60 con el triterpeno C<sub>9</sub> indujo un aumento significativo de la apoptosis (62% de las células apoptóticas), siendo muy superior a los otros compuestos ensayados.



**Figura 121.** Cambios morfológicos asociados con la apoptosis, determinados por el método de la microscopía de fluorescencia cuantitativa, utilizando la tinción con trihidrocloruro de bisbencimida.

La valoración cualitativa de la fragmentación del ADN en geles de agarosa puso de manifiesto patrones electroforéticos típicos de la hidrólisis intranucleosómica de la cromatina en respuesta a los triterpenos ensayados.

El triterpeno **C<sub>9</sub>** indujo fragmentación intranucleosómica del ADN en las células HL-60 a una concentración de 30 μM después de 24 h de tratamiento y además redujo la supervivencia determinada con el ensayo de MTT (tabla 8). Las sustancias **A<sub>4</sub>-A<sub>9</sub>** se ensayaron a una concentración de 100 μM durante 12 h de tratamiento detectando una importante hidrólisis a esa concentración.

Ninguno de los compuestos ensayados ha mostrado actividad citotóxica previa, en cambio, las sustancias **A<sub>6</sub>-A<sub>9</sub>** se han ensayado como inhibidores frente a promotores tumorales, evaluándose su efecto inhibitorio sobre el desarrollo del virus de Epstein-Barr asociado con una temprana activación de antígeno en células Raji.<sup>158,159</sup> Además presentan una moderada actividad antifúngica frente a *Microsporium cannis* y *Trichophyton mentagrophytes*.<sup>282</sup>

En conclusión, hemos observado que todos los triterpenos ensayados a excepción de **C<sub>6</sub>** y **C<sub>13</sub>** inhiben el crecimiento de células de leucemia humana HL-60 en cultivo. Para las sustancias **C<sub>6</sub>** y **C<sub>13</sub>** no se observa ningún efecto, mientras que los compuestos **A<sub>4</sub>-A<sub>9</sub>** muestran resultados que indican que los efectos citotóxicos están mediados en parte por activación de la apoptosis. El compuesto **C<sub>9</sub>** resultó ser el más efectivo y su actividad está mediada por activación de apoptosis.

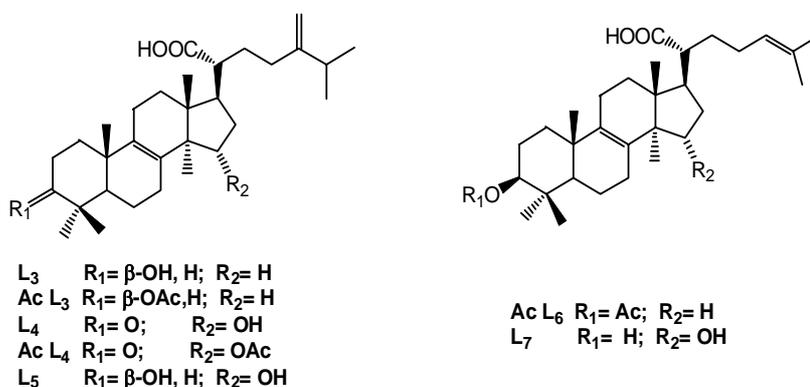
---

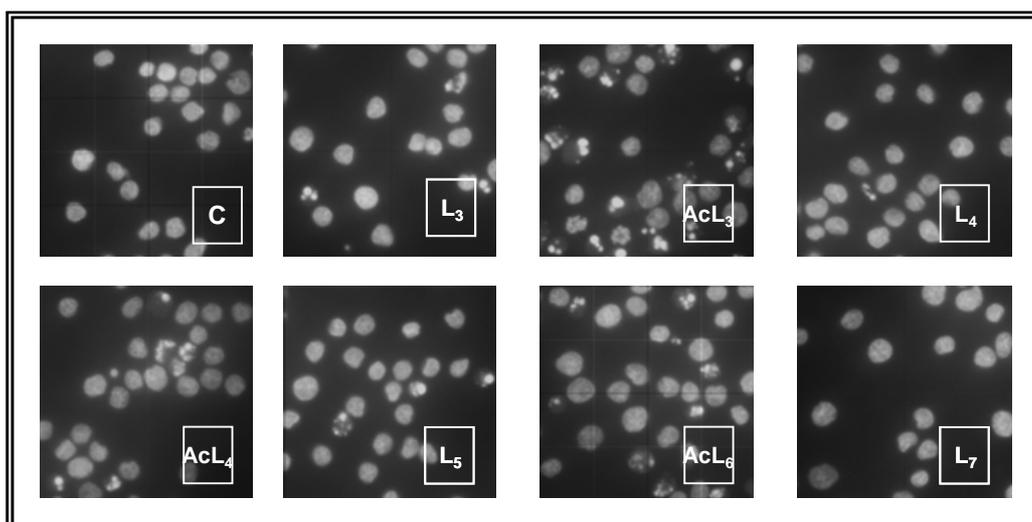
<sup>282</sup> Smania, E. F. A.; Delle-Monache, F.; Samania Jr, A.; Yunes, R. A.; Cuneo, R. S. "Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*" *Fitoterapia* 74, **2003**, 375-377.

### Evaluación de la citotoxicidad de los triterpenos aislados en basidiomicetos del género *Laetiporus*.

Nosotros hemos evaluado la citotoxicidad de los triterpenos **L<sub>3</sub>-L<sub>7</sub>** así como la de los derivados acetilados de **L<sub>3</sub>** y **L<sub>4</sub>** sobre la línea celular de leucemia humana HL-60. Hemos observado que estos compuestos disminuyen la supervivencia y proliferación desencadenando cambios morfológicos y fragmentación internucleosomal de ADN característicos de muerte celular por apoptosis. La apoptosis inducida por estos triterpenos es mediada por la activación de caspasa-3 y la liberación de citocromo *c* mitocondrial.

Para determinar si este efecto citotóxico es debido a apoptosis, las células de leucemia mieloide humana HL-60 se trataron con los triterpenos ensayados y se evaluó el aspecto típico de esta clase de muerte celular (la contracción celular, la formación de cuerpos apoptóticos, la condensación de cromatina y la segmentación nuclear), mediante microscopía de fluorescencia, usando como tinción la trihidrocloruro de bis-bencimida (Hoechst 33258). Como se observa en la figura 122, los triterpenos **L<sub>3</sub>**, **AcL<sub>3</sub>**, **AcL<sub>4</sub>** y **AcL<sub>6</sub>** (10  $\mu$ M, 8 h) inducen cambios morfológicos típicos de células apoptóticas.

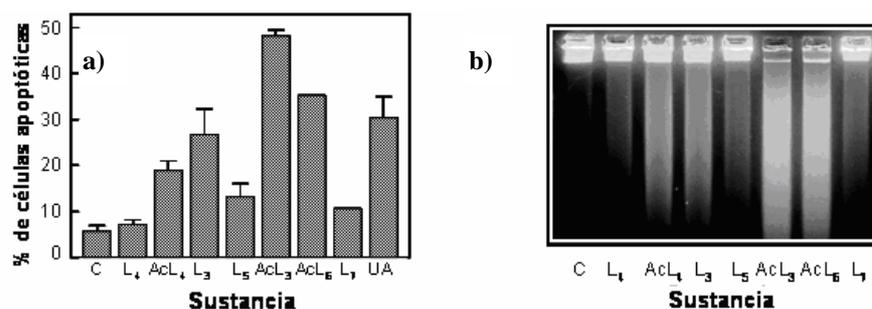




**Figura 122.** Inducción de apoptosis en células HL-60 por los triterpenos ensayados. Las células fueron cultivadas en ausencia (C, control) o presencia de 10  $\mu$ M del indicado triterpeno durante 8 h. Posteriormente, las células se tiñeron con Hoechst 33258 y los núcleos se visualizaron utilizando microscopía de fluorescencia.

Los triterpenos **AcL<sub>3</sub>** y **AcL<sub>6</sub>** fueron los más potentes inductores de apoptosis observado también mediante microscopía de fluorescencia cuantitativa (figura 123a). El ácido ursólico (UA), el cual induce muerte celular por apoptosis, fue utilizado como control positivo.<sup>281</sup>

También se examinó si estos triterpenos inducían fragmentación de ADN, considerada el punto final del proceso apoptótico. Los experimentos pusieron de manifiesto la formación de fragmentos de ADN formados por hidrólisis intranucleosomal de cromatina y fue evidente después de 16 h de tratamiento con 10  $\mu$ M de **L<sub>3</sub>**, **Ac L<sub>3</sub>**, **Ac L<sub>4</sub>** y **AcL<sub>6</sub>** (figura 123b).

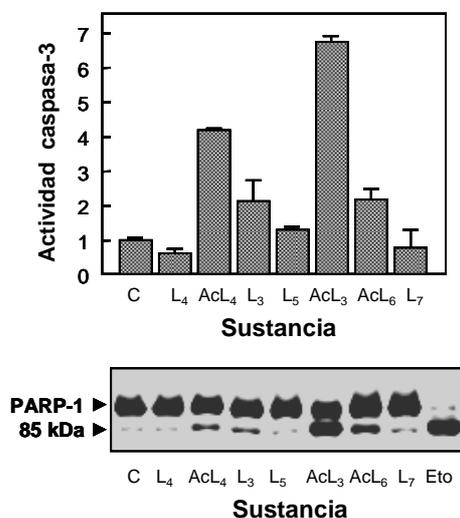


**Figura 123.** Inducción de apoptosis en células HL-60 por los triterpenos ensayados. a). Las células se cultivaron en ausencia (C, control) o presencia de 30  $\mu\text{M}$  de los compuestos indicados durante 8 h. Después de la tinción con Hoechst 33258, los núcleos se cuantificaron mediante microscopía de fluorescencia. Los valores representan la media y el error estándar de una medición realizada por triplicado. Resultados similares en experimento independientes; b). Las células fueron tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de cada una de las sustancias durante 16 h, el ADN celular total fue aislado y teñido con el bromuro de etidio después de haber realizado la electroforesis con gel de agarosa al 2%. La fragmentación internucleosomal de ADN fue visualizada bajo luz ultravioleta.

Para definir cual de las caspasas está implicada en el proceso de apoptosis inducida por los triterpenos evaluados, analizamos las actividades enzimáticas de extractos celulares de HL-60 tratadas con cada sustancia (10  $\mu\text{M}$ , 6 h) frente al sustrato tetrapéptido DEVD-pNA (para caspasa-3). La actividad relativa hidrolítica hacia el sustrato tetrapéptido aumentó considerablemente (figura 124, gráfico superior) de una manera dependiente de la concentración del triterpeno. El máximo de actividad de caspasa-3 fue obtenido con 10  $\mu\text{M}$  de **AcL<sub>3</sub>** (7 veces más activo, comparado con las células sin tratar; figura 6, gráfico superior).

Estos triterpenos también inducen el procesamiento de poli(ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1), enzima que es sustrato de la caspasa-3. La enzima PARP-1 cataliza la transferencia de la unidad de ADP-ribosa de su sustrato,  $\text{NAD}^+$ , a un número limitado de aceptores proteicos involucrados en la arquitectura cromatina o en el metabolismo del ADN. La ruptura de PARP-1 inactiva la enzima, imposibilitando la reparación de ADN. Como era de esperar, se visualizaron dos bandas: la

correspondiente a la proteína restante intacta PARP-1 (116 kDa) y el fragmento típico de apoptosis de 85 kDa (figura 124, gráfico inferior).

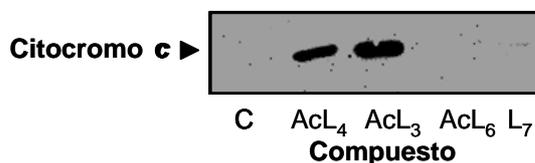


**Figura 124.** Activación de caspasa-3 y procesamiento del enzima PARP-1. *Gráfico superior.* Las células se incubaron en ausencia (C, control) o en presencia del compuesto indicado (10  $\mu$ M, 6 h) y los lisados celulares se ensayaron para la actividad de caspasa-3 utilizando el sustrato colorimétrico DEVD-pNA. Los resultados muestran un experimento representativo realizado por duplicado y expresados como el aumento de la actividad caspasa con respecto al control. *Gráfico inferior.* Las células se trataron con las correspondientes sustancias y cantidades equivalentes de proteínas se sometieron a western-blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti-PARP-1. El etopósido (Eto, 5  $\mu$ M) se usó como control positivo.

Este efecto fue evidente para la sustancia **AcL<sub>3</sub>** (10  $\mu$ M) después de 6 h de tratamiento. El etopósido,<sup>283</sup> un fármaco quimioterapéutico que induce apoptosis en la mayoría de las líneas celulares, fue usado como control positivo (figura 124, gráfico inferior).

<sup>283</sup> Kaufmann, S. H. "Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukaemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note" *Cancer Research* 49, **1989**, 5870-5878.

El análisis western-blot para el citocromo *c* de las fracciones citosólicas presentó una única banda con el tamaño esperado de 15 kDa (figura 125). La liberación de citocromo *c* se observó a una dosis de 10  $\mu$ M para los compuestos **AcL<sub>3</sub>** y **AcL<sub>4</sub>**.



**Figura 125.** Liberación de citocromo *c* mediante análisis de Western blot. Las células HL-60 fueron tratadas a una concentración de 10  $\mu$ M de los compuestos indicados durante 6 h. Las células se lisaron y el citosol se analizó mediante inmunoensayo con el anticuerpo anti-citocromo *c*.

En la bibliografía no hay ningún estudio de citotoxicidad de los compuestos evaluados, sin embargo se ha descrito la actividad citotóxica moderada de **L<sub>6</sub>** frente a las líneas celulares Walker-256 y MCF-7.<sup>284</sup>

**Tabla 9.** Efecto de los triterpenos ensayados sobre la viabilidad de las células HL-60<sup>a</sup>

| Compuestos  | IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) |
|---|-----------------------------|
| <b>L<sub>3</sub></b> (ácido eburicóico).                        | 25 $\pm$ 2                  |
| <b>AcL<sub>3</sub></b> (ácido acetil eburicóico).               | 15 $\pm$ 4                  |
| <b>L<sub>4</sub></b> (ácido 3-oxo sulfurénico).                 | 407 $\pm$ 42                |
| <b>AcL<sub>4</sub></b> (ácido versisponico C)                   | 25 $\pm$ 1                  |
| <b>L<sub>5</sub></b> (ácido sulfurénico)                        | 14 $\pm$ 1                  |
| <b>AcL<sub>6</sub></b> (ácido acetil trametenólico)             | 31 $\pm$ 7                  |
| <b>L<sub>7</sub></b> (ácido 15 $\alpha$ -hidroxi trametenólico) | 12 $\pm$ 1                  |
| <b>UA</b> (ácido ursólico)                                      | 21 $\pm$ 4                  |

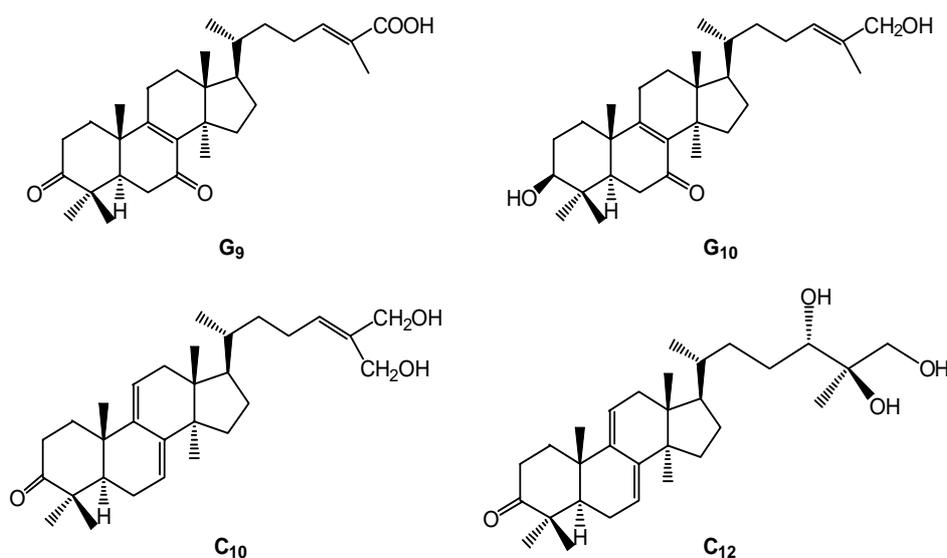
<sup>a</sup>Los datos mostrados representan el promedio, de dos experimentos independientes con tres determinaciones cada uno.

<sup>284</sup> Kirsti, K.; Lauri, K.; Raimo, H. "Antitumor activity of some compounds and fractions from an n-hexane extract of *Inonotus obliquus*" *Acta Pharmaceutica Fennica* 96, **1987**, 33-40.

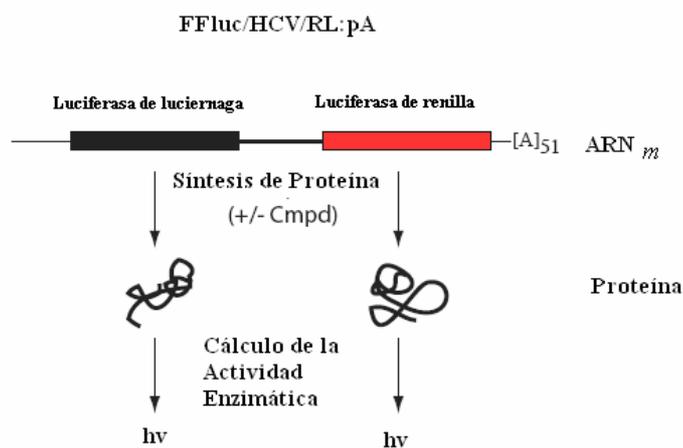
En este estudio observamos una notable diferencia de la citotoxicidad entre los compuestos **L<sub>4</sub>** y **L<sub>5</sub>** (tabla 9). Este resultado pone de manifiesto que la reducción del grupo carbonilo en la posición 3 conlleva un aumento de la citotoxicidad en la línea celular de leucemia humana HL-60. En conclusión, estos resultados indican que estos triterpenos inducen apoptosis vía activación de caspasa-3 y que el triterpeno **AcL<sub>3</sub>** podría ser un compuesto interesante para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales.

### Evaluación de la inhibición de la biosíntesis de proteínas utilizando algunos de los triterpenos aislados

La expresión de genes es un proceso complejo regulado a muchos niveles y cuya etapa limitante es, generalmente, la transcripción. Una técnica muy común en el estudio de la actividad transcripcional es el uso de los llamados genes reporteros que codifican proteínas fácilmente detectables. Entre ellas está la enzima bioluminiscente luciferasa, cuya actividad genera emisión de fotones que se pueden medir con precisión. Para investigar la actividad transcripcional de un gen, la secuencia del promotor que regula su expresión se liga a la secuencia que codifica para la enzima luciferasa, una proteína de la luciérnaga que emite bioluminiscencia, muy usada como gen reportero. Estas construcciones de ADN son introducidas en las células por medio de plásmidos. Una vez que las células han sido transfectadas, la activación del compuesto usado inducirá o inhibirá la síntesis de luciferasa.<sup>285</sup>



Los triterpenos que se sometieron a evaluación fueron **G<sub>9</sub>**, **G<sub>10</sub>**, **C<sub>10</sub>** y **C<sub>12</sub>**, en un sistema de células Krebs de ratón. El ARN-*m* usado para producir proteína poseía dos pautas abiertas de lectura, una de las cuales codifica para la luciferasa de luciérnaga y la otra para la luciferasa de renilla (figura 126).



**Figura 126.** Diagrama esquemático del gen que codifica la proteína para una transcripción *in vitro* el plásmido es linealizado con BamH I

Los triterpenos se ensayaron a una concentración final de 50  $\mu\text{M}$ . Los números en las columnas luciferasa de luciérnaga (LL) y luciferasa de renilla (LR) están expresados en unidades de luz. Las columnas tituladas “LL rel.” y “LR rel.” son los datos normalizados con la concentración apropiada en dimetilsulfóxido (DMSO). Las primeras cuatro incubaciones (agua o 0,5% DMSO) son controles que no producen inhibición y las siguientes dos incubaciones con 10  $\mu\text{M}$  anisomicina es el control positivo puesto que es un conocido inhibidor de la síntesis de proteínas.<sup>286</sup>

<sup>285</sup> Frawley, L. S.; Faught, W. J.; Nicholson, J.; Moomaw, B. “Real-time measurement of gene expression in living endocrine cells” *Endocrinology* 135, **1994**, 468-471.

<sup>286</sup> Grollman, A. P.; Walsh, M. “Inhibitors of protein biosynthesis. II. Mode of action of anisomycin” *J. Biol. Chem.* 242, **1967**, 3226-3233.

**Tabla 10.** Valores de intensidad luminosa para los triterpenos ensayados.

|                                     | <b>LL</b> | <b>LR</b> | <b>LL %</b>    | <b>LR. %</b>   |
|-------------------------------------|-----------|-----------|----------------|----------------|
| Agua                                | 86438     | 182477    |                |                |
| Aguar                               | 13346     | 41087     |                |                |
| 0.05% DMSO                          | 34343     | 120355    |                |                |
| 0.05% DMSO                          | 71033     | 139854    | 75171,4        | 136737,7       |
| 10 $\mu$ M Anisomicina <sup>a</sup> | 127       | 3341      |                |                |
| 10 $\mu$ M Anisomicina <sup>a</sup> | 123       | 3264      |                |                |
| <b>Triterpenos</b>                  |           |           | <b>LL rel.</b> | <b>LR rel.</b> |
| C <sub>12</sub> (Ganodermanontriol) | 67937     | 115125    | 0,90376127     | 0,84194045     |
| C <sub>10</sub> (Ganoderiol F)      | 79450     | 105097    | 1,05691792     | 0,76860295     |
| G <sub>10</sub> (Lucidadiol)        | 78418     | 121474    | 1,0431893      | 0,88837241     |
| G <sub>9</sub> (Ganoderic Acid DM)  | 54495     | 102482    | 0,72494326     | 0,74947875     |

<sup>a</sup> La anisomicina fue el control positivo.

Para que un compuesto muestre actividad significativa en este experimento, debería mostrar, al menos, un efecto 3 veces menor (es decir los valores de LL rel. o de LR rel. tienen que ser 0,3 o menores). Como se observa en la tabla 10, los valores resultaron ser muy altos, es decir, que no produjeron una inhibición significativa de la biosíntesis de proteínas.

***PARTE EXPERIMENTAL***

### Cultivos celulares

La línea celular de leucemia promielocítica humana fue establecida por Gallagher y col.<sup>287</sup> Las células se cultivaron en suspensión en medio RPMI-1640 (Invitrogen) complementadas con un 10% (v/v) suero bovino fetal inactivado por calor, penicilina (100 unidades/ml) y estreptomina (100 µg/ml), manteniéndose en una atmósfera húmeda de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células se mantuvieron a una densidad inferior a 1 x 10<sup>6</sup> células/ml. Las disoluciones stock de los compuestos ensayados (100 mM) en dimetilsulfóxido (DMSO) se almacenaron a -20°C. Las diluciones posteriores se hicieron en el medio de cultivo inmediatamente antes de usar. En todos los experimentos, la concentración final de DMSO no fue superior al 0,5 % (v/v), una concentración que no fue tóxica para las células. La viabilidad celular se determinó usando el ensayo de exclusión del azul de tripán. Para asegurar un crecimiento exponencial, las células se resuspendieron en medio fresco 24 h antes de cada tratamiento.

### Ensayo de citotoxicidad

La evaluación de la citotoxicidad se llevó a cabo utilizando el ensayo de MTT.<sup>288</sup> Las células (1x 10<sup>4</sup>) se trataron con diferentes concentraciones de los compuestos evaluados en placas de 96-pocitos durante diferentes períodos de tiempo (24, 36, 72 y 96 h) a 37°C. Los triterpenos se disolvieron y se aplicaron en DMSO. Las células control siempre se trataron con la misma cantidad de DMSO. La supervivencia de las células se detectó en base a su capacidad para metabolizar el bromuro de 3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il] 2,5-difenil tetrazolio (MTT). La absorbancia a 570 nm fue usada

---

<sup>287</sup> Gallagher, R.; Collins, S.; Trujillo, J.; McCredie, K.; Ahearn, M.; Tasi, S.; Metzgar, R.; Aulakh, G.; Ting, R.; Ruscetti, F.; Gallo, R. "Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukaemia" *Blood* 54, **1979**, 713-733.

<sup>288</sup> Mosmann, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays" *J. Immunol. Methods* 65, **1983**, 55-63.

como la medida de la viabilidad celular. La supervivencia celular se calculó como la fracción de células vivas en relación con el control de cada punto como (%) supervivencia celular = absorbancia promedio en células tratadas/absorbancia promedio en células control x 100. Las concentraciones que inducen una inhibición del 50 % del crecimiento celular ( $IC_{50}$ ) se determinaron gráficamente para cada experimento usando la curva empleada en el software Prism 2.0<sup>TM</sup> (GraphPad) y la ecuación derivada por De Lean y col.<sup>289</sup>

### **Microscopía de fluorescencia cuantitativa**

Para la detección de células apoptóticas, las células se fijaron en 3% de paraformaldehído durante 10 min. a temperatura ambiente y, posteriormente, se tiñeron con 10  $\mu\text{g/ml}$  de trihidrocloruro de bisbencimida (Hoesht 33258) durante 30 min. a 37°C. Las células apoptóticas se identificaron por su cromatina fragmentada.<sup>290</sup> Los núcleos con cromatina condensada (supercondensación de cromatina en la periferia nuclear) o los núcleos fragmentados en múltiples y pequeños cuerpos densos fueron considerados apoptóticos. Los núcleos dispersos y sin condensar se consideraron no apoptóticos. Se contaron un mínimo de 500 células por muestra, y cada experimento se realizó por triplicado.

### **Determinación de la fragmentación del ADN**

La fragmentación de ADN se realizó como se describe a continuación:<sup>291</sup> las células ( $1 \times 10^6$ ) se lavaron con PBS y se incubaron en 20  $\mu\text{l}$  de 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 0,5% SDS y 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  RNasa A (Sigma) a 37°C durante 1 h. Se añadieron 2  $\mu\text{l}$  de proteinasa K (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Sigma) y la mezcla se incubó a 50°C durante 2 h

<sup>289</sup> DeLean, A.; Munson, P. J.; Rodbard, D. "Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves" *Am. J. Physiol.* 235, **1978**, E97-E102.

<sup>290</sup> Schwartz, G. K.; Farsi, K.; Maslak, P.; Kelsen, D. P.; Spriggs, D. "Potentiation of apoptosis by flavopiridol in mitomycin-C-treated gastric and breast cancer cells" *Clin. Cancer Res.* 3, **1997**, 1467-1472.

adicionales. El ADN se extrajo con 100  $\mu$ l de una disolución formada por fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1) y se mezcló con 5  $\mu$ l de una disolución que contiene (10 mM EDTA, pH 8,0, 1% (w/v) agarosa de bajo punto de fusión, 0,25% azul de bromofenol, y 40% de sacarosa). Las mezclas se separaron mediante electroforesis en 2% de gel de agarosa, y las bandas se detectaron después de la tinción con bromuro de etidio y exposición a la luz ultravioleta.

#### **Ensayo de actividad caspasa.**

Después de los tratamientos, las células se centrifugaron a 1.000 x g durante 5 min a 4°C, y se lavaron con PBS. Las células se resuspendieron y se lisaron con tampón HEPES (50 mM Hepes, pH 7,4, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,1% Chaps). Después de centrifugación durante 10 min. a 17.000 x g a 4°C se determinó la concentración de proteínas en los sobrenadantes por el método de Bradford y se almacenaron a -20°C hasta que se determinó la actividad caspasa. Se usaron cantidades equivalentes de proteína (~20  $\mu$ g) y los tubos se mantuvieron en hielo hasta la realización de la medida de la actividad caspasa. La actividad del enzima se determinó midiendo el aumento neto de absorbancia a 405 nm usando el sustrato específico para caspasa-3 DEVD-pNA.

#### **Análisis de transferencia Western de la Hidrólisis de PARP**

La inducción de apoptosis se valoró también mediante la ruptura proteolítica de PARP-1.<sup>292</sup> Las células HL-60 (~ 7x10<sup>5</sup>) se trataron con los compuestos aislados a la concentración indicada durante diferentes períodos de tiempo a 37 °C. Se prepararon los lisados celulares en una disolución tampón que contenía 20 mM Hepes (pH 7,4), 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % Nonidet P-40, 1 mM fluoruro de

---

<sup>291</sup> Ito, Y.; Pandey, P.; Place, A.; Sporn, M. B.; Gribble, G. W.; Honda, T. "The novel triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid induces apoptosis of human myeloid leukemia cells by a caspase-8-dependent mechanism" *Cell Growth Differ.* 11, **2000**, 261-267.

fenilmetilsulfonilo, 1 µg/ml leupeptina, aprotinina y pepstatina A. Los materiales insolubles se eliminaron por centrifugación a 10.000 x g durante 10 min. Las proteínas extraídas (50 µg/pocillo) se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico al 7,5 %, y se transfirieron electroforéticamente a membranas de PVDF Immobilon-P de Millipore. La carga y la transferencia de cantidades iguales de proteínas se confirmó por tinción de la membrana con Ponceau S o bien utilizando un anticuerpo frente a beta-actina. Las membranas se bloquearon con 5 % de leche desnatada en tampón Tris salino conteniendo 0,1 % Tween-20 (TBST) durante 1 h, seguido por incubación con el anticuerpo monoclonal anti-PARP (BD PharMingen; dilución 1:1.000 en TBST suplementado con 3 % leche desnatada) durante toda la noche. Después del lavado e incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (Amersham Pharmacia Biotech), el complejo antígeno-anticuerpo se visualizó por quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) usando el protocolo del fabricante. La aparición de una banda de 85-kDa se usó como medida de la apoptosis.

#### **Aislamiento de la Fracción Citosólica y Análisis de la Liberación de Citocromo c mediante Western blot**

Las células se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en un tampón HEPES (20 mM Hepes, pH 7,5, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM ditiotreitól, 0,1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 10 µg/ml leupeptina, aprotinina, y pepstatina A) conteniendo 250 mM sacarosa. Después de 30 min de incubación en hielo, las células se lisaron a través de aguja (22-G) y los lisados se centrifugaron a 1.000 x g durante 5 min a 4 °C. Los sobrenadantes se centrifugaron a 105.000 x g durante 45 min a 4°C y los sobrenadantes resultantes se usaron como la fracción citosólica soluble. Las proteínas citosólicas (50 µg) se separaron en un gel de

---

<sup>292</sup> Tewari, M.; Quan, L. T.; O'Rourke, K.; Desnoyers, S.; Zeng, Z.; Beidler, D. R. "Yama/PPP32β, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhabitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase" *Cell* 81, **1995**, 801-809.

poliacrilamida/SDS al 15% y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se incubó con el anticuerpo anti-citocromo c (BD Transduction Laboratories) (1:250 dilution). Después de los lavados e incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano (Amersham Pharmacia Biotech), las bandas de proteínas se detectaron por quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) como se describió anteriormente.

### **Evaluación de la inhibición de la biosíntesis de proteínas**

Se evaluaron en el sistema de traducción *in vitro* derivado de células Krebs. El ARNm usado para producir proteína presentaba dos pautas de lectura abiertos, uno que codificaba para luciferasa de luciérnaga y otro que codificaba para luciferasa de renilla (figura 8). El sistema de traducción se incubó en presencia de 50  $\mu$ M de los triterpenos indicados a 30°C durante 1 h y después se valoró la cantidad de proteína sintetizada *in vitro* midiendo la actividad luciferasa de las dos proteínas. Una reducción o ausencia de actividad (comparadas con las incubaciones en ausencia de compuestos) es señal de un inhibidor de la síntesis de proteínas.

## ***TÉCNICAS GENERALES***

## **1. Técnicas instrumentales**

### ***1.1 Resonancia Magnética Nuclear.***

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear fueron realizados en disolución usando distintos disolventes, según se indica, utilizando como referencia interna TMS en el caso de  $\text{CDCl}_3$ . Los espectros de  $^1\text{H}$ , y  $^{13}\text{C}$  fueron realizados en espectrómetros BRUKER AVANCE 300, AVANCE 400 y AMX 500 equipados con una sonda de detección inversa en el caso del AVANCE 300, y una unidad de gradientes, según necesidades. Para la realización de experimentos bidimensionales homonucleares COSY, DEPT, NOESY y ROESY, y heteronucleares (C-H y N-H) HSQC, HMQC y HMBC se utilizaron programas convencionales suministrados por BRUKER.

### ***1.2 Puntos de Fusión.***

Los puntos de fusión se realizaron utilizando un equipo Ernst Leintz. GMBH Wetzlar y un equipo Büchi B-540, los datos de punto de fusión se presentan sin corregir.

### ***1.3 Rotación Óptica.***

Las determinaciones de las actividades ópticas se realizaron en polarímetros PERKIN ELMER modelo 241 y modelo 343, usando la línea D del sodio a  $25^\circ\text{C}$  y en disolución usando disolventes secos, según se indica, en celda de 1 dm.

#### **1.4 Espectroscopia Ultravioleta.**

Los espectros de ultravioleta se efectuaron en un espectrofotómetro JASCO modelo V-560, con una celda de cuarzo de 5 mm. Los disolventes (según se indica) se utilizaron secos.

#### **1.5 Espectroscopia Infrarroja.**

Los espectros de Infrarrojo fueron medidos en un espectrofotómetro BRUKER IFS 55, realizados en disolución de cloroformo seco, o usando como soporte pastillas de KBr 0.2 mm de espesor, o bien, depositando el producto sobre pastillas de NaCl de 25 mm de diámetro y 4 mm de espesor (film), según se indica en cada caso.

#### **1.6 Espectrometría de Masas.**

Los espectros de masa, tanto de baja como de alta resolución, fueron realizados empleando las técnicas de ionización por impacto electrónico (EI) o ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB) operando a 70 eV, en un espectrómetro FISIONS VG MICROMASS modelo VG Autospec. En el caso de los FAB (positivos) se utilizó como matriz el alcohol 3-nitrobencílico.

#### **1.7 Análisis elemental.**

Los análisis elementales fueron realizados en un equipo de la marca FISIONS modelo EA 1108 para CHNS.

#### **1.8 Difracción de Rayos X.**

La difracción de rayos X fue realizada en un difractómetro de monocristal Enraf-Nonius MACH-S3.

## **2. Técnicas cromatográficas**

### ***2.1 Cromatografía en capa fina.***

La monitorización de la separación de compuestos por cromatografía en columna y evolución de las reacciones, fue realizada mediante placas cromatográficas con fase estacionaria de gel de sílice marca MERCK 60F<sub>254</sub> 0.2 mm en soporte de aluminio y MACHEREY-NAGEL G/UV<sub>254</sub> 0.2 mm en soporte ALUGRAM<sup>®</sup> y mediante placas finas con fase estacionaria de Alumina neutra de la marca MACHEREY-NAGEL ALOX N/UV<sub>254</sub> 0.2 mm en soporte de aluminio. Para el revelado fueron usados varios procedimientos:

- Exposición a la luz ultravioleta de 254 nm y 356 nm.
- Pulverizaciones con una disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O-AcOH en proporción (1:4:20) conocido como oleum y posterior calentamiento a 140°C.
- Pulverizaciones con una disolución al 10% de ácido fosfomolibdico en etanol y posterior calentamiento a 140°C.

### ***2.2 Cromatografía preparativa.***

La purificación de algunos compuestos fue realizada mediante cromatografía preparativa utilizando placas de gel de sílice de un 1 mm de espesor y 20 x 20 cm en soporte de vidrio, de la marca Merck (60 PF<sub>254+366</sub>). La fase móvil utilizada es indicada en cada caso.

### ***2.2 Cromatografía en columna.***

Se utilizó como fase estacionaria gel de sílice de tipo 70-230 mesh, grado 9385 60Å y 60PF<sub>254</sub> de la marca Merck, la preparación de las columnas se realizó mediante los procedimientos habituales de empaquetado en seco a vacío o previa mezcla de la gel

con la fase móvil y posterior compactación. Los disolventes habituales fueron mezclas de n-hexano-acetato de etilo, o según indicación.

También fueron utilizadas columnas de exclusión molecular empleando Sephadex LH-20 de la compañía Aldrich como fase estacionaria. Los disolventes habituales fueron mezclas terciarias de n-hexano-diclorometano-metanol en las proporciones indicadas.

### **3. Disolventes**

Los disolventes empleados en la purificación de las sustancias se redestilaron previa utilización mientras que los utilizados en algunas reacciones se usaron anhidros tras destilación con un agente desecante adecuado y bajo atmósfera inerte. El tetrahidrofurano y el éter etílico fueron secados sobre sodio metálico y destilados, utilizando como indicador de humedad benzofenona y el diclorometano fue secado y destilado sobre hidruro cálcico.

## ***ABREVIATURAS***

**ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

|                        |   |                     |   |
|------------------------|---|---------------------|---|
| [ $\alpha$ ]           | rotación específica   | HEPES               | ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazine etanosulfónico   |
| $^{13}\text{C}$ RMN    | resonancia magnética nuclear de carbono                           | HMBC                | Experimento de RMN de acoplamiento C-H a larga distancia  |
| $^1\text{H}$ RMN       | resonancia magnética nuclear de protón                            | HOBt                | 1-hidroxi benzotriazol  |
| a                      | ancho/a   | HREIMS              | Espectrometría de masa de alta resolución (EIMS)  |
| Ac <sub>2</sub> O      | anhídrido acético   | HRFABMS             | espectrometría de masas de alta resolución (FABMS)  |
| AcOEt                  | acetato de etilo  | HSQC                | Experimento de RMN de acoplamiento C-H a corta distancia (heteronuclear multiple quantum coherente) |
| AcOH                   | ácido acético   | i.                  | intensidad  |
| AD-mix $\alpha, \beta$ | Dihidroxilación asimétrica  | IC <sub>100</sub>   | concentración inhibitoria al 100% de los individuos analizados                                      |
| AMP <sub>c</sub>       | adenosin monofosfato cíclico                                      | IC <sub>50</sub>    | concentración inhibitoria al 50% de los individuos analizados                                       |
| c                      | concentración   | IR                  | espectroscopía infrarroja   |
| CC                     | cromatografía en columna  | J                   | constante de acoplamiento   |
| CO <sub>2</sub>        | Anhídrido carbónico   | LD <sub>50</sub>    | dosis letal en el 50% de los individuos analizados  |
| COSY                   | Experimento RMN (correlación escalar protón-protón)               | Liebermann-Burchard | cloroformo, anhídrido acético y ácido sulfúrico   |
| d                      | doblete   | MIC                 | concentración mínima inhibitoria  |
| dd                     | doble doblete   | min                 | minuto  |
| ddd                    | doble doblete   | mL                  | mililitro   |
| DMF                    | dimetil formamida   | MTT                 | Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio   |
| DMSO                   | dimetil sulfóxido   | NF- $\kappa$ B      | factor de transcripción $\kappa$ B  |
| dt                     | doble triplete  | NGF                 | Factor de crecimiento   |
| DTT                    | ditiotreitól  | NOESY               | Experimento RMN correlación espacial protón-protón  |
| ECA                    | carcinoma de Ehrlich  | °C                  | grados Celsius  |
| EDC                    | Hidrocloruro de 1-etil-(3-di metilaminopropil)-3-etilcarbodiimida | PBS                 | solución buffer de fosfatos   |
| EDTA                   | ácido etilendiamino tetraacético                                  | PCC                 | clorocromato de piridinio   |
| EGTA                   | ácido etilenebis(oxonitrilo) tetraacético                         | PARP-1              | poli(ADP-ribosa) polimerasa-1   |
| EIMS                   | espectrometría de masas de impacto electrónico                    | p.f.                | punto de fusión   |
| EM                     | espectrometría de masas   |                     |   |
| Eto                    | etoposido   |                     |   |
| eV                     | electrónvoltio  |                     |   |
| FABMS                  | espectrometría de masas por bombardeo de átomos rápidos           |                     |   |
| g                      | gramo   |                     |   |
| h                      | hora  |                     |   |
| HBr                    | ácido bromhídrico   |                     |   |

|       |  |                  |  |
|-------|--|------------------|--|
| PVDF  | membrana de polivinil<br>dieno difluoruro  | THF              | tetrahidrofurano                               |
| q     | cuarteto   | TLC              | cromatografía en capa fina                     |
| rdto  | rendimiento  | Tris             | 2-amino-2-hidroximetil<br>propano-1,3-diol     |
| rel.  | relativo   | UA               | ácido ursólico                                 |
| ROESY | rotating Overhauser effect<br>spectroscopy (correlación<br>espacial protón-protón)   | UV               | espectroscopía ultravioleta                    |
| RMN   | resonancia magnética nuclear   | $\delta$         | desplazamiento químico en<br>partes por millón |
| s     | singlete   | $\lambda_{\max}$ | longitud de onda máxima                        |
| SDS   | dodecil sulfato sódico   | $\mu\text{L}$    | microlitro                                     |
| t     | tripleto   | $\mu\text{M}$    | micromolar                                     |
| TBST  | Tampón TBST: Tris Buffer<br>Salino conteniendo Tris 50 mM<br>- 6.05 g/l-, NaCl 140 mM -8.20<br>g/l conteniendo 0,5% Tween 20 |                  |  |

## ***CONCLUSIONES***

Una vez concluida la presente Tesis Doctoral pasaremos a relatar los resultados obtenidos:

1. Se hace un breve estudio de la morfología, fisiología y química de seis hongos recogidos en Colombia, poniendo especial atención a las sustancias terpénicas y esfingolípidas dando una visión general actualizada de sus usos económicos y farmacológicos.
2. Se estudian los componentes químicos de *Ganoderma lucidum* aislándose seis esteroides: ergosta 7,22-dien-3-ona (**G<sub>1</sub>**), ergosta -5,7-dien-3 $\beta$ -ol (**G<sub>2</sub>**), ergosta-7-en-3 $\beta$ -ol (**G<sub>3</sub>**), ergosterol (**G<sub>4</sub>**), peróxido de ergosterol (**G<sub>5</sub>**) y ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (**G<sub>6</sub>**) y cinco triterpenos ganodermadiol (**G<sub>7</sub>**), ganodermenonol (**G<sub>8</sub>**), ácido ganodérico (**G<sub>9</sub>**), lucidadiol (**G<sub>10</sub>**) y lucidal (**G<sub>11</sub>**) siendo estas dos últimas sustancias nuevas en la bibliografía consultada.
3. De *Ganoderma concinna* se aíslan quince sustancias identificadas como ergosta 7,22-dien-3-ona (**C<sub>1</sub>**), peróxido de ergosterol (**C<sub>3</sub>**), ergosta -7,22-dien-3 $\beta$ -ol (**C<sub>4</sub>**), ganoderal A (**C<sub>2</sub>**), ganodermenonol (**C<sub>5</sub>**), ganodermadiol, (**C<sub>7</sub>**), ácido ganoderico Y (**C<sub>8</sub>**), ganoderiol F (**C<sub>10</sub>**), ganodermatriol (**C<sub>11</sub>**), ganodermanontriol (**C<sub>12</sub>**), ganoderiol A (**C<sub>14</sub>**), ganoderiol B (**C<sub>15</sub>**) así como tres nuevas sustancias 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -lanosta-7,9(11),24-trien-26-al (**C<sub>6</sub>**), 15 $\alpha$ ,26-dihidroxi-5 $\alpha$ -lanosta-7,9(11),24-trien-3-ona (**C<sub>9</sub>**) y 8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -epoxi-4,4,14 $\alpha$ -trimetil-5 $\alpha$ -pregnano-3,7,11,15,20-pentanona (**C<sub>13</sub>**).
4. De *Ganoderma australe* se aislaron e identificaron mediante métodos espectroscópicos una serie de esteroides coincidentes con los aislados en los hongos anteriores tales como ergosterol (**A<sub>1</sub>**), ergosta -7,22-dien-3 $\beta$ -ol (**A<sub>2</sub>**), peróxido de ergosterol (**A<sub>3</sub>**) y los triterpenos ácidos applanoxídicos A (**A<sub>8</sub>**), C

- (A<sub>6</sub>), F (A<sub>7</sub>), G (A<sub>9</sub>), austrolactona (A<sub>4</sub>) y ácido austrálico (A<sub>5</sub>), estos dos últimos nuevos en la bibliografía consultada.
5. De *Laetiporus sulphureus* se aísla un isoprenoide denominado ubiquinona Q9 (L<sub>1</sub>), dos esteroides identificados como peróxido de ergosterol (L<sub>2</sub>) y cerevisterol (L<sub>8</sub>) y cinco triterpenos denominados ácido eburicóico (L<sub>3</sub>), ácido sulfurénico (L<sub>5</sub>), ácido trametenólico (L<sub>6</sub>), ácido 15 $\alpha$ -hidroxitrametenólico (L<sub>7</sub>) y el ácido 3-oxo-sulfurénico (L<sub>4</sub>) siendo este último nuevo en la bibliografía.
  6. Se estudian los componentes químicos de *Suillus luteus* aislándose, por primera vez de este género, la nueva ceramida suillumida (S<sub>6</sub>) y un tetraprenilfenol (S<sub>4</sub>), un derivado del ácido cinámico (S<sub>5</sub>), un glicérido (S<sub>8</sub>), un derivado del ácido benzoico (S<sub>11</sub>) y seis esteroides (S<sub>1-3</sub>, S<sub>7</sub>, S<sub>9</sub>) y (S<sub>10</sub>).
  7. Por último, se estudian los componentes químicos de *Trametes menziesii* aislándose, por primera vez de este género, dos nuevas ceramidas denominadas trametenamida A (T<sub>6</sub>) y B (T<sub>7</sub>). También se obtuvo el ácido linoleico (T<sub>1</sub>) y cuatro esteroides, el ergosta-7,22-dien-3-ona (T<sub>2</sub>), ergosta 7,22-dien-3 $\beta$ -ol (T<sub>3</sub>), peróxido de ergosterol (T<sub>4</sub>) y cerevisterol (T<sub>5</sub>).
  8. Dado el prometedor potencial biológico de la nueva ceramida trametenamida B (T<sub>7</sub>) se desarrolló la metodología para su síntesis total con la finalidad de dar su estereoquímica y compararla con el producto natural.
  9. Como producto de partida se utilizó galactosa acetilada (I) y 1-octadecanol (XII) lográndose en parte nuestro objetivo sintético.
  10. Se realiza por primera vez la síntesis de dos ceramidas (XVIII y XIX) las cuales contienen en el resto de ácido graso dos grupos hidroxilos.

11. Se hace un estudio de la actividad biológica de algunos metabolitos aislados de los hongos del género *Ganoderma* y *Laetiporus*.
12. Hemos evaluado los efectos de los triterpenos aislados de basidiomicetos del género *Ganoderma* sobre la viabilidad de las células leucémicas humanas HL-60 y hemos determinado que todos los triterpenos ensayados a excepción de **C<sub>6</sub>** y **C<sub>13</sub>** inhiben el crecimiento y la supervivencia de estas células y que los efectos citotóxicos están mediados en parte por activación de la apoptosis, determinada por microscopía fluorescente cuantitativa y por fragmentación del ADN en geles de agarosa.
13. De los estudios de citotoxicidad de los triterpenos aislados de basidiomicetos del género *Laetiporus*, concluimos que los triterpenos **L<sub>3</sub>-L<sub>7</sub>** y sus derivados acetilados **L<sub>3</sub>** y **L<sub>4</sub>** disminuyen la supervivencia y proliferación de las células HL-60 desencadenando cambios morfológicos y fragmentación internucleosomal de ADN característicos de muerte celular por apoptosis. Los triterpenos **AcL<sub>3</sub>** y **AcL<sub>6</sub>** fueron los más potentes inductores de apoptosis.
14. Existe una notable diferencia de la citotoxicidad inducida por los compuestos **L<sub>4</sub>** y **L<sub>5</sub>** poniendo de manifiesto que la reducción del grupo carbonilo en la posición 3 conlleva un aumento de la citotoxicidad en la línea celular de leucemia humana HL-60.
15. La apoptosis inducida por los triterpenos **AcL<sub>3</sub>** y **AcL<sub>4</sub>** está mediada por la activación de caspasa-3 y la liberación de citocromo *c* mitocondrial.
16. Los triterpenos ensayados no produjeron una inhibición significativa de la biosíntesis de proteínas.

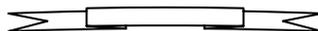
***PUBLICACIONES***

**Esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:**

Antonio G. González, Francisco León, Augusto Rivera, Claudia M. Muñoz y Jaime Bermejo

**Lanostanoids triterpenes from *Ganoderma lucidum***

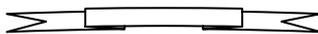
*Journal of Natural Products*, 62(12), **1999**, 1700-1701



Antonio G. González, Francisco León, Augusto Rivera, Juan I. Padrón, Javier González-Platas, Juan C. Zuluaga, José Quintana, Francisco Estévez y Jaime Bermejo

**New lanostanoids from *Ganoderma concinna***

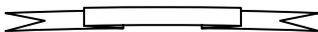
*Journal of Natural Products*, 65(3), **2002**, 417-421



Francisco León, Meiser Valencia, Augusto Rivera, Ivonne Nieto, José Quintana, Francisco Estévez y Jaime Bermejo

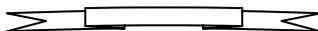
**Novel cytostatic lanostanoid triterpenes from *Ganoderma australe***

*Helvetica Chimica Acta*, 86, **2003**, 3088-3095



Francisco León, José Quintana, Augusto Rivera, Francisco Estévez, Jaime Bermejo  
**Isolation of lanostane triterpenes from *Laetiporus sulphureus* that induce apoptosis in human myeloid leukemia cells**

*Journal of Natural Products*, 67(12), **2004**, 2008-2011



Francisco Toledo Marante, Ana García Castellanos, Francisco León y Jaime Bermejo

**Ecología química en hongos y líquenes**

*Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 109, **2004**, 509-528