

Ergosta-7,22-dien-3 β -ol y 5 α -lanosta-7,9 (11), 24-trien-3 β , 26-diol Aislados de *Ganoderma applanatum*

**Irama Ramírez^{1*}, Darly Villalobos¹, Graciela Bocaranda²
y Alí Bahsas³**

¹Instituto de Investigaciones. Facultad de Farmacia. Universidad de Los Andes. Mérida.

²Universidad Experimental de los Llanos Occidentales "Ezequiel Zamora". Barinas.

³Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear. Facultad de Ciencias.
Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela

Recibido: 24-03-03. Aceptado: 06-11-03

Resumen

Se aislaron dos compuestos del extracto acetónico de los cuerpos fructíferos de *Ganoderma applanatum* y fueron caracterizados como ergosta-7,22-dien-3 β -ol y 5 α -lanosta-7,9(11), 24-trien-3 β , 26-diol, sobre la base de datos espectroscópicos, principalmente IR, EM y RMN (¹H, ¹³C). También se utilizaron técnicas de RMN bidimensionales (HMQC, COSY y HMBC). Este es el primer reporte de la presencia de estos compuestos en una muestra de *Ganoderma applanatum* venezolana.

Palabras clave: Basidiomicetos; ganodermadiol; *Ganoderma applanatum*; triterpenos.

Ergosta-7, 22-dien-3 β -ol and 5 α -lanosta-7,9 (11), 24-trien-3 β , 26-diol Isolated of *Ganoderma applanatum*

Abstract

There were isolated two compounds from extraction with acetone of *Ganoderma applanatum* fruitful bodies. Those compounds were characterized as ergosta-7,22-dien-3 β -ol and 5 α -lanosta-7,9(11),24-trien-3 β ,26-diol on the basic of spectroscopic data, mainly IR, EM and NMR (¹H, ¹³C). They were also applied two-dimensional NMR techniques (HMQC, COSY and HMBC). This is the first report of the presence of those compounds in a *Ganoderma applanatum* venezuelan sample.

Key words: Basidiomycetes; ganodermadiol; *Ganoderma applanatum*; triterpenes.

Introducción

Ganoderma applanatum pertenece a los hongos Basidiomicetos, una de las divisiones de los Macromicetos llamados tam-

bién hongos superiores. Los hongos están extensamente distribuidos en el mundo y algunos de ellos se han usado en la medicina tradicional china como antiinflamatorio, analgésico, hemostático, diurético, antidia-

* Autor para la correspondencia. E-mail: irama@ula.ve.

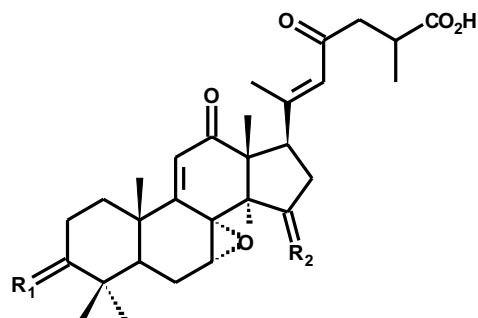
bético, antitumoral, anticonceptivo y como alimento (1). El uso de los cuerpos fructíferos frescos o secos de algunas especies del género *Ganoderma* en la medicina Oriental, han recibido gran atención por parte de los químicos, por lo que se le han realizado estudios para aislar, identificar y determinar sus constituyentes farmacológicamente activos, como los triterpenos del tipo lanostano, compuestos de gran interés debido a que sus productos oxigenados inhiben la síntesis del colesterol malo (LDL) y evitan la toxicidad de las células hepáticas *in vitro* (2). Los triterpenos lanostenoides, llamados Ácidos Applanoxídicos A, B, C y D aislados de *G. applanatum* de origen Indonesio, inhibieron el crecimiento de tumores (3). También de la misma especie, se aislaron los Ácidos Applanoxídicos E, F, G y H, los cuales mostraron actividad inhibitoria contra tumores inducidos (4) (Figuras 1 y 2).

Es importante resaltar que la especie *G. applanatum* venezolana no había sido estudiada hasta ahora desde el punto de vista químico. En este trabajo se presenta un estudio preliminar del extracto acetónico de los cuerpos fructíferos de la misma.

Materiales y Métodos

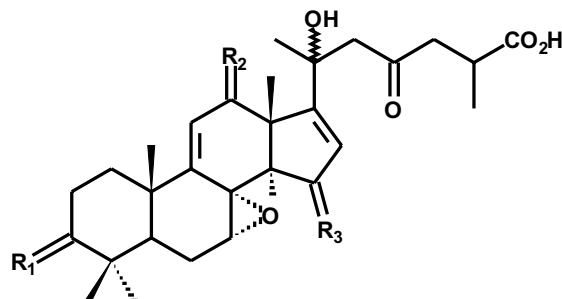
Métodos generales experimentales

Los espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT-135 (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlations), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlations) y COSY (Correlated Spectroscopy) se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance DRX-400 usando CDCl₃ como solvente. Los espectros IR se corrieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo FT-1725X en pastillas de KBr. Los espectros de masa se tomaron en un espectrómetro Hewlett-Packard 5973 a 70 eV. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y están sin corregir.



Ácidos	R ₁	R ₂
Applanoxídicos		
A	O	α-OH
B	β-OH	O
E	O	β-OH
F	O	O

Figura 1.



Ácidos	R ₁	R ₂	R ₃
Applanoxídicos			
C	O	O	O
D	β-OH	O	O
G	O	O	β-OH
H	β-OH	α-OH	O

Figura 2.

Para la cromatografía en capa fina, analítica y preparativa, se utilizó gel de sílice fluorescente (HF 254) sobre placas de vidrio, con un espesor de gel de 0,25 mm para capa fina y 0,50 mm para capa gruesa. Las cromatoplacas se desarrollaron en sistemas de eluyentes adecuados (mezclas de Hexano,

Acetato de Etilo, Diclorometano y Acetona) y se revelaron rociándolos con "Oleum" [$\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{SO}_4$, (20: 4:1)], y luego calentándolas por varios minutos a 100°C .

Materiales

Los cuerpos fructíferos de *Ganoderma applanatum* fueron recolectados a mediados de agosto de 1992 en los alrededores del caserío Altamira de Cáceres, ubicado en el Estado Barinas, cerca de los límites con el estado Mérida (Venezuela), a una altitud aproximada de 750 m.s.n.m.

Extracción y separación

Los cuerpos fructíferos de *Ganoderma applanatum* (5,8 Kg) fueron secados a 40°C , posteriormente molidos y extraídos, primeramente con hexano y luego con acetona. El extracto con hexano se realizó con el fin de separar los compuestos menos polares. La extracción con acetona se desarrolló a temperatura ambiente hasta agotamiento y la disolución fue concentrada en un rotavapor hasta obtener aproximadamente 47,5 g de extracto seco.

El extracto acétonico fue redisolto en acetona y mezclado con tres veces su peso de gel de sílice (142,5 g) en un cristizador de vidrio. Esta mezcla se dejó secar a temperatura ambiente por 48 horas, luego se homogenizó y el extracto adsorbido en gel de sílice (cabeza de columna), fue recromatografiado sobre el mismo adsorbente utilizando columna al vacío y empleando como eluyente mezclas de Hex-AcOEt en orden creciente de polaridad. Se recogieron 98 fracciones de 250 mL y las mismas fueron concentradas al vacío, analizadas por cromatografía de capa fina y reunidas adecuadamente. Cada reunión fue recromatografiada utilizando las técnicas de sefadex, preparativa o columna seca dependiendo de sus características (cantidad y composición). Luego de obtenidos los productos puros se procedió a determinarles el punto de fusión a cada uno de ellos y a efectuar el estudio espectroscópico correspondiente.

Resultados y Discusión

Se aisló un sólido que luego de recristalizado con acetato de etilo produjo unas agujas blancas de punto de fusión: $166-168^\circ\text{C}$. Su espectro IR muestra absorción a 3400 cm^{-1} característica de una vibración de tensión de hidroxilo, a 2900 cm^{-1} típica de una vibración de tensión de un enlace C-H alifático y una absorción a 1620 cm^{-1} característica de vibración de tensión de un enlace C=C. Su espectro de RMN- ^1H muestra en la región olefinica entre 5,1 y 5,2 ppm un grupo de señales que integra para tres protones. En δ : 3,57 hay un multiplete característico de un protón unido a un carbono oxigenado. También se observan dos dobletes, uno a δ : 0,99 y δ : 0,89, los cuales integran cada uno para tres protones, indicando la presencia de dos metilos acoplados cada uno a un hidrógeno. Por otro lado entre 0,77 y 0,82 ppm hay un grupo de señales que integra para nueve protones sugiriendo la presencia de tres metilos adicionales. A campo mas alto (δ : 0,52) hay un singulete que integra para tres protones característico de un metilo angular. El espectro de RMN- ^{13}C presenta señales correspondientes a veintiocho carbonos, lo cual unido al análisis anterior permitió suponer que el compuesto es un triterpeno de veintiocho carbonos. Del análisis del DEPT-135, se evidenció que el compuesto tiene seis metilos, ocho metilenos, siete metinos, dos carbonos cuaternarios saturados, tres metinos olefinicos, un oximetino y un carbono cuaternario trigonal. De los resultados anteriores se establece que la formula molecular del compuesto en estudio es $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}$. Las correlaciones observadas ($\text{H}-3 \rightarrow \text{H}-4$, $\text{H}-3 \rightarrow \text{H}-1$, $\text{H}-3 \rightarrow \text{H}-2$, $\text{H}-6 \rightarrow \text{H}-5$, $\text{H}-6 \rightarrow \text{H}-4$, $\text{H}-25 \rightarrow \text{H}-27$, $\text{H}-25 \rightarrow \text{H}-28$, $\text{H}-24 \rightarrow \text{H}-25$, $\text{H}-28 \rightarrow \text{H}-24$, $\text{H}-6 \rightarrow \text{H}-7$ y $\text{H}-7 \rightarrow \text{H}-14$) en su espectro COSY (Figura 3) y el análisis de su espectro HMBC (Figura 4), donde se presentan las siguientes correlaciones: $\text{C}-23 \rightarrow \text{H}-17$, $\text{C}-22 \rightarrow \text{H}-17$, $\text{C}-20 \rightarrow \text{H}-21$, $\text{C}-22 \rightarrow \text{H}-21$, $\text{C}-23 \rightarrow \text{H}-28$, $\text{C}-25 \rightarrow \text{H}-28$, $\text{C}-24 \rightarrow \text{H}-28$, $\text{C}-17 \rightarrow \text{H}-21$, $\text{C}-27 \rightarrow \text{H}-26$, $\text{C}-26 \rightarrow \text{H}-27$, $\text{C}-25 \rightarrow \text{H}-27$,

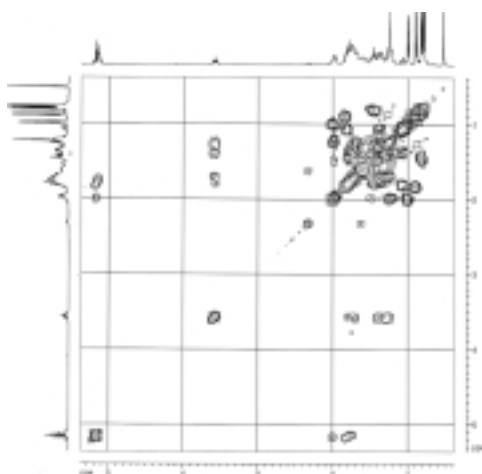


Figura 3.

C-1 → H-19, C-24 → H-26, C-24 → H-27, C-9 → H-19, C-1 → 2H-18 y C-14 → H-18, permitió establecer la presencia de los fragmentos A, B y C (Figura 5) en la estructura.

El espectro de masas presenta un ion molecular m/z : 398 lo cual concuerda con la fórmula molecular establecida a partir del espectro HMBC, además también se observa un ion a m/z : 271 (muy intenso) característico de esteroides con una cadena lateral insaturada y que se genera del rompimiento de la cadena lateral menos dos hidrógenos $[M-C_9H_{17}-2H]^+$ (5), confirmándose la presencia del fragmento (B). Luego de este análisis, se estableció que la estructura del compuesto es semejante al ergosta-7,22-dien-3 β -ol [1], la cual se corrobora por comparación con los desplazamientos de las señales de RMN- ^{13}C reportados en la literatura para el mismo compuesto (6) con los obtenidos experimentalmente. El ergosta-7,22-dien-3 β -ol ha sido aislado de otras especies del género *Ganoderma*, entre ellas *G. capense* (7), *G. australe* (8), así como también de *G. appllanatum* de origen asiático (9).

También se aisló un sólido en forma de agujas incoloras de punto de fusión: 162-164°C. En su espectro IR está presente una absorción a 3550 cm^{-1} característica de una vibración de tensión del grupo hidroxilo

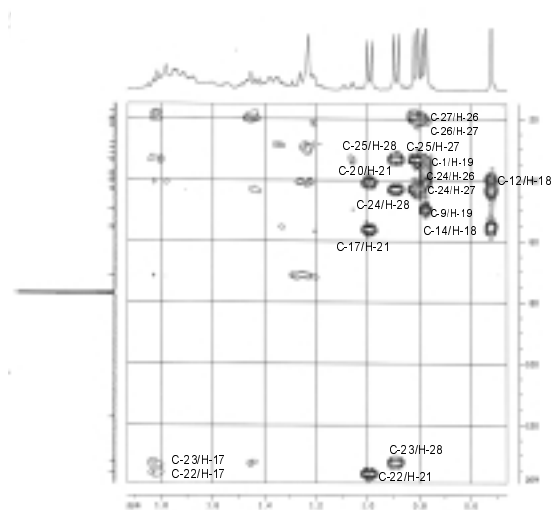


Figura 4.

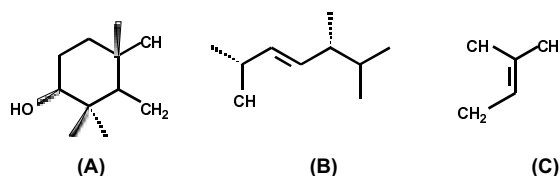
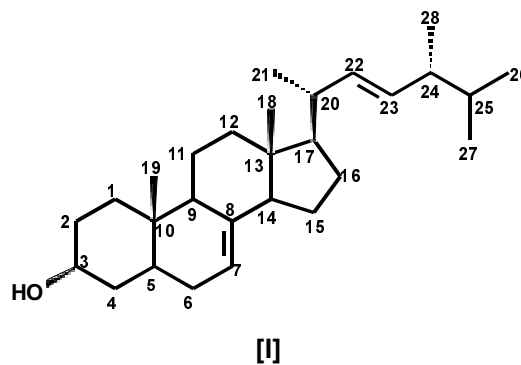


Figura 5



(-OH) y una absorción a 1650 cm^{-1} típica de una vibración de tensión del enlace C=C. Su espectro de RMN- 1H presenta tres singulete (δ : 0,54; δ : 0,96 y δ : 0,99) cada uno integrando para tres protones, característicos de grupos metilos. También están en esta región a campo alto, un singulete a δ : 0,86 que integra para seis protones, característicos

de dos metilos y un doblete a δ : 0,89 (J: 6,52 Hz) que integra para tres protones, característico de un metilo acoplado a un protón. En δ : 1,68 está un singulete que integra para tres protones típicos de un metilo olefinico. En δ : 3,23 está un doblete de doblete (J: 11,08 y 4,52 Hz) característico de un hidrógeno unido a un carbono hidroxilado, confirmado esto por el HMQC donde se observa la correlación de la señal protónica con la de un carbono metínico a δ : 78,95. El singulete que aparece en δ : 3,98 integrando para dos protones, indica la presencia de un metileno hidroxilado, corroborado en el espectro de HMQC donde se observa la correlación de esta señal con la correspondiente al carbono en δ : 69,10. En la región entre 5,29 y 5,45 ppm aparecen tres señales cada una asignable a un protón olefinico, confirmado en el HMQC por las correlaciones de cada una de esas señales con sus respectivos carbonos ubicados en la región olefinica. En el espectro de RMN- ^{13}C se distinguen señales correspondientes a treinta carbonos, lo cual sugiere que el compuesto en estudio es un triterpeno. El análisis del DEPT-135, muestra la presencia de siete metilos, ocho metilenos, tres metinos olefinicos, cuatro carbonos cuaternarios alifáticos, dos carbonos cuaternarios olefinicos, tres metinos alifáticos, un oximetino y un oximetileno. A partir de este análisis se pudo establecer que la fórmula molecular del compuesto es $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$. Las correlaciones H-3 \rightarrow H-2, H-24 \rightarrow H-23, H-11 \rightarrow H-12 y H-7 \rightarrow H-6 en su espectro COSY (Figura 6) y en su espectro HMBC (Figura 7) (C-27 \rightarrow H-24, C-13 \rightarrow H-11, C-5 \rightarrow H-6, C-26 \rightarrow H-24, C-8 \rightarrow H-11, C-27 \rightarrow H-26, C-24 \rightarrow H-26, C-25 \rightarrow H-26, C-30 \rightarrow H-3, C-29 \rightarrow H-3, C-13 \rightarrow H-18, C-12 \rightarrow H-18, C-14 \rightarrow H-18, C-26 \rightarrow H-27, C-3 \rightarrow H-30, C-3 \rightarrow H-29, C-24 \rightarrow H-27, C-25 \rightarrow H-27, C-9 \rightarrow H-28 y C-8 \rightarrow H-19) indican que están presentes en la molécula los fragmentos D, E y F (Figura 8).

A partir del análisis anterior, se propuso para el compuesto la estructura del 5α -lanosta-7,9(11), 24-trien-3 β , 26-diol [II],

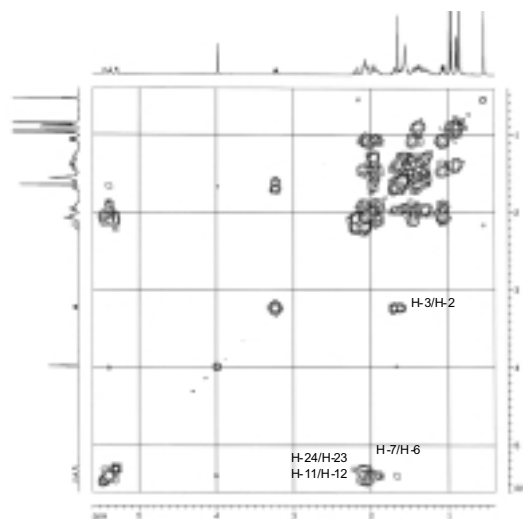


Figura 6.

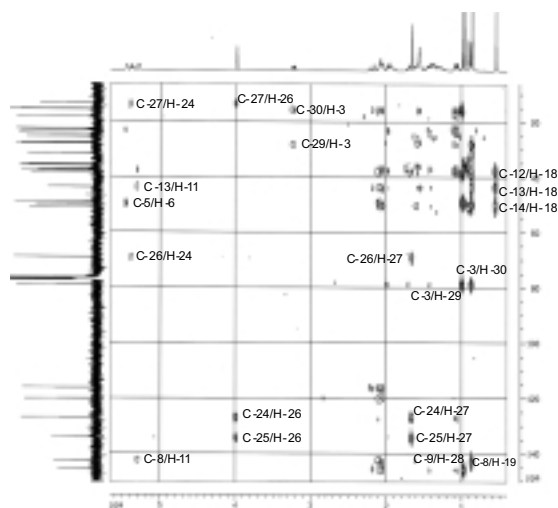


Figura 7.

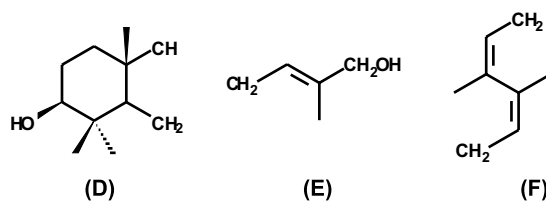
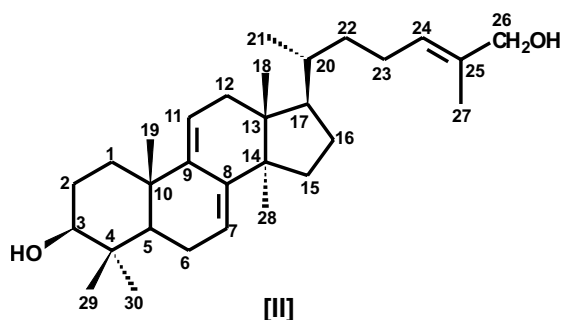


Figura 8.



confirmado por los reportes bibliográficos que indican que las señales de desplazamiento de RMN-¹³C del compuesto aislado son semejantes a las reportadas para el Ganodermanolide aislado de *G. lucidum* (10). Es la primera vez que existe un reporte de este compuesto para *G. applanatum*.

Referencias Bibliográficas

1. KOYAMA K., IMAIZUMI T., AKIBA M., KINOSHITA K., TAKAHASHI K., SUSUKI A., YANO S., HORIE S., WATANABE K., NAOI K. *Planta Medica* 63: 224-227, 1997.
2. SHIAO M., LIN L., YEH S., CHOU C. *Journal of Natural Products* 50: 886-890, 1987.
3. CHAIRUL T., HAYASHI Y., NISHIZAWA M., TOKUDA H., CHAIRUL S.M., HAYASHI Y. *Phytochemistry* 30: 4105-4109, 1991.
4. CHAIRUL, CHAIRUL S., HAYASHI Y. *Phytochemistry* 35: 1305-1308, 1994.
5. KELLER A.K., MAILLARD M.P., HOSTETT-MAN K. *Phytochemistry* 41: 1401, 1996.
6. ABRAHAM R., MONASTERIOS J. *Journal of Chem Soc Perkin II* 662-665, 1974.
7. JINGGUANG Y., FUZHEN S., CUIYING H., SHILIN Y. *Zhongcaoyao* 12: 7-11, 1981.
8. GONZÁLES A.G., BERMEJO B.J., TOLEDO F.J., MEDIAVILLA P.M.J., BELTRAN T.E. *An Quim Ser C* 82:149-151.
9. RIPPERGER H., BUDZIKIEWICZ H. *Phytochemistry* 14: 2297-2298, 1975.
10. ARISAWA M., FUJITA A., SAGA M., FUKUMURA H., HAYASHI T., SHIMIZU M., MORITA N. *Journal of Natural Products* 49: 621-625, 1986.