

ALGUNOS METABOLITOS PRESENTES EN EL MIXOMICETE *PHYSARELLA OBLONGA*

¹N. HERRERA, ¹L.F. ECHEVERRI, ²A.E. FRANCO-MOLANO & ¹W. QUIÑONES

¹Laboratorio de Química Orgánica de Productos Naturales, SIU,
Univ. de Antioquia, Medellín, Colombia
nahelo241980@gmail.com

²Laboratorio de Ecología y Taxonomía de Hongos, Univ. de Antioquia, Medellín, Colombia

Summary. HERRERA, N., L.F. ECHEVERRI, A.E. FRANCO-MOLANO & W. QUIÑONES (2010). Some metabolites present in the myxomycete *Physarella oblonga*. *Bol. Soc. Micol. Madrid* 34:141-146.

Myxomycetes are very attractive microorganisms to search biologically active compounds, because their ecological characteristics allowing them to be challenging with other organisms such as fungi, bacteria and parasites. This study was carried out to analyze the production of several secondary metabolites from *Physarella oblonga*, and establish their presence by NMR spectroscopy; so, polyunsaturated fatty acids and stigmaterol were isolated and identified. The first one are typical of myxomycetes, but the latter is reported only in some species of the order *Physarales*.

Key words: Myxomycetes, secondary metabolites, stigmaterol, *Physarella oblonga*.

Resumen. HERRERA, N., L.F. ECHEVERRI, A.E. FRANCO-MOLANO & W. QUIÑONES (2010). Metabolitos presentes en el mixomicete *Physarella oblonga*. *Bol. Soc. Micol. Madrid* 34:141-146.

Los mixomicetes son organismos bastante atractivos para la búsqueda de compuestos biológicamente activos debido a sus características ecológicas que les permiten estar compitiendo con otros organismos como hongos, bacterias y parásitos. En el presente trabajo se realizó un estudio para la obtención de metabolitos presentes en la especie *Physarella oblonga*, encontrándose por RMN ácidos grasos poliinsaturados característicos de los mixomicetes y el estigmaterol que no había sido indicado para esta especie, pero sí para algunas especies del orden *Physarales*.

Palabras claves: Mixomicetes, metabolitos secundarios, estigmaterol, *Physarella oblonga*.

INTRODUCCIÓN

Los mixomicetes son un grupo de organismos eucarióticos que crecen sobre sustratos tan variados como troncos de árboles caídos, ramas en proceso de descomposición, corteza de árboles, hojarasca, musgos, líquenes, excre-

mentos de herbívoros e incluso sobre plantas vivas (STEPHENSON, 1994). Actualmente se conocen alrededor de 850 especies (LADO, 2005). Se alimentan de materia orgánica en descomposición, de bacterias, hongos, protozoos, esporas y algas verdes (NDIRITU, 2009). Son móviles y producen esporas como mecanismo

reproductivo y de dispersión (GRAY, 1949). Actualmente son considerados protozoos (reino Protista), pero anteriormente se ubicaban como hongos (reino Mycetae), ya que poseen características morfológicas intermedias entre protozoos y hongos (STEPHENSON, 1994), (MORENO & *al.*, 2001).

Los estudios químicos de sus metabolitos secundarios han sido muy limitados, pero se ha demostrado que los mixomicetes presentan una gran cantidad de compuestos que incluyen lípidos, alcaloides, compuestos aromáticos, pigmentos, terpenoides, aminoácidos, péptidos, carbohidratos, amidas y derivados (DEMBITSKY, 2005). Además, se ha demostrado que los mixomicetes han desarrollado metabolitos secundarios diferentes a los conocidos en otros grupos (STEGLICH, 1989), (HASHIMOTO, 1994), (BLUMENTHAL, 2002). Son organismos que poseen un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados (MISONO, 2003), los principales ácidos grasos pueden ser divididos en tres grupos: ácido palmítico, ácido cis-vaccénico y ácido esteárico. Estos ácidos grasos incluyen grandes cantidades de ciclopropano el cual parece ser obtenido de la ingesta de bacterias y es incorporado dentro de los lípidos de los mixomicetes. El desarrollo de la ameba a esporocarpio maduro es acompañado por un decrecimiento en el contenido de ácidos grasos de ciclopropano y un incremento de ácidos grasos insaturados principalmente como octadeca-5,11-acido dienoico. Con respecto a los esteroides en *Physarum polycephalum* han sido encontrados seis compuestos que incluyen el estigmasterol, el β -sitosterol, el estigmastanol, el campesterol, el campestanol y el colesterol (DEMBITSKY, 2005). Algunos mixomicetes producen compuestos poliinsaturados como el pigmento poliéxico fuligorubin A, que fue aislado de *Fuligo septica*. Un caso similar es el de *Ceratiomyxa fruticulosa*, del que se aisló un pigmento con un anillo de pirona, la ceratiopirona. En otras especies también se han descrito otras sustancias coloreadas con cadenas insaturadas poliéxicas tales como chrysophysarin A aislada de *P. polycephalum*, physarochromo A, polycephalin B y C y ácido physarorubínico (TOMAS, 2002). Chrisofisarin A y physarochromo A son pigmentos amarillos

que fueron aislados del microplasmodio del mixomicete *P. polycephalum* (DEMBITSKY, 2005). Finalmente las physariginas A y C, son tres pigmentos que fueron aislados del cultivo plasmodial del mixomicete *Physarum rigidum* (MISONO, 2003).

Estos estudios son una alternativa para la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas, que ofrecen novedosas estructuras químicas, diferentes a las encontradas en las plantas, hongos y organismos marinos. Trabajos de este tipo son realizados en muy pocos países, siendo Japón el país de referencia (ISIBASHI, 2007). Por ello decidimos efectuar este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recogida del material: Se recolectaron aproximadamente 100 g de sustrato [hojarasca, mantillo, mantillo aéreo (hojas secas aún en árboles o arbustos y que no han entrado en contacto con el suelo) y suelo] en bolsas de papel, en dos zonas geográficamente diferentes de Colombia. La primera se localiza en la región Andina, en el departamento de Antioquia y corresponden al campus de la Universidad de Antioquia y la segunda se encuentra en la costa Caribe, en el departamento de Bolívar y se localiza en el municipio de Mompox. Los cuerpos fructíferos obtenidos fueron depositados en el herbario de la Universidad de Antioquia. La especie de trabajo *Physarella oblonga* (Fig. 1) está almacenada bajo el código Herrera nº 164153.

Cámaras húmedas y cultivo: El material recogido se puso en cámaras húmedas siguiendo el protocolo indicado por STEPHENSON & STEMPEN (1994), con este método el plasmodio fue depositado en cajas de Petri estándar con papel filtro, a las que se les adicionó diariamente agua destilada con el objeto de mantenerlas húmedas. Después de aproximadamente dos semanas, pequeñas secciones del plasmodio en desarrollo, fueron transferidas a platos de agar a los cuales se les añadió avena previamente esterilizada como fuente de alimento. De forma separada, una caja de Petri se revisó constantemente hasta observar la presencia de cuerpos fructíferos para su clasificación taxonómica.



Fig. 1. Esporangio de *Physarella oblonga* en cultivo de agar corteza.

Obtención de extractos: La masa plasmodial fue recogida de las cajas de Petri, extrayendo dos veces en Etanol al 96%, filtrando al vacío y evaporando hasta obtener el extracto etanólico totalmente seco. Se realizó una partición líquido-líquido con solventes de polaridad creciente tales como hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol. De 5 a 10 mg de cada extracto fueron usados para ensayos biológicos y la otra parte fue sometida a separación por columnas.

Fraccionamiento del extracto de Physarella oblonga: Para el aislamiento de compuestos se realizaron columnas en silicagel 60, usando los solventes diclorometano y metanol: Se recogieron 43 fracciones las cuales fueron monitoreadas por ccf (cromatografía de capa fina) usando cromatoplasmas de silicagel 60 F254 uniendo las fracciones más similares dando como resultado 7 fracciones. De ellas, la primera fracción fue fraccionada separada usando columna en silicagel 60, 230-260 mesh Merk® usando diclorometano y

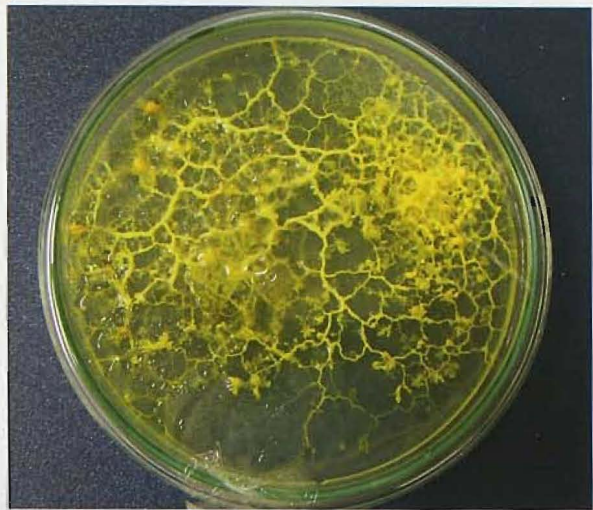


Fig. 2. Plasmodio de *Physarella oblonga* en cultivo de agar corteza.

metanol, obteniéndose finalmente otras 15 fracciones. La segunda fracción fue separada usando hexano y acetato generando otras 6 fracciones, algunas de estas fueron sometidas a análisis por RMN.

RESULTADOS

Entre los especímenes de *Myxomycetes* recogidos en la Universidad de Antioquía se ha seleccionado *Physarella oblonga*, que ha sido usada para estudios de extracción de metabolitos debido a la características de su plasmodio, que permite una mayor cantidad de masa plasmodial. Una segunda especie fue recogida en el departamento de Bolívar, pero no se ha podido identificar debido a la formación de esclerocios y la falta de fructificaciones.

Para el cultivo se ha utilizado agar, corteza y avena autoclavada lo que ha permitido un mayor crecimiento de los plasmodios (Fig. 2). Los cultivos eran trasladados a oscuridad total y a una temperatura de 26° C. Los días donde se presentó el mayor contenido de biomasa, fueron entre el cuarto y el quinto día después de su inoculación. Aproximadamente cinco gramos de extracto se recogieron para obtener el extracto crudo.

Cuando se realizó el primer fraccionamiento, para el aislamiento de compuestos a partir del

extracto de *Physarella oblonga*, se encontró un gran número de metabolitos en el extracto crudo (Fig. 3), los cuales fueron detectados por ccf (cromatografía en capa fina). Se evidencia entonces, un alto número de compuestos presentes en la masa plasmodial con diferentes polaridades, diferentes coloraciones y fluorescencias cuando se exponen a la luz ultravioleta. Igualmente cuando se evaluó el extracto de la especie sin identificar, también se encontró esa alta variabilidad de metabolitos.

De la fracción 1 se logró establecer la presencia de un ácido graso poliinsaturado según los análisis de resonancia magnética nuclear de ^1H RMN y ^{13}C RMN. Al observarlo por cromatografía en capa fina (ccf) se detecta que es el compuesto mayoritario en dicha fracción y se observa de color naranja con luz UV. (Fig. 4). En la misma Fig., se encuentra el espectro de carbono (^{13}C RMN) y se aprecian señales características de dobles enlaces y entre 120 y 140 ppm y entre 5 y 7 ppm en el espectro de protón, además de las señales típicas para este tipo de compuestos.

De la fracción 2 fue aislado el estigmasterol, en el espectro de carbono se observan las señales características de este compuesto (Fig. 5), de igual forma se evidencia una cromatografía de capa fina, usando como sistema de elución la mezcla de los solventes diclorometano:metanol (4:0,2), dando como resultado un compuesto que se revela de color rojo oscuro.

DISCUSION

A pesar de usar varias metodologías para la fructificación del espécimen que no fue posible identificar, como el traslado hacia la luz blanca directa, traslado hacia la luz UV, en oscuridad total, estresando el medio con altas temperaturas, esta especie no fructificó y continuó presentando los esclerocios con formas globosas tanto en cámara húmeda como en cultivos sólidos con agar. Estas organelas se caracterizan por presentar reducidas cantidades de mucoproteínas y contener lípidos en altas cantidades, incluso en proporciones dos veces más elevadas que el plasmodio activo, se sugiere que el incremento de los lípidos está directamente relacionado con el decrecimiento de carbohidratos (LYNCH, 1973). La masa plasmodial obtenida, presenta un fuerte color anaranjado con finas redes de protoplasma. Los fraccionamientos y la técnica de RMN nos permitieron la identificación de un gran número de triglicéridos característicos de este tipo de organismos, aunque esto solo fue posible en estado plasmodial.

El estigmasterol es un metabolito que ha sido obtenido de varios mixomicetes como *Physarum polycephalum* y *P. flavicomum* (BULLOCK, 1976). Sin embargo este es uno de los problemas presentes en estudios quimiotaxonómicos de mixomicetes debido a la presencia de este tipo de

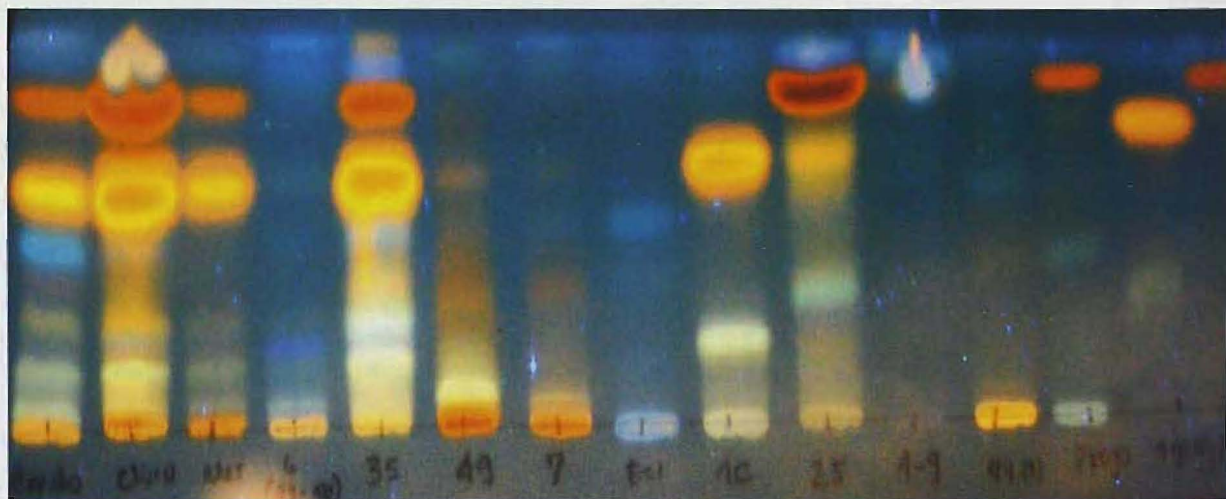


Fig. 3. Cromatografía en capa fina donde se muestran los metabolitos presentes en el plasmodio de *Physarella oblonga*.

ALGUNOS METABOLITOS PRESENTES EN EL MIXOMICETE *PHYSARELLA OBLONGA*

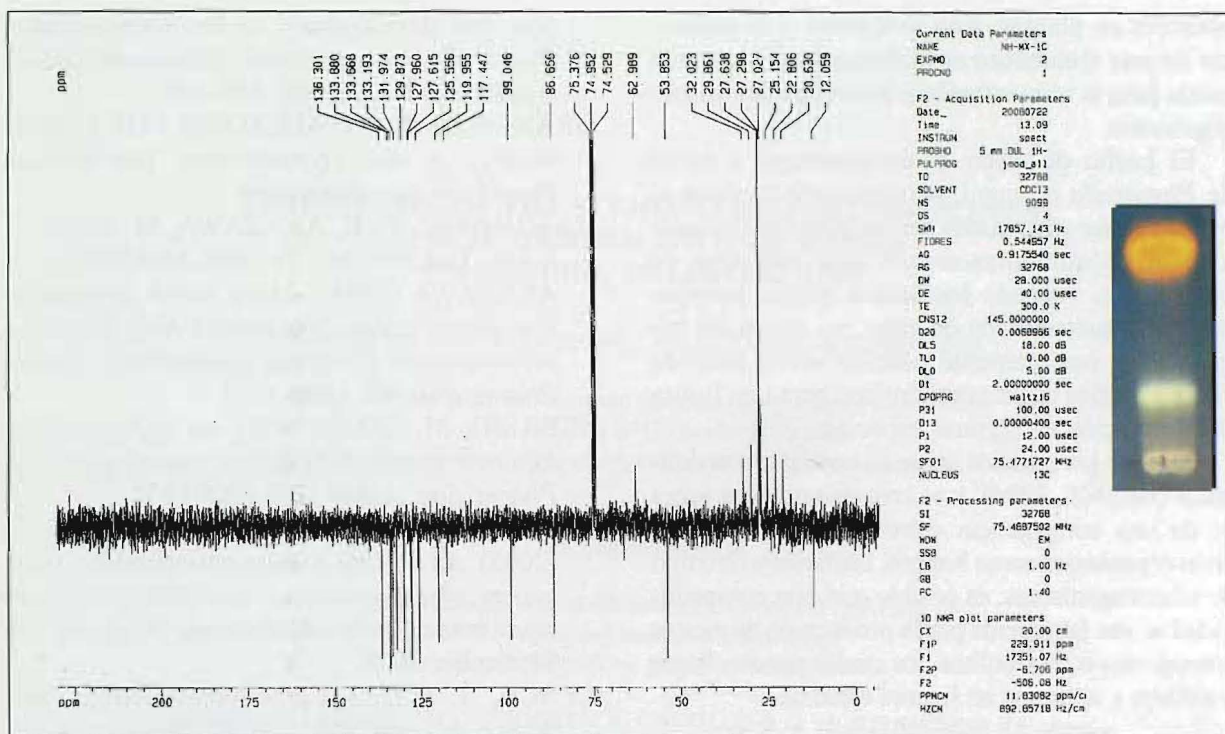


Fig. 4. Espectro de carbono del acido graso poliinsaturado y ccf.

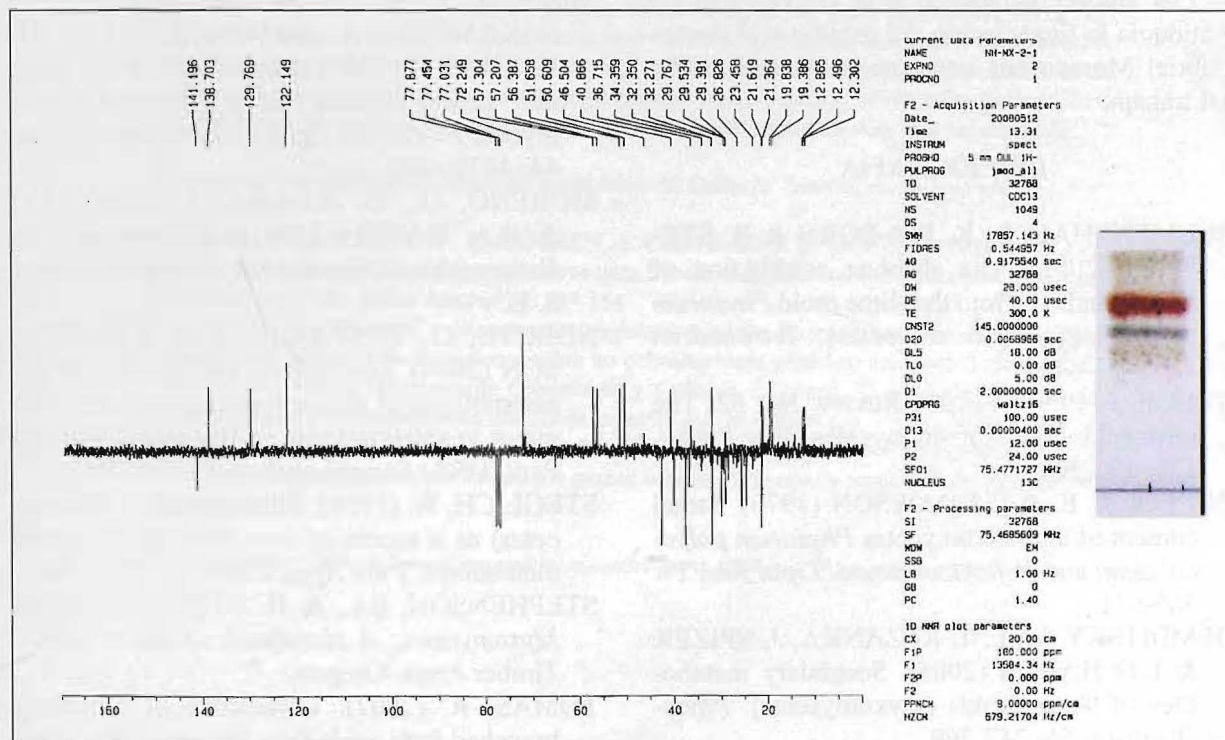


Fig. 5. Espectro de carbono del estigmasterol y ccf.

esteroles en plantas. Aún se discute si la presencia de este metabolito es proveniente de la avena usada para la alimentación o provenga del mismo organismo.

El hecho de aislar el estigmasterol a partir de *Physarella oblonga*, perteneciente también al orden *Physarales*, puede ser un punto importante a nivel de quimiotaxonomía para este tipo de organismos. Además los ácidos grasos polinsaturados característicos de ellos, así como los triglicéridos, posiblemente podrían servir también como criterios quimitaxonómicos para una futura determinación de algunas especies.

Aunque los estudios sobre su ecología son limitados (BRUCE, 1994), y se cree que muchas veces se da una competencia entre los mixomicetes y otros organismos como hongos, bacterias y otro tipo de microorganismos, es posible que esta competitividad se vea favorecida por la producción de ciertos compuestos o metabolitos, los cuales pueden llegar a aislarse y aplicarse en futuros estudios.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Antioquía la financiación del estudio y al doctor Gabriel Moreno sus consejos en la realización del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- BLUMENTHAL, F., K. POLBORN & B. STEFFAN (2002). The absolute configuration of polycephalin C from the slime mold *Physarum polycephalum* (*Myxomycetes*). *Tetrahedron* 42: 8433-8437.
- BRUCE, I (1994). Tansley Review No. 62: The phytosociology of myxomycetes. *New Phytol.* 126: 175-201.
- BULLOCK, E. & C.J DAWSON (1976). Sterol content of the myxomycetes *Physarum polycephalum* and *P. flavicomum*. *J. Lipid Res.* 17: 565-571.
- DEMBITSKY, V.M., T. REZANKA, J. SPIZEK & L.O HANUS (2005). Secondary metabolites of slime molds (myxomycetes). *Phytochemistry* 66: 747-769.
- GRAY, W.D. (1949). The laboratory cultivation and development of the myxomycetes *Physarella oblonga* and *Physarum didermoides*. *Ohio J. Sci.* 49: 105-108.
- GRAY, W.D. & C.J. ALEXOPOULOS (1968). *Biology of the Myxomycetes*. The Ronald Press Company, New York.
- HASHIMOTO, T., K. AKAZAWA, M. TORI, Y. KAN, T. KUSUMI, H. TAKAHASHI & Y. ASAKAWA (1994). Three novel polyacetylene triglycerides, lycogarides A-C, from the myxomycetes *Lycogala epidendrum*. *Chem. Pharm. Bull.* 42: 1531-1533.
- ISIBASHI, M. (2007). Study on myxomycetes as a new source of bioactive natural products. *Pharm. Soc. Japan* 127: 1369-1381.
- HERNÁNDEZ-CRESPO, J. C. & C. LADO (2005). *An on-line nomenclatural information system of Eumycetozoa*. Available at: <http://www.nomen.eumycetozoa.com>. Accessed 13 September 2008.
- LYNCH, T. (1973). Carbohydrate metabolism during differentiation (Sclerotization) of the myxomycete *Physarum flavicomum*. *Archiv. Microbiol.* 90: 189-198.
- MISONO, Y., A. ITO, J. MATSUMOTO, S. SAKAMOTO, K. YAMAGUCHI & M. ISHIBASHI (2003). Physarigins A-C, three new yellow pigments from a cultured myxomycete *Physarum rigidum*. *Tetrahedron Lett.* 44: 4479-4481.
- MORENO, G., C. ILLANA, A. CASTILLO & R.A. GARCIA (2001). *Myxomycetes de Extremadura. Campiña Sur*. Impresos Postalx S. L.
- NDIRITU, G., F. SPIEGEL & L. STEPHENSON (2009). Distribution and ecology of the assemblages of myxomycetes associated with major vegetation types in Big Bend National Park, USA. *Fungal ecology* 2: 168-183.
- STEGLICH, W. (1989). Slime moulds (*Myxomycetes*) as a source of new biologically active metabolites. *Pure Appl. Chem.* 61: 281-288.
- STEPHENSON, S.L. & H. STEMPEN (1994). *Myxomycetes: A Handbook of Slime Molds*. Timber Press, Oregon.
- TOMAS, R. (2002). Glycosides of polyenoic branched fatty acids from myxomycetes. *Phytochemistry* 60: 639-646.