

ANÁLISIS BROMATOLÓGICO, ÁCIDOS GRASOS Y ESTEROLES
MAYORITARIOS DEL HONGO SILVESTRE *Cantharellus lateritius* var.
colombianus R.H. PETERSEN DEL ALTO DE DAZA (NARIÑO)

ALEXIS JOHANA CASTELLANOS
ANGELICA LUCÍA ORDÓÑEZ GIRALDO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2010

ANÁLISIS BROMATOLÓGICO, ÁCIDOS GRASOS Y ESTEROLES
MAYORITARIOS DEL HONGO SILVESTRE *Cantharellus lateritius* var.
colombianus R.H. PETERSEN DEL ALTO DE DAZA (NARIÑO)

ALEXIS JOHANA CASTELLANOS
ANGELICA LUCÍA ORDÓÑEZ GIRALDO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Químico

Directora

OLGA LUCÍA BENAVIDES CALVACHE
Ing. Química, M. Sc.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2010

Las ideas y conclusiones aportadas por el presente trabajo de grado, son de responsabilidad exclusiva de los autores.

Artículo 1° del acuerdo No. 324 del 11 de octubre de 1996, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación:

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre de 2010

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todas las bendiciones recibidas.

A nuestras familias, por todo su amor y apoyo incondicional.

A la profesora Olga Lucía Benavides, por la dirección y orientación en el desarrollo de este trabajo de grado.

A David Arturo Perdomo, por su colaboración en el análisis de ácidos grasos y por su orientación durante el desarrollo de este trabajo.

A Jesús Cabrera, Juan Pablo Jiménez, Juan Pablo Torres y a Marisol Urbano, por sus valiosos aportes.

A Sandra Espinosa, de la sección de Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño, por su colaboración en el análisis bromatológico del hongo.

Al Rafael Mariano Álvarez del Grupo de Investigación de Sustancias Bioactivas de la Universidad de Antioquia, por su colaboración en la identificación y cuantificación de los esteroides.

A Esperanza Franco Molano del Programa Extensión de Taxonomía de Hongos de la Universidad de Antioquia, por la identificación taxonómica de la especie fúngica.

A Piedad Rebolledo, jefe de laboratorios Especializados, por su colaboración y buena voluntad.

Al profesor Henry Insuasty, por facilitarnos el espacio y equipos durante la ejecución de este trabajo de investigación.

A los profesores del Departamento de Química por todas sus enseñanzas.

A la VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES, POSGRADOS Y RELACIONES INTERNACIONALES DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO (VIPRI) por la financiación de este trabajo.

RESUMEN

El hongo silvestre *Cantharellus lateritius* es un basidiomiceto ectomicorrízico que se distribuye desde el este de Estados Unidos hasta Colombia. Esta especie es una de las más vistosas, grandes y frecuentes en cuanto a venta en los mercados de Centroamérica, aunque no se han publicado estudios previos sobre su composición química.

Se realizó el análisis bromatológico de *C. lateritius var colombianus* R.H. Petersen y los parámetros evaluados indicaron que esta especie es una fuente de minerales y carbohidratos y contiene baja cantidad de ácidos grasos que en su mayoría son de tipo insaturado.

Se identificó por CG-EM los esteroides: NN1 (pregnano acetilado), desmosterol, 5,6-dihidroergosterol, estigmasterol, 7,22-ergostadienol, gama-ergostenol, gamasitosterol, ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona y los triterpenos: lanosterol, lup-20(29)-en-3-ona, lupan-3-ol-acetato, friedelan-3-ona.

Se realizó la cuantificación de los compuestos mayoritarios por cromatografía de gases-FID, encontrándose en mayor concentración el gama-ergostenol y ausencia de ergosterol, lo que diferencia a esta seta de otros basidiomicetos. También se identificó por esta técnica, los ácidos grasos: oleico, linoleico y palmítico.

ABSTRACT

The wild mushroom *Cantharellus lateritius* is an ectomycorrhizal basidiomycete. It is distributed from the eastern United States to Colombia. This species is one of the most colorful, large and it is sold in the markets of Central America, although it has not been reported preliminary studies on its chemical composition.

To the fungus *Cantharellus lateritius* var. *colombianus* R.H. Petersen was made a bromatology analyses and the parameters evaluated indicated that this species is a rich source of protein and carbohydrates and contains low amounts of fatty acids and these are mostly unsaturated type.

Were identified by GC-MS the follow sterols: NN1 (acetylated pregnane), desmosterol, 5.6-dihydroergosterol, stigmasterol, 7,22-ergostadienol, gamma-ergosterol, gamma-sitosterol, ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one and the triterpenes: lanosterol, lup-20(29)-en-3-ona, lupan-3-ol-acetate, friedelan-3-ona.

Main compounds were quantified by gas chromatography-FID, the compound with the highest concentration was gamma-ergosterol and there was not ergosterol, which differentiates this fungus from other basidiomycetal mushrooms. Also this technique was employed to identify the fatty acids: oleic acid, linoleic and palmitic acids.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	
156	
1. OBJETIVOS	199
2. MARCO REFERENCIAL	200
2.1 ANTECEDENTES	200
2.2. MARCO TEORICO	21
2.2.1 El reino fungi	21
2.2.2 Género <i>Cantharellus</i>	233
2.2.3 Metabolitos secundarios	23
2.2.4 Esteroles	24
2.2.5 Triterpenos	27
2.2.6 Ácidos grasos	28
2.2.7 Técnicas para aislamiento, purificación y análisis	31
2.2.8 Análisis bromatológico	33
3. METODOLOGÍA	366
3.1 DETERMINACIÓN DEL SITIO DE RECOLECCIÓN	36
3.2 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL FÚNGICO	36
3.3 PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA RECOLECTADA	377

3.4	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO	38
3.5	OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE	388
3.6	OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS A PARTIR DE LA FRACCIÓN SAPONIFICADA	399
3.7	OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR EL MÉTODO SOXHLET	40
3.8	ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CG-FID	40
3.9	FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ESTERÓLICO	41
3.10	ANÁLISIS DE PRELIMINAR DE ESTEROLES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CG-FID	420
3.11	RECRISTALIZACIÓN	42
3.12	ESTUDIO ESTRUCTURAL DE ESTEROLES Y TRITERPENOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS CG-EM	42
3.13	CUANTIFICACIÓN DE ESTEROLES Y TRITERPENOS MAYORITARIOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CG	43
3.14	ANÁLISIS BROMATOLÓGICO	44
3.14.1	Humedad	44
3.14.2	Materia seca parcial	44
3.14.3	Ceniza	44
3.14.4	Extracto etéreo	44
3.14.5	Fibra cruda	44
3.14.6	Carbohidratos totales	45
3.14.7	Vitamina A	45

3.14.8 Vitamina C	45
3.14.9 Energía bruta	45
3.14.10 Nitrógeno total (método micro Kjeldahl)	45
3.14.11 Fósforo	45
3.14.12 Calcio	46
3.14.13 Magnesio	46
3.14.14 Potasio	46
3.14.15 Azufre	46
3.14.16 Hierro, cobre, manganeso y cinc	46
3.14.17 Acidez	46
3.14.18 pH	46
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1. CLASIFICACIÓN DEL MATERIAL FUNGICO	488
4.2. ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CG-FID	49
4.3. IDENTIFICACIÓN DE ESTEROLES MAYORITARIOS	51
4.4. CUANTIFICACIÓN DE ESTEROLES MAYORITARIOS	57
4.5. IDENTIFICACIÓN DE TRITERPENOS	61
4.6. CUANTIFICACIÓN DE TRITERPENOS MAYORITARIOS	64
4.7. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DEL CUERPO FRUCTÍFERO	64
CONCLUSIONES	690
RECOMENDACIONES	70

BIBLIOGRAFÍA

¡Error! Marcador no definido.

ANEXOS

¡Error! Marcador no definido.

LISTA DE ABREVIAS Y ACRÓNIMOS

AG. Ácidos Grasos
AGI. Ácidos Grasos Insaturados
AGS. Ácidos Grasos Saturados
AOAC. The Scientific Association dedicated to Analytical Excellence® (Asociación científica dedicada a la excelencia analítica)
BS. Base seca
CC. Cromatografía en columna
CCD. Cromatografía en capa delgada
CG. Cromatografía de gases
CG-FID. Cromatografía de gases con detector de llama
CG-EM. Cromatografía de gases – espectrometría de masas
CGL. Cromatografía gas-líquido
DI. Diámetro interno
EI. Estandar interno
EM. Espectrometría de masas
FAMES. Fatty Acid Methyl Esters
FDA. Food And Drug Administration
FID. Detector de ionización de llama
FIPs. Fungal immunomodulatory proteins (proteínas inmunomoduladoras fúngicas)
HDL. High density lipoprotein (Lipoproteína de alta densidad)
HSV. Herpes simplex viruses (virus del herpes simple)
LDL. Low density lipoprotein (lipoproteína de baja densidad)
Min. Minutos
msnm. Metros sobre el nivel del mar
RSD. Relative standard deviation (Desviación estándar relativa)
SD. Standard deviation (Desviación estándar)

UV. Ultravioleta
VIH. Virus de la inmunodeficiencia humana
WHO. World health organization (Organización mundial de la salud)

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Ácidos grasos más comunes	30
Tabla 2. Condiciones de análisis para ácidos grasos por CG-FID	41
Tabla 3. Condiciones para análisis preliminar de esteroides por CG-FID	42
Tabla 4. Condiciones de análisis para la identificación de esteroides y triterpenos por CG-EM	43
Tabla 5. Condiciones de análisis para cuantificación de esteroides y triterpenos mayoritarios por CG-FID	44
Tabla 6. Identificación de ácidos grasos como derivados metilados en el extracto clorofórmico	50
Tabla 7. Identificación ácidos grasos como derivados metilados en el extracto etéreo	50
Tabla 8. Esteroides mayoritarios fracción R1	51
Tabla 9. Área del estándar interno de colesterol	58
Tabla 10. Repetibilidad de las áreas cromatográficas de esteroides obtenidas por CG-FID	58
Tabla 11. Cuantificación de los esteroides mayoritarios presentes en el hongo <i>C. lateritius</i>	59
Tabla 12. Cuantificación de los triterpenos mayoritarios presentes en el hongo <i>C. lateritius</i>	64
Tabla 13. Repetibilidad de las áreas cromatográficas de triterpenos obtenidas por CG-FID	64

Tabla 14. Composición química de <i>C. lateritius var. colombianus</i>	65
Tabla 15. Composición química de hongos silvestres comestibles	66
Tabla 16. Comparación de la composición química de <i>C. lateritius</i> con otros alimentos	67

LISTA D FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Interacción del hombre con los hongos (Alexopoulos y colaboradores, 1996)	21
Figura 2. Estructura de Drosophilin A	24
Figura 3. Estructura de 1,2-Dihidroximintlactona	24
Figura 4. Estructura de Strobilurin A	24
Figura 5. Núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno	25
Figura 6. Estructura básica para esteroides: colestano	25
Figura 7. Estructura de los esteroides citotóxicos de la especie <i>Agaricus blazei</i>	26
Figura 8. Estructura del escualeno	28
Figura 9. Estructura de los esteroides del macromiceto <i>Ganoderma conccina</i>	28
Figura 10. Estructura de los isómeros de moléculas insaturadas	30
Figura 11. Bosque de robles Alto de Daza	36
Figura 12. Diferentes estados de crecimiento de <i>C. lateritius</i>	37
Figura 13. Hongos después de la molienda	38
Figura 14. Concentración del extracto etanólico a presión reducida	38
Figura 15. Extracción líquido-líquido con agua: acetato de etilo	39
Figura 16. Resina obtenida por saponificación	39
Figura 17. Extracción agua:cloroformo de la fracción de ácidos grasos	40
Figura 18. Montaje Soxhlet	40

Figura 19. Cromatografía en columna para la obtención de la fracción esterólica	42
Figura 20. Hongo silvestre <i>Cantharellus lateritius var.colombianus</i> R.H. Petersen	48
Figura 21. Cromatograma del extracto clorofórmico derivatizado	49
Figura 22. Cromatograma del extracto etéreo derivatizado	49
Figura 23. Espectro de masas de NN1 (pregnano acetilado)	52
Figura 24. Espectro de masas de Desmosterol	53
Figura 25. Espectro de masas de Estigmasterol	53
Figura 26. Espectro de masas de 5,6-Dihidroergosterol	54
Figura 27. Espectro de masas de 7,22-Ergostadienol	55
Figura 28. Espectro de masas de Gama-ergostenol	55
Figura 29. Espectro de masas de Gama-sitosterol	56
Figura 30. Espectro de masas de Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona	57
Figura 31. Cromatograma de la fracción R1	58
Figura 32. Espectro de masas del Lanosterol	61
Figura 33. Espectro de masas de Lup-20(29)-en-3-ona	62
Figura 34. Espectro de masas de Lupan-3-ol acetato	62
Figura 35. Espectro de masas de Friedelan-3-ona	63

LISTA I NEXOS

- Anexo A. Cromatograma de los metil esteres de ácidos grasos (FAMES)
- Anexo B. Tiempos de retención de los Estándares de Metil Ésteres de Ácidos Grasos (FAMES)
- Anexo C. Fracciones obtenidas por cromatografía en columna con una mezcla eluyente benceno:acetato de etilo
- Anexo D. Cromatograma de la fracción F1
- Anexo E. Cromatograma de la fracción F2
- Anexo F. Cromatograma de la fracción F3
- Anexo G. Cromatograma de la fracción F4
- Anexo H. Cromatograma de la fracción F5
- Anexo I. Cromatograma de la fracción F6
- Anexo J. Cromatograma de la fracción F7
- Anexo K. Cromatograma de la fracción F8
- Anexo L. Cromatograma de la fracción F9
- Anexo M. Cromatograma de la fracción F10
- Anexo N. Fragmentaciones de masas NN1 Pregnano acetilado
- Anexo O. Fragmentaciones de masas Desmosterol
- Anexo P. Fragmentaciones de masas Estigmasterol
- Anexo Q. Fragmentaciones de masas 5,6-Dihidroergosterol
- Anexo R. Fragmentaciones de masas 7,22-Ergostadienol
- Anexo S. Fragmentaciones de masas Gamaergosterol
- Anexo T. Fragmentaciones de masas Gamasitosterol
- Anexo U. Fragmentaciones de masas Ergosta-4,6,8-(14),22-tetraen-3-ona
- Anexo V. Fragmentaciones de masas Lanosterol
- Anexo W. Fragmentaciones de masas Lup-20(29)-en-3-ona
- Anexo X. Fragmentaciones de masas Lupan-3-ol-acetato

INTRODUCCIÓN

La descripción de los hongos es muy extensa y los biólogos los definen como organismos eucarióticos, aclorofílicos, que se nutren de diferentes sustratos u otros organismos y se reproducen sexual - asexualmente por estructuras somáticas ramificadas conocidas como hifas, las cuales están rodeadas por una pared celular ¹.

Desde los primeros tiempos las setas han sido tratadas como una clase especial de alimentos. Los griegos creían que los hongos proporcionaban la fuerza para los guerreros en la batalla. Los faraones apreciaban las setas como un manjar, y los romanos las consideraban un "alimento de los dioses" y se servían solo en ocasiones festivas. Los chinos atesoraban los hongos como un alimento saludable, el "elixir de la vida". Los indígenas mexicanos utilizaban las setas alucinógenas en las ceremonias religiosas y en la brujería, así como para fines terapéuticos. No cabe duda de que los primeros humanos probaron los hongos y por ensayo y error llegaron a familiarizarse con ellos, aprendiendo de esta manera a diferenciar los hongos comestibles de los venenosos.²

Algunos hongos tienen un gran valor nutricional porque contienen proteínas, vitaminas, minerales, fibra y bajo contenido de grasa^{3, 4, 5}. De acuerdo con estudios

¹ BRUNS y colaboradores. 1991. FUNGAL MOLECULAR SYSTEMATICS.

² CHANG y MILES. 2004. MUSHROOM NUTRICEUTICALS.

³ BOBEK y colaboradores. 1991. CHOLESTEROL-LOWERING EFFECT OF THE MUSHROOM *Pleurotus ostreatus* IN HEREDITARY HYPERCHOLESTEROLEMIC RATS.

⁴ GUO y colaboradores. 2007. NON-VOLATILE COMPONENTS OF SEVERAL NOVEL SPECIES OF EDIBLE FUNGI IN CHINA.

⁵ TSAI y colaboradores. 2009. FLAVOUR COMPONENTS AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SEVERAL CULTIVATED MUSHROOMS.

previos sobre ácidos grasos en los cuerpos fructíferos de los hongos se ha podido concluir que en éstos predominan ácidos grasos insaturados (AGI), los cuales intervienen en varios aspectos de la salud humana, como son, el mantenimiento de membranas celulares y producción de prostaglandinas (regulan los procesos de inflamación y coagulación sanguínea)^{6, 7}. Asimismo las grasas son necesarias en la dieta humana para que las vitaminas liposolubles de los alimentos (A, D, E y K) puedan ser absorbidas y para regular el metabolismo del colesterol. Se sabe que los mamíferos pueden sintetizar ácidos grasos saturados (AGS) e insaturados a partir de otros precursores pero no pueden sintetizar ácido linoleico que es un ácido graso esencial⁸. Algunos hongos tienen valor medicinal como suplementos dietéticos, y hay otros que por tener valor nutricional y medicinal se definen como nutraceuticos. En los últimos años la gente se ha preocupado cada vez más por la salud y la nutrición, lo que ha permitido la comercialización de setas.⁹

Los hongos se han empleado a nivel industrial en la fermentación alcohólica¹⁰, en la producción de antibióticos; enoles (*Saccaromyces* spp.), ácido cítrico (*Aspergillus niger*), hormonas (*Gibberella fujikuroi*)¹¹, plaguicidas y fungicidas naturales¹² y en farmacología¹³; son los principales agentes que descomponen celulosa y lignina, componentes primarios de los bosques; y son también una fuente proteica en la dieta animal y humana¹⁴ destacándose las especies *Agaricus bisporus* (champiñón), *Lentinus edodes* (“shiitake”), *Pleurotus ostreatus* (“orellana”), *Auricularia auricula-judae* (“oreja de Judas”), *Volvariella volvacea* (seta china o de la paja de arroz) y *Flammulina velutipes* (seta de invierno pie de terciopelo)¹⁵. Por todas estas aplicaciones ha surgido un gran interés en su estudio, reconociéndose su importancia como recurso natural.

Entre los metabolitos secundarios más abundantes presentes en las especies fúngicas se encuentran los esteroides que son sintetizados a través de procesos metabólicos pues su esqueleto básico proviene del ácido mevalónico al igual que los esteroides y terpenoides¹⁶. La actividad biológica de varios esteroides ha sido comprobada mediante la observación de la inhibición del crecimiento de líneas

⁶ SIJTSMA y DE SWAAF. 2004. BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION AND APPLICATIONS OF THE OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACID DOCOSAHEXAENOIC ACID.

⁷ CANALEJO y colaboradores. 1996. A CATALOGUE OF FATTY ACIDS.

⁸ LUQUE. 1995. BIOQUÍMICA DESCRIPTIVA.

⁹ CHANG y MILES. 2004. MUSHROOM NUTRICEUTICALS.

¹⁰ KŁOSOWSKI y colaboradores. 2006. CHARACTERISTICS OF ALCOHOLIC FERMENTATION WITH THE APPLICATION OF *Saccharomyces cerevisiae* YEASTS: AS-4 STRAIN AND I-7-43 FUSANT WITH AMYLOLYTIC PROPERTIES.

¹¹ FRAGA y colaboradores. 1998. THE BIOTRANSFORMATION OF MANOYL OXIDE DERIVATIVES BY *Gibberella fujikuroi*: THE FUNGAL EPIMERIZATION OF AN ALCOHOL GROUP.

¹² LORENZEN. 1998. BASIDIOMYCETES AS A SOURCE FOR NEW BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS.

¹³ GONZALES y colaboradores. 2002. NEW LANOSTANOIDS FROM THE FUNGUS *Ganoderma concinna*.

¹⁴ ALEXOPOULOS y colaboradores. 1996. INTRODUCTORY MYCOLOGY.

¹⁵ GARCÍA. 2002. EL CULTIVO DE LOS HONGOS SUPERIORES COMESTIBLES, UN RECURSO DE DESARROLLO INELUDIBLE EN EL SIGLO XXI.

¹⁶ DEWICK. 2002. MEDICINAL NATURAL PRODUCTS. A BIOSYNTHETIC APPROACH.

celulares tumorales *In vitro* y también son reconocidos por tener efectos benéficos sobre la salud humana ya que reducen los niveles de colesterol y son usados en la prevención de cáncer de colon¹⁷.

Colombia, por su ubicación geográfica tiene una gran biodiversidad en micoflora y las condiciones climáticas apropiadas para que los hongos puedan producir una variedad importante de compuestos químicos. Sin embargo, en nuestro país son relativamente pocos los estudios adelantados con relación a la constitución química de los hongos y estas investigaciones enfatizan principalmente en el contenido de ergosterol^{18,19}. Debido a esto, surge la necesidad de estudiar las especies de hongos macroscópicos que existen en nuestro país, específicamente en el departamento de Nariño, puesto que la identificación de estas especies promisorias puede contribuir en el desarrollo de otras investigaciones para determinar la actividad biológica de sus metabolitos y en el cultivo de especies comestibles como una alternativa de sostenibilidad económica para la región.

En el presente trabajo se realiza por primera vez un estudio químico de la fracción esterólica, de ácidos grasos y un análisis bromatológico de la especie *Cantharellus lateritius* var. *colombianus* R.H. Petersen, lo que fomentará nuevos estudios sobre la biodiversidad nariñense.

¹⁷ YUE y colaboradores. 2001. STEROLS FROM THE FUNGUS *Lactarium volemus*.

¹⁸ BENAVIDES. 2004. ESTUDIO QUÍMICO DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE DEL HONGO MACROMICETO *Lentinus edodes* (Shiitake).

¹⁹ RIVERA y colaboradores. 2005. DEHIDROERGOSTEROL: UN ARTEFACTO GENERADO DURANTE EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ESTEROLES EN EL HONGO *Pleurotus sajor-caju*.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio químico de la especie fúngica *Cantharellus lateritius* var. *colombianus* R.H. Petersen recolectado en la zona del Alto de Daza (Nariño).

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Identificar los esteroides mayoritarios de *C. lateritius*, por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.
- ❖ Cuantificar los esteroides mayoritarios de *C. lateritius* por Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Llama.
- ❖ Identificar los ácidos grasos de *C. lateritius* por Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Llama.
- ❖ Realizar el análisis bromatológico de *C. lateritius*.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 ANTECEDENTES

A nivel nacional se han hecho estudios químicos de metabolitos secundarios^{20, 21, 22} y de la fracción esterólica de macromicetos^{23, 24}, entre los que se encuentra la investigación sobre la especie *Lentinus edodes* (Shiitake), hongo superior que se cultivó en desechos del café y se adaptó a las condiciones ambientales de Chinchiná (Caldas) a partir de una cepa traída de Corea. En este hongo identificaron los esteroides: ergosterol, ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol, α -dihidroergosterol, fungisterol, neoergosterol, ergosta-7,22-dien-3,5-diol-6-ona, ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona y por primera vez se aisló el ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol²⁵. También se han realizado diversos estudios sobre la presencia de ácidos grasos en los cuerpos fructíferos de varios hongos macroscópicos, tanto a nivel nacional^{20, 21, 22} como internacional^{26,27,28,29}. Existen publicaciones sobre la composición nutricional de hongos silvestres que muestran que estos tienen un alto contenido proteico, de carbohidratos y tienen baja cantidad de grasa^{30,31}. Aunque en la Universidad de Nariño no se han realizado estudios sobre la micoflora de la región, la Universidad Nacional en conjunto con la Universidad Distrital Francisco José de Caldas publicaron un estudio sobre la morfoanatomía y ubicación geográfica de la especie *Pseudocyphellaria aurata* en la zona del Alto de Daza³².

²⁰ COY. 2000. ESTUDIO QUÍMICO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DEL HONGO MACROMICETO *Laetiporus sulphureus*.

²¹ CUCAITA y NIETO. 2007. ACIDOS GRASOS, ESTERES Y ESTEROLES DEL CUERPO FRUCTÍFERO DEL HONGO *Laccaria laccatta*.

²² CHEGWIN. 2008. TRITERPENOS y ÁCIDOS GRASOS AISLADOS IDENTIFICADOS EN EL HONGO COMESTIBLE *Pleurotus Sajor-Cajú*.

²³ OSORIO. 2004. ESTUDIO COMPARATIVO POR CG-EM DE LAS FRACCIONES ESTERÓLICAS DEL HONGO *Pleurotus sajor caju* CULTIVADO EN DESECHOS DEL CAFÉ.

²⁴ BENAVIDES. 2004. ESTUDIO QUÍMICO DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE DEL HONGO MACROMICETO *Lentinus edodes* (Shiitake).

²⁵ RIVERA y colaboradores. 2009. (22E)-ERGOSTA-6,22-DIENE-3,5,8-TRIOL: A NEW POLYHYDROXYSTEROL ISOLATED FROM *Lentinus edodes* (SHIITAKE).

²⁶ PETROVA y colaboradores. 2007. CG-EM STUDIES OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF TWO INEDIBLE MUSHROOMS OF THE GENUS *Agaricus*.

²⁷ YILMAZ y colaboradores. 2006. FATTY ACID COMPOSITION IN SOME WILD EDIBLE MUSHROOMS

²⁸ RIBEIRO y colaboradores. 2009. FATTY ACID COMPOSITION OF WILD EDIBLE MUSHROOMS SPECIES: A COMPARATIVE STUDY.

²⁹ Díez y ALVAREZ. 2001. COMPOSITIONAL AND NUTRITIONAL STUDIES ON TWO WILD EDIBLE MUSHROOMS FROM NORTHWEST SPAIN.

³⁰ COLAK y colaboradores. 2009. NUTRITIONAL COMPOSITION OF SOME WILD EDIBLE MUSHROOMS.

³¹ AGRAHAR-MURUGKAR y SUBBULAKSHMI. 2005. NUTRITIONAL VALUE OF EDIBLE WILD MUSHROOMS COLLECTED FROM THE KHASI HILLS OF MEGHALAYA.

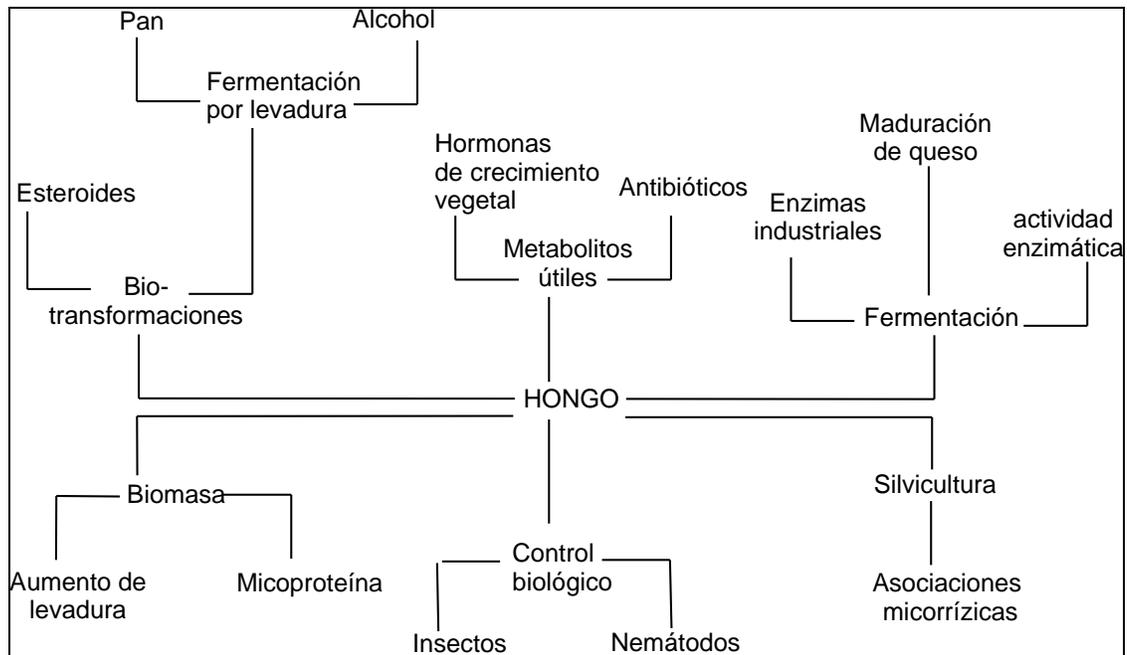
³² MONCADA y FORERO. 2006. EL GÉNERO *Pseudocyphellaria vain*. (*Lobariaceae* - ASCOMYCETES LIQUENIZADOS) EN COLOMBIA.

2.2. MARCO TEORICO

2.2.1 El reino fungi. La relación del hombre y los hongos comienza desde hace miles de años; por ejemplo, la ciudad de Micenas recibió este nombre en honor a un hongo encontrado por Perseus. En Egipto las levaduras fueron utilizadas para la fermentación. Los romanos creían que la aparición de los champiñones y las trufas era luz que arrojaba Júpiter a la tierra. Los hongos también influyeron en la religión y la mitología de Guatemala y México³³.

En la industria, los hongos se emplean para producir alcohol y una variedad de compuestos químicos (Fig. 1) incluyendo ergosterol, cortisona, varias enzimas tales como la α -amilasa, celulasa, catalasa, renina, lactasa y lipasa; ácidos orgánicos como fumárico, láctico, cítrico, succínico y oxálico; reguladores del crecimiento de plantas conocidas como giberelinas; y vitaminas del complejo B obtenidas de la levadura³⁴.

Figura 1. Interacción del hombre con los hongos (Alexopoulos y colaboradores, 1996)



³³ FRAZER. 1898. PAUSANIAS'S DESCRIPTION OF GREECE (TRANSL.).

³⁴ ALEXOPOULOS y colaboradores. 1996. INTRODUCTORY MYCOLOGY.

2.2.1.1 Generalidades. Los hongos se han definido con base en las siguientes características³⁵:

1. Organización unicelular, pluricelular o dimórfica; nunca formando tejidos verdaderos.
2. Talo formado por hifas que en conjunto forman el micelio. Algunas veces forman pseudotejido.
3. Almacenan principalmente glucógeno.
4. Paredes celulares compuestas de quitina y polisacáridos como hemicelulosas, quitosana, beta-glucana, manana, glicógeno.
5. Fundamentalmente aerobios, aunque existen anaerobios facultativos.
6. Nutrición heterótrofa, de tipo ingestivo, en el cual las enzimas son liberadas sobre el sustrato y luego el hongo ingiere las sustancias ya degradadas.

2.2.1.2 Clasificación. Los hongos estaban clasificados dentro del reino vegetal pero debido a que no llevan a cabo el proceso de la fotosíntesis, se clasifican en un reino propio denominado reino Fungi. Este reino incluye los phyla denominados Chytridiomycota, Zigomicota, Ascomycota y Basidiomycota³⁶.

2.2.1.3 Reproducción. De acuerdo al tipo de órgano para la producción de esporas los macromicetos pueden ser ascomicetos o basidiomicetos. En el primer grupo las esporas se forman dentro de un asca y en el segundo se forman por fuera de una estructura llamada basidio³⁵.

2.2.1.4 Distribución y hábitat. Según el tipo de sustrato en el cual crecen, los hongos pueden ser saprófitos cuando crecen sobre materia orgánica en descomposición, parásitos cuando crecen sobre organismos vivos: plantas (hojas, tallos, raíces, flores o frutos), animales, insectos u otros hongos y micorrízicos cuando forman simbiosis con raíces de fanerógamas (micorrizas)³⁵.

2.2.1.5 Morfología. Los hongos están constituidos por hifas o filamentos delgados que pueden ser cenocíticos o septados. El conjunto de hifas forma el micelio y éste puede producir cuerpos fructíferos bajo condiciones adecuadas de humedad³⁵.

2.2.1.6 Atributos nutricionales. Los hongos han sido consumidos por su palatabilidad y/o su valor nutricional. La palatabilidad puede ser determinada por color, textura, aroma y sabor y el valor nutricional consiste en un análisis aproximado de la composición de proteína, aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos, vitaminas y minerales presentes. Cabe señalar que la composición de una

³⁵ URIBE. 1998. ASPECTOS GENERALES SOBRE BIOLOGÍA DE LOS HONGOS. PRODUCCIÓN DE VITAMINA D₂ A PARTIR DE HONGOS MACROMICETOS: ASPECTOS CIENTÍFICOS, TÉCNICOS Y ECONÓMICOS.

³⁶ ALEXOPOULOS y colaboradores. 1996. INTRODUCTORY MYCOLOGY.

especie dada esta afectada por su variabilidad genética (lo que conduce a diferentes cepas) y por condiciones ambientales, incluyendo la naturaleza del sustrato³⁷.

2.2.1.7 Valor medicinal. Más de la mitad de la población mundial utiliza medicamentos y suplementos dietéticos a base de plantas y hongos para el cuidado de su salud. Estos productos han sido llamados de diversas formas: vitaminas, suplementos dietéticos, fitoquímicos y nutraceuticos^{37, 38}.

De las 14.000 a 15.000 especies de hongos en el mundo³⁹ alrededor de 700 tienen propiedades medicinales conocidas. Recientemente se han aislado de las setas muchas sustancias bioactivas con efectos inmunomoduladores, entre los que se incluyen polisacáridos, proteínas de bajo peso molecular unidas a polisacáridos, glicoproteínas (lectinas) y triterpenoides^{40,41}. Muchas, si no todas las setas, contienen polisacáridos biológicamente activos, que presentan propiedades inmunoestimulantes y antitumorales.

2.2.2 Género *Cantharellus*. Este género se caracteriza por producir cuerpos fructíferos comestibles, ectomicorrízicos y saprofitos, presentes geográficamente en diversos lugares del mundo. El género se ha estudiado en Europa y Norteamérica, donde hay mayor abundancia de especies y donde los cuerpos fructíferos son más conocidos a nivel popular y con un fuerte mercado. En el continente americano, a medida que se avanza hacia el sur, la abundancia de especies del género *Cantharellus* disminuye. Dentro de este género, la especie *C.lateritius* es una de las especies que más se comercializa en los mercados del altiplano guatemalteco⁴².

2.2.3 Metabolitos secundarios. Se han empleado a nivel industrial en la producción de antibióticos: penicilina (*Penicillium* spp.), ácido fusídico (*Fusidium coccineum*) y Drosophilin A (Fig. 2) que es producto de la fermentación del hongo del género *Psathyrella*⁴³; de agentes reductores de colesterol: lovastatina (*Monascus ruber*, género *Pleurotus* y *L. edodes*)⁴⁴ y mevastatina (*Penicillium citrinum*)⁴⁵; de

³⁷ CHANG y MILES. 2004. MUSHROOM NUTRICEUTICALS.

³⁸ BROWER. 1988. NUTRACEUTICALS: POISED FOR A HEALTHY SLICE OF THE HEALTHCARE MARKET.

³⁹ HAWKSWORTH. 2001. MUSHROOMS: THE EXTENT OF THE UNEXPLORED POTENTIAL.

⁴⁰ IKEKAWA. 2001. BENEFICIAL EFFECTS OF EDIBLE AND MEDICINAL MUSHROOMS ON HEALTH CARE.

⁴¹ ZHOU y GAO. 2002. THE IMMUNOMODULATING EFFECTS OF *Ganoderma lucidum*.

⁴² FLORES y colaboradores 2006. *Cantharellus* y *Craterellus* EN GUATEMALA: DIVERSIDAD Y ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE SIETE ESPECIES REPRESENTATIVAS EN EL PAÍS.

⁴³ TEUNISSEN y colaboradores. 1997. THE DE NOVO PRODUCTION OF DROSOPHILIN A (TETRACHLORO-4-METHOXYPHENOL) AND DROSOPHILIN A METHYL ETHER (TETRACHLORO-1,4-DIMETHOXYBENZENE) BY LIGNINOLYTIC BASIDIOMICETES.

⁴⁴ BOBEK y colaboradores. 1991. CHOLESTEROL-LOWERING EFFECT OF THE MUSHROOM *Pleurotus ostreatus* IN HEREDITARY HYPERCHOLESTEROLEMIC RATS.

⁴⁵ KAVANAGH. 2005. FUNGI: BIOLOGY AND APPLICATIONS.

hormonas como la giberelina (*Gibberella fujikuroi*)⁴⁶; de drogas inmunosupresoras: cyclosporin A (*Tolypocladium inflatum*)⁴⁷; de plaguicidas y fungicidas naturales como la 1,2-Dihidroximintlactona aislada del hongo superior *Cheimonophyllum candidissimum* (contra gusanos y malezas) (Fig. 3) o de fungicidas comerciales que se derivan del Strobilurin A (Fig. 4) obtenido a partir del macrohongo *Strobilurus tenacellus*⁴⁸; en farmacología mediante extractos del macromiceto *Ganoderma conccina* con reconocida actividad contra células HL-60 de leucemia humana⁴⁹.

Figura 2. Estructura de Drosophilin A

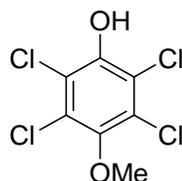


Figura 3. Estructura de 1,2-Dihidroximintlactona

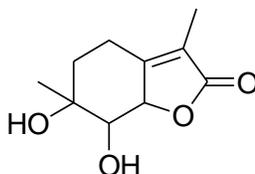
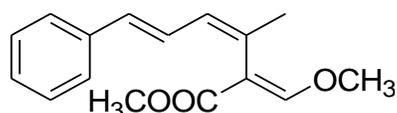


Figura 4. Estructura de Strobilurin A



2.2.4 Esteroides. Estos metabolitos secundarios son 3- β -hidroxiesteroides cristalinos que contienen una cadena lateral alifática. Distintas cadenas laterales dan lugar a una variada serie de esteroides, tales como ergosterol, sitosterol y estigmasterol entre otros⁵⁰.

⁴⁶ FRAGA y colaboradores. 1998. THE BIOTRANSFORMATION OF MANOYL OXIDE DERIVATIVES BY *Gibberella fujikuroi*: THE FUNGAL EPIMERIZATION OF AN ALCOHOL GROUP.

⁴⁷ RAMANA y colaboradores. 1999. CYCLOSPORIN-A PRODUCTION BY *Tolypocladium inflatum* USING STATE SOLID FERMENTATION.

⁴⁸ LORENZEN. 1998. BASIDIOMYCETES AS A SOURCE FOR NEW BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS

⁴⁹ GONZALES y colaboradores. 2002. NEW LANOSTANOIDES FROM THE FUNGUS *Ganoderma conccina*.

⁵⁰ GROS y colaboradores. 1985. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS NATURALES.

2.2.4.1 Distribución y estado natural. Los esteroides hacen parte de la familia de los triterpenos. Están muy difundidos y se encuentran tanto libres como esterificados con ácidos alifáticos o como glicósidos, ya sea de origen animal, vegetal o fúngico.

2.2.4.2 Estructura. En general, los compuestos esteroidales están formados por un núcleo de 4 anillos denominado ciclopentanoperhidrofenantreno (Fig. 5). El anillo A es un ciclohexano y está unido a otros dos anillos de 6 miembros (anillos B y C), el anillo D es un ciclopentano. Para los esteroides y sus derivados, la estructura básica es del tipo colestano (Fig. 6)⁵¹.

La mayoría de esteroides naturales poseen 4 clases de núcleos tetracíclicos: Δ^5 -3-Hidroxiandrosteno, Δ^0 -3-Hidroxiandrostano, Δ^7 -3-Hidroxiandrosteno, $\Delta^{5,7}$ -3-Hidroxiandrostadieno y $\Delta^{5,7,9(11)}$ -3-Hidroxiandrostatrieno y muchos de ellos tienen cadenas laterales hidrocarbonadas saturadas o monoinsaturadas en los carbonos 22, 24 o 25⁵².

Figura 5. Núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno

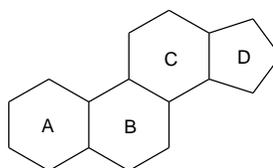
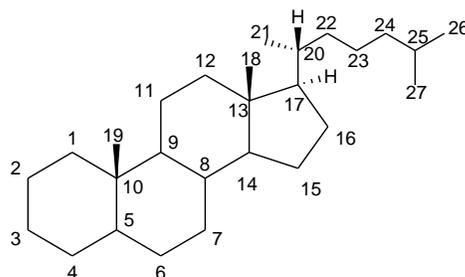


Figura 6. Estructura básica para esteroides: colestano



2.2.4.3 Propiedades físicas. La gran mayoría de esteroides conocidos son sólidos cristalinos incoloros, solubles en solventes orgánicos relativamente apolares (Cloroformo, Benceno, etc.) y menos solubles en alcoholes de bajo peso molecular. Presentan actividad óptica debido a los carbonos asimétricos que poseen. Los esteroides se pueden recrystalizar en metanol caliente o en la mezcla metanol-tetrahidrofurano 10:1, formando cristales en forma de agujas brillantes incoloras. Los que presentan dobles enlaces conjugados son de color amarillento y tienden a descomponerse por acción de la luz como por ejemplo los esteroides con insaturaciones en C-5 y C-7, los cuales son susceptibles a la reacción de

⁵¹ MAKIN y GOWER 2010. STEROID ANALYSIS

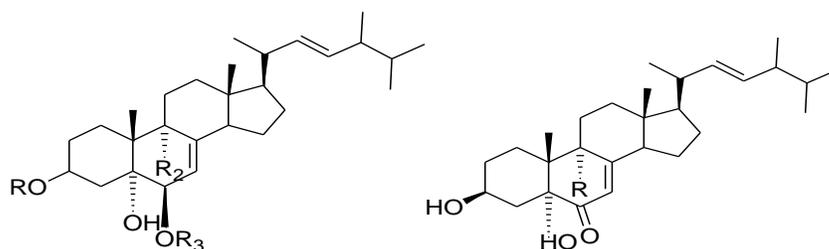
oxidación fotoquímica⁵². Los esteroides por tratamiento con ácidos fuertes en condiciones de deshidratación dan reacciones coloreadas que son útiles para su identificación preliminar⁵³.

2.2.4.4 Biogénesis. Los esteroides se derivan biogenéticamente del AcetilCoA (Ruta del Acetato) vía mevalonato y escualeno. En los esteroides vegetales el precursor inmediato es el cicloartenol, mientras que los animales es el lanosterol⁵⁴.

2.2.4.5 Bioactividad. En los macromicetos se han aislado muchos esteroides que presentan actividad biológica, entre éstos el ergosterol (esterol más abundante en los hongos superiores) que es precursor de hormonas de crecimiento vegetal⁵⁵. Sufre fototermoisomerización cuando es expuesto a luz UV (λ 280 – 320 nm) produciendo vitamina D₂ (esta reacción puede suceder al interior de los hongos en su estado silvestre o dentro de los organismos que los consumen, siempre y cuando estén expuestos a la luz UV)⁵⁶. Esta vitamina regula el metabolismo de calcio y fósforo e interviene en los procesos de control, regulación y absorción de sustancias importantes para los procesos de calcificación y otras funciones en el organismo del hombre y los animales⁵⁷.

De la especie *Agaricus blazei* se obtuvieron tres esteroides citotóxicos (Fig. 7), con actividad contra células cancerosas hepáticas⁵⁸.

Figura 7. Estructura de los esteroides citotóxicos de la especie *Agaricus blazei*



(1) R = H; R₂ = H; R₃ = CH₃

R = OH

(2) R = H; R₂ = OH; R₃ = H

El potencial que tienen los esteroides para disminuir el colesterol es un hecho que se conoce desde hace más de 50 años. La estructura de los esteroides puede modificarse para formar ésteres, los cuales se pueden incorporar fácilmente a los

⁵² HANSON. 1977. TERPENOIDS AND STEROIDS.

⁵³ GROS y colaboradores. 1985. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS NATURALES.

⁵⁴ CORDELL. 1995. CHANGING STRATEGIES IN NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY.

⁵⁵ YAOITA y colaboradores. 1998. STEROL CONSTITUENTS FROM EDIBLE MUSHROOM.

⁵⁶ CHANG y MILES. 2004. MUSHROOM NUTRICEUTICALS.

⁵⁷ WEST. 1990. BIOQUÍMICA MÉDICA.

⁵⁸ KAWAGISHI y colaboradores. 1988. CYTOTOXIC STEROIDS FROM THE MUSHROOM *Agaricus blazei*.

alimentos que contienen grasas sin perder la efectividad para disminuir los niveles de colesterol. Los ésteres formados a partir de esteroides son los productos más recientes que en dosis apropiadas han demostrado tener importantes efectos en la disminución del colesterol LDL (inhiben hasta en un 14% la absorción del colesterol)⁵⁹.

La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) afirma que los ésteres de esteroides pueden reducir el riesgo de padecer enfermedad en las arterias coronarias si se los consume en combinación con una dieta baja en grasas saturadas y colesterol⁶⁰.

2.2.5 Triterpenos. Forman parte de los frutos, raíces, látex, semillas y hojas de las plantas⁶¹.

2.2.5.1 Distribución y estado natural. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza tanto en plantas y animales superiores, como en hongos y bacterias. Estos productos se encuentran ya sea en su estado libre o acompañados de azúcares (glicósidos). Su estructura está compuesta de 30 átomos de carbono (seis unidades isoprénicas), generalmente tetracíclicos o pentacíclicos y pueden contener grupos hidroxilo, cetona, aldehído o ácido carboxílico. Se han descrito provenientes de fuentes naturales más de 40 triterpenos cíclicos con fórmula $C_{30}H_{50}$, alrededor de 150 con fórmula $C_{30}H_{50}O$ y numerosos compuestos relacionados.

2.2.5.2 Clasificación. Se dividen en acíclicos, tetracíclicos y pentacíclicos. Dependiendo del número de anillos que lo conforman se denominan ursanos, oleananos o lupanos⁶².

2.2.5.3 Biogénesis. La mayoría de los triterpenos son resultado de la ciclación enzimática de escualeno ($C_{30}H_{50}$) o del óxido de escualeno ($C_{30}H_{50}O$) que transcurre con una precisa regioselectividad y estereoespecificidad para construir nuevos ciclos y originan centros quirales. El escualeno (Fig 8) es procesado biosintéticamente para generar lanosterol el cual es precursor estructural de todos los esteroides⁶³.

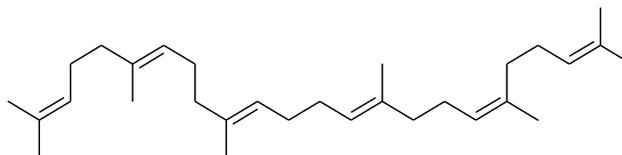
⁵⁹ CATER y colaboradores. 1998. LOWERING SERUM CHOLESTEROL WITH PLANT STEROLS AND STANOLS: HISTORICAL PERSPECTIVES.

⁶⁰ FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA 2000. AUTHORIZES NEW CORONARY HEART DISEASE HEALTH CLAIM FOR PLANT STEROL AND PLANT STANOL ESTERS.

⁶¹ GROS y colaboradores. 1985. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS NATURALES.

⁶² BRUNETON. 2001. FARMACOGNOSIA – FITOQUÍMICA - PLANTAS MEDICINALES.

Figura 8. Estructura del escualeno

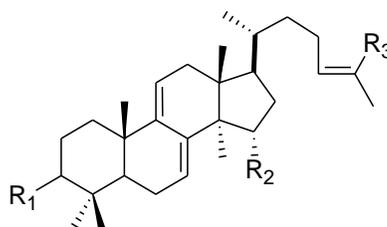


2.2.3.4 Bioactividad. A pesar de los limitados usos medicinales que tienen los triterpenos, se está haciendo investigación en esta línea y los resultados indican el gran potencial que tienen como drogas y posibles agroquímicos. Entre las propiedades terapéuticas de los triterpenos se puede mencionar la reconocida actividad antiinflamatoria (calenduladiol), citotóxica (lupeol y α -amirina), antileucémica y antiviral. Además son usados como repelentes de insectos y en el tratamiento de disentería y malaria⁶³.

Del hongo *Ganoderma lucidum* se aislaron triterpenos que mostraron citotoxicidad *in vitro* sobre las células hepatomáticas, inhibición de histamina, inhibición de la síntesis y absorción de colesterol y estimulación de la agregación plaquetaria⁶⁴. De la especie *Ganoderma pfeifferi* se estudiaron algunos triterpenos lanostanoides antivirales, con actividad contra virus de influenza tipo A y herpes HSV⁶⁵.

Del hongo *Ganoderma conccina* se aislaron tres nuevos lanostanoides (Fig 9) que dieron positivas las pruebas de actividad biológica contra células HL-60 de leucemia humana⁶⁶.

Figura 9. Estructura de los esteroides del macromiceto *Ganoderma conccina*



- (1) $R_1 = \beta\text{-OH}$, H ; $R_2 = H$; $R_3 = \text{CHO}$
- (2) $R_1 = O$; $R_2 = \alpha\text{-OH}$; $R_3 = \text{CH}_2\text{OH}$
- (3) $R_1 = O$; $R_2 = H$; $R_3 = \text{CHO}$

2.2.6 Ácidos grasos. Son biomoléculas orgánicas de naturaleza lipídica formadas por una cadena hidrocarbonada lineal, de número par de átomos de carbono, en

⁶³ ROMO. 2006. QUÍMICA DE LA FLORA MEXICANA.

⁶⁴ JONG y BIRMINGHAM. 1992. MEDICAL BENEFITS OF DE MUSHROOM *Ganoderma*.

⁶⁵ MOTHANA y colaboradores. 2003. ANTIVIRAL LANOSTANOID TRITERPENES FROM DE FUNGUS *Ganoderma pfeifferi*.

⁶⁶ GONZALES y colaboradores. 2002. NEW LANOSTANOIDS FROM THE FUNGUS *Ganoderma conccina*.

cuyo extremo hay un grupo carboxilo. Cada átomo de carbono se une al siguiente y al precedente por medio de un enlace covalente sencillo o doble. Las fuentes más abundantes de los ácidos grasos esenciales (que tienen varias funciones fisiológicas fundamentales), son algunos aceites vegetales, las nueces y las semillas. Además de formar parte de la estructura de la membrana, los ácidos linoleico y linolénico son precursores de varios metabolitos importantes.

2.2.6.1 Distribución y estado natural. Se localizan en los alimentos, generalmente en forma de ésteres unidos al glicerol (triglicéridos) o de forma libre después de la hidrólisis del enlace éster.

En los macromicetos se presentan principalmente ácidos grasos esenciales (48Yilmaz) los cuales pueden estar en la grasa cruda en estado libre o como tri-, di- y monoglicéridos⁶⁷. Se sabe que el contenido de ácidos grasos puede variar dependiendo de la estructura estudiada (píleo, estípite) o fase de crecimiento del macromiceto analizado⁶⁸.

2.2.6.2 Propiedades físicas. La longitud de la cadena y su grado de insaturación tienen una influencia marcada sobre los puntos de fusión de los ácidos grasos. A mayor longitud de la cadena de los ácidos grasos saturados (AGS), mayor punto de fusión y a mayor insaturación menor punto de fusión. A temperatura ambiente, los AGS de más de 12 carbonos son sólidos mientras que los ácidos grasos insaturados (AGI) son líquidos viscosos⁶⁹. Debido a su carácter anfipático, los ácidos grasos de cadena corta son más solubles en agua que los ácidos grasos de cadena larga.

Los nombres comunes de los ácidos grasos (AG) se derivan, por lo general, de la fuente donde se los encontró por primera vez. Así, láurico deriva del latín *laurus*, planta de laurel; mirístico del latín *myristica*, género de la nuez moscada; palmítico del latín *palma*, árbol de palma; esteárico del griego *estear*, grasa dura; araquídico del latín *arachis*, un género de leguminosa; lignocérico del latín *lignum*, madera; oleico del latín *oleum*, aceite; linoleico del griego *linon*, lino⁷⁰.

2.2.6.3 Clasificación. Algunos ácidos grasos son saturados (enlaces sencillos) y otros insaturados (contienen uno o más dobles enlaces). Los ácidos grasos insaturados se pueden presentar en dos formas isómeras: cis y trans (Fig. 10). En la configuración cis, que es la predominante en los ácidos grasos naturales, los grupos semejantes o idénticos se encuentran del mismo lado del doble enlace.

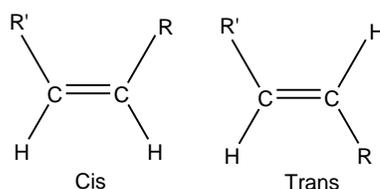
⁶⁷ AGRAHAR-MURUGKAR y SUBBULAKSHMI. 2005. NUTRITIONAL VALUE OF EDIBLE WILD MUSHROOMS COLLECTED FROM THE KHASI HILLS OF MEGHALAYA.

⁶⁸ CHEGWIN. 2008. TRITERPENOS y ÁCIDOS GRASOS AISLADOS IDENTIFICADOS EN EL HONGO COMESTIBLE *Pleurotus Sajor-Cajú*”.

⁶⁹ NELSON y COX. 2000. LEHNINGER PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY.

Cuando estos grupos se encuentran en lados opuestos de un doble enlace, se dice que la molécula es un isómero trans⁷⁰.

Figura 10. Estructura de los isómeros de moléculas insaturadas



Una forma simplificada para denominar los ácidos grasos es especificando la longitud de la cadena y el número de dobles enlaces, separados por dos puntos. Así, el ácido palmítico saturado de 16 carbonos, se designa 16:0 y el ácido oleico, de 18 carbonos y con un doble enlace se designa 18:1. La posición de los dobles enlaces se designa con la letra griega Δ (delta) y la posición del carbono donde ocurre el doble enlace se designa con superíndice; en el caso del ácido oleico, la designación completa sería 18:1 ^{Δ 9} (Tabla 1)⁷¹.

Tabla 1. Ácidos grasos más comunes⁷²

Nombre común	Estructura	Abreviatura	Punto de fusión °C
Láurico	$H_3C(CH_2)_{10}COOH$	12:0	44
Mirístico	$H_3C(CH_2)_{12}COOH$	14:0	54
Palmítico	$H_3C(CH_2)_{14}COOH$	16:0	63
Esteárico	$H_3C(CH_2)_{16}COOH$	18:0	70
Araquídico	$H_3C(CH_2)_{18}COOH$	20:0	76.5
Lignocérico	$H_3C(CH_2)_{22}COOH$	24:0	86
Palmitoleico	$H_3C(CH_2)_5CH=C(CH_2)_7COOH$	16:1 ^{Δ9}	-0.5
Oleico	$H_3C(CH_2)_7CH=C(CH_2)_7COOH$	18:1 ^{Δ9}	13.5
Linoleico	$H_3C(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$	18:2 ^{Δ9,12}	-5
Linolénico	$H_3CCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$	18:3 ^{Δ9,12,15}	-11
Araquidónico	$H_3C(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_3COOH$	20:4 ^{Δ5,8,11,14}	-49.5

2.2.6.4 Biogénesis. El primer paso en la biosíntesis de ácidos grasos es la síntesis de ácido palmítico, ácido graso saturado de 16 carbonos; los demás ácidos grasos se obtienen por modificaciones del ácido palmítico añadiendo unidades de dos carbonos provenientes del acetyl-CoA.

Mientras que los vegetales y las bacterias pueden sintetizar todos los ácidos grasos que requieren, los mamíferos solo sintetizan los ácidos grasos saturados y algunos de los insaturados. Los ácidos grasos esenciales (linoleico y linolénico) que no se pueden sintetizar se deben obtener del alimento⁷².

⁷⁰ BOHINSKI. 1991. BIOQUÍMICA.

⁷¹ NELSON y COX. 2000. LEHNINGER PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY.

2.2.6.5 Bioactividad. Los AG cumplen amplias funciones como mediadores en los procesos de la inflamación y de la respuesta inmune tanto en vertebrados como en invertebrados⁷². También se ha propuesto utilizar los ácidos grasos contenidos en las esporas como marcadores quimiotaxonómicos para la diferenciación de especies, además algunos monoésteres del glicerol presentan una actividad antimicrobiana contra bacterias y ciertas levaduras⁷³.

La carencia de ácidos grasos esenciales en la dieta humana causa dermatitis (piel escamosa), mala cicatrización de las heridas, disminución de la resistencia a las infecciones, alopecia (pérdida del pelo) y trombocitopenia (reducción del número de plaquetas)⁷⁴.

2.2.7 Técnicas para aislamiento, purificación y análisis

2.2.7.1 Cromatografía. Esta técnica agrupa diversos métodos que permiten separar componentes que de otra forma no se podrían separar. En todas las separaciones cromatográficas la muestra se desplaza a través de una fase estacionaria, gracias al arrastre de una fase móvil. Ambas fases deben ser inmiscibles, mientras que la fase móvil puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico, la fase estacionaria es un sólido que se fija a una columna o a una superficie plana. Las fases estacionaria y móvil deben elegirse teniendo en cuenta que la muestra debe desplazarse de manera diferente en cada una de ellas⁷⁵.

❖ Cromatografía de elución en columna (CC). La elución es el proceso por el cual se adiciona fase móvil nueva a través de la fase estacionaria. La renovación continua del eluyente hace que la fase móvil que contiene parte de la muestra avance por la columna y los componentes al entrar en contacto con ella se separen. Se presentan una serie de intercambios con la fase estacionaria en la cual quedan restos de muestra que la fase móvil continúa arrastrando. La muestra (solute) solo se mueve en la fase móvil y de su tiempo de retención en ésta depende la velocidad media⁷⁶.

❖ Cromatografía en Capa Delgada (CCD). La cromatografía en capa delgada es un procedimiento rápido y sencillo para separar mezclas de sustancias, para identificar/caracterizar o para determinar semicuantitativamente componentes individuales. La separación se basa en que las sustancias contenidas en la muestra a analizar o analito se reparten de modo diferencial entre una fase estacionaria y otra móvil. En la CCD la fase móvil se desplaza por una fina capa

⁷² MARCUS y GORMAN. 1984. 12S,20-DIHYDROXYICOSATETRAENOIC ACID: A NEW ICOSANOID SYNTHESIZED BY NEUTROPHILS FROM 12S-HYDROXYICOSATETRAENOIC ACID PRODUCED BY THROMBIN- OR COLLAGEN-STIMULATED PLATELETS.

⁷³ BRONDZ y colaboradores. 2004. MULTIVARIATE ANALYSIS OF FATTY ACIDS IN SPORES OF HIGHER BASIDIOMYCETES: A NEW METHOD FOR CHEMOTAXONOMICAL CLASSIFICATION OF FUNGI.

⁷⁴ CONNOR. 2000. IMPORTANCE OF N-3 FATTY ACIDS IN HEALTH AND DISEASE.

⁷⁵ SKOOG y colaboradores. 2001. "PRINCIPIOS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL".

de fase estacionaria, transportando así los componentes individuales de una mezcla dependiendo de la solubilidad y de su comportamiento frente a la adsorción. El recorrido particular de cada sustancia (R_f) se emplea así para su identificación. Las separaciones por CCD se realizan introduciendo el borde inferior de la placa cromatográfica en el solvente y por capilaridad se desplaza sobre la superficie de la placa⁷⁶.

- Relación de frente (R_f). La constante R_f es una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa como una fracción decimal, mide la retención de un componente y se define como:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida desde el origen por el compuesto}}{\text{distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente}}$$

La distancia recorrida por el compuesto se mide generalmente desde el origen al centro de la mancha, los cálculos se simplifican si el denominador es 10. Para que los R_f sean reproducibles deben ser fijadas una serie de condiciones (espesor de la placa, fase móvil, fase estacionaria, cantidad de la muestra). El máximo valor de R_f que se puede alcanzar es de 1, lo ideal es un R_f entre 0.65 y 0.7⁷⁷.

❖ Cromatografía de gases (CG). Se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria líquida que está fija a una superficie sólida inerte. En esta técnica de separación, la muestra debe ser volatilizada e inyectada en la parte superior de una columna cromatográfica. Para la elución se usa un gas inerte (fase móvil) que no interactúa con la muestra⁷⁸.

- Detector de ionización de llama (FID). Consiste en un quemador en el cual el efluente de la columna se mezcla con hidrógeno y con aire para encenderse eléctricamente. La mayoría de los compuestos orgánicos forman iones que pueden conducir la electricidad a través de la llama. El FID responde al número de átomos de carbono que entra en el detector por unidad de tiempo, por ello, es más un detector sensible a la masa, que un sistema sensible a la concentración.

❖ Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM). Actualmente existen instrumentos de cromatografía gaseosa que pueden acoplarse directamente a equipos de espectrometría de masas de barrido rápido. Esto gracias a que el caudal de las columnas capilares es suficientemente bajo como para que la salida pueda introducirse directamente a la cámara de ionización del espectrómetro. Este tipo de acoplamientos ha permitido la identificación de cientos de componentes naturales de los alimentos y contaminantes en el agua, así como la realización de análisis médicos basados en componentes del aliento y fármacos⁷⁸.

⁷⁶ HAMILTON y HAMILTON. 1987. THIN LAYER CHROMATOGRAPHY.

⁷⁷ SKOOG y colaboradores. 2001. "PRINCIPIOS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL".

2.2.8 Análisis bromatológico. La bromatología estudia los alimentos considerando sus características físicas, su composición química y atributos nutritivos. El análisis proximal de un alimento se realiza en términos de humedad, materia seca, ceniza, extracto etéreo, fibra cruda, proteína, extracto no nitrogenado, carbohidratos totales, vitaminas, energía, nitrógeno, minerales, acidez y pH.

2.2.8.1 Humedad. El contenido de agua en un alimento varía entre un 60 y un 95%. La determinación de humedad se basa en la pérdida de peso que sufre el alimento al calentarlo a 100°C. Este valor incluye además las sustancias volátiles.

2.2.8.2 Cenizas. En general se componen de carbonatos originados en la materia orgánica y no propiamente de la muestra. Su análisis se realiza por método directo (calcinación) y debe estar enfocado a la determinación de calcio, fósforo, potasio, manganeso y hierro.

2.2.8.3 Extracto etéreo grasa bruta. Hace referencia al conjunto de las sustancias extraídas con solventes orgánicos (éter etílico, hexano, etc). Este grupo incluye sustancias como glicéridos, fosfolípidos, esteroides, ácidos grasos, pigmentos carotenoides y clorofílicos y vitaminas liposolubles. La grasa es el principal material de reserva corporal, es un componente necesario de los tejidos vivos y es esencial en la nutrición humana porque aporta los ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles⁷⁸. Su determinación se hace mediante el método Soxhlet⁷⁹. Cuando el análisis es gravimétrico en la extracción se emplea un tiempo de 8 horas mientras que para la identificación y cuantificación por CG-FID se requiere un tiempo de extracción de 2 horas, con el fin de evitar la degradación estas sustancias.

2.2.8.4 Fibra Cruda. En esta fracción se encuentran comúnmente celulosa, pentosanas, lignina, suberina, cutina, alginatos y peptinas. Aunque la fibra no posee un valor nutritivo apreciable su función en el tracto intestinal es la de aumentar el volumen de las materias nutritivas y estimular el peristaltismo intestinal. El método empleado para la determinación consiste en efectuar dos digestiones. La primera con H₂SO₄ y la segunda con NaOH. La finalidad del método es la de eliminar las proteínas, carbohidratos solubles, residuos de grasas, vitaminas y otros compuestos diferentes que interfieren en su determinación⁸⁰.

2.2.8.5 Proteína. Este término se aplica a un gran número de compuestos nitrogenados. Estructuralmente son polímeros cuyas unidades básicas son aminoácidos que están unidos por enlaces peptídicos. Algunos alimentos son fuentes ricas de proteínas, que en el tracto gastrointestinal liberan aminoácidos, los cuales son resintetizados por el organismo animal para formar nuevas

⁷⁸ OSBORNE. 1986. ANÁLISIS DE LOS NUTRIENTES DE LOS ALIMENTOS.

⁷⁹ THE SCIENTIFIC ASSOCIATION DEDICATED TO ANALYTICAL EXCELLENCE (AOAC). 1990.

⁸⁰ BERNAL. 1998. ANALISIS DE ALIMENTOS Vol. 2.

proteínas requeridas para el crecimiento, mantenimiento y reparación de las células del cuerpo. Para su determinación se utiliza el método Kjeldhal⁸¹.

2.2.8.6 Carbohidratos. Este grupo incluye pentosas, metilpentosas, hexosas, así como los mono-, di- y polisacáridos, aminoácidos azúcares, alcoholes de azúcar y ácidos. En los organismos vivos, los hidratos de carbono sirven tanto para las funciones estructurales esenciales como para almacenar energía. Este parámetro se determina por técnicas espectrofotométricos⁸².

2.2.8.7 Vitaminas. Son sustancias orgánicas con actividad biológica muy elevada que se requieren en pequeñas cantidades para el crecimiento y mantenimiento de la salud humana. Como no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano en las cantidades requeridas, se deben suministrar en la dieta. La determinación de las vitaminas se realiza por técnicas espectrofotométricos⁸³.

2.2.8.8 Nitrógeno. Este componente se encuentra en los alimentos principalmente en forma de proteínas. El contenido de nitrógeno, que se expresa como nitrógeno total o "proteína" (N x 6.525), se determina por el método Kjeldahl que consiste en una digestión en la que se convierte el nitrógeno primero en sulfato amónico y finalmente en amoniaco; el amoniaco formado se destila y se titula con una disolución ácida normalizada⁸⁴.

2.2.8.9 Elementos minerales. Agrupa aquellos elementos en su mayoría metálicos, que se presentan en concentraciones relativamente altas como Si, Ca, Mg, K, P, S y Cl y otros en menor concentración como el Fe, Al, Mn, F, B, As, Co, Cu, Hg, Mo, Pb, Se, Sn y Zn. La presencia de As, Hg, Pb y Sn es siempre resultado de la contaminación (con la posible excepción del As en los mariscos); el Fe, Mn, Cu, Mo, Zn y I forman parte en cantidades traza de ciertas enzimas de los tejidos animales y el F, B son sustituyentes naturales de los vegetales que se han desarrollado en ciertos suelos. El análisis de estos elementos se hace por técnicas espectrofotométricos⁸⁵.

Las setas son una buena fuente de minerales. Estos son captados por el micelio en crecimiento y translocado a los esporóforos. Las concentraciones de los minerales varía según la especie, la acidez y contenido de materia orgánica en el sustrato, sitio de recolección y edad del cuerpo fructífero⁸⁵.

❖ Potasio. Es el mineral que se encuentra asociado con el sodio y aparece en mayor cantidad en el cuerpo humano después del calcio y del fósforo. Este

⁸¹ BOHINSKI. 1991. BIOQUÍMICA.

⁸² NELSON y COX. 2000. LEHNINGER PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY.

⁸³ HURST. 2008. FUNCTIONAL FOODS AND NUTRACEUTICALS.

⁸⁴ THE SCIENTIFIC ASSOCIATION DEDICATED TO ANALYTICAL EXCELLENCE (AOAC). 1990.

⁸⁵ KALAC. 2009. CHEMICAL COMPOSITION AND NUTRITIONAL VALUE OF EUROPEAN SPECIES OF WILD GROWING MUSHROOMS: A REVIEW.

macromineral mantiene la presión normal en el interior y el exterior de las células, regula el balance de agua en el organismo humano, disminuye los efectos negativos del exceso de sodio y participa en el mecanismo de contracción y relajación de los músculos. El 97% del potasio se encuentra intracelularmente y el 3% restante en forma extracelular⁸⁶.

❖ Fósforo. Este macromineral está presente en todas las células y fluidos del organismo, interviene en la división de las células y por tanto en el crecimiento, en la formación y el mantenimiento de los huesos, el desarrollo de los dientes, la secreción normal de la leche materna, la formación de los tejidos musculares y el metabolismo celular. Se ha comprobado que la ingestión frecuente de antiácidos interfiere en la absorción de este macromineral en el organismo. Para la determinación de fósforo se emplea un método colorimétrico basado en la formación de fosfomolibdato⁸⁷.

❖ Azufre. En los alimentos naturales, el azufre forma parte de proteínas y de aminoácidos como la cisteína y la metionina. Se encuentra también, en cantidades traza en la tiamina (vitamina B1), en algunas especias como la mostaza. Este mineral puede ser determinado por turbidimetría, evaluando el precipitado de sulfato de bario que se mantiene en suspensión por medio de la adición de gelatina⁸⁷.

❖ Magnesio. Este mineral es componente del sistema óseo, de la dentadura y de muchas enzimas. Interviene en el metabolismo energético, en la transmisión de los impulsos nerviosos, en la contracción y relajación de los músculos y en el transporte de oxígeno a nivel tisular. Su absorción se efectúa a nivel intestinal y los elementos de la dieta que compiten con su nivel de absorción son el calcio, fósforo, las fibras y algunos ácidos grasos (lípidos). Su determinación se hace por espectrofotometría de absorción atómica⁸⁷.

❖ Calcio. Este macromineral es el cuarto componente del cuerpo después del agua, las proteínas y las grasas. El calcio, participa en la coagulación, en la correcta permeabilidad de las membranas y a su vez adquiere fundamental importancia como regulador nervioso y neuromuscular, modulando la contracción muscular (incluida la frecuencia cardiaca), la absorción y secreción intestinal y la liberación de hormonas. Su determinación se hace realiza por espectrofotometría de absorción atómica⁸⁷.

⁸⁶ THE SCIENTIFIC ASSOCIATION DEDICATED TO ANALYTICAL EXCELLENCE (AOAC). 1990.

3. METODOLOGÍA

3.1 DETERMINACIÓN DEL SITIO DE RECOLECCIÓN

La recolección del material fúngico se realizó en el bosque ubicado en el Alto de Daza (Fig. 11), corregimiento Morasurco, Municipio de Pasto, Departamento de Nariño, en el Km. 17 vía Pasto-Chachagüí, a 1° 3.245' de latitud norte y 77° 36.789' de longitud oeste, a una altura de 2892 msnm, con una temperatura y humedad promedio de 14 °C y 59% respectivamente y está compuesto en su mayoría por robles⁸⁷. Este bosque se eligió porque posee una gran variedad de especies fúngicas.

Figura 11. Bosque de robles Alto de Daza



3.2 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL FÚNGICO

Entre los meses de mayo y septiembre del año 2009, correspondientes a la época de mayor pluviosidad, se recolectaron 25 muestras compuestas por hongos en estado maduro (hongos que ya esporularon). También se realizó un registro fotográfico del macromiceto en sus diferentes estados de crecimiento (Fig 12).

⁸⁷ NUPAN y RIASCOS. 2008. INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES EN EL PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE *Ischnocolus* sp₁ (Araneae: Mygalomorphae).

Figura 12. Diferentes estados de crecimiento de *C. lateritius*



Para la identificación del hongo se envió una muestra de la especie en sus diferentes estados de crecimiento, el registro fotográfico y la esporada⁸⁸ al Programa Extensión de Taxonomía de Hongos de la Universidad de Antioquia.

3.3 PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA RECOLECTADA

Para este estudio se utilizó toda la muestra recolectada sin división entre píleo y estípite porque el objetivo era estudiar todo el cuerpo fructífero del hongo.

- Lavado de los hongos. La muestra recolectada se limpió para eliminar fango, suelo, plantas, insectos y demás agentes extraños adheridos al material de interés.
- Secado y molienda. Una vez realizada la limpieza del material fúngico, se dejó secar al ambiente, alejado del suelo y protegido de la luz directa del sol. Posteriormente la muestra seca se cortó en trozos pequeños, se pulverizó en un molino, obteniéndose 467,40 g de material (Fig. 13) el cual se almacenó en un frasco de vidrio a 4 °C.

⁸⁸ URIBE. 1998. ASPECTOS GENERALES SOBRE BIOLOGÍA DE LOS HONGOS. PRODUCCIÓN DE VITAMINA D₂ A PARTIR DE HONGOS MACROMICETOS: ASPECTOS CIENTÍFICOS, TÉCNICOS Y ECONÓMICOS.

Figura 13. Hongos después de la molienda



3.4 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

Se maceró 350.32 g de muestra con etanol al 96% con agitación constante del medio. Cada tres días se filtraba el macerado y la solución se concentraba a presión reducida (Fig. 14) para recuperar el solvente que se empleaba nuevamente para la maceración. Este procedimiento se realizó por 20 días, obteniéndose 24.73 g de extracto etanólico ⁸⁹.

Figura 14. Concentración del extracto etanólico a presión reducida



3.5 OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE

El extracto etanólico se sometió a reparto con agua y acetato de etilo 1:1 (Fig.15). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se concentró a presión

⁸⁹ BENAVIDES. 2004. ESTUDIO QUÍMICO DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE DEL HONGO MACROMICETO *Lentinus edodes* (Shiitake).

reducida y se obtuvo 16.46 g de extracto. Este extracto se saponificó durante 2 horas con hidróxido de sodio al 10% en etanol – agua (3:2). La resina obtenida (Fig. 16) se sometió a reparto con agua – cloroformo. La fase clorofórmica insaponificada se lavó hasta neutralidad, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida, obteniéndose 1.49 g de extracto ⁹⁰.

Figura 15. Extracción líquido-líquido con agua: acetato de etilo



Figura 16. Resina obtenida por saponificación



3.6 OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS A PARTIR DE LA FRACCIÓN SAPONIFICADA

La fase acuosa saponificada obtenida de las extracciones agua – cloroformo se acidificó con HCl 12N hasta pH ácido. Se llevó nuevamente a reparto con agua – cloroformo (Fig. 17) y la fase orgánica se lavó hasta neutralidad, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. El extracto obtenido se analizó por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID).

⁹⁰ BENAVIDES. 2004. ESTUDIO QUÍMICO DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE DEL HONGO MACROMICETO *Lentinus edodes* (Shiitake).

Figura 17. Extracción agua:cloroformo de la fracción de ácidos grasos.



3.7 OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR EL MÉTODO SOXHLET

Se realizó la extracción a 5 g de muestra seca con hexano a 80°C por 2 horas (Fig. 18) y luego se concentró el extracto a presión reducida.

Figura 18. Montaje Soxhlet



3.8 ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CG-FID

- Esterificación de la muestra. A 50 μ L del extracto obtenido por los dos métodos (saponificación y extracción soxhlet) se adicionó 10 mL de HCl/Metanol 5% v/v. La

mezcla se llevó a sistema de reflujo por 2 horas⁹¹. Posteriormente se dejó enfriar y se realizó la extracción de los metil ésteres de los ácidos grasos con 3 mL de n-Hexano (Mallinckrodt Grado HPLC).

- Análisis de las Muestras. La identificación de los metil ésteres de ácidos grasos se realizó usando el método de comparación de sus tiempos de retención con los de Estándares de Metil Esteres de Ácidos Grasos (FAMES) alta pureza (Alltech) (Anexos A y B) analizados bajo las condiciones que se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de análisis para ácidos grasos por CG-FID

Equipo	Shimadzu CG-17 A
Detector	Ionización de llama FID
Columna	DB-5 (J&W Scientific. 30m x 0.25mm DI 0.25µm)
Programación de temperatura en la columna	150°C (4 min) $\xrightarrow{4^\circ\text{C}/\text{min}}$ 250°C (5 min)
Temperatura del inyector	250°C
Temperatura del detector	280°C
Fase móvil	Helio UAP (99.995%)
Flujo de la fase móvil	1 ml/min
Presión	11.603 psi
Modo de inyección	Split 1:20
Volumen de inyección	1 µL

3.9 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ESTERÓLICO

La fracción clorofórmica insaponificada, se sometió a un proceso de separación mediante CC (Fig. 19) sobre sílica gel (0.06 – 0.20 mm, Merck), utilizando una relación fase estacionaria:muestra 50:1⁹² y una mezcla eluente benceno:acetato de etilo en polaridad creciente. Como mejor mezcla eluente se eligió benceno:acetato de etilo 9:1 mediante una serie de pruebas realizadas por CCD, usando cromatoplasmas de sílica gel 60 F254 Merck (Diámetro 0.02 mm, espesor 0.20 mm) de 20 x 20 cm.

Durante la separación por CC se recogieron fracciones de 4 mL y se realizó el monitoreo del proceso por CCD. Las placas de cromatografía se revelaron con el reactivo Liebermann – Burchard⁹³, se fijaron al calor⁹³ y se observaron en lámpara UV Fisher® ($\lambda = 254$ y 365 nm). Las fracciones que presentaron iguales Rf se unieron (Anexo C) obteniéndose 10 fracciones denominadas: F1-F10

⁹¹ CHRISTIE. 1972. IN TOPICS IN LIPID CHEMISTRY.

⁹² GUZMÁN y colaboradores. 2009. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ESTUDIO QUÍMICO DEL HONGO *Pleurotus djamor* RECOLECTADO EN CÓRDOBA.

⁹³ LOCK. 1994. INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA: MÉTODOS DE ESTUDIO DE PRODUCTOS NATURALES.

Figura 19. Cromatografía en columna para la obtención de la fracción esterólica



3.10 ANÁLISIS DE PRELIMINAR DE ESTEROLES POR CROMATOGRFÍA DE GASES CG-FID

Los cromatogramas de las fracciones F1 a F10 (Anexos D a M) obtenidos por CG-FID bajo las condiciones que se indican en la Tabla 3, mostraron compuestos mayoritarios con similares índices de retención en las fracciones F1 – F6 las cuales se unieron para formar la fracción R1, y en las fracciones F7 – F10 que se unieron en la fracción R2.

Tabla 3. Condiciones para análisis preliminar de esteroides por CG-FID

Equipo	Shimadzu CG-17 A
Detector	Ionización de llama FID
Columna	DB-5 (J&W Scientific. 30m x 0.25mm DI 0.25 μ m)
Programación de temperatura en la columna	150°C (3 min) $\xrightarrow{5^\circ\text{C}/\text{min}}$ 300°C (5 min) $\xrightarrow{10^\circ\text{C}/\text{min}}$ 310°C (10 min)
Temperatura del inyector	280°C
Temperatura del detector	300°C
Fase móvil	Helio UAP (99.995%)
Flujo de la fase móvil	1 ml/min
Presión	11.603 psi
Modo de inyección	Split 1:20
Volumen de inyección	1 μ L

3.11 RECRISTALIZACIÓN

Las fracciones R1 y R2 se recrystalizaron en metanol.

3.12 ESTUDIO ESTRUCTURAL DE ESTEROLES Y TRITERPENOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS CG-EM

Con los espectros de masas obtenidos bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 4, se identificaron los esteroides y triterpenos por comparación con los de la espectroscopia NIST/EPA/NIH 08 spectral database con un nivel de confianza del 95% y mediante el análisis de fragmentación de masas según la literatura especializada^{94,95,96}.

Tabla 4. Condiciones de análisis para la identificación de esteroides y triterpenos por CG-EM

Equipo	Agilent CG 7890A FID/MSD 5975C
Detector	MSD
Columna	HP-5MS (30 m x 250 μ m x 0.25 μ m)
Velocidad de calentamiento	190°C (3 min) $\xrightarrow{12^\circ\text{C}/\text{min}}$ 290°C (20 min)
Temperatura del inyector	270°C
Temperatura del detector	280°C
Energía de ionización	70 eV
Rango de adquisición de masas	40-500 m/z
Fase móvil	helio
Flujo de la fase móvil	1 ml/min
Presión	20.17 psi
Modo de inyección	splitless
Volumen de inyección	1.5 μ L

- Condiciones de análisis. Se colocaron alícuotas de 50 μ L en viales ámbar de 2 ml y se procedió a la inyección de las sustancias. Se realizó una secuencia de análisis con inyección automática por duplicado. Los eventos de integración de la señal de cada analito se optimizaron y se mantuvieron para evitar la pérdida de exactitud y precisión.

3.13 CUANTIFICACIÓN DE ESTEROLES Y TRITERPENOS MAYORITARIOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Preparación de las muestras. Las fracciones R1 y R2 se disolvieron en 1 mL de cloroformo, luego se tomó 500 μ L y se completó hasta 1 mL con metanol. A estas soluciones se adicionó 10 μ L de estándar interno colesterol de 1000 ppm y se calculó la concentración de los esteroides y triterpenos mayoritarios usando el método de áreas normalizadas⁹⁷ de acuerdo a la respuesta del patrón. Las

⁹⁴ TOKES y DJERASSI. 1968. ANTIMICROBIAL STEROIDS FROM THE FUNGUS *Fomitopsis pinicola*.

⁹⁵ MCLAFFERTY y TURECEK. 1993. INTERPRETATION OF MASS SPECTRA.

⁹⁶ BIEMANN. 1962. MASS SPECTROMETRY ORGANIC CHEMICAL APPLICATIONS.

⁹⁷ RIVERA y colaboradores. 2002. COMPOSICIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LA FRACCIÓN ESTERÓLICA DE ONCE HONGOS COLOMBIANOS.

condiciones de análisis para la cuantificación de las fracciones R1 y R2 se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de análisis para cuantificación de esteroides y triterpenos mayoritarios por CG-FID

Equipo	Agilent CG 7890A FID
Detector	FID
Columna	HP-5MS (30 m x 250 μ m x 0.25 μ m)
Velocidad de calentamiento	190°C (3 min) $\xrightarrow{12^\circ\text{C}/\text{min}}$ 290°C (20 min)
Temperatura del inyector	270°C
Temperatura del detector	280°C
Fase móvil	helio
Flujo de la fase móvil	1 ml/min
Presión	20.17 psi
Modo de inyección	splitless
Volumen de inyección	1.5 μ l

3.14 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

Estos análisis fueron realizados por la Sección de Bromatología de la Universidad de Nariño.

3.14.1 Humedad. Se llevó la muestra fresca a estufa de ventilación forzada a 65°C durante 72 horas. Se dejó enfriar y se pesó. Se llevó nuevamente a estufa a 105°C por 4 horas luego se dejó enfriar y se pesó.

3.14.2 Materia seca parcial. En una estufa se secaron 20 g de muestra, a una temperatura de 65°C durante 48 horas. Posteriormente se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y después se pesó.

3.14.3 Ceniza. Se incineró 1 g de muestra en la mufla a 600°C durante 4 horas. Después se llevó a estufa a 105°C por 20 minutos, se enfrió en desecador y se pesó. Se llevó nuevamente a mufla por 1 hora, a estufa por 20 minutos y se enfrió en desecador hasta peso constante.

3.14.4 Extracto etéreo. En la unidad de extracción se colocó 1 g de muestra seca, se acopló el balón de fondo plano a la unidad de extracción y se adicionó un exceso de éter etílico. Se adaptó el sistema de extracción al refrigerante y se calentó en estufa a 40°C por 8 horas. Posteriormente se enfrió en desecador y se pesó.

3.14.5 Fibra cruda. En un erlenmeyer se adicionó 0.2 g del residuo de la determinación del extracto etéreo, 20 mL de H₂SO₄ al 1.25% y 3 gotas de antiespumante. Se acopló el sistema de reflujo y se llevó a ebullición durante 30 minutos. Luego se adicionó 2 mL de NaOH al 24% y se continuó la ebullición durante 30 min. más. Se filtró la solución caliente a través de un crisol gooch con

lana de vidrio. Se transfirió todo el residuo a un crisol, que luego se sometió a calentamiento en estufa a 105°C durante 3 horas. Finalmente se incineró el residuo en mufla a 600°C hasta obtener cenizas de color blanco. Se llevó a estufa a 105°C por 20 minutos y se pesó.

3.14.6 Carbohidratos totales. Se pesó 0.25 g de muestra parcialmente seca (12% de humedad), se adicionó 25 mL de HCl 0.6 N, se llevó a ebullición por 30 min. y se dejó enfriar. Posteriormente se filtró y del filtrado se tomó una alícuota de 0.1 mL, la cual se neutralizó con NaOH 0.6 N. De la muestra neutralizada se tomó 2 mL y se llevó a baño de hielo. Luego se adicionó 8 mL del reactivo de antrona, se calentó en baño maría durante 10 minutos. Luego se enfrió en baño de hielo y se leyó la absorbancia a 630 nm. También se realizó una curva patrón de glucosa en una escala de concentración de 1 a 12 ppm.

3.14.7 Vitamina A. Se pesó 1 g de muestra, se maceró con 4 mL de isopropanol, se filtró y se completó el filtrado a 10 mL. Se realizó una curva patrón de vitamina A empleando un blanco del proceso y soluciones patrón en una escala de concentración de 1 a 10 ppm. Se leyó la absorbancia de todas las soluciones a 325 nm.

3.14.8 Vitamina C. Se maceró 1 g de muestra con 4 mL de ácido oxálico al 0.15%, se filtró y se completó el filtrado a 5 mL. Se tomó 1 mL de filtrado y se adicionó 0.1 mL de o-nitroanilina, 0.1 mL de nitrito de sodio, se mezcló bien y se dejó reposar hasta decoloración. Luego se adicionó 3.8 mL de etanol, 1.2 mL de NaOH y 3.8 mL de agua destilada. Se realizó la curva patrón de vitamina C y se leyó la absorbancia de cada solución a una longitud de onda de 540 nm.

3.14.9 Energía bruta. Se peletizó 0.6 g de la muestra y se empleó la bomba calorimétrica para la determinación de energía total.

3.14.10 Nitrógeno total (método micro Kjeldahl). Se transfirieron 0.2 g de muestra al balón Kjeldahl, se agregó 2 g de mezcla catalítica, 5 mL de H₂SO₄, se adaptó el balón en el digestor hasta que el líquido quedó totalmente claro y de un color azul verdoso y se dejó enfriar. Luego se transfirió el contenido al destilador y se colocó un erlenmeyer con 5 mL de ácido bórico y 3 gotas del indicador mixto en el terminal de salida del equipo de destilación. Se adicionó aproximadamente 20 mL de NaOH al 40% hasta neutralizar la solución (aparición de un color café oscuro). Se comprobó que la destilación de amoníaco había terminado con papel indicador de pH. El destilado se tituló con H₂SO₄ 0.1 N.

3.14.11 Fósforo. Se realizó una curva patrón de fósforo en una escala de concentración de 0.5 a 12 ppm. También se preparó el blanco con 9 mL de la solución para desarrollar color y 1 mL de agua destilada. De cada solución patrón preparada se tomó 1 mL, se adicionó 9 mL de la solución para desarrollar color y después de 15 minutos se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-vis

Perkin Elmer Lambda 11 a 660 nm. Este mismo procedimiento se realizó a 1 mL del extracto diluido (1 a 20).

3.14.12 Calcio. Se realizó una curva patrón con soluciones de concentración final 1, 2 y 4 ppm (sensibilidad). A 1 mL del extracto diluido (1 a 20) y de las soluciones patrón, se adicionó 9 mL de solución de sodio de 1200 ppm. También se preparó un blanco del proceso. Se leyó cada solución en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 2380, a una longitud de onda de 422.7 nm y un slit de 0.7.

3.14.13 Magnesio. Se realizó una curva patrón con soluciones de concentración final 0.25, 0.3 y 0.5 ppm (sensibilidad). A 1 mL del extracto diluido (1 a 20) y de las soluciones patrón, se adicionó 9 mL de solución de sodio de 1200 ppm. También se preparó un blanco del proceso. Se leyó la absorbancia de cada solución en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 2380 a una longitud de onda de 285.2 nm y un slit de 0.7.

3.14.14 Potasio. Se tomó 0.5 mL del extracto y se aforó a 100 mL con agua. Se preparó un blanco con 3 mL de HCl 6 N, aforados con agua destilada a 100 mL. Luego se leyó la absorbancia de cada solución en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 2380, a una longitud de onda de 766.5 nm y un slit de 1.4

3.14.15 Azufre. Se tomó 10 mL de cada uno de los patrones, se adicionó 2 mL de la solución inicial ácida de azufre y 2 mL del reactivo turbidimétrico. Se dejó en reposo por 35 minutos y se agitó. En el espectrofotómetro UV-vis Perkin Elmer Lamba 11, se leyó la absorbancia de las soluciones y del extracto, a los 40 y 60 mi. a una longitud de onda de 420 nm.

3.14.16 Hierro, cobre, manganeso y cinc. En un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 2380 se leyó la absorbancia de los extracto y de los patrones de sensibilidad de 5, 4, 2.5 y 1 ppm, a una longitud de onda de 248.3, 324.8, 213.8, 279.5 nm respectivamente. El slit para hierro y cobre fue de 0.2 y para manganeso y cinc fue de 0.7.

3.14.17 Acidez. Para la determinación de acidez, se tomaron 25 mL de la muestra previamente macerada con agua, se añadió unas gotas de fenolftaleína y se tituló con NaOH hasta la obtención de una coloración rosa persistente durante 30 segundos.

3.14.18 pH. Se maceró 25 g de muestra en 50 mL de agua caliente. Luego se adaptó el condensador de reflujo al erlenmeyer, se calentó en baño de agua hirviendo durante 30 min., se enfrió y se trasvasó cuantitativamente el contenido del erlenmeyer a un balón volumétrico. Se aforó a 250 mL, se mezcló bien y filtró. Para la lectura se utilizó un volumen de muestra preparada que fue suficiente para

la inmersión de los electrodos según el tipo de aparato empleado. Antes de la determinación se calibró el potenciómetro con soluciones buffer de pH 4 y 7.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CLASIFICACIÓN DEL MATERIAL FUNGICO

El hongo se encontró como una especie gregaria, desarrollándose principalmente cerca a las fuentes de agua y alrededor de los robles, bajo sombra y en las zonas de mayor humedad del bosque. El macromiceto fue identificado como *Cantharellus lateritius var.colombianus* R.H. Petersen (Fig. 20). De acuerdo con su hábitat en la naturaleza, el género *Cantharellus* puede clasificarse como una especie micorriza del tipo ectomicorrícico, debido a que se forma una asociación entre las raíces de la planta y el hongo la cual se puede observar a simple vista. Las micorrizas son beneficiosas en plantaciones que se encuentran en terrenos de poca fertilidad⁹⁸.

Figura 20. Hongo silvestre *Cantharellus lateritius var.colombianus* R.H. Petersen



⁹⁸ CHALET y colaboradores. 1990. SEASONAL FLUCTUATIONS OF GROWTH AND NITROGEN METABOLISM IN THE ECTOMYCORRHIZAL ASSOCIATION DOUGLAS Fir-*Laccaria laccata*.

4.2. ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CG-FID

Para el análisis de ácidos grasos se emplearon dos técnicas de extracción: extracción de la fase saponificada y método soxhlet. De acuerdo con los cromatogramas (Fig. 21 y 22), el segundo método extrae una mayor cantidad de ácidos grasos porque se observan más picos con mayor área, esto se debe que el primer método extrae los lípidos saponificables mientras que el segundo método extrae todo el material lipídico.

Figura 21. Cromatograma del extracto clorofórmico derivatizado

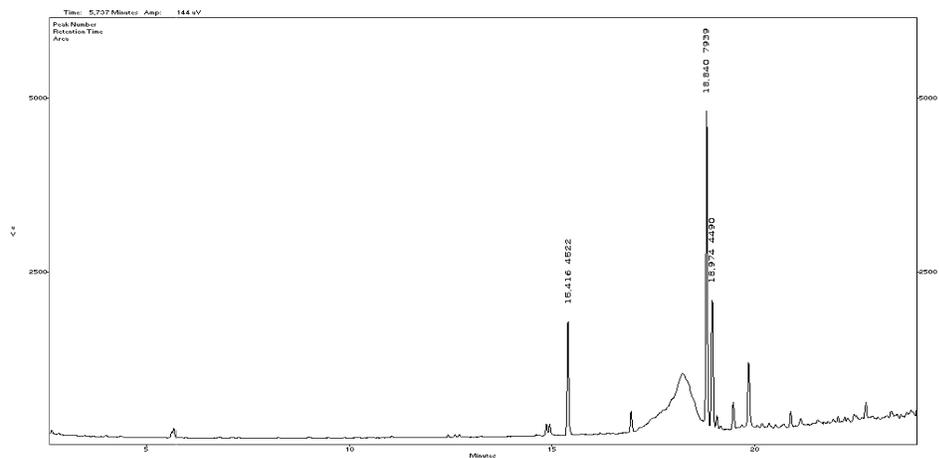
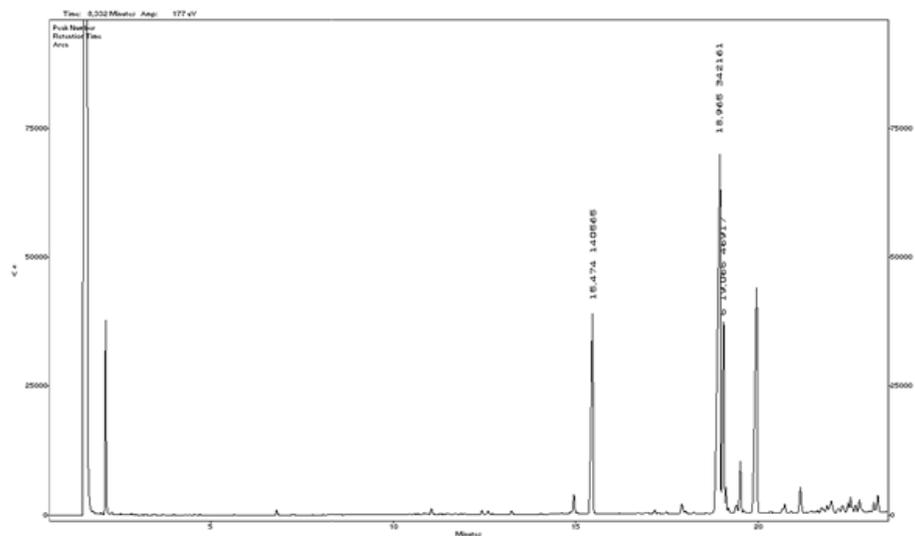


Figura 22. Cromatograma del extracto etéreo derivatizado



Aunque en los hongos, la cantidad de lípidos totales varía de acuerdo a la especie, en los basidiomicetos el perfil de ácidos grasos (AG) se compone principalmente de ácido palmítico (16:0), oleico (18:1 Δ^9) y linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$)⁹⁹, lo que es concordante con los resultados obtenidos en esta investigación para *C. lateritius*. Además se encontró que la concentración de AGI es superior a la de ácidos grasos saturados en los dos métodos, resultados que se presentan también en otras especies de hongos ¹⁰⁰.

Según la normalización de área respecto a los AG identificados, el ácido linoleico (omega 6) es el de mayor concentración, seguido de los ácidos oleico (omega 9) y palmítico (Tablas 6 y 7). Estos ácidos pueden existir en su forma libre o estar conjugados para formar constituyentes lipídicos. El ácido linoleico presente en esta especie fúngica, es el precursor del alcohol 1-octen-3-ol, el cual junto con dos cetonas de C8 asociadas (1-octen-3-ona y octanona) son los principales sustancias volátiles que contribuyen en mayor medida al sabor del hongo. Diferentes estudios indican que la relación ácido linoleico: oleico puede proveer un importante criterio para diferenciar especies de un mismo género ¹⁰¹.

Tabla 6. Identificación de ácidos grasos como derivados metilados en el extracto clorofórmico.

Pico No.	Tiempo de retención	Cantidad Relativa (% Área)*	Identificación
1	15,42	25,85	Acido Palmítico ME
2	18,84	50,82	Acido Linoleico ME
3	18,97	23,33	Acido Oleico ME

*. Normalizado respecto a los AG identificados.

Tabla 7. Identificación ácidos grasos como derivados metilados en el extracto etéreo

Pico No.	Tiempo de Retención	Cantidad Relativa (% Área)*	Identificación
1	15,474	24,63	Acido Palmítico ME
2	18,965	56,67	Acido Linoleico ME
3	19,065	18,70	Acido Oleico ME

*. Normalizado respecto a los ÁG identificados.

El alto contenido de ácidos grasos insaturados se debe principalmente al ácido linoleico, que en *L. edodes* representa el 76%, en *V. volvariella* el 70%, en *A.*

⁹⁹ PEDNEAULT y colaboradores. 2006. FATTY ACID COMPOSITION OF LIPIDS FROM MUSHROOMS BELONGING TO THE FAMILY *Boletaceae*.

¹⁰⁰ BENAVIDES. 2004. ESTUDIO QUÍMICO DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE DEL HONGO MACROMICETO *Lentinus edodes* (Shiitake).

¹⁰¹ KALAC. 2009. CHEMICAL COMPOSITION AND NUTRITIONAL VALUE OF EUROPEAN SPECIES OF WILD GROWING MUSHROOMS: A REVIEW.

bisporus el 69% y en *C. lateritius* el 56.67%. Aunque en este estudio no se consideraron las variaciones en el contenido de AG dependientes de temperatura, Pedneault y otros autores informan que durante el cultivo de *P. ostreatus*, el aumento de temperatura por encima de 17°C, incrementa la proporción de AGI.

Los AGI son esenciales en la dieta humana, mientras que los AGS, que están presentes en grandes cantidades en las grasas animales, pueden ser perjudiciales. El hallazgo de una alta proporción de AGI y un alto porcentaje de ácido linoleico en estos hongos es un factor significativo en relación con las setas como un alimento saludable ya que conducen al incremento de colesterol HDL, la disminución de colesterol LDL, de triacilglicerol y la oxidación de lípidos^{102,103}.

4.3. IDENTIFICACIÓN DE ESTEROLES MAYORITARIOS

La identificación de los compuestos se realizó mediante el uso del software AMDIS 2.68 (The Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System), lo que permitió analizar la pureza de las señales (peak purity) y los perfiles de los iones de cada espectro, con lo que fue posible atribuir la identidad de las sustancias y además permitió la integración de cada pico mediante iones selectos pertenecientes a los núcleos químicos de los esteroides y triterpenos en cada caso. Además los espectros de esta base de datos tienen corrección de ruido en forma automática.

De la fracción R1 (Anexo C) se obtuvieron 8 compuestos que se presentan en la Tabla 8. En la fracción R2 se identificaron los mismos esteroides pero en menor concentración.

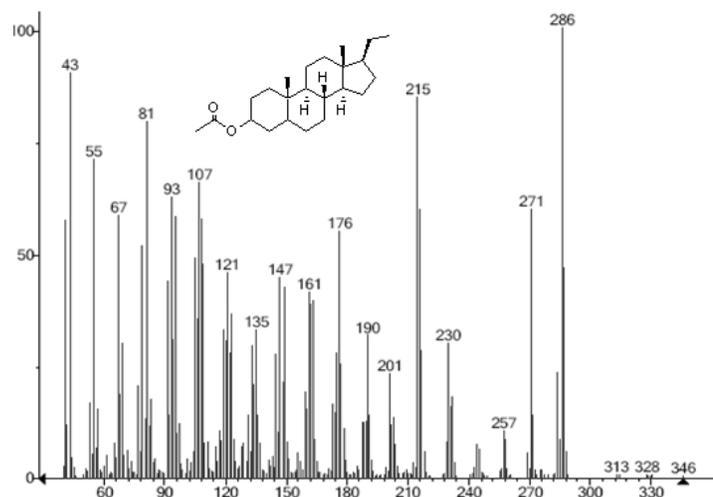
Tabla 8. Esteroides mayoritarios fracción R1

Pico	tr (min.)	Sustancia	% relativo de área
1	10.93	NN1 (pregnano acetilado)	3,63
2	15.93	Desmosterol	0,04
3	16.77	5,6-Dihidroergosterol	5,49
4	17.37	Estigmasterol	8,55
5	17.62	7,22-ergostadienol	2,37
6	17.72	Gama-ergosterol	14,28
7	18.28	Gama-sitosterol	7,71
8	19.49	Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona	2,61

¹⁰² BARROS y colaboradores. 2008. WILD AND COMMERCIAL MUSHROOMS AS SOURCE OF NUTRIENTS AND NUTRACEUTICALS.

¹⁰³ HOLMAN. 1976. SIGNIFICANCE OF ESSENTIAL FATTY ACIDS IN HUMAN NUTRITION, IN LIPIDS.

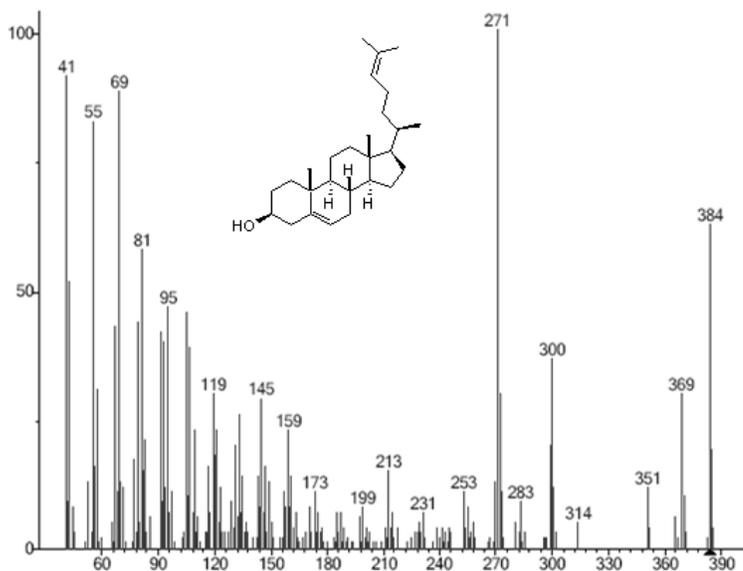
Figura 23. Espectro de masas de NN1 (pregnano acetilado)



La figura 23 corresponde al espectro de masas del NN1 pregnano acetilado, en donde se evidencia el ion molecular de m/z 346 del compuesto $C_{23}H_{38}O_2$, así como un conjunto de iones m/z: 286 (100%) [$M^+ - CH_3COOH$], 271 (60.3%) [$f^+ - \cdot CH_3$], 230 (29.3%) [$f^+ - C_4H_8$], 215 (86.2%) [$M^+ - \cdot CH_3$] y 161 (41.4%) [$M^+ - C_4H_6$] (Anexo N). Los fragmentos 215 y 147 indican la ausencia de insaturaciones en el núcleo esteroidal, lo que permite concluir que este esteroide es del tipo Δ^0 -3 β -hidroxiandrostano¹⁰⁴.

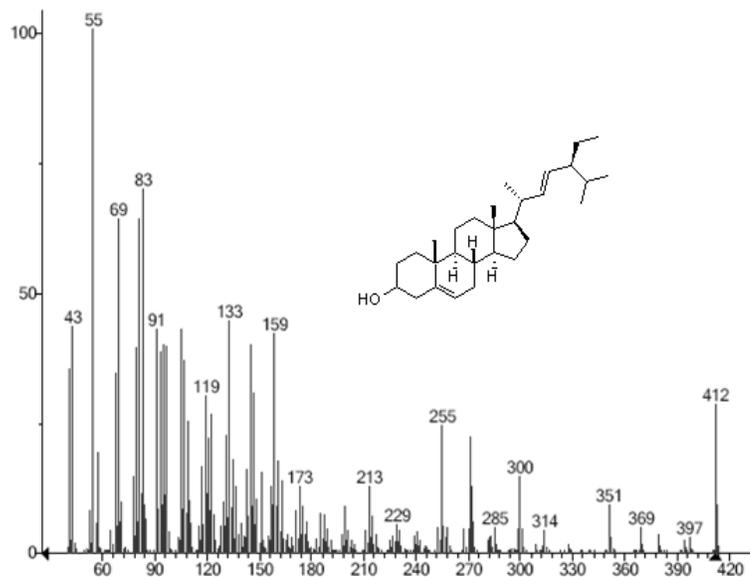
¹⁰⁴ VALLE, H. y SANTAFÉ, G. 2009. ESTEROLES LIBRES DE LA ESPONJA MARINA *Mycale laevis*.

Figura 24. Espectro de masas de Desmosterol



La figura 24 muestra el espectro de masas del Desmosterol, este compuesto tiene el ion molecular m/z 384 que corresponde a la fórmula molecular $C_{27}H_{44}O$, así como un conjunto de iones típicos m/z : 369 (29.3%) $[M^+ - \cdot CH_3]$, 351 (12.1%) $[M^+ - H_2O]$, 300 (37.9%) $[M^+ - C_6H_{12}, rH]$, 271(100%) $[M^+ - C_2H_4O, -\cdot C_5H_9]$ y 69 (87.9%) $[M^+ - \cdot C_{22}H_{35}O](Anexo\ O)$.

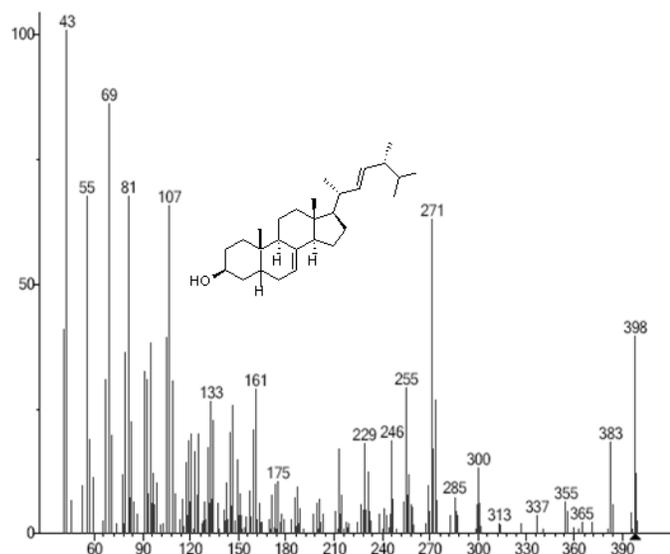
Figura 25. Espectro de masas de Estigmasterol



En el espectro de masas del Estigmasterol (Fig. 25) se tiene el ion molecular de m/z 412 que corresponde a la fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$, así como un conjunto

de iones de m/z: 271 (22.4%) [$M^+ - C_{10}H_{21}, 2rH$], 255 (24.1%) [$M^+ - C_6H_{13}, -C_4H_8O$], 213 (12.1%) [$M^+ - C_{13}H_{25}, rH, -H_2O$], 300 (15.5%) [$M^+ - C_8H_{16}, rH$] y 159 (41.4%) [$M^+ - C_{13}H_{25}, rH -C_4H_8O$] (Anexo P). El ion fragmento m/z 300 es característico de los esteroides tipo Δ^5, Δ^{22} ^{105, 106}.

Figura 26. Espectro de masas de 5,6-Dihidroergosterol

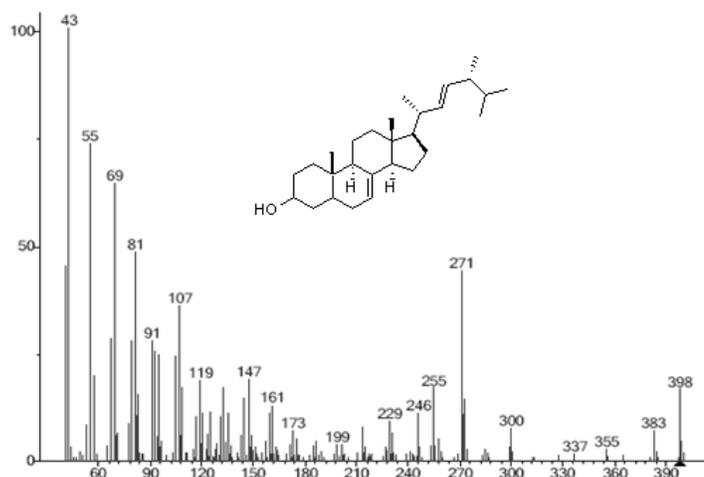


La figura 26 muestra el espectro de masas del 5,6-Dihidroergosterol en el cual se observa el ion molecular con un valor de m/z 398 correspondiente a la fórmula molecular $C_{28}H_{46}O$, así como un conjunto de iones del tipo 3 β -hidroxiandrosteno m/z: 383 (19%) [$M^+ - CH_3$], 365 (3.4%) [$M^+ - H_2O$], 355 (6.9%) [$M^+ - C_3H_7$], 271(53.4%) [$M^+ - C_9H_{19}, 2rH$] y 107 (62.1%) [$M^+ - C_{11}H_{16}O$] (Anexo Q). La presencia del ión m/z 246 indica una insaturación en el C7.

¹⁰⁵ BERNARD y TOKES. 1977. ELECTRON IMPACT INDUCED FRAGMENTATION OF CHOLESTEROL AND RELATED C-5 UNSATURATED STEROIDS.

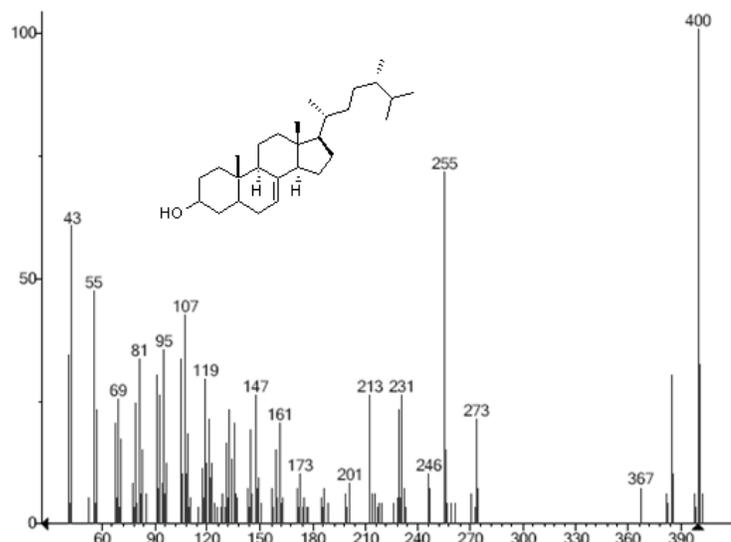
¹⁰⁶ VALLE, H. y SANTAFÉ, G. 2009. ESTEROLES LIBRES DE LA ESPONJA MARINA *Mycale laevis*.

Figura 27. Espectro de masas de 7,22-Ergostadienol



En la figura 27 se muestra el espectro de masas del 7,22-Ergostadienol, donde se observa el ion molecular con un valor de m/z 398 correspondiente a la fórmula molecular $C_{28}H_{46}O$, así como un conjunto de iones del tipo 3 β -hidroxiandrosteno m/z : 383 (6.9%) $[M^+ - \cdot CH_3]$, 355 (5.2%) $[M^+ - C_3H_7]$, 337 (1.7%) $[M^+ - H_2O]$, 271 (34.5%) $[M^+ - C_9H_{19}, 2rH]$ y 107 (36.2%) $[M^+ - C_{11}H_{16}O]$ (Anexo R). La insaturación se presenta en C7 debido a la presencia del ion m/z 246, el cual es diagnóstico del núcleo Δ^7 .

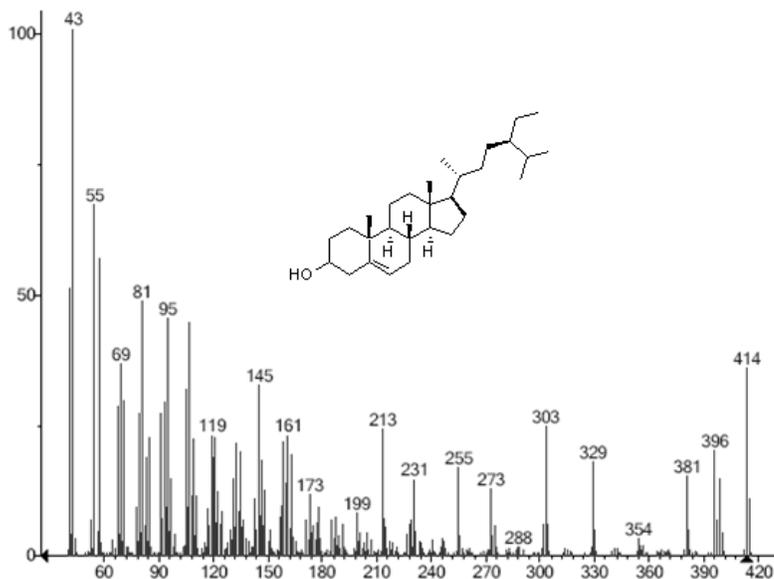
Figura 28. Espectro de masas de Gama-ergostenol



La figura 28 muestra el espectro de masas del Gama-ergostenol con un ion molecular de m/z 400 el cual es consistente con la fórmula molecular $C_{28}H_{48}O$, y

algunos iones característicos de esteroides hidroxilados en el C3 de m/z: 385 (24.1%) $[M^+ - \cdot CH_3]$, 273 (22.4%) $[M^+ - \cdot C_9H_{19}]$, 255 (72.4%) $[M^+ - H_2O]$, 231 (25.9%) $[M^+ - C_{12}H_{25}, rH]$ y 213 (25.9%) $[M^+ - H_2O]$ (Anexo S). El ion fragmento de m/z 246 indica una insaturación Δ^7 . Una diferencia de 127 uma (C_9H_{19}) entre el ion molecular y el ion de m/z 273 se origina por la pérdida de la cadena lateral y la ausencia del ión de m/z 300, implica que la cadena lateral es saturada ¹⁰⁷.

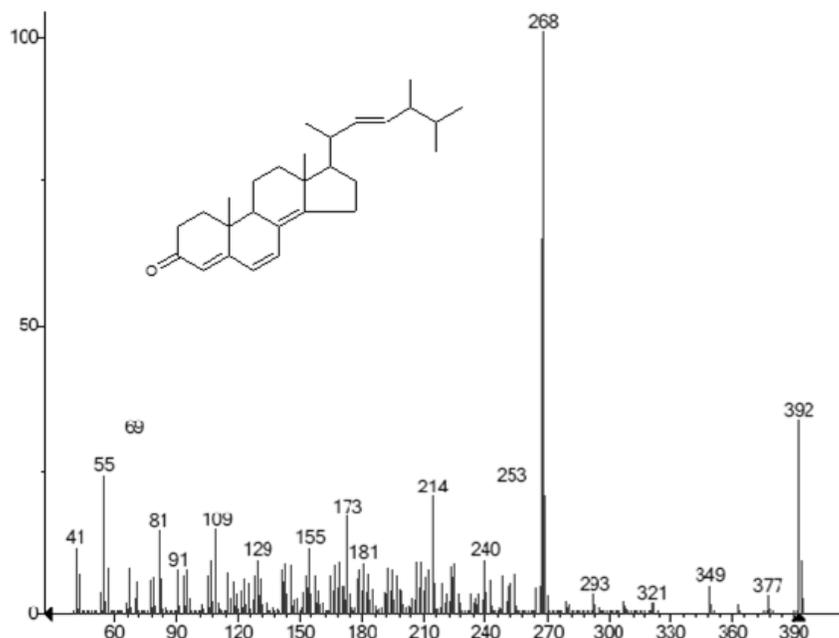
Figura 29. Espectro de masas de Gama-sitosterol



En el espectro de masas del Gama-sitosterol (Fig. 29) se observa el ion molecular de m/z 414 que corresponde a la fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$, así como un conjunto de iones de m/z: 396 (20.7%) $[M^+ - H_2O]$, 273 (12.1%) $[M^+ - \cdot C_{10}H_{21}]$, 255 (17.2%) $[M^+ - H_2O]$, 231 (15.5%) $[M^+ - \cdot C_{13}H_{27}, rH]$, 213 (24.1%) $[M^+ - H_2O]$, 145 (32.8%) $[M^+ - C_5H_8, rH]$ (Anexo T).

¹⁰⁷ CUCAITA y NIETO. 2007. ACIDOS GRASOS, ESTERES Y ESTEROLES DEL CUERPO FRUCTÍFERO DEL HONGO *Laccaria laccatta*.

Figura 30. Espectro de masas de Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona



En el espectro de masas del Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (Fig. 30) se tiene un ion molecular de m/z 392, que corresponde a la fórmula molecular $C_{28}H_{40}O$. Se presenta una fragmentación típica para un esqueleto tetracíclico tipo ergostano con iones m/z : 377 (3.4%) [$M^+ - \cdot CH_3$], 268 (100%) [$M^+ - C_9H_{16}$], 240 (19%) [$M^+ - C_2H_4$], 69 (31%) [$M^+ - C_{24}H_{36}$] y 55 (25.9%) [$M^+ - C_{14}H_{45}$] (Anexo U) cuya formación implica cuatro puntos de insaturación que corresponden a cuatro dobles enlaces carbono-carbono y uno carbono-oxígeno.

4.4. CUANTIFICACIÓN DE ESTEROLES MAYORITARIOS

De la fracción R2 no se cuantificaron los esteroides porque en la fracción R1 se encontraron los mismos compuestos en una mayor concentración. La cuantificación de la fracción R1 (Fig. 31) se realizó utilizando el método de normalización de áreas¹⁰⁸. Los cálculos se realizaron teniendo en cuenta el área promedio del estándar interno colesterol (EI) (Tabla 9). Tanto los esteroides mayoritarios como el EI se inyectaron por triplicado mediante la técnica CG-FID. El contenido de esteroides en *C. lateritius* se relaciona en la Tabla 10.

¹⁰⁸ RIVERA y colaboradores. 2002. COMPOSICIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LA FRACCIÓN ESTERÓLICA DE ONCE HONGOS COLOMBIANOS.

Figura 31. Cromatograma de la fracción R1

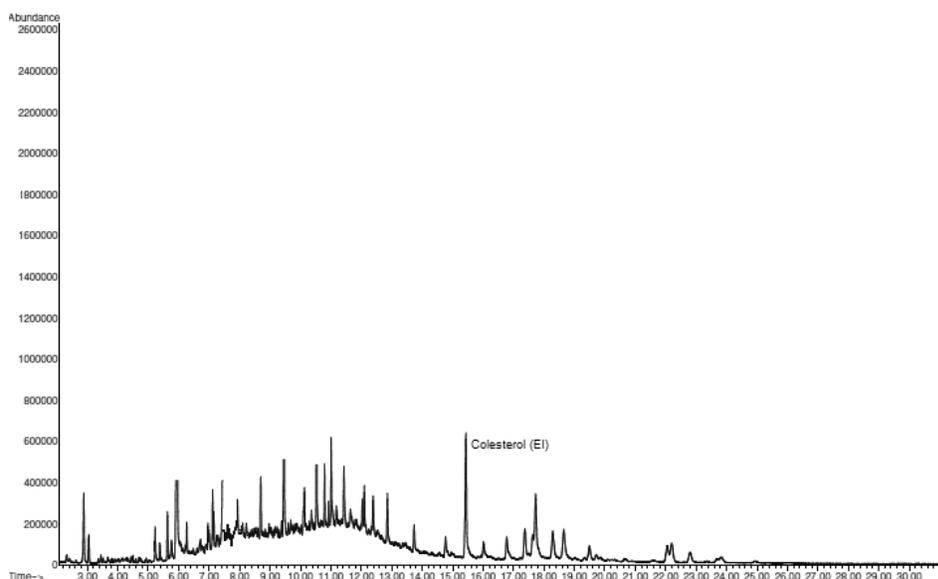


Tabla 9. Área del estándar interno de colesterol

Patrón ppm	Área	Área	Área	Promedio	SD	%RSD
1000	4805776	4810423	478568	4788256	34449	0.72

Tabla 10. Repetibilidad de las áreas cromatográficas de esteroides obtenidas por CG-FID

Compuesto	Área	Área	Área	Promedio	SD	%RSD
NN1(pregnano acetilado)	479456	476879	474038	476791	2710	0.57
Desmosterol	5899	5632	5820	5784	137	2.37
5,6-dihidroergosterol	723431	721309	716606	720449	3493	0.48
Estigmasterol	1111565	1109780	1114792	1112046	2540	0.23
7,22-ergostadienol	306328	299087	309196	304870	5210	1.71
gama-ergosterol	1899449	1901341	1863221	1888004	21483	1.14
gama-sitosterol	1009345	1110456	1006159	1041987	59318	5.69
ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona	342890	341786	339970	341549	1474	0.43

En la Tabla 10 se indican los triplicados de las áreas para cada esteroide y su respectiva SD y %RSD que se encuentran en el rango de 137 – 59318 y 0.23 – 5.69%, respectivamente, esto demuestra que el método es confiable dado que la precisión en las áreas es repetitiva.

En *C. lateritius*, el componente mayoritario (Tabla 11) a nivel de compuestos esteroideos es el gama-ergostenol (157mg/100 g de extracto clorofórmico), lo que marca una diferencia con otras setas en las que el esteroil mayoritario es ergosterol. La ausencia de este metabolito en la especie estudiada pudo ocurrir por la inhibición de la enzima 14 α -demetilasa que interviene en la biosíntesis de ergosterol¹⁰⁹, o por los cambios morfológicos que implican el desarrollo de las ectomicorrizas, como por ejemplo cambios bioquímicos importantes que producen una acumulación de polipéptidos, dando como resultado una reorganización estructural de las proteínas que modifican directamente el patrón de metabolitos secundarios¹¹⁰. Además este patrón se ve afectado por el tipo de nutrientes que conforman el sustrato y las condiciones climáticas¹¹¹ que pueden originar vías alternas en la producción de dichos metabolitos. Se debe considerar también que aunque se evitó al máximo la exposición de la muestra a la luz solar, la recolección se extendió por cuatro meses y el proceso de secado se realizó al ambiente, lo que pudo producir una fotoisomerización del ergosterol a Vitamina D.

Tabla 11. Cuantificación de los esteroides mayoritarios presentes en el hongo *C. lateritius*

Compuesto	tr (min)	Área del analito (cuentas)	mg esteroil/100 g extracto clorofórmico
NN1-pregnano acetilado	19.93	476791	39.83
Desmosterol	15.93	5784	0.48
5,6-dihidroergosterol	16.77	720449	60.18
Estigmasterol	17.37	1112046	92.90
7,22-ergostadienol	17.62	304870	25.47
gama-ergostenol	17.72	1888004	157.72
gama-sitosterol	18.28	1041987	87.05
ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona	19.49	341549	28.53

Los esteroides 5,6-Dihidroergosterol, 7,22-Ergostadienol, Gama-ergostenol, Gama-sitosterol, Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona se han encontrado en los hongos *Lentinus edodes*¹¹², *Ganoderma lucidum*¹¹³, *Suillus luteus*¹¹⁴ y *Laccaria laccatta*¹⁰⁹ estudiados en Colombia, sin embargo en estas investigaciones no se realiza su cuantificación.

¹⁰⁹ KAVANAGH. 2005. FUNGI: BIOLOGY AND APPLICATIONS.

¹¹⁰ CUCAITA y NIETO. 2007. ACIDOS GRASOS, ESTERES Y ESTEROLES DEL CUERPO FRUCTÍFERO DEL HONGO *Laccaria laccatta*.

¹¹¹ TEE. 2006. SETAS, IDENTIFICACIÓN Y RECOLECCIÓN.

¹¹² BENAVIDES. 2004. ESTUDIO QUÍMICO DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE DEL HONGO MACROMICETO *Lentinus edodes* (Shiitake).

¹¹³ ZULUAGA y colaboradores. 2007. QUÍMICA Y ACTIVIDADES ANTIOXIDANTE Y BACTERICIDA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL HONGO *Ganoderma lucidum*.

¹¹⁴ NIETO y ÁVILA. 2008. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y COMPUESTOS TRITERPENOIDES DEL CUERPO FRUCTÍFERO DE *Suillus luteus*.

Los esteroides 5,6-Dihidroergosterol y 7,22-Ergostadienol tienen estructuras similares, pero su estereoquímica es diferente, puesto que poseen el mismo patrón de fragmentación en el espectro de masas y tiempos de retención similares los cuales son 16.77 y 17.62 min., respectivamente. Con el fin de diferenciar la estereoquímica de estos dos compuestos se hace necesario emplear técnicas espectroscópicas bidimensionales.

No se conocen estudios sobre la actividad biológica algunos esteroides encontrados en *C. lateritius*, sin embargo cabe destacar que:

El desmosterol fue identificado en especies de *Saprolegniales* y *Leptomitales* pertenecientes a los *phycomycetes* que son la clase más primitiva de hongos y a menudo son unicelulares¹¹⁵.

La presencia de estigmasterol no es común en basidiomicetos, aunque el hongo por ser micorrízico, pudo haberlo incorporado del árbol sobre el que se reproduce, ya que dicho esteroide se encuentra en todas las plantas superiores^{116, 117}.

El estigmasterol ha mostrado inhibir marcadamente la producción de tumores en carcinogénesis en ratas y exhibe un significativo efecto inhibitorio sobre la transcriptasa reversa del VIH¹¹⁸, por lo tanto la presencia de este esteroide es importante desde el punto de vista farmacológico.

El gamma-sitosterol se diferencia de los esteroides comunes por la presencia de un grupo etilo en la posición 24. Este compuesto tiene importancia a nivel medicinal puesto que estudios químicos han demostrado que cuando se consume ofrecen protección contra enfermedades cardiovasculares¹¹⁹ y reducen significativamente la concentración de colesterol de baja densidad LDL, que es el principal responsable de las enfermedades coronarias¹²⁰.

El esteroide ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona es un compuesto fluorescente que se relaciona con la bioluminiscencia de hongos y bacterias¹²¹. Este hecho se basa en que la emisión de luz a una longitud de onda de 528 nm de extractos de hongos como *Armillaria mellea*, *Collybia velutipes*, *Mycena citricolor* y *Lampteromyces*

¹¹⁵ MEDIAVILLA. 1984. METABOLITOS DE HONGOS SUPERIORES.

¹¹⁶ NIETO, I. y ÁVILA, I. 2008. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y COMPUESTOS TRITERPENOIDES DEL CUERPO FRUCTÍFERO DE *Suillus luteus*.

¹¹⁷ GRANDMOUGIN-FERJANI y colaboradores. 1999. STEROL DISTRIBUTION IN ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI.

¹¹⁸ MANGAS y colaboradores. 2008. CARACTERIZACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DEL EXTRACTO APOLAR DE LAS HOJAS DE *Clusia minor*

¹¹⁹ JIA y colaboradores. 2006. EFFECTS OF DIFFERENT PHYTOSTEROL ANALOG ON COLONIC MUCOSAL CELL PROLIFERATION IN HAMSTERS.

¹²⁰ LAGARDA y colaboradores. 2006. ANALYSIS OF PHYTOSTEROLS IN FOODS.

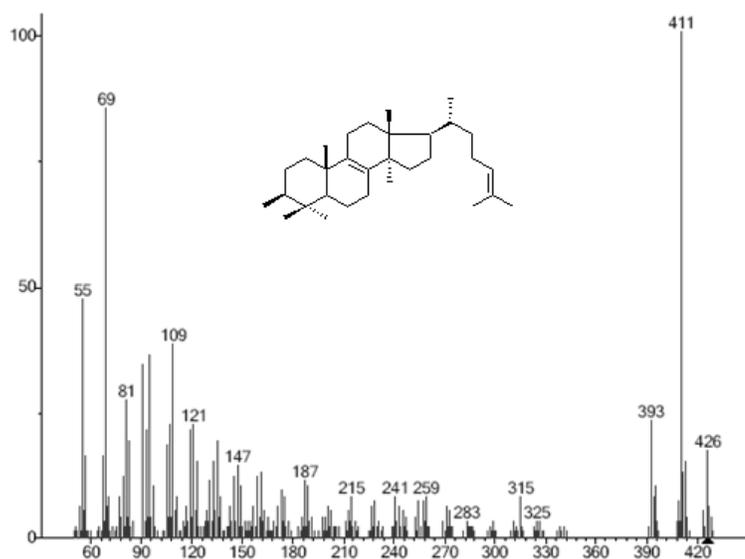
¹²¹ AIRTH y FOERSTER. 1964. ENZYMES ASSOCIATED WITH BIOLUMINESCENCE IN *panus stypticus luminescens* AND *Panus stypticus non-luminescens*.

*japonicus*¹²², es idéntica a la emisión fluorescente de este compuesto. Sin embargo este metabolito también se ha encontrado en hongos no lusminiscentes como, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma australe*¹²³ y *C. lateritius*.

4.5. IDENTIFICACIÓN DE TRITERPENOS

En la especie *C. lateritius* se identificaron cuatro triterpenos de los cuales no se conoce su actividad biológica.

Figura 32. Espectro de masas del Lanosterol

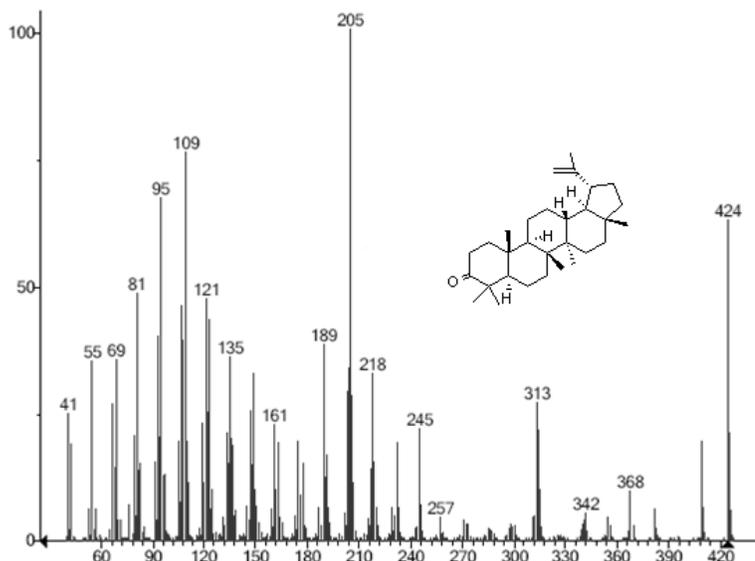


En el espectro de masas de este compuesto (Figura 32) se observa el ion molecular a m/z 426 que corresponde a la fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$, así como un conjunto de iones m/z: m/z 411 (100%) [$M^+ - \cdot CH_3$], 393 (24.1%) [$M^+ - H_2O$], 109 (37.9%) [$M^+ - C_{22}H_{37}O, 2rH$], 69 (86.2%) [$M^+ - C_3H_4$] y 55 (46.6%) [$M^+ - C_4H_6$] (Anexo V).

¹²² WASSINK y KUWABARA. 1966. BIOLUMINESCENCE IN PROGRESS.

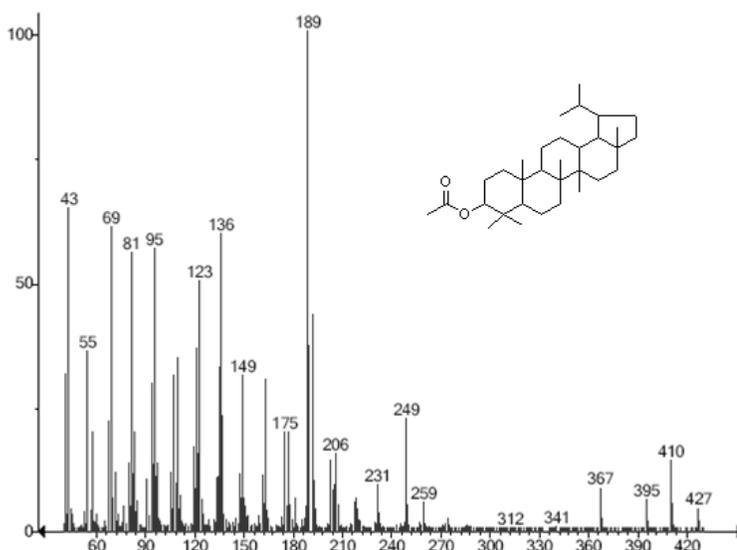
¹²³ MEDIAVILLA. 1984. METABOLITOS DE HONGOS SUPERIORES.

Figura 33. Espectro de masas de Lup-20(29)-en-3-ona



En el espectro de masas de este compuesto (Figura 33) se observa el ion molecular de m/z 424 que corresponde a la fórmula molecular $C_{30}H_{48}O$, así como un conjunto de iones m/z: 368 (10.3%) [$M^{++} - C_3H_4O$], 313 (19%) [$f^{++} - C_4H_7, rH$], 342 (6.9%) [$M^{++} - C_6H_{10}$], 205 (100%) [$M^{++} - C_{15}H_{23}O, rH$] y 109 (75.9%) [$M^+ - C_{15}H_{24}, rH$] (Anexo W).

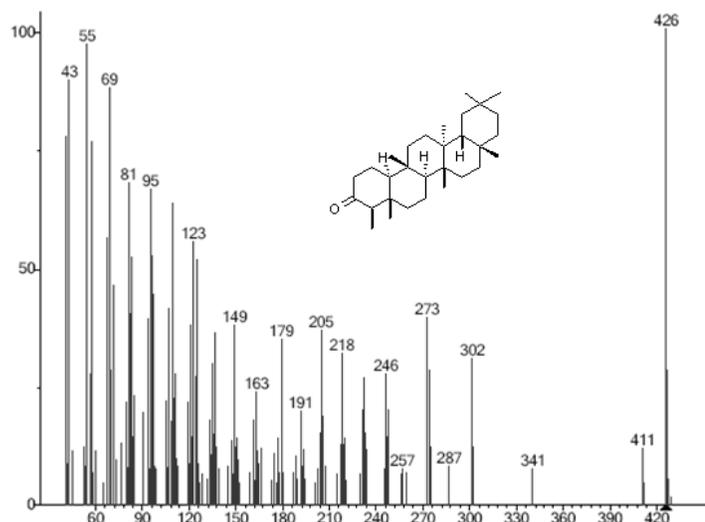
Figura 34. Espectro de masas de Lupan-3-ol acetato



En el espectro de masas de este compuesto (Figura 34) se observa el ion molecular a m/z 455 que corresponde a la fórmula molecular $C_{31}H_{51}O_2$, así como un conjunto de iones de m/z: 427 (5.2%) [$M^{++} - C_2H_3O$], 249 (24.1%) [$M^{++} -$

$C_{16}H_{29}$, rH], 206 (15.5%) [$M^{+} - C_{17}H_{28}O$], 123 (50%) [$f^{+} - C_6H_{11}$, rH] y 81(56.9%) [$f^{+} - C_9H_{16}$] (Anexo X).

Figura 35. Espectro de masas de Friedelan-3-ona



En el espectro de masas de este compuesto (Figura 35) se observa el ion molecular a m/z 426 que corresponde a la fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$, así como un conjunto de iones m/z: 411 (12.1%) [$M^{+} - \cdot CH_3$], 341 (8.6%) [$M^{+} - C_5H_9O$, rH], 123 (56.9%) [$M^{+} - C_{21}H_{35}O$, rH], 69 (87.9%) [$M^{+} - C_{25}H_{42}$, $\cdot CH_3$] y 55 (96.6%) [$M^{+} - C_{27}H_{47}O$, rH] (Anexo Y).

La friedelina o friedelan-3-ona es un triterpeno que tiene un esqueleto de anillo básico denominado friedelano, el mismo que está oxigenado en la posición tres, generalmente como cetona¹²⁴. De este compuesto no se conoce estudios sobre su actividad biológica pero se sabe que podría tener injerencia en la actividad antiulcerogénica¹²⁵ y posee actividad citotóxica en las líneas celulares PC3 y U251¹²⁶. Ensayos in vitro también indican la inhibición de la transcriptasa VIH-1 reversa¹²⁴. Este compuesto se ha encontrado en plantas medicinales como *Inula helenium* y en hongos como *Ganoderma applanatum*, *Gloeophyllum aepiarium*, *Mycocalia reticulata*, *Phellinus pomaceus* y *Phellodon ferrugineum*.

¹²⁴ VALENCIA. 1995. FUNDAMENTOS DE FITOQUÍMICA.

¹²⁵ OLIVEIRA y colaboradores. 1991. PHARMACOLOGICS AND TOXICOLOGICS EFFECTS OF TWO MAYTENUS SPECIES IN LABORATORY ANIMALS.

¹²⁶ REYES y colaboradores. 2004. CYTOTOXIC EFFECTS OF MAMMEA TYPE COUMARINS FROM *Calophyllum brasiliense*.

4.6. CUANTIFICACIÓN DE TRITERPENOS MAYORITARIOS

De fracción R2 no se cuantificaron los triterpenos porque en la fracción R1 se encontraron los mismos compuestos en una mayor concentración. La cuantificación de la fracción R1 se realizó utilizando el método de normalización de áreas^{127, 128}. Los cálculos se realizaron teniendo en cuenta el área promedio del estándar interno colesterol (Tabla 9). Tanto los triterpenos como el estándar interno se inyectaron por triplicado mediante la técnica CG-FID. El contenido de triterpenos en *C. lateritius* se relaciona en la Tabla 12.

Tabla 12. Cuantificación de los triterpenos mayoritarios presentes en el hongo *C. lateritius*

Compuesto	Tr (min)	Área del analito (Cuentas)	mg triterpeno/100 g extracto clorofórmico
Lanosterol	18.65	1052836	87.95
Lup-20,(29)-en-3-ona	22.05	554591	46.33
lupan-3-ol-acetato	22.19	411022	34.34
Friedelan-3-ona	22.79	449455	37.55

En la Tabla 13 se indican los triplicados de las áreas para cada triterpeno y su respectiva SD y %RSD que se encuentran en el rango de 2158 – 3658 y 0.27 – 0.89%, respectivamente, esto demuestra que el método es confiable dado que la precisión en las áreas es repetitiva.

Tabla 13. Repetibilidad de las áreas cromatográficas de triterpenos obtenidas por CG-FID

Compuesto	Área	Área	Área	Promedio	SD	%RSD
Lanosterol	1051776	1056008	1050725	1052836	2797	0.27
lup-20,(29)-en-3-ona	554007	552201	557564	554591	2729	0.49
lupan-3-ol-acetato	409852	415112	408103	411022	3648	0.89
Friedelan-3-ona	446997	450332	451036	449455	2158	0.48

4.7. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DEL CUERPO FRUCTÍFERO

Los hongos cultivados como *Agaricus bisporus*, *Pleurotus spp.*, *Lentinus edodes*, *Volvariella volvacea*, *Auricularia spp.* son muy consumidos por ser un alimento saludable, bajo en calorías, grasas, por contener ácidos grasos esenciales, proteínas vegetales (19 – 35 % en BS), vitaminas (riboflavina, tiamina, ácido ascórbico, vitamina D) y un alto contenido de minerales (especialmente fósforo y

¹²⁷ RIVERA y colaboradores. 2002. COMPOSICIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LA FRACCIÓN ESTERÓLICA DE ONCE HONGOS COLOMBIANOS.

¹²⁸ NIETO, I. y VALENCIA, M. 2002. ESTEROLES, ÁCIDOS GRASOS E HIDROCARBUROS DE LOS CUERPOS FRUCTÍFEROS DE *Ganoderma australe*.

potasio). Sin embargo, en la actualidad el consumo de hongos silvestres se ha incrementado especialmente en los países asiáticos y europeos por las características nutricionales, organolépticas (aroma y sabor)¹²⁹ y farmacológicas que estos poseen¹³⁰. Por estudios previos se determinó que la humedad afecta directamente los perfiles nutricionales del hongo¹³¹ y que depende del tiempo de cosecha, periodo de maduración y condiciones ambientales tales como humedad, temperatura en el periodo de crecimiento y condiciones de almacenamiento, aunque estas variables no se tuvieron en cuenta para esta investigación, así que no se puede predecir con exactitud su efecto sobre el macromiceto.

En este estudio se presenta por primera la composición nutricional del hongo silvestre *C. lateritius var. colombianus* y los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Composición química de *C. lateritius var. colombianus*

	Unidad de medida	Base húmeda	Base seca
Humedad	g/100g	89.63	-
Materia seca	g/100g	10.37	-
Ceniza	g/100g	1.41	13.64
Extracto etéreo	g/100g	0.31	2.95
Fibra cruda	g/100g	1.48	14.28
Proteína	g/100g	2.33	22.46
Extracto no nitrogenado	g/100g	4.84	46.67
Carbohidratos totales	g/100g	4.93	47.48
Vitamina A	UI/100g	273	-
Vitamina C	mg/100g	7.93	-
Energía	Kcal/100g	43	416
Nitrógeno	g/100g	0.37	3.59
Calcio	mg/100g	1.23	11.83
Fósforo	mg/100g	47.78	460.60
Magnesio	mg/100g	9.35	90.17
Potasio	g/100g	0.46	4.44
Azufre	mg/100g	6.92	66.71
Cobre	mg/100g	0.40	3
Manganeso	mg/100g	0.46	4
Cinc	mg/100g	1	6
Hierro	mg/100g	16	153
Acidez	mmolH ⁺ /100g	1.16	-
pH		5.7	-

En la Tabla 15 se muestra la composición química de algunos hongos silvestres¹²⁹ y estos resultados se comparan con los obtenidos en *C. lateritius*.

¹²⁹ MAGA, J. 1981. MUSHROOM FLAVOUR.

¹³⁰ BOBEK y colaboradores. 1991. CHOLESTEROL-LOWERING EFFECT OF THE MUSHROOM *Pleurotus ostreatus* IN HEREDITARY HYPERCHOLESTEROLEMIC RATS.

¹³¹ COLAK y colaboradores. 2009. NUTRITIONAL COMPOSITION OF SOME WILD EDIBLE MUSHROOMS.

Tabla 15. Comparación de la composición química de *C. lateritius* con otros hongos silvestres comestibles¹²⁹.

Hongo	Humedad	Ceniza	Grasa	Proteína	Carbohidratos Totales	Energía
<i>Cantharellus lateritius</i>	89.63	13.64	2.95	22.46	47.48	416.00
<i>Craterellus cornucopioides</i>	89.65	10.26	5.89	50.10	34	388.29
<i>Armillaria mellea</i>	83.82	3.16	6.08	21.12	70	417.64
<i>Lactarius volemus</i>	87.57	2.91	3.98	25.21	64	393.06
<i>Ramaria flava</i>	93.31	3.05	5.20	35.55	65	450.20
<i>Cantharellus cibarius</i>	87.92	7.78	1.40	34.17	57	367.88
<i>Hydnum repandum</i>	93.31	11.38	8.80	34.14	55	434.20

En general, la grasa bruta de hongos está formada por toda clase de compuestos lipídicos como ácidos grasos libres, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, esteroides, ésteres de esteroles y fosfolípidos. En este estudio se encontró que el hongo *C. lateritius* contiene menor cantidad de grasa que otros hongos silvestres (Tabla 15).

Los carbohidratos son los componentes mayoritarios en los cuerpos fructíferos de hongos, estos incluyen glucanos, mono- y disacáridos, polialcoholes, glucógeno y quitina¹³². Especies de *Pleurotus* contienen carbohidratos que van desde 46,6 hasta 81.8%¹³³, en *A. bisporus* es del 60%, y en *C. lateritius* es del 47.48%.

Recientemente, ha surgido un gran interés en la caracterización de los polisacáridos solubles en agua obtenidos de los cuerpos fructíferos de hongos¹³⁴ debido a su capacidad para inhibir el crecimiento de tumores. Una fracción importante de los polisacáridos ácidos designados como H51 tienen una fuerte actividad antitumoral y estructuralmente se componen de un esqueleto de residuos de glucosa $\beta(1,3)$, probablemente con ramificaciones de residuos de galactosa y manosa y también con azúcares ácidos.

El contenido de vitaminas A y C de la especie fúngica estudiada indica que este hongo es una buena fuente de antioxidantes y se puede emplear en complementos nutricionales, en el tratamiento del escorbuto, la diabetes, hipoglicemia y cáncer¹³⁵.

¹³² KURZTMAN. 1997. NUTRITION FROM MUSHROOMS, UNDERSTANDING AND RECONCILING AVAILABLE DATA.

¹³³ BANO y RAJARATHNAM. 1982. *Pleurotus* MUSHROOM AS A NUTRITIOUS FOOD, IN TROPICAL MUSHROOMS – BIOLOGICAL NATURE AND CULTIVATION METHODS.

¹³⁴ YOSHIOKA y colaboradores. 1975. ISOLATION, PURIFICATION AND STRUCTURE OF COMPONENTS FROM ACIDIC POLYSACCHARIDES OF *Pleurotus ostreatus*.

¹³⁵ KANG y colaboradores. 1998. IN VIVO DUAL EFFECTS OF VITAMIN C ON PARAQUAT-INDUCED LUNG DAMAGE: DEPENDENCE ON RELEASED METALS FROM THE DAMAGED TISSUE.

En *C. lateritius var. colombianus* el contenido de fibra es mayor al de *A. bisporus* (10.4%)¹³⁶, lo cual es importante porque la fibra se considera como un ingrediente importante en una dieta equilibrada y saludable ya que son los responsables de la disminución de colesterol. Anderson y Ward¹³⁷ informaron que los pacientes con diabetes que incluyen en su dieta una alta cantidad de fibra reducen sus requerimientos de insulina al día y se estabiliza su perfil de glucosa en la sangre¹³⁸. La fibra en los hongos se constituye por polisacáridos estructurales como hemicelulosas, sustancias pecticas y quitina (polímero N-acetil-D-glucosamina) que están presentes en las paredes celulares¹³⁹.

El contenido total de ceniza tiene dos constituyentes principales que son fósforo y potasio¹⁴⁰. Para *C. lateritius*, el contenido de ceniza fue mayor que en otros hongos silvestres (Tabla 15). El K es particularmente abundante y representa casi el 45% del contenido total de cenizas. Na y Ca están presentes en concentraciones aproximadamente iguales en todos los hongos con excepción de *L. edodes* en el que la concentración de Ca es especialmente alta.

El contenido total de proteína es mayor en *C. lateritius* que en algunas frutas (Tabla 16). Este parámetro está afectado por numerosos factores, como son el estado de desarrollo de hongo, la parte muestreada y el nivel de nitrógeno disponible en el sustrato¹⁴¹.

Tabla 16. Comparación de la composición química de *C. lateritius* con otros alimentos¹⁴²

Alimento	Proteína g/100 g	Fibra	Ceniza
<i>C. lateritius</i>	2.33	1.48	1.41
Naranja	0.7	0.7	0.5
Zanahoria	0.7	1.1	0.8
Leche de soja	3.8	-	0.4
Papaya	0.5	0.8	0.5
Piña	0.4	0.5	0.4

El análisis de la composición proximal del hongo indica que éste es rico en proteína cruda y carbohidratos, tiene un contenido moderado de fibra cruda y

¹³⁶ CHANG y MILES. 2004. MUSHROOM NUTRICEUTICALS.

¹³⁷ ANDERSON y WARD. 1979. HIGH-CARBOHYDRATE HIGH-FIBER DIETS FOR INSULIN-TREATED MEN WITH DIABETES MELLITUS.

¹³⁸ BOBEK y colaboradores. 1991. CHOLESTEROL-LOWERING EFFECT OF THE MUSHROOM *Pleurotus ostreatus* IN HEREDITARY HYPERCHOLESTEROLEMIC RATS.

¹³⁹ CHEUNG. 1997. DIETARY FIBRE CONTENT AND COMPOSITION OF SOME EDIBLE FUNGI DETERMINED BY TWO METHODS OF ANALYSIS.

¹⁴⁰ LI y CHANG. 1982. NUTRITIVE VALUE OF *Volvariella volvacea*, IN TROPICAL MUSHROOMS – BIOLOGICAL NATURE AND CULTIVATION METHODS.

¹⁴¹ FLEGG y MAW. 1977. MUSHROOMS AND THEIR POSSIBLE CONTRIBUTION TO WORLD PROTEIN NEEDS.

¹⁴² INSTITUTO COLOMBIANO DE BIENESTAR FAMILIAR. 2000. TABLA DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS COLOMBIANOS.

cenizas, y bajo contenido de grasa, los valores energéticos también son moderados, por lo que puede ser incluido en una dieta baja en calorías. Es una buena fuente de vitaminas y minerales, el potasio y el fósforo son los dos elementos predominantes en la porción mineral.

CONCLUSIONES

Se identificaron 8 esteroides tetracíclicos tipo colestano: NN1 (pregnano acetilado), 5,6-dihidroergosterol, estigmasterol, 7,22-ergostadienol, gama-ergostenol, gamasitosterol, ergosta-4,6,8-(14)-22-tetraen-3-ona y desmosterol, que se caracterizan por contener insaturaciones en las posiciones C5, C6, C7, C8(14), C22 y C24.

Se identificaron cuatro triterpenos: lanosterol, lup-20(29)-en-3-ona, lupan-3-ol-acetato y friedelan-3-ona.

El método soxhlet y la saponificación permitieron aislar ácidos grasos y mediante CG-FID se identificaron dos de tipo insaturado: linoleico, oleico y uno de tipo saturado: palmítico. El primer método permitió extraer una mayor cantidad de AG.

Del análisis cromatográfico realizado a la fracción de ácidos grasos obtenida de *C. lateritius*, se determinó que el contenido de ácidos grasos insaturados (oleico y linoleico) es mucho mayor que el contenido de ácidos grasos saturados (palmítico) lo cual es concordante con el perfil de ácidos grasos de basidiomicetos.

El análisis bromatológico de esta especie fúngica indicó que *Cantharellus lateritius* es una buena fuente alimenticia en términos de vitaminas, minerales, carbohidratos y grasa cruda.

RECOMENDACIONES

Emplear técnicas bidimensionales para determinar la estereoquímica de los compuestos 5,6-dihidroergosterol y 7,22-ergostadienol, ya que mediante CG-EM no fue posible diferenciarlos.

Determinar la actividad biológica de los metabolitos secundarios aislados de *C. lateritius*.

Realizar estudios multidisciplinarios en cuanto al cultivo de hongos silvestres y su correspondiente estudio químico, que permitirían introducir estas especies como un alimento para la población Nariñense.

Realizar el estudio bromatológico que incluya análisis de los aminoácidos en los diferentes estados de maduración del hongo, para determinar la variación de su composición nutricional.

Realizar un estudio fitoquímico para determinar otros metabolitos de interés farmacológico o industrial.

BIBLIOGRAFÍA

AGRAHAR-MURUGKAR, D. y SUBBULAKSHMI, G. 2005. NUTRITIONAL VALUE OF EDIBLE WILD MUSHROOMS COLLECTED FROM THE KHASI HILLS OF MEGHALAYA. *FOOD CHEMISTRY*. 89(4). 599-603

AIRTH, R. y FOERSTER, G. 1964. ENZYMES ASSOCIATED WITH BIOLUMINESCENCE IN *PANUS STYPTICUS LUMINESCENS* AND *PANUS STYPTICUS NON-LUMINESCENS*. *J. Bacteriol.* 88(5): 1372–1379.

ALEXOPOULOS, C., MIMS, C. y BLACKWELL, M. 1996. INTRODUCTORY MYCOLOGY. Fourth Edition. Ed. John Wiley & Sons, inc. NY.

ANDERSON, J. y WARD, K. 1979. HIGH-CARBOHYDRATE HIGH-FIBER DIETS FOR INSULIN-TREATED MEN WITH DIABETES MELLITUS. *Am. J. Clin. Nutr.* 32. 2312–2321.

BANO, Z. y RAJARATHNAM, S. 1982. *Pleurotus* MUSHROOM AS A NUTRITIOUS FOOD, IN TROPICAL MUSHROOMS – BIOLOGICAL NATURE AND CULTIVATION METHODS. Chinese University Press. Hong Kong. 363–380.

BARROS, L., CRUZ, T., BAPTISTA P., ESTEVINH L. y FERREIRA, I. 2008. WILD AND COMMERCIAL MUSHROOMS AS SOURCE OF NUTRIENTS AND NUTRACEUTICALS. *Food and Chemical Toxicology*. 46. 2742–2747

BENAVIDES, O. 2004. ESTUDIO QUÍMICO DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE DEL HONGO MACROMICETO *Lentinus edodes* (Shiitake). Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.

BERNAL, I. ANALISIS DE ALIMENTOS Vol. 2. 1998. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Colección Julio Carrizosa Valenzuela. Tercera edición. Colombia.

BERNARD, A. y TOKES, L. 1977. ELECTRON IMPACT INDUCED FRAGMENTATION OF CHOLESTEROL AND RELATED C-5 UNSATURATED STEROIDS. *J. Org. Chem.* 42. 725-731.

BIEMANN, K. 1962. MASS SPECTROMETRY ORGANIC CHEMICAL APPLICATIONS. New York. McGraw-Hill.

BOBEK, P., GINTER, E., JURCOVICOVA, M., y KUNIA, K. 1991. CHOLESTEROL-LOWERING EFFECT OF THE MUSHROOM *Pleurotus ostreatus*

IN HEREDITARY HYPERCHOLESTEROLEMIC RATS. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 35. 191–195.

BOHINSKI, R. 1991. *BIOQUÍMICA*. México. Pearson Educación.

BRONDZ, I., HOILAND, K. y EKEBERG, D. 2004. MULTIVARIATE ANALYSIS OF FATTY ACIDS IN SPORES OF HIGHER BASIDIOMYCETES: A NEW METHOD FOR CHEMOTAXONOMICAL CLASSIFICATION OF FUNGI. *J. Chrom. B*. 800. 303-307.

BROWER, V. 1988. NUTRACEUTICALS: POISED FOR A HEALTHY SLICE OF THE HEALTHCARE MARKET. *Nat. Biotechnol.* 16. 728–731.

BRUNETON, J. 2001. *FARMACOGNOSIA – FITOQUÍMICA – PLANTAS MEDICINALES*. Segunda ed. Editorial Acriba. Zaragoza – España.

BRUNS, T., WHITE, T. y TAYLOR J. 1991. FUNGAL MOLECULAR SYSTEMATICS. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22. 525 – 564.

CANALEJO, E., PEÑA, M., GÓMEZ, L. y RUIZ, J. 1996. A CATALOGUE OF FATTY ACIDS. *Nutr Hosp.* 11. 29-36.

CATER, N. y GRUNDY, S. 1998. LOWERING SERUM CHOLESTEROL WITH PLANT STEROLS AND STANOLS: HISTORICAL PERSPECTIVES. *J Postgrad Med.* 6-14.

CHALET, M., BOTTON, B. y BAVOY, J. 1990. SEASONAL FLUCTUATIONS OF GROWTH AND NITROGEN METABOLISM IN THE ECTOMYCORRHIZAL ASSOCIATION DOUGLAS *Fir-Laccaria laccata*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 28. 59-64.

CHANG, S. y MILES, P. 2004. *MUSHROOMS, CULTIVATION, NUTRITIONAL VALUE, MEDICINAL EFFECT, AND ENVIRONMENTAL IMPACT*. USA. CRC Press.

CHEGWIN, C. 2008. TRITERPENOS y ÁCIDOS GRASOS AISLADOS IDENTIFICADOS EN EL HONGO COMESTIBLE *Pleurotus Sajor-Cajú*". *J. Chil. Chem. Soc.* 2008. 53(2). 1515 – 1517.

CHEUNG, P. 1997. DIETARY FIBRE CONTENT AND COMPOSITION OF SOME EDIBLE FUNGI DETERMINED BY TWO METHODS OF ANALYSIS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 72. 255–260.

COLAK, A., FAIZ, O. y SESLI, E. 2009. NUTRITIONAL COMPOSITION OF SOME WILD EDIBLE MUSHROOMS. *Turkish Journal of Biochemistry*. 34 (1) 25–31.

CONNOR, W. 2000. IMPORTANCE OF N-3 FATTY ACIDS IN HEALTH AND DISEASE. *American Journal of Clinical Nutrition*. 71(1). 171S-175S.

CORDELL, G. 1995. CHANGING STRATEGIES IN NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY. *Phytochemistry*. 40(6). 1585- 1612.

COY, E. 2000. ESTUDIO QUÍMICO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DEL HONGO MACROMICETO *Laetiporus sulphureus*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá. 29-35.

CHRISTIE, W. 1972. IN TOPICS IN LIPID CHEMISTRY. 3. 171-197.

CUCAITA, E. y NIETO, I. 2007. ACIDOS GRASOS, ESTERES Y ESTEROLES DEL CUERPO FRUCTÍFERO DEL HONGO *Laccaria laccatta*. *Revista Colombiana de Química*. 36(3). 277 – 284.

DEWICK, P. 2002. MEDICINAL NATURAL PRODUCTS. A BIOSYNTHETIC APPROACH. New York, 167.

DÍEZ, V. y ALVAREZ, A. 2001. COMPOSITIONAL AND NUTRITIONAL STUDIES ON TWO WILD EDIBLE MUSHROOMS FROM NORTHWEST SPAIN. *Food Chemistry*. 75(4). 417-422.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA 2000. AUTHORIZES NEW CORONARY HEART DISEASE HEALTH CLAIM FOR PLANT STEROL AND PLANT STANOL ESTERS.

FLEGG P. y MAW, G. 1977. MUSHROOMS AND THEIR POSSIBLE CONTRIBUTION TO WORLD PROTEIN NEEDS. *Mushroom J*. 48. 395-403.

FLORES, R., CHÉ, G., GARCÍA, J., MALDONADO, M., BRAN, M., MORALES, O. y CÁCERES, R. 2006. *Cantharellus y Craterellus* EN GUATEMALA: DIVERSIDAD Y ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE SIETE ESPECIES REPRESENTATIVAS EN EL PAÍS. Instituto de investigaciones químicas y biológicas. Facultad de ciencias químicas y farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. *Revista científica. Edición especial*. 4(1). 36 – 41.

FRAGA, B., GONZÁLEZ, P., R. y HERNÁNDEZ, M. 1998. THE BIOTRANSFORMATION OF MANOYL OXIDE DERIVATIVES BY *Gibberella fujikuroi*: THE FUNGAL EPIMERIZATION OF AN ALCOHOL GROUP. *Tetrahedron*. 54(22). 6159-6168.

FRAZER, J. 1898. PAUSANIAS'S DESCRIPTION OF GREECE (TRANSL.). Vol. I. MacMillan. London.

GARCÍA, C. 2002. EL CULTIVO DE LOS HONGOS SUPERIORES COMESTIBLES, UN RECURSO DE DESARROLLO INELUDIBLE EN EL SIGLO XXI. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. 68. 753 – 776.

GONZALES, A., LEÓN, F., RIVERA, A., PADRÓN, J., GONZÁLEZ-PLATA, J., ZULUAGA, J., QUINTANA, J., ESTÉVEZ, F. y BERMEJO, J. 2002. NEW LANOSTANOLIDS FROM THE FUNGUS *Ganoderma concinna*. J.Nat. Prod. 65 (3). 417-421.

GRANDMOUGIN-FERJANI, A., DALPÉ, Y., HARTMANN, M., LARUELLE, F. y SANCHOLLE, M. 1999. STEROL DISTRIBUTION IN ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI. Phytochemistry. 50. 1027-1031.

GROS, E., POMILIO, A., SELDES, A. y BURTON, G. 1985. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS NATURALES. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Argentina.

GUO, L., LIN, J. y LIN, J. 2007. NON-VOLATILE COMPONENTS OF SEVERAL NOVEL SPECIES OF EDIBLE FUNGI IN CHINA. Food Chemistry. 100. 643–649.

GUZMÁN, M., ZÚÑIGA, N., SANTAFÉ, G., TORRES, O. y ANGULO, A. 2009. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ESTUDIO QUÍMICO DEL HONGO *Pleurotus djamor* RECOLECTADO EN CÓRDOBA. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Córdoba. 2. 64 – 69.

HAMILTON, R. y HAMILTON, S. 1987. THIN LAYER CHROMATOGRAPHY. Analytical Chemistry by open learning. London.

HANSON, J. 1977. TERPENOLIDS AND STEROIDS. Vol. 7. The Chemical Society. London.

HAWKSWORTH, D. 2001. MUSHROOMS: THE EXTENT OF THE UNEXPLORED POTENTIAL. Int. J. Med. Mushrooms. 13. 333–337.

HOLMAN, R. 1976. SIGNIFICANCE OF ESSENTIAL FATTY ACIDS IN HUMAN NUTRITION, IN LIPIDS. Vol. I. New York. 215–226,

HURST, J. 2008. FUNCTIONAL FOODS AND NUTRACEUTICALS. Second Edition. CRC Press. USA.

IKEKAWA, T. 2001. BENEFICIAL EFFECTS OF EDIBLE AND MEDICINAL MUSHROOMS ON HEALTH CARE. Int. J. Med. Mushrooms. 3. 291–298.

INSTITUTO COLOMBIANO DE BIENESTAR FAMILIAR. 2000. TABLA DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS COLOMBIANOS. 7ª Edición. Colombia.

JIA, X., EBINEA, N., WANGB, Y, AWADC, A. y JONES, P. 2006. EFFECTS OF DIFFERENT PHYTOSTEROL ANALOG ON COLONIC MUCOSAL CELL PROLIFERATION IN HAMSTERS. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 17. 396 – 401.

JONG. S. y BIRMINGHAM, J. 1992. MEDICAL BENEFITS OF DE MUSHROOM *Ganoderma*. *Adv. Appl. Microbiology*. 37. 101-134.

KALAC, P. 2009. CHEMICAL COMPOSITION AND NUTRITIONAL VALUE OF EUROPEAN SPECIES OF WILD GROWING MUSHROOMS: A REVIEW. *Food Chemistry*. 113. 9–16

KANG, S., JANG, Y. y PARK, H. 1998. IN VIVO DUAL EFFECTS OF VITAMIN C ON PARAQUAT-INDUCED LUNG DAMAGE: DEPENDENCE ON RELEASED METALS FROM THE DAMAGED TISSUE. *Free Radic. Res*. 28. 93-107.

KAVANAGH, K. 2005. FUNGI: BIOLOGY AND APPLICATIONS. John Wiley & Sons. Great Britain.

KAWAGISHI, H., KATSUMI, R., SAZAWA, T., MIZUNO, T., HAGIWARA, T. y NAKAMURA T. 1988. CYTOTOXIC STEROIDS FROM THE MUSHROOM *Agaricus blazei*. *Phytochemistry*. 27. 2777-2779.

KŁOSOWSKI, G., CZUPRYŃSKI, B. y WOLSKA, M. 2006. CHARACTERISTICS OF ALCOHOLIC FERMENTATION WITH THE APPLICATION OF *Saccharomyces cerevisiae* YEASTS: AS-4 STRAIN AND I-7-43 FUSANT WITH AMYLOLYTIC PROPERTIES. *Journal of Food Engineering*. 76(4). 500-505.

KURZTMAN R. 1997. NUTRITION FROM MUSHROOMS, UNDERSTANDING AND RECONCILING AVAILABLE DATA. *Mycoscience*. 38. 247-253.

LAGARDA, M., GARCÍA, G. y FARRÉ, R. 2006. ANALYSIS OF PHYTOSTEROLS IN FOODS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41. 1486 – 1496.

LI, G. y CHANG, S. 1982. NUTRITIVE VALUE OF *Volvariella volvacea*, IN TROPICAL MUSHROOMS – BIOLOGICAL NATURE AND CULTIVATION METHODS. Chinese University Press. Hong Kong. 199–219.

LOCK, O. 1994. INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA: MÉTODOS DE ESTUDIO DE PRODUCTOS NATURALES. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial Lima. Perú.

LORENZEN, A. 1998. BASIDIOMYCETES AS A SOURCE FOR NEW BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS. *Current Organic Chemistry*. 2 701-710

LUQUE, E. 1995. BIOQUÍMICA DESCRIPTIVA. Universidad de Nariño.

MAGA, J. 1981. MUSHROOM FLAVOUR. *J. Agric. Food Chem.* 29(1). 1-4.

MAKIN, H. y GOWER, D. 2010. STEROID ANALYSIS. Springer. London.

MANGAS, R., MONTES, R., BELLO, A. y NIVAL, A. 2008. CARACTERIZACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DEL EXTRACTO APOLAR DE LAS HOJAS DE *Clusia minor* L. *Lat. Am. J. Pharm.* 27(5). 747-51.

MARCUS, A., SAFIER, L., ULLMAN, H., BROEKMAN, J., ISLAM, N., OGLESBY, T. y GORMAN, R. 1984. 12S,20-DIHYDROXYICOSATETRAENOIC ACID: A NEW ICOSANOID SYNTHESIZED BY NEUTROPHILS FROM 12S-HYDROXYICOSATETRAENOIC ACID PRODUCED BY THROMBIN- OR COLLAGEN-STIMULATED PLATELETS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 81(3). 903-907.

MCLAFFERTY, F. y TURECEK, F. 1993. INTERPRETATION OF MASS SPECTRA. California: University Science Books.

MEDIAVILLA, L. 1984. METABOLITOS DE HONGOS SUPERIORES. Universidad de la Laguna. España.

MONCADA, B. y FORERO, E. 2006. EL GÉNERO *Pseudocyphellaria* vain. (*Lobariaceae* - ASCOMYCETES LIQUENIZADOS) EN COLOMBIA. *Caldasia*. 28(2). 197 - 215.

MOTHANA, R., AWADH, N., JANSEN, R., WEGNER, U., MENDEL, R. y LINDEQUIST, U. 2003. ANTIVIRAL LANOSTANOID TRITERPENES FROM DE FUNGUS *Ganoderma pfeifferi*. *Fitoterapia*. 74.177-180.

NELSON, D. y COX, M. 2000. LEHNINGER PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY. Fourth Edition. Worth Publishers. New York.

NIETO, I. y ÁVILA, I. 2008. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y COMPUESTOS TRITERPENOIDES DEL CUERPO FRUCTÍFERO DE *Suillus luteus*. *Rev.Colomb.Quim.* 37(3).

NIETO, I. y VALENCIA, M. 2002. ESTEROLES, ÁCIDOS GRASOS E HIDROCARBUROS DE LOS CUERPOS FRUCTÍFEROS DE GANODERMA AUSTRAL. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 47(4).

NUPAN, J. y RIASCOS, J. 2008. INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES EN EL PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE *Ischnocolus* sp₁ (Araneae: Mygalomorphae). Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Nariño.

OLIVEIRA, M., MONTEIRO, M., MACAUBAS, C., PEREIRA, V. y CARLINI, E. 1991. PHARMACOLOGICS AND TOXICOLOGICS EFFECTS OF TWO MAYTENUS SPECIES IN LABORATORY ANIMALS. *J. Ethnopharmacol.* 34(1). 29-41.

OSBORNE, D. 1986. ANÁLISIS DE LOS NUTRIENTES DE LOS ALIMENTOS. Ed. Acribia. España.

OSORIO, H. 2004. ESTUDIO COMPARATIVO POR CG-EM DE LAS FRACCIONES ESTERÓLICAS DEL HONGO *Pleurotus sajor caju* CULTIVADO EN DESECHOS DEL CAFÉ. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.

PEDNEAULT, K., ANGERS, P., GOSSELIN, A. y TWEDDELL, R. 2006. FATTY ACID COMPOSITION OF LIPIDS FROM MUSHROOMS BELONGING TO THE FAMILY *Boletaceae*. *Mycological Research.* 110. 1179–1183.

PETROVA, A., ALIPIEVA, K., KOSTADINOVA, E., ANTONOVA, D., LACHEVA, M., GJOSHEVA, M., POPOV, S. y BANKOVA, V. 2007. CG-EM STUDIES OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF TWO INEDIBLE MUSHROOMS OF THE GENUS *Agaricus*. *Chemistry Central Journal.* 1. 33.

RAMANA, M., MOHAN, E. y SADHUKHAN, A. CYCLOSPORIN-A PRODUCTION BY *Tolypocladium inflatum* USING STATE SOLID FERMENTATION. 1999. *Process Biochemistry.* 34(3). 269-280.

REYES, R., ESTRADA, E., RAMÍREZ, T., AMEKRAZB, B., AUMELASB, A., JANKOWSKIB, C. y VÁZQUEZ, M. 2004. CYTOTOXIC EFFECTS OF MAMMEA TYPE COUMARINS FROM *Calophyllum brasiliense*. *Life Sciences.* 75. 1635–1647.

RIBEIRO, B., GUEDES DE PINHO, P., ANDRADE, P., BAPTISTA, P. y VALENTÃO, P. 2009. FATTY ACID COMPOSITION OF WILD EDIBLE MUSHROOMS SPECIES: A COMPARATIVE STUDY. *Microchemical Journal.* 93(1). 29-35

RIVERA, A., BENAVIDES, O. L. y RIOS-MOTTA, J. 2009. (22E)-ERGOSTA-6,22-DIENE-3,5,8-TRIOL: A NEW POLYHYDROXYSTEROL ISOLATED FROM *Lentinus edodes* (SHIITAKE). *Natural Product Research.* 23(3). 293 — 300

RIVERA, A., OSORIO, H., RÍOS-MOTTA, J., NIETO, I. y LAVERDE, C. 2005. DEHIDROERGOSTEROL: UN ARTEFACTO GENERADO DURANTE EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ESTEROLES EN EL HONGO *Pleurotus sajor-caju*. Revista Colombiana de Química. 34(2). 117 – 125.

RIVERA, A., NIETO, I. y VALENCIA, M. 2002. COMPOSICIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LA FRACCIÓN ESTERÓLICA DE ONCE HONGOS COLOMBIANOS. Revista Colombiana de Química. 31. 95.

ROMO, A. 2006. QUÍMICA DE LA FLORA MEXICANA. Investigaciones en el instituto de Química. UNAM. México.

SIJTSMA L. y DE SWAAF, M. 2004. BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION AND APPLICATIONS OF THE OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACID DOCOSAHEXAENOIC ACID. Appl Microbiol Biotechnol. 64. 146-153.

SKOOG, D., HOLLER, J. y NIEMAN, T. 2001. “PRINCIPIOS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL”. Mc Graw-Hill. España.

TEE, S. 2006. SETAS, IDENTIFICACIÓN Y RECOLECCIÓN. Primera edición. Editorial Parragón.

TEUNISSEN, P., SWARTS, H. Y FIELD, J. THE DE NOVO PRODUCTION OF DROSOPHILIN A (TETRACHLORO-4-METHOXYPHENOL) AND DROSOPHILIN A METHYL ETHER (TETRACHLORO-1,4-DIMETHOXYBENZENE) BY LIGNINOLYTIC BASIDIOMICETES. 1997. Appl Microbiol Biotechnol. 47. 695-700

THE SCIENTIFIC ASSOCIATION DEDICATED TO ANALYTICAL EXCELLENCE (AOAC). 1990. 16th Edition. Gaithersburg, M.D.

TOKES, G. y DJERASSI, C. 1968. ANTIMICROBIAL STEROIDS FROM THE FUNGUS *Fomitopsis pinicola*. J Chem. Soc. 90(20). 5465.

TSAI, S., HUANG, S., LO, S., WU, T., LIAN, P., y MAU, J. 2009. FLAVOUR COMPONENTS AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SEVERAL CULTIVATED MUSHROOMS. Food Chemistry. 113. 578-584.

URIBE, J. 1998. ASPECTOS GENERALES SOBRE BIOLOGÍA DE LOS HONGOS. PRODUCCIÓN DE VITAMINA D₂ A PARTIR DE HONGOS MACROMICETOS: ASPECTOS CIENTÍFICOS, TÉCNICOS Y ECONÓMICOS. CYTED-COLCIENCIAS. Bogotá.

VALENCIA C. 1995. FUNDAMENTOS DE FITOQUÍMICA. Editorial Trillas. México.

VALLE, H. y SANTAFÉ, G. 2009. ESTEROLES LIBRES DE LA ESPONJA MARINA *Mycale laevis*. *Vitae*. 16(1).

YAOITA, Y., AMEMIYA, K., OHNUMA, H., MASAKI, A., MATSUKI, T. y KIKUCHI, M. 1998. STEROL CONSTITUENTS FROM EDIBLE MUSHROOM. *Chem. Pharm. Bull.* 46(6). 944 – 950

YOSHIOKA, Y., EMORI, M., IKEKAWA, J. y FUKUOKA, F., 1975. ISOLATION, PURIFICATION AND STRUCTURE OF COMPONENTS FROM ACIDIC POLYSACCHARIDES OF *Pleurotus ostreatus*. *Carbohydrate Res.* 43. 305–320.

YILMAZ, N., SOLMAZ, M., TÜRKEKUL I. y ELMASTAS M. 2006. FATTY ACID COMPOSITION IN SOME WILD EDIBLE MUSHROOMS GROWING IN THE MIDDLE BLACK SEA REGION OF TURKEY. *Journal Food chemistry.* 99(1).168-174.

YUE, J., CHEN, S., LIN, Z. y SUN, H. 2001. STEROLS FROM THE FUNGUS *Lactarium volemus*. *Phytochemistry.* 56. 801 – 806.

WASSINK, E. y KUWABARA, S. 1966. BIOLUMINESCENCE IN PROGRESS. Princeton Univ. Press. New Jersey.

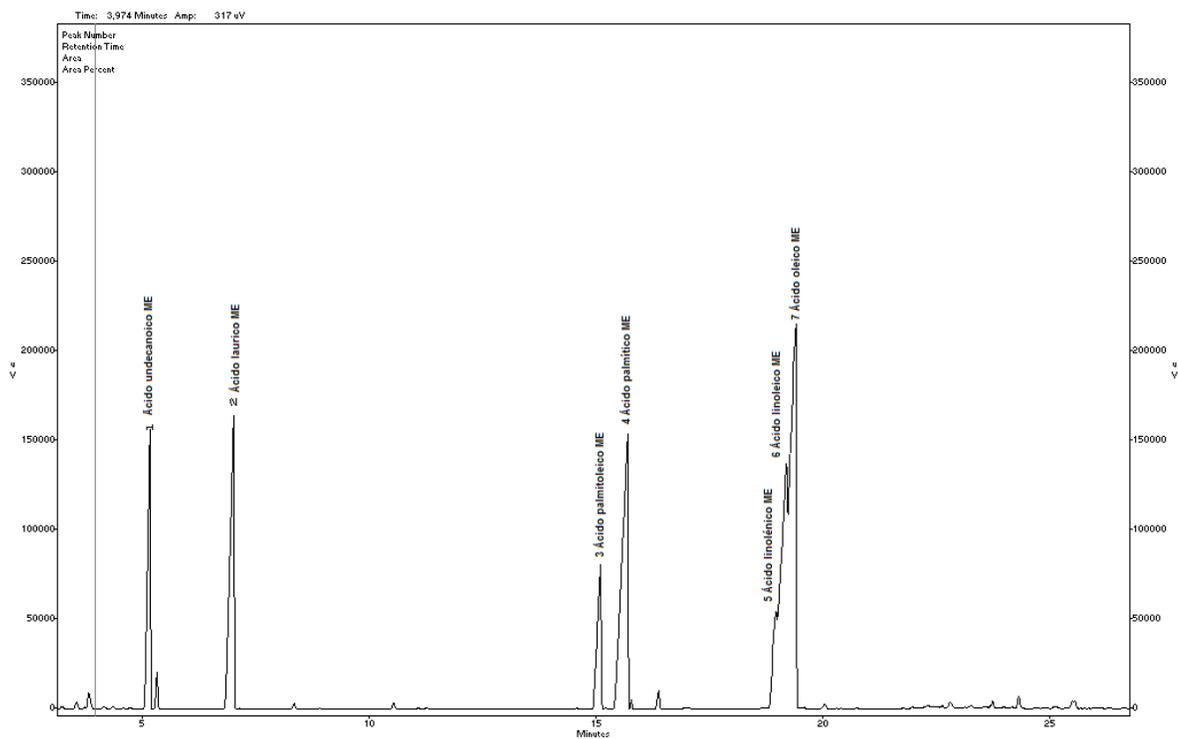
WEST, E. 1990. BIOQUÍMICA MÉDICA. Cuarta edición. Ed. Interamericana. México.

ZHOU, S. y GAO, Y. 2002. THE IMMUNOMODULATING EFFECTS OF *Ganoderma lucidum*. *Int. J. Med. Mushrooms.* 4. 1–11.

ZULUAGA, J., PÉREZ, C., ANGULO, A., TORRES, O. y SANTAFÉ, G. 2007. QUÍMICA Y ACTIVIDADES ANTIOXIDANTE Y BACTERICIDA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL HONGO *Ganoderma lucidum*. *Scientia et Technica.* 33. 329-332.

ANEXOS

Anexo A. Cromatograma de los metil ester de acidos grasos (FAMES)



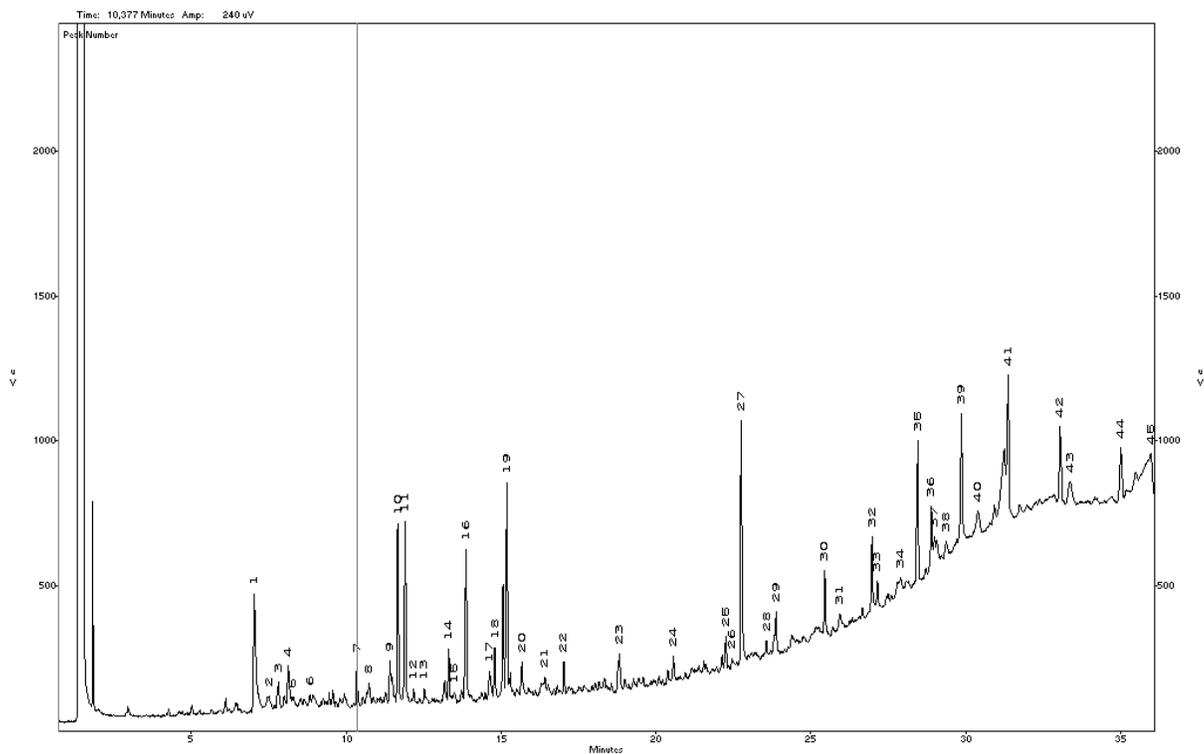
Anexo B. Tiempos de retención de los Estándares de Metil Ésteres de Ácidos Grasos (FAMES)

Pico	Estándar	t_r (min)
1	Ácido undecanoico ME	5.183
2	Acido laurico ME	7.025
3	Acido palmitoleico ME	15.132
4	Acido palmítico ME	15.716
5	Acido linolénico ME	18.990
6	Ácido linoléico ME	19.224
7	Ácido oleico ME	19.432

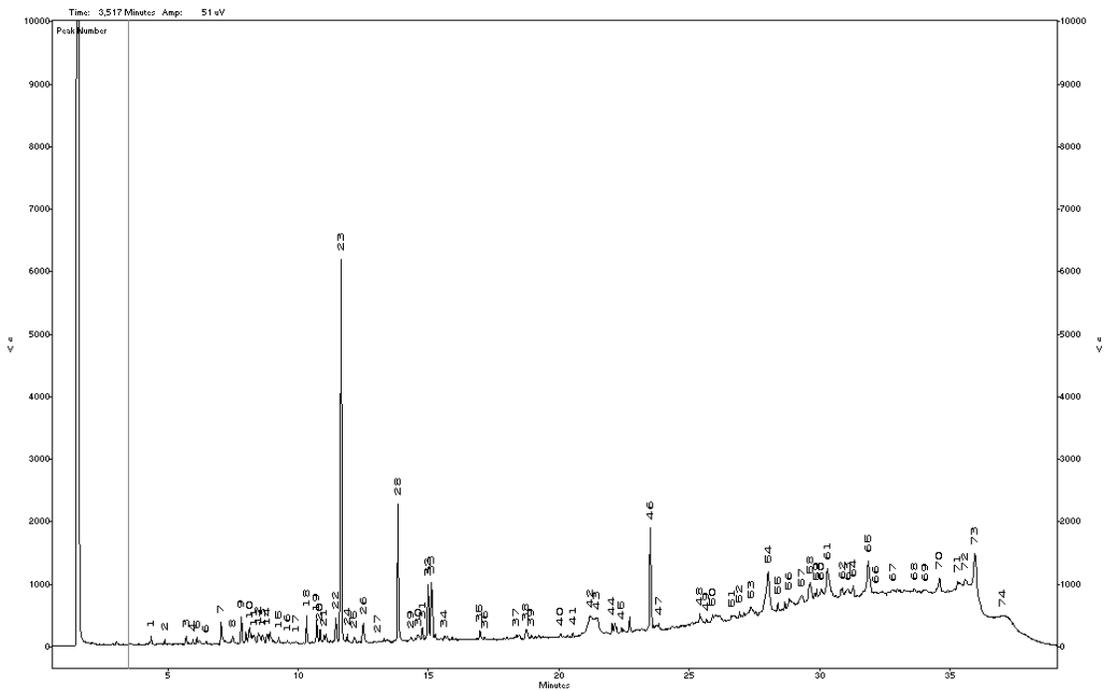
Anexo C. Fracciones obtenidas por cromatografía en columna con mezcla eluyente benceno:acetato de etilo

Nombre	Fracción	Viales con rf similar	Peso de la fracción (mg)	Relación de la mezcla eluyente benceno:acetato de etilo
F1	R1	1	6	9:1
F2		2	8	9:1
F3		3	7	9:1
F4		4 – 8	24	9:1
F5		9 – 17	63	9:1
F6	R2	18 – 25	38	9:1
F7		26 – 49	26	9:1
F8		50 – 57	4	9:1
F9		58 – 65	6	9:1
F10		66 – 81	12	9:1

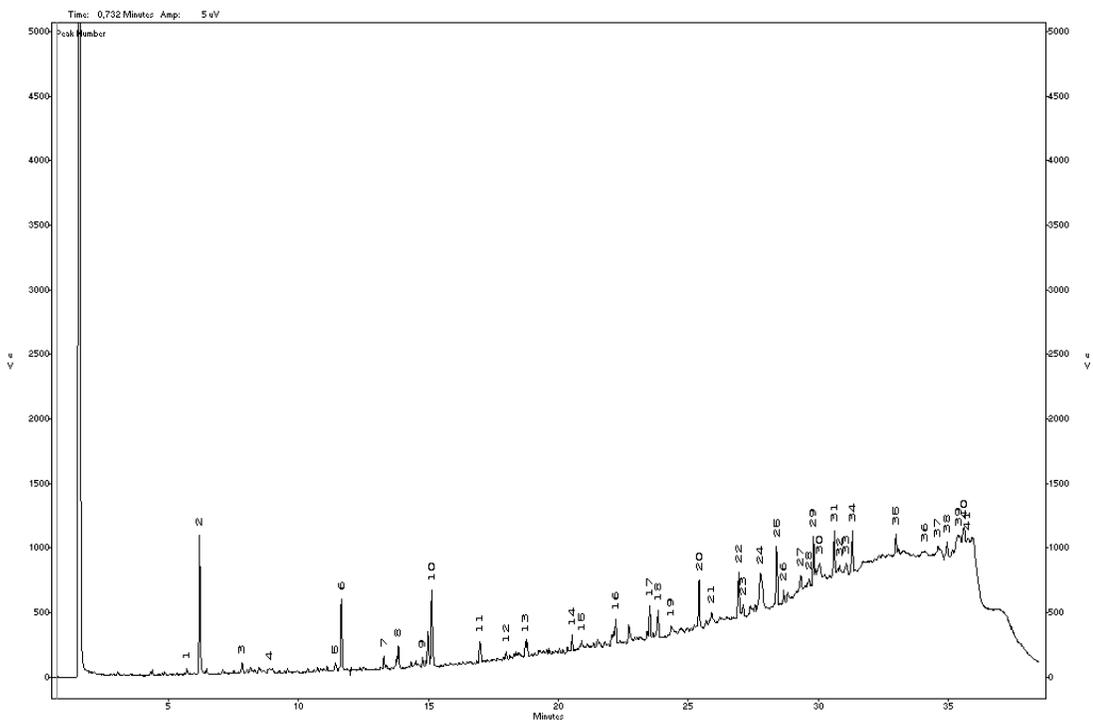
Anexo D. Cromatograma de la fracción F1



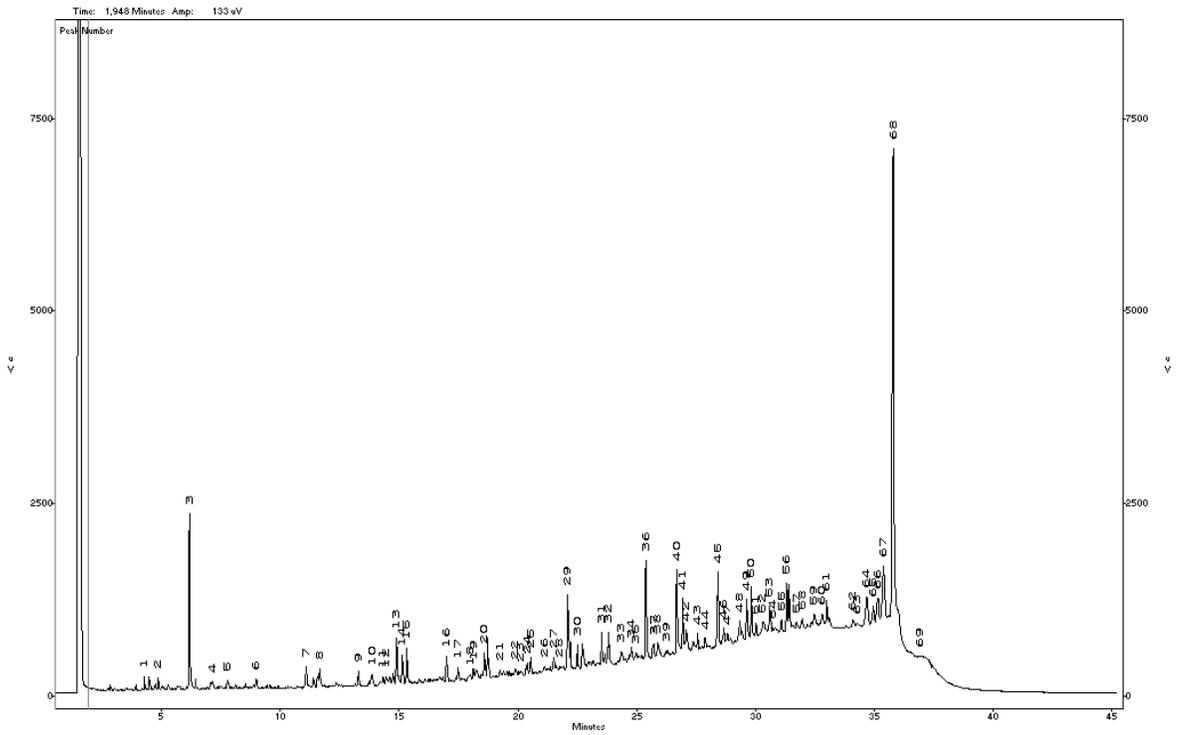
Anexo E. Cromatograma de la fracción F2



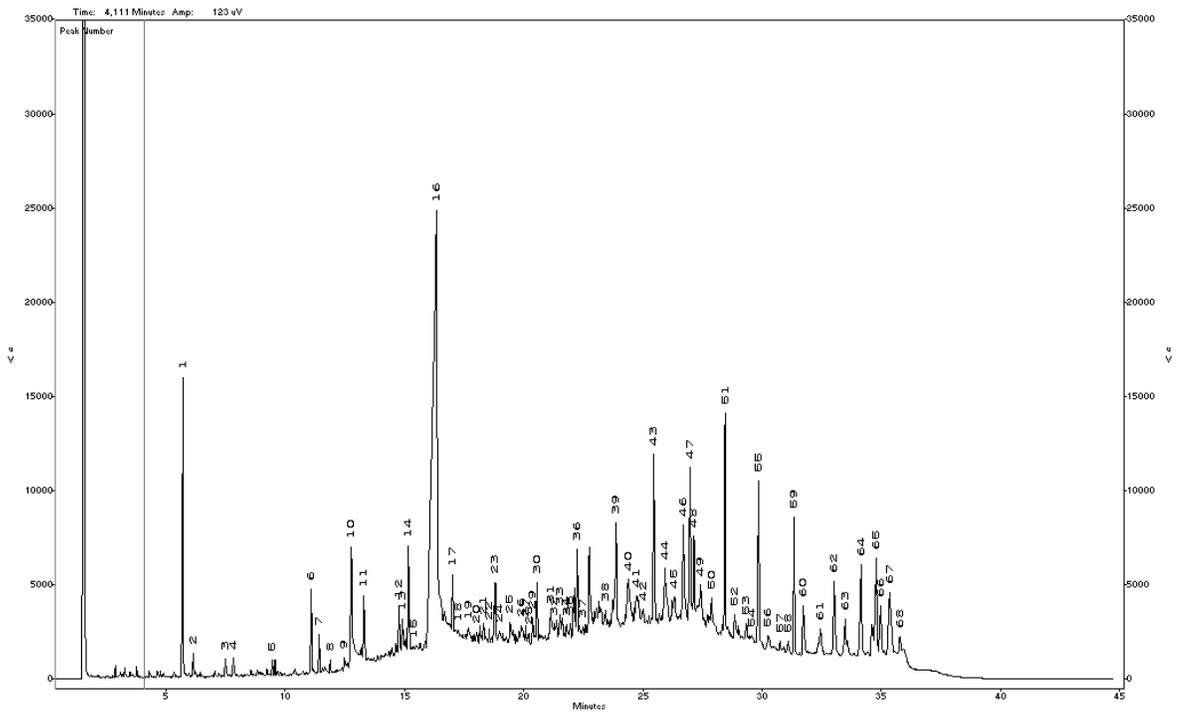
Anexo F. Cromatograma de la fracción F3



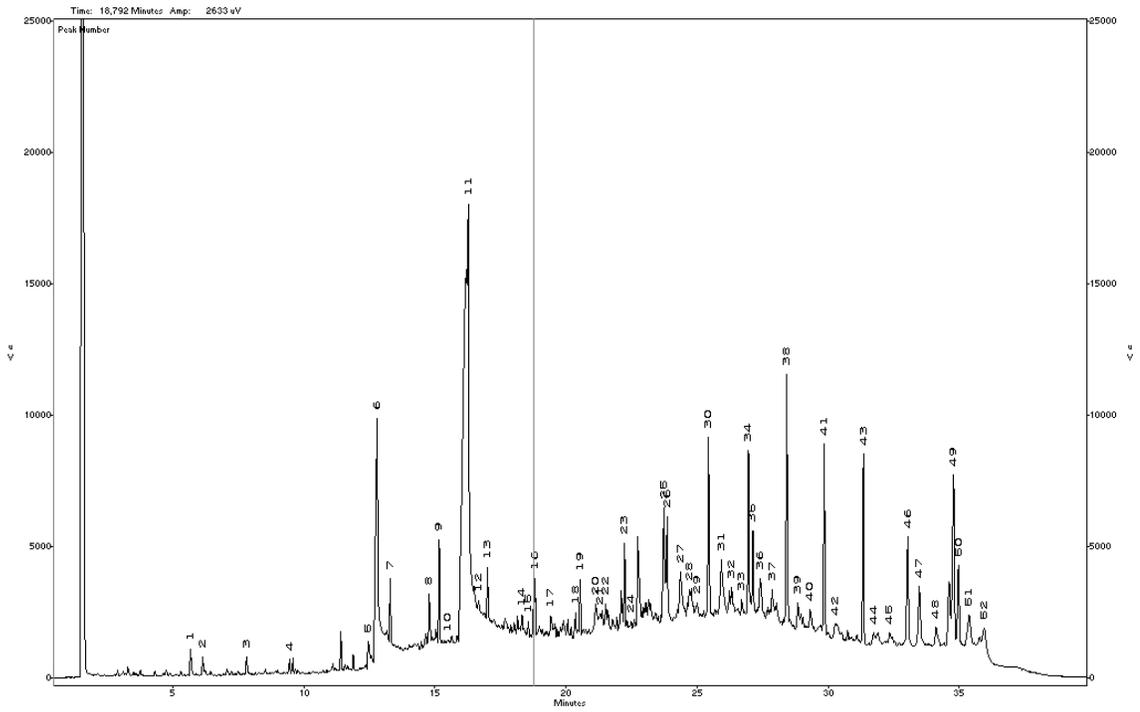
Anexo G. Cromatograma de la fracción F4



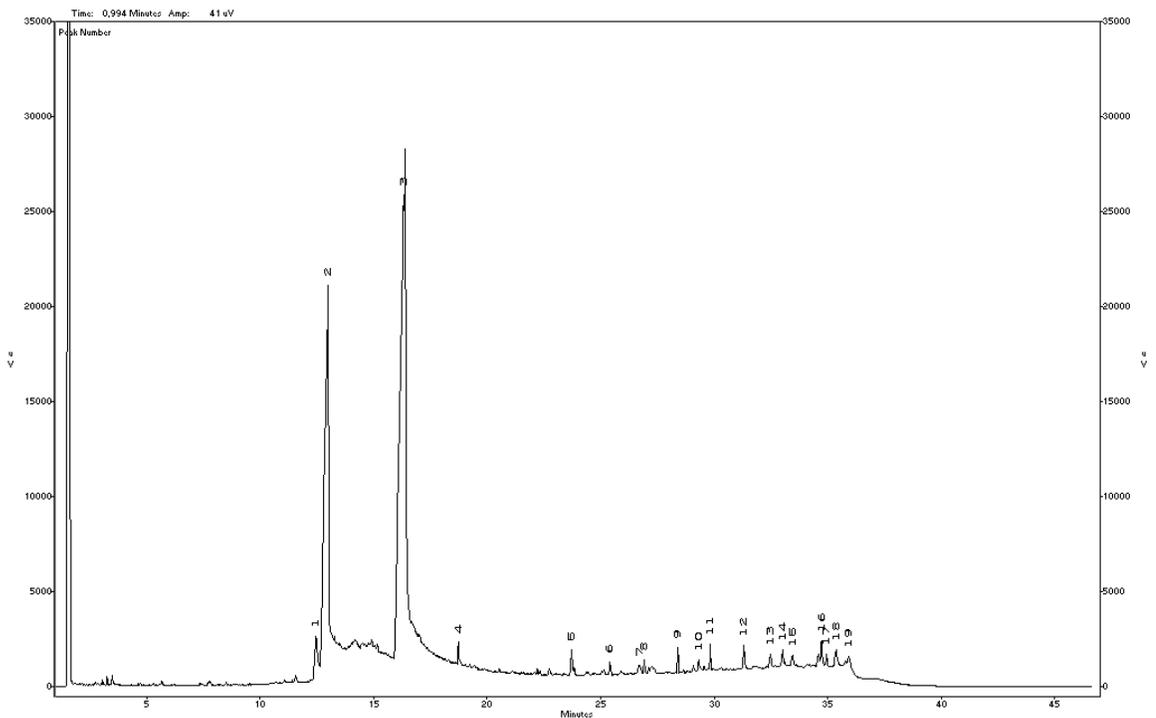
Anexo H. Cromatograma de la fracción F5



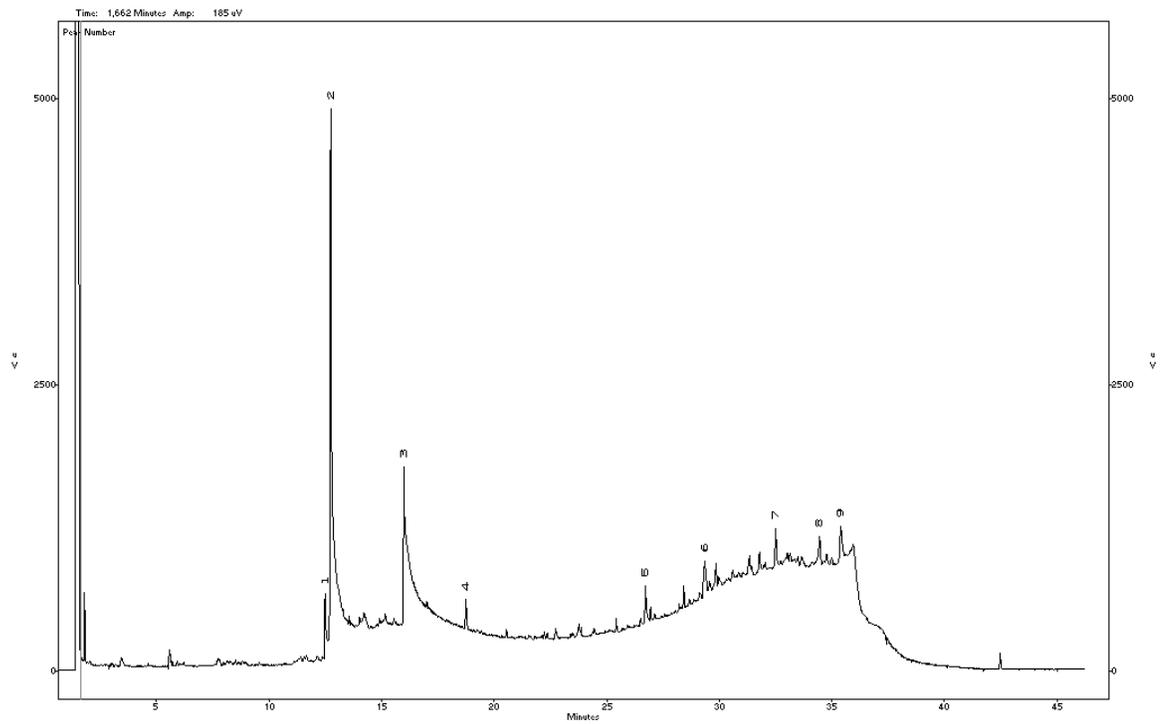
Anexo I. Cromatograma de la fracción F6



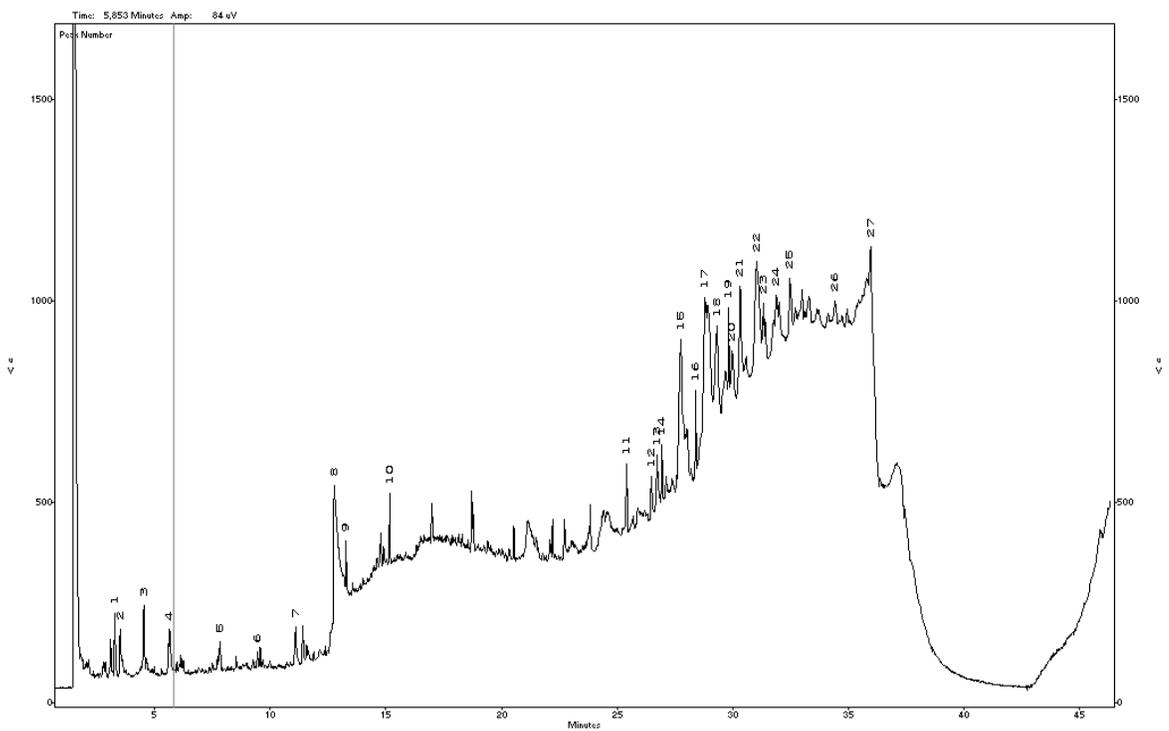
Anexo J. Cromatograma de la fracción F7



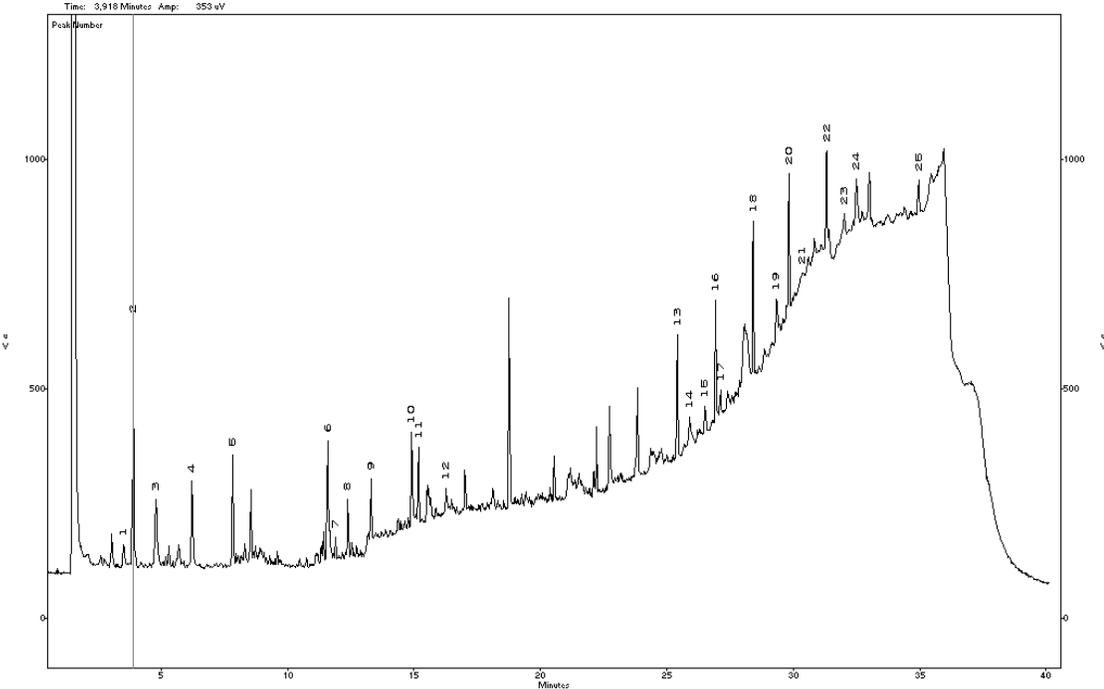
Anexo K. Cromatograma de la fracción F8



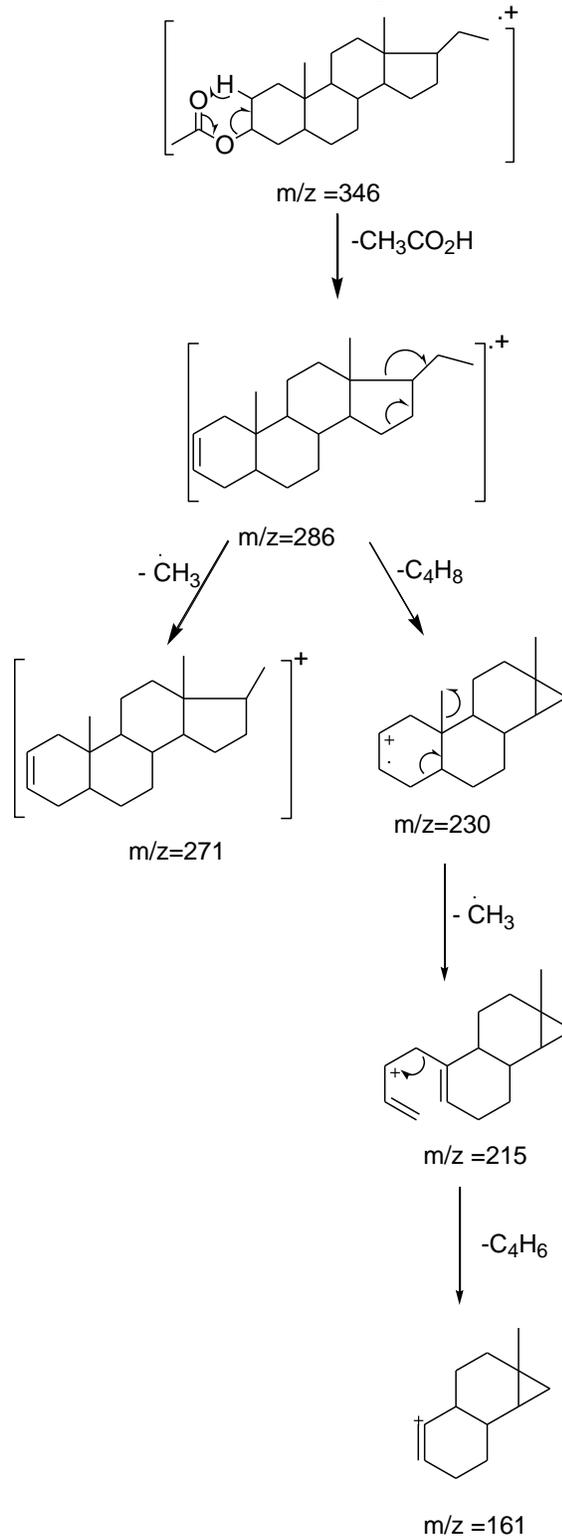
Anexo L. Cromatograma de la fracción F9



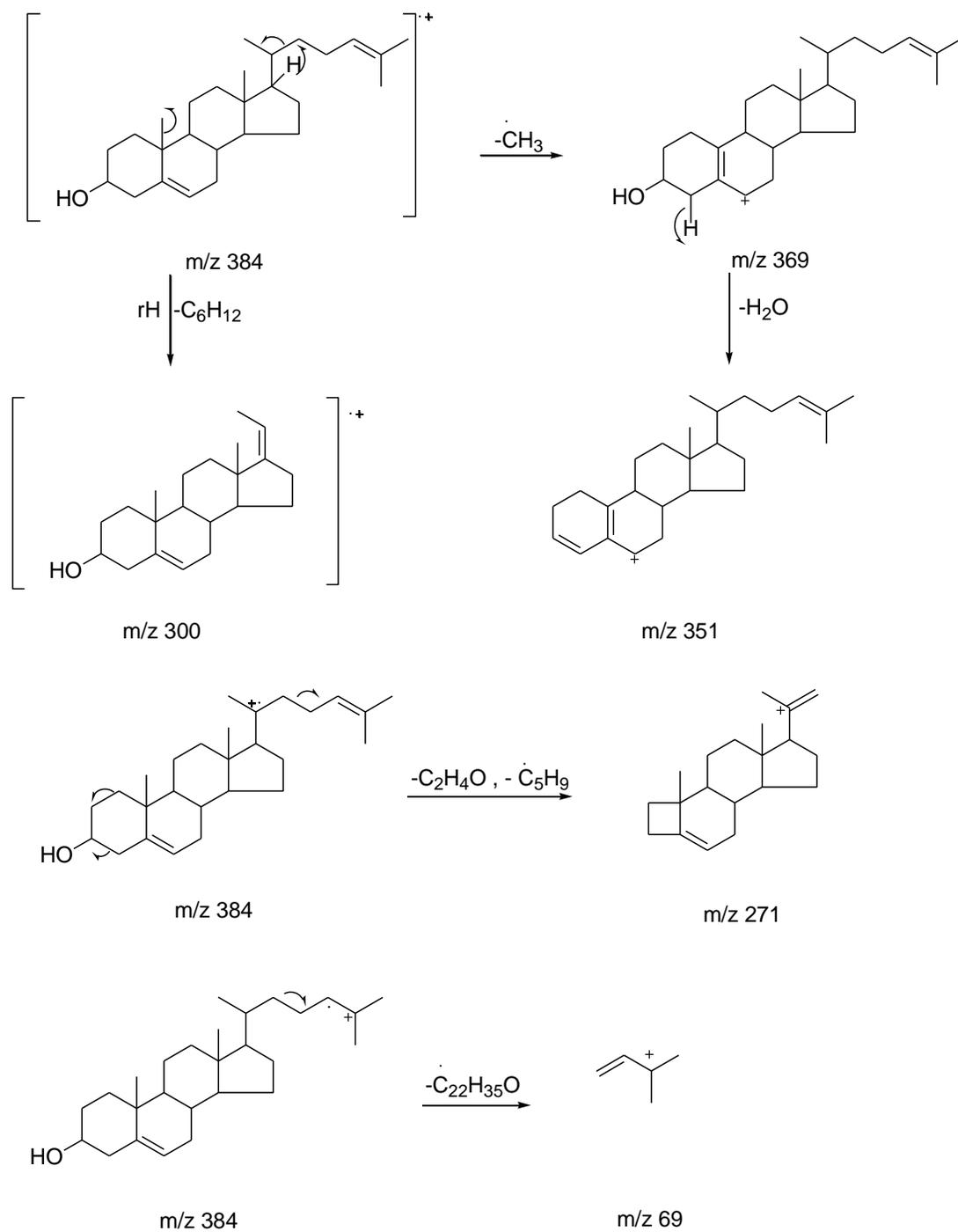
Anexo M. Cromatograma de la fracción F10



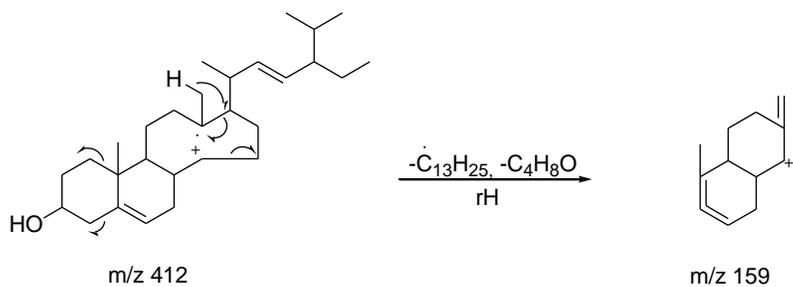
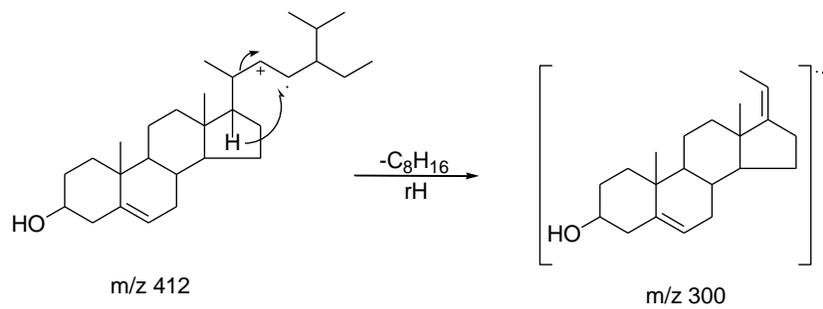
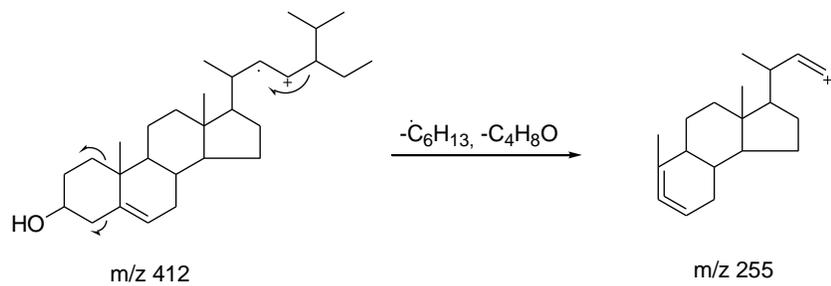
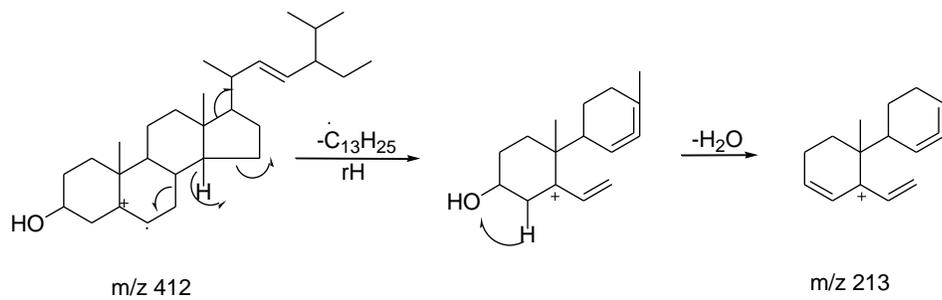
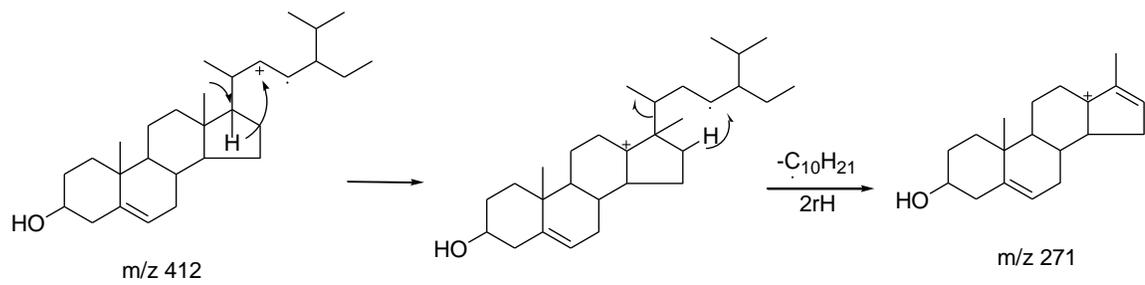
Anexo N. Fragmentaciones de masas NN1-Pregnano acetilado



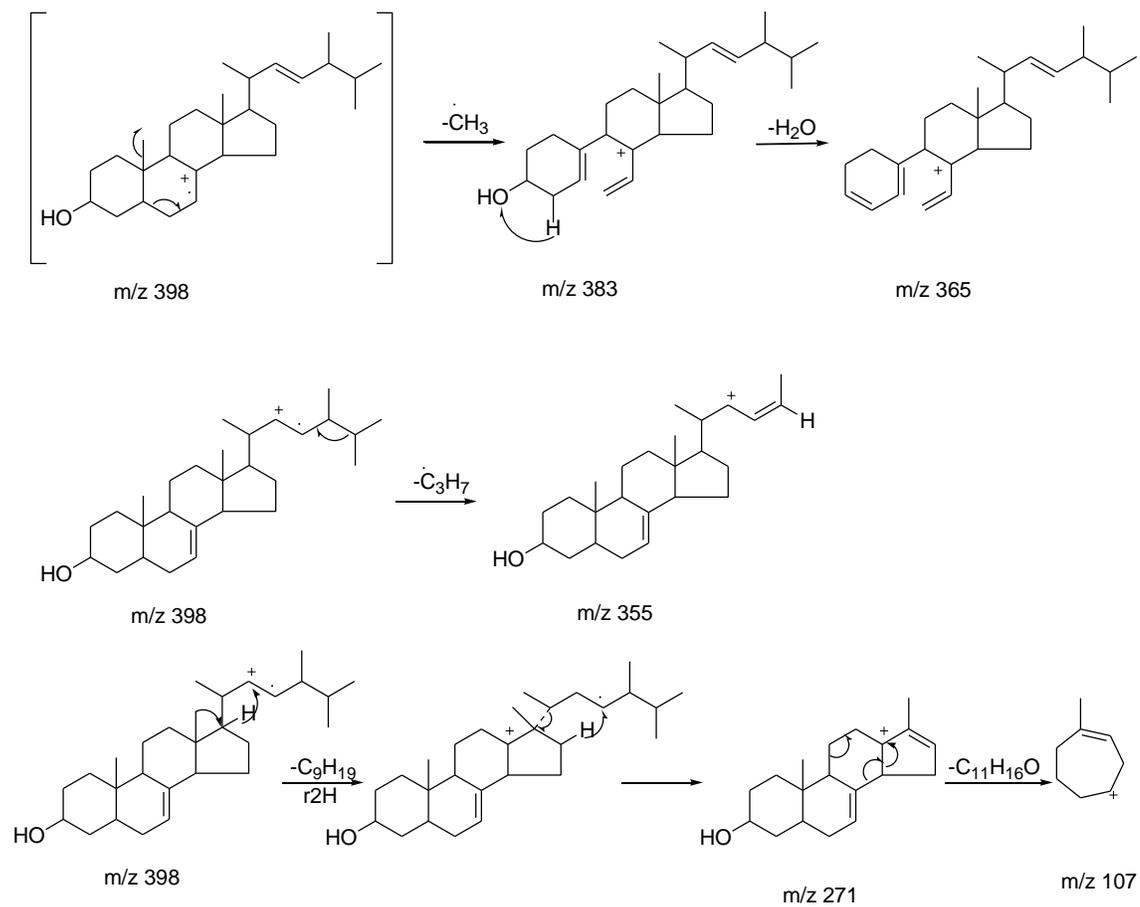
Anexo O. Fragmentaciones de masas Desmosterol



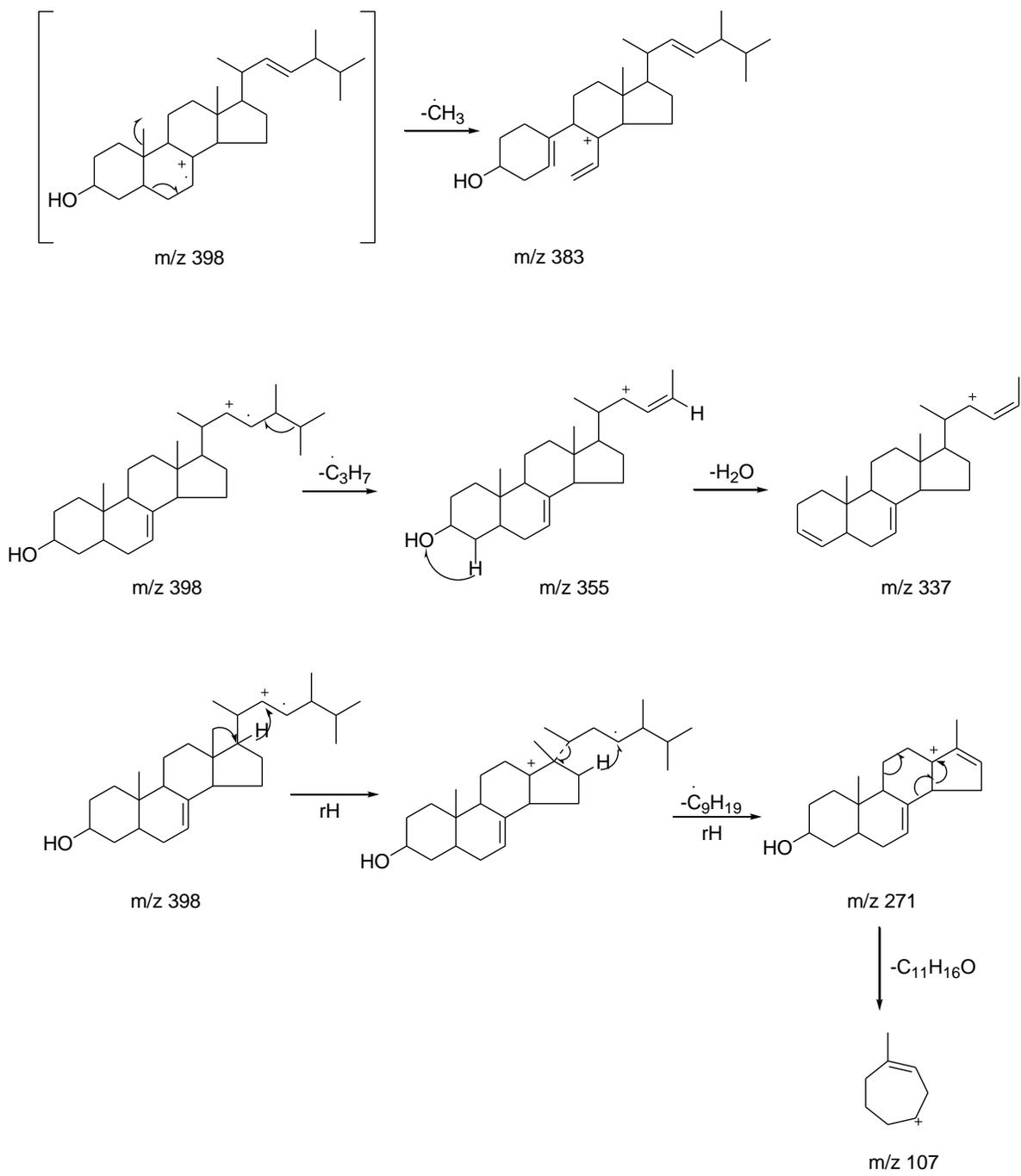
Anexo P. Fragmentaciones de masas Estigmasterol



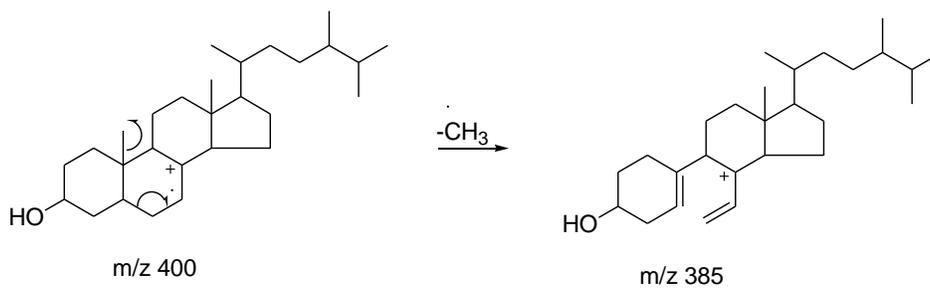
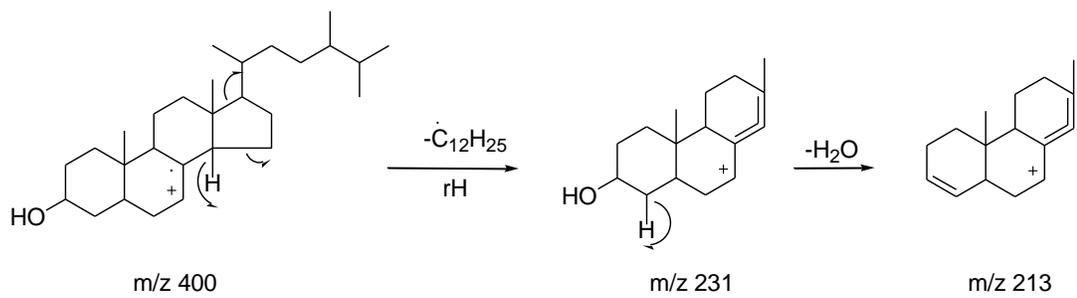
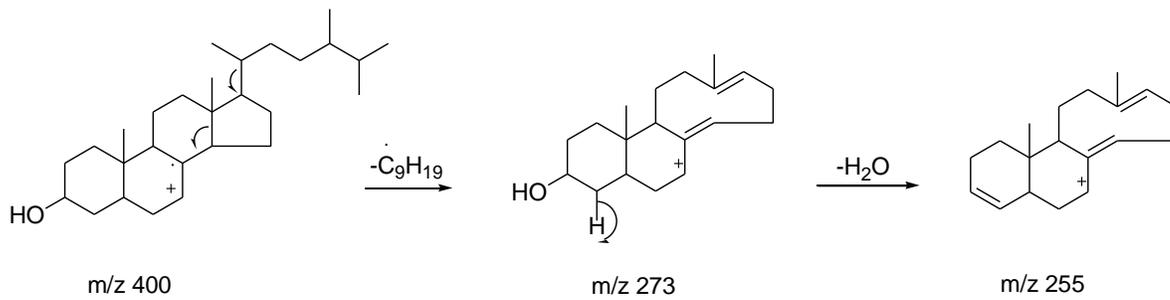
Anexo Q. Fragmentaciones de masas 5,6-Dihidroergosterol



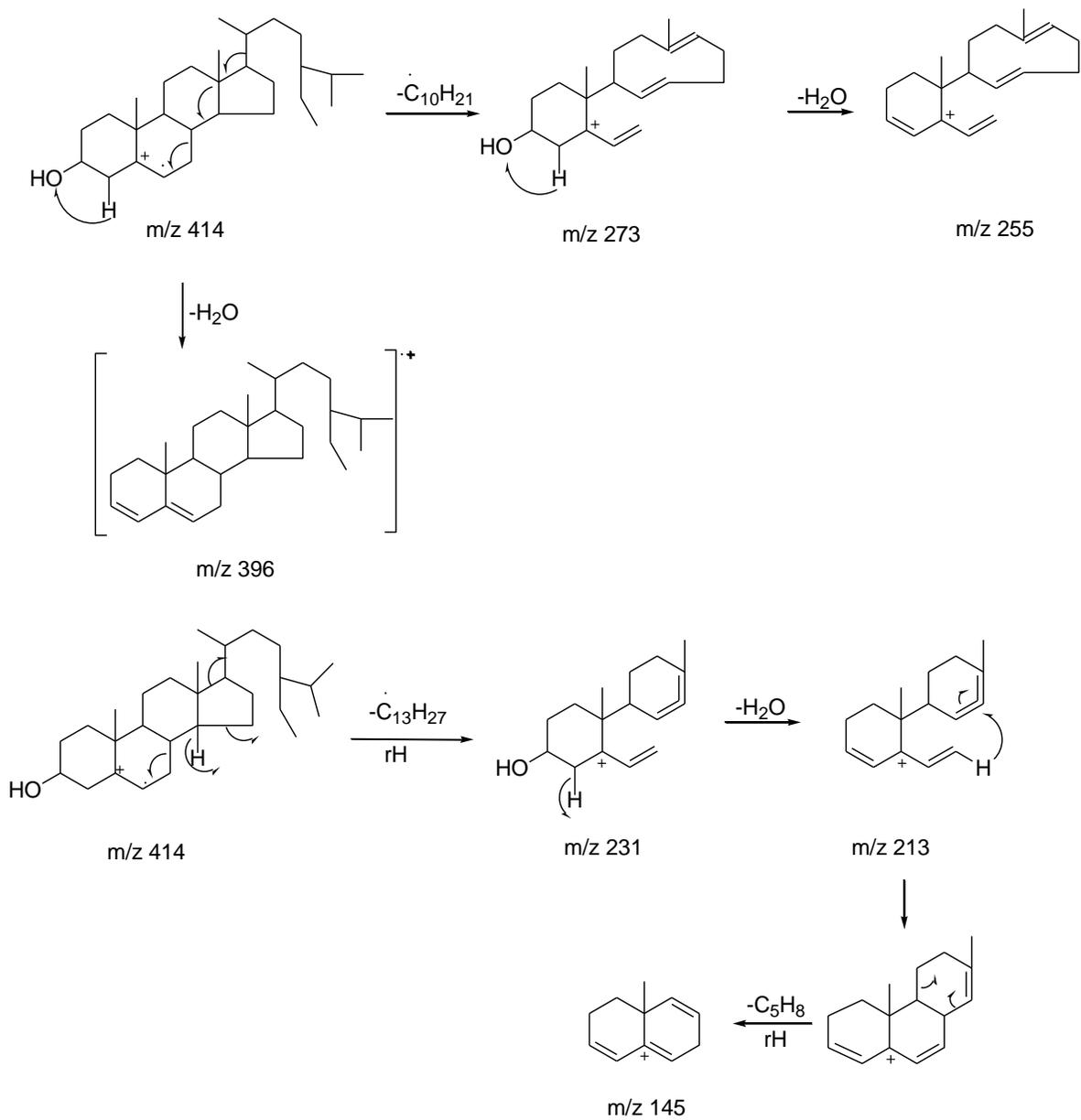
Anexo Q. Fragmentaciones de masas 7,22-Ergostadienol



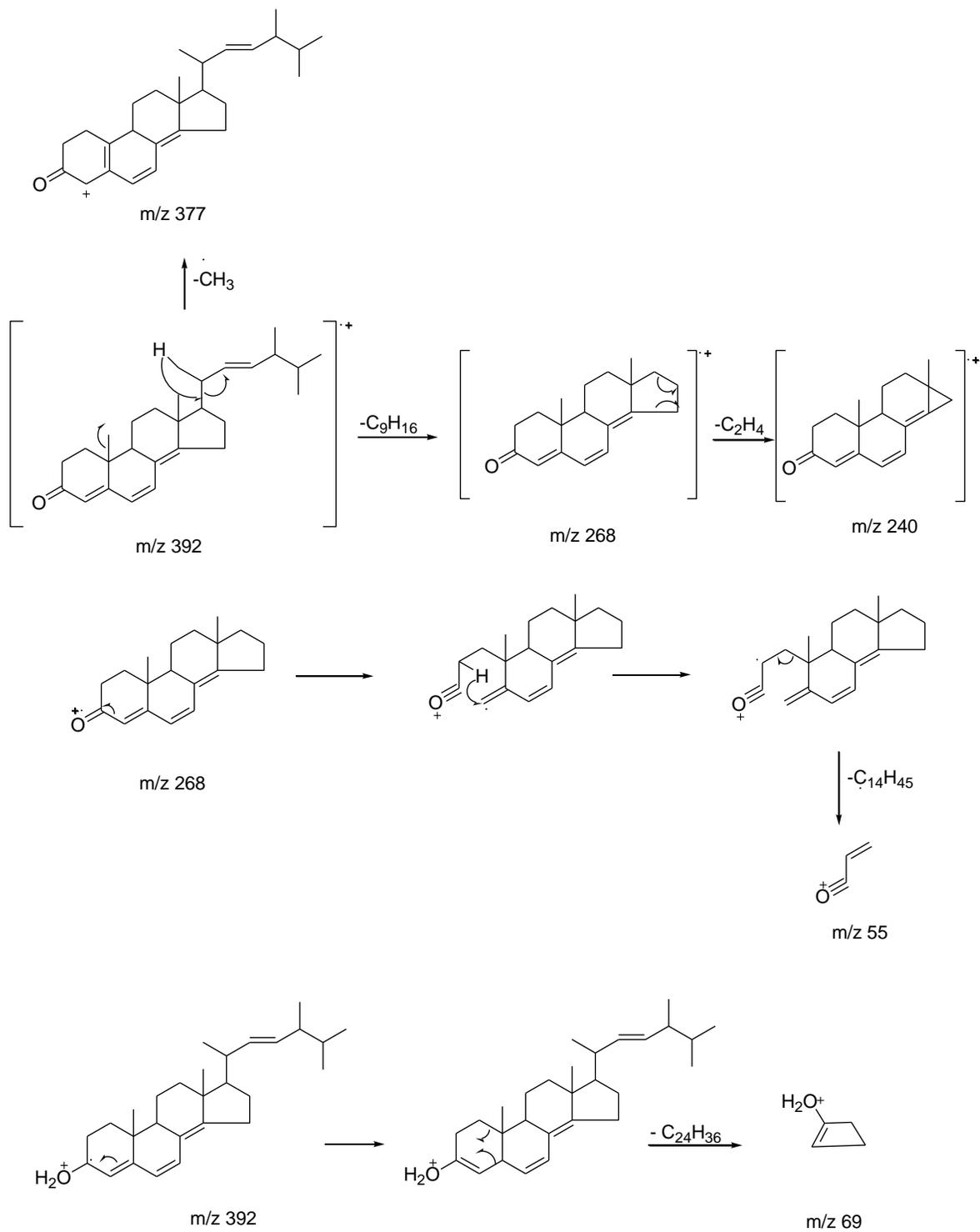
Anexo S. Fragmentaciones de masas Gama-ergosterol



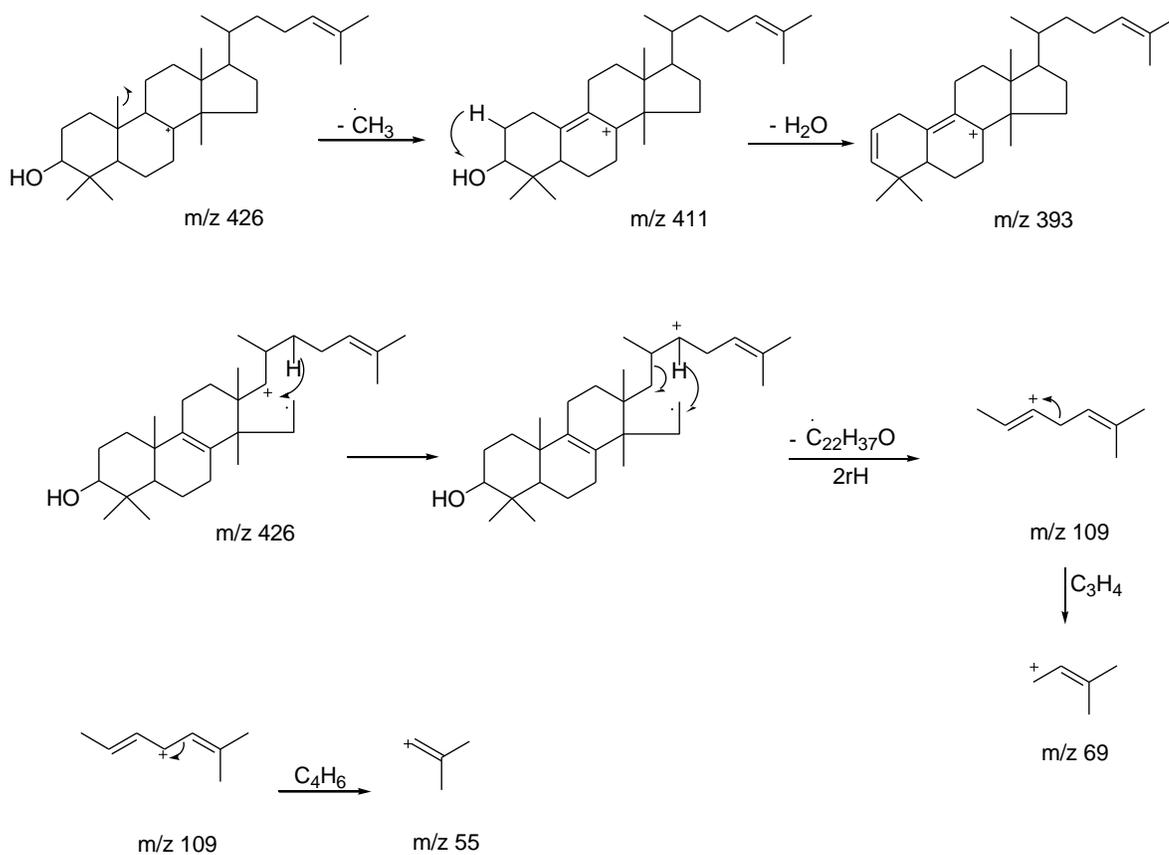
Anexo T. Fragmentaciones de masas Gama-sitosterol



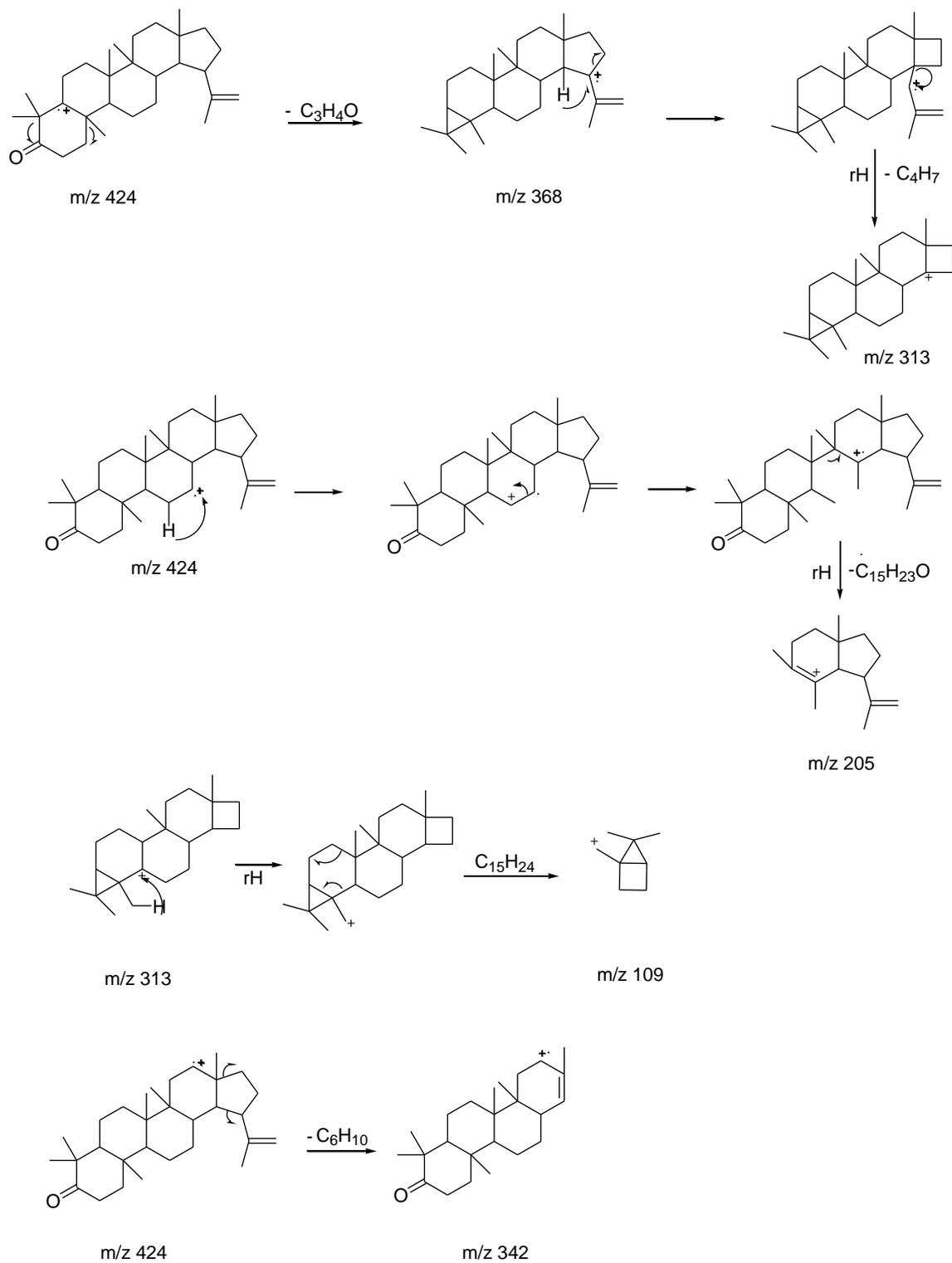
Anexo U. Fragmentaciones de masas Ergosta-4,6,8-(14),22-tetraen-3-ona



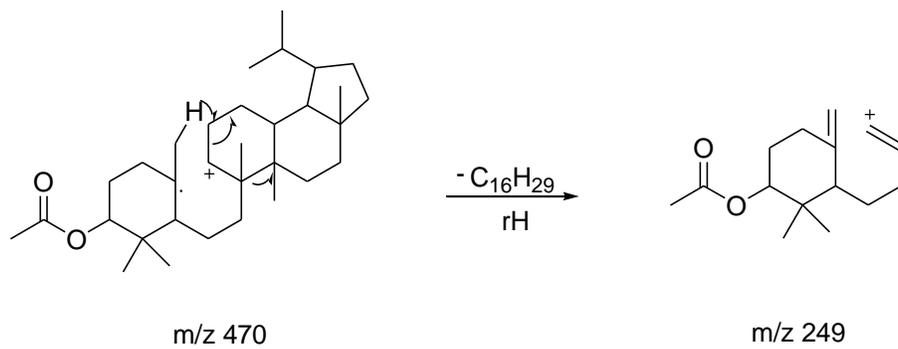
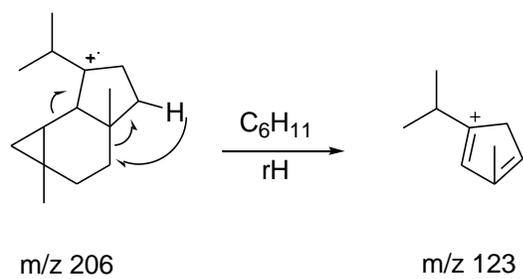
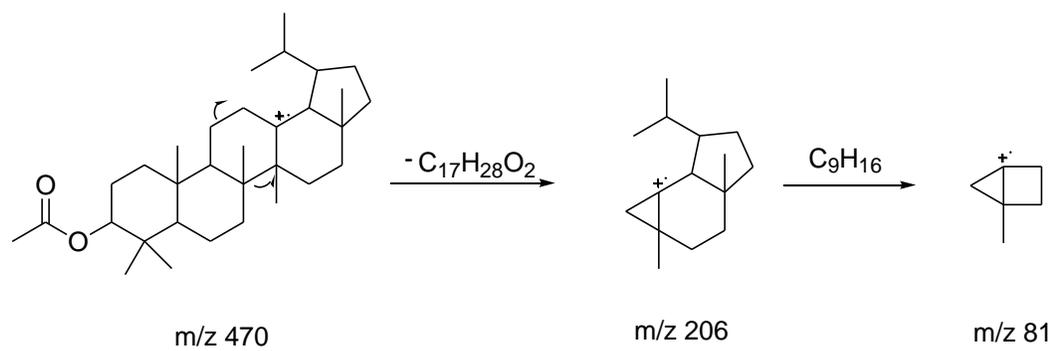
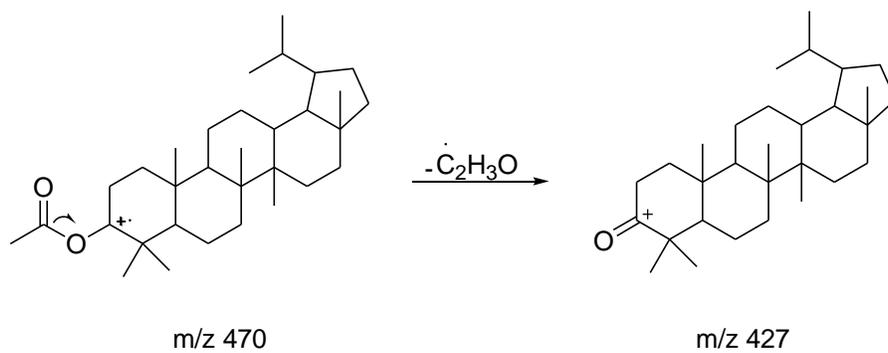
Anexo V. Fragmentaciones de masas Lanosterol



Anexo W. Fragmentaciones de masas Lup-20(29)-en-3-ona



Anexo X. Fragmentaciones de masas Lupan-3-ol-acetato



Anexo Y. Fragmentaciones de masas Friedelan-3-ona

