

## Composición lipídica y evaluación de las actividades antioxidante y leishmanicida del basidiomiceto *Ganoderma* sp.

### Lipid composition and evaluation of the antioxidant and leishmanicidal activities of the basidiomycete *Ganoderma* sp.

Carlos A. Pérez C,<sup>I</sup> Gilmar G. Santafé P,<sup>I</sup> Mabel G. Torres T,<sup>II</sup> Omar L. Torres A,<sup>III</sup> Mary C. Montaña C,<sup>IV</sup> Sara M. Robledo<sup>RV</sup>

<sup>I</sup> Grupo de Investigación Química de los Productos Naturales, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Córdoba. Colombia.

<sup>II</sup> Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Tecnológica del Chocó "Diego Luis Córdoba". Colombia.

<sup>III</sup> Grupo de Investigación en Desarrollo y Evaluación de Fármacos y Afines, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Córdoba. Colombia.

<sup>IV</sup> Centro de Ecología Química Agrícola, Universidad Politécnica de Valencia. España.

<sup>V</sup> Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

---

#### RESUMEN

**Introducción:** los hongos del género *Ganoderma* han sido utilizados para el cuidado de la salud en la medicina tradicional asiática por más de 2000 años. Desde 1980 los estudios químicos han reportado un sin número de metabolitos secundarios con propiedades bioactivas.

**Objetivo:** identificar compuestos lipídicos en el extracto etanólico del hongo *Ganoderma* sp., además de evaluar sus actividades antioxidante y leishmanicida.

**Métodos:** la extracción de las fracciones lipídicas presentes en el cuerpo fructífero de *Ganoderma* sp. Se realizó por Cromatografía en Columna. La elucidación estructural se determinó por Espectrometría de Masas y Resonancia Magnética Nuclear. La actividad antioxidante del extracto etanólico fue evaluada con las metodologías del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y el radical catiónico 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS); la actividad leishmanicida por citometría de flujo y la actividad citotóxica usando el ensayo colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) sobre la línea celular U937.

**Resultados:** diecinueve esteres metílicos y ergosterol fueron identificados por espectrometría de masas en el extracto etanólico. Un compuesto triterpenoidal se elucidó usando Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear. Los valores de

concentración media inhibitoria (IC<sub>50</sub>) de la actividad antioxidante del extracto etanólico para las metodologías de los radicales DPPH y ABTS fueron de 85,63 µg/mL y 62,82 µg/mL, respectivamente. Los valores de las actividades citotóxica y leishmanicida fueron > 200,0 µg/mL y 21,5 µg/mL ± 4,4 respectivamente.

**Conclusiones:** las estructuras de los derivados de ácidos grasos elucidados corresponden a compuestos con diferentes grados de insaturación. En este estudio se realizó el reporte de la Ganoderona A, como compuesto triterpenoidal. La elevada actividad antioxidante en relación a otros trabajos sugiere que este organismo es una fuente importante de metabolitos secundarios con propiedades captadoras de radicales libres, aunque los valores de actividad leishmanicida no fueron significativos se recomienda continuar con el estudio de otras particiones del extracto etanólico.

**Palabras clave:** ganoderona; ácidos grasos; esteroides; radicales libres; línea celular U937.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** Fungi from the genus *Ganoderma* have been used in Asian traditional medicine for more than 2 000 years. Since the year 1980 chemical studies have reported a large number of secondary metabolites with bioactive properties.

**Objective:** Identify lipid compounds in ethanolic extract from the fungus *Ganoderma* sp. and evaluate their antioxidant and leishmanicidal activities.

**Methods:** Extraction of lipid fractions from the fruiting body of *Ganoderma* sp. was conducted by column chromatography. Structural features were determined by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. Antioxidant activity of the ethanolic extract was evaluated with the methodologies for radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and cationic radical 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS); leishmanicidal activity by flow cytometry, and cytotoxic activity with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide colorimetric assay (MTT) on cell line U937.

**Results:** Nineteen methyl esters and ergosterol were identified by mass spectrometry in the ethanolic extract. A triterpenoid compound was identified by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Mean inhibitory concentration values (IC<sub>50</sub>) for antioxidant activity of the ethanolic extract using the methodologies for radicals DPPH and ABTS were 85.63 µg/ml and 62.82 µg/ml, respectively. Values for cytotoxic and leishmanicidal activities were > 200.0 µg/ml and 21.5 µg/ml ± 4.4, respectively.

**Conclusions:** The structure of the fatty acid derivatives identified corresponds to compounds with varying degrees of unsaturation. The study included the report of *Ganoderma* A as a triterpenoid compound. Antioxidant activity was found to be higher than in previous studies, suggesting that this organism is an important source of secondary metabolites with free radical scavenging properties. Although leishmanicidal activity values were not found to be significant, it is recommended to study other partitions of the ethanolic extract.

**Keywords:** *ganoderma*; fatty acids; sterols; free radicals; cell line U937.

## INTRODUCCIÓN

Los hongos del género *Ganoderma* han permanecido en la cumbre de la medicina tradicional asiática por más de 2000 años debido a los múltiples efectos benéficos relacionados con la prevención y tratamiento de enfermedades. Los productos derivados de estos organismos poseen los índices más altos de venta en la industria de nutraceuticos de Oriente y Estados Unidos<sup>1</sup>. Desde 1980 las estructuras de estos hongos, como sus cuerpos fructíferos y esporas, han recibido mucha atención en la medicina homeopática y como fuente promisoría de nuevos medicamentos<sup>2,3</sup>. Investigaciones recientes sobre los constituyentes químicos del género *Ganoderma* revelan la presencia de múltiples productos naturales, incluidos lípidos y polisacáridos con numerosas actividades biológicas: hipotensoras,<sup>4</sup> citotóxicas,<sup>5</sup> inmunomoduladoras,<sup>6-10</sup> hepatoprotectoras,<sup>11-14</sup> antitumorales,<sup>15-19</sup> antioxidantes,<sup>20,21</sup> antiinflamatorias,<sup>22-24</sup> antivirales,<sup>25</sup> antiplasmodiales,<sup>26,27</sup> antibacterianas,<sup>28</sup> neuroprotectoras,<sup>29</sup> y antidiabéticas.<sup>30</sup> Estudios farmacológicos evidencian más de 431 metabolitos secundarios de varias especies del género *Ganoderma*, la caracterización de sus estructuras químicas y actividades biológicas se describen en muchas publicaciones.<sup>31-42</sup>

Para el género *Ganoderma*, se reporta que diferentes condiciones de cultivo y composición del sustrato tienen una fuerte influencia sobre el desarrollo del hongo, afectando directamente la producción de metabolitos secundarios.<sup>43-45</sup>

En Latinoamérica existe una gran biodiversidad de hongos del género *Ganoderma*,<sup>46</sup> que constituyen un recurso natural del cual es posible obtener sustancias bioactivas novedosas para combatir diferentes patologías, como por ejemplo la *leishmaniasis*,<sup>47</sup> una enfermedad parasitaria de origen tropical que afecta a la población más vulnerable del planeta o también enfermedades neurodegenerativas, tumorales y cardiovasculares, que en muchos casos están relacionadas con el estrés oxidativo.<sup>48</sup>

Por tanto, el objetivo de este estudio consistió en determinar los metabolitos secundarios presentes en las fracciones lipídicas del extracto etanólico de *Ganoderma* sp. (MG Torres-Torres 997) recolectado en el Departamento de Córdoba (Colombia), evaluando su actividad antioxidante y leishmanicida.

## MÉTODOS

### Recolección del material fúngico

El cuerpo fructífero (basidioma) silvestre del espécimen *Ganoderma* sp. fue colectado en el Municipio de Montería, departamento de Córdoba (N 8° 47' 51,852" O 75° 51' 7,815" - 18 msnm "sabana tropical") y se encontró creciendo cerca del suelo sobre raíces de *Delonix regia* (Bojer). Una muestra micológica del organismo está depositada en la colección de hongos de la Universidad Tecnológica del Chocó "Diego Luis Córdoba" y se encuentran registrado como MG Torres-Torres 997.

### Tratamiento del material fúngico

El basidioma del espécimen se sometió a limpieza mecánica y a lavado con agua corriente. Luego, se dividió en fragmentos pequeños, que se secaron a la sombra durante 48 h. Una vez secos, los pequeños trozos se redujeron a polvo fino, posteriormente 200 g del material se sometieron a percolación con etanol del 96 %. Este proceso se llevó a cabo en la oscuridad durante 8 días, al término de los cuales,

se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. De esta manera, se obtuvo el extracto etanólico total.

#### Fraccionamiento cromatográfico

El extracto etanólico se analizó por cromatografía de capa delgada (CCD), la mezcla de solventes que separó el mayor número de compuestos con mejor distribución en la placa fue bencina:acetato de etilo (7:1 v/v). El sistema seleccionado se utilizó para realizar cromatografía en columna (CC), empleando como revelador ácido sulfúrico al 5 % en etanol separando de esta forma la fracción de ácidos grasos, la de esteroides y una tercera fracción de la cual se obtuvo un compuesto triterpenoidal (Ganoderona A), estudiada a través de CC usando como sistema de elución cloroformo.

#### Derivatización de ácidos grasos

Los ácidos grasos fueron derivatizados hasta los respectivos ésteres metílicos usando la siguiente metodología, 200 mg de la fracción de ácidos grasos se colocaron a reflujo con 4 ml de solución 2N de hidróxido de potasio (KOH) en metanol a 80 °C por 3 h con agitación magnética, luego la mezcla se enfrió, monitoreando la saponificación por CCD usando bencina:acetato de etilo (7:1 v/v) y como revelador vainillina. Posteriormente fueron adicionados 3 ml de solución al 20 % de trifluoruro de boro metanólico (BF<sub>3</sub>/MeOH) y la solución resultante se colocó a reflujo por 3 h a 80 °C. Luego se verificó la esterificación por CCD usando el mismo sistema. La mezcla de reacción se extrajo con diclorometano, se lavó con solución saturada de cloruro de sodio, se adicionó sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a 37°C por destilación a presión reducida. Los ésteres metílicos obtenidos fueron purificados por CC y posteriormente se analizaron por Cromatografía de Gases de Alta Resolución Acoplado a Espectrometría de Masas (CGAR-EM).

#### Evaluación de la actividad antioxidante

Para evaluar la capacidad captadora de radicales libres frente al radical DPPH y el radical catiónico ABTS fue empleado el método desarrollado por Guzmán et al (2013)<sup>49</sup>.

#### Método DPPH

Se evaluó el extracto etanólico, para esto se prepararon por triplicado soluciones con concentraciones de 5, 10, 20, 40, 80 y 100 µg/mL, en dimetil sulfóxido (DMSO) y posteriormente diluidas con solución de DPPH medidas a una absorbancia ajustada de 0,300 ± 0,05 a una λ=517 nm, en un espectrofotómetro UV/VIS GENESYS 20, hasta completar 2 mL en el tubo de reacción.

Blanco de la muestra: a 20 µl de cada concentración se le adicionaron 1980 µl de Metanol.

Referencia: a 20 µl de DMSO se le adicionaron 1980 µl de solución madre de DPPH y se introdujeron en tubo de reacción. Después de incubar a temperatura ambiente por 30 min en la oscuridad se procedió a leer la absorbancia a 517 nm, lo que permitió encontrar el porcentaje de inhibición. Posteriormente, se graficó el porcentaje de inhibición vs la concentración de la muestra para obtener el IC<sub>50</sub> es decir, la concentración necesaria para captar el 50 % de los radicales libres de DPPH.

## Método ABTS

Se prepararon por triplicado soluciones de 5, 10, 20, 40, 80 y 100 µg/ml del extracto etanólico en DMSO y posteriormente diluidas con solución de ABTS con una absorbancia ajustada de  $0,700 \pm 0,05$  a una  $\lambda=734$  nm, hasta completar 2 mL en el tubo de reacción.

**Blanco de la muestra:** a 20 µl de cada concentración se le adicionaron 1980 µL de buffer fosfato pH: 7,4.

**Referencia:** a 20 µl de buffer fosfato se le adicionaron 1980 µl de solución de ABTS y se determinó la variación de la absorbancia, luego se graficó el porcentaje de inhibición vs la concentración de la muestra para obtener el IC<sub>50</sub>.

## Evaluación de las actividades citotóxica y leishmanicida *in vitro*

La actividad citotóxica del extracto se evaluó sobre la línea celular promonocítica humana U937 mediante el micrométodo enzimático con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Para la evaluación, las células estaban en fase exponencial de crecimiento ajustándose a una concentración de 100 000 células/ml en platos para cultivo celular de 96 pozos en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y utilizando una concentración 20 µg/ml para el extracto fúngico. Las células primero se incubaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 72 h en presencia del extracto y, posteriormente, el efecto citotóxico se determinó mediante MTT, que se incubó a 37 °C durante 3 h. La producción de formazán se midió a 570 nm en un espectrofotómetro. Como control de viabilidad se usaron células cultivadas en ausencia de los extractos, para control de citotoxicidad se empleó anfotericina B.

La actividad leishmanicida del extracto etanólico se evaluó sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania panamensis* (cepa UA140 pirGFP) por citometría de flujo, para lo cual las células U937 se dispensaron en platos de 24 pozos a una concentración de 100 000 células/ml, las cuales fueron tratadas con acetato de forbol miristato (PMA) durante 48 h a 37 °C, luego se infectaron con promastigotes en fase estacionaria de crecimiento en medio NNN modificado, a una proporción de 1:15 células/parásito, luego de 3 h de incubación a 34 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>, se lavaron los parásitos no internalizados y se incubaron de nuevo a 34 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> para permitir la diferenciación a amastigotes. Después de 24 h de incubación se adicionó el extracto a una concentración 20 µg/mL. Las células infectadas y tratadas se mantuvieron a 34 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 72 h. El efecto leishmanicida se midió a 488 nm de excitación y 525 nm de emisión en un citómetro de flujo.

Para la evaluación de la carga parasitaria por citometría de flujo las células se infectan con parásitos que están expresando fluorescencia verde y se tiñen con el anticuerpo monoclonal anti-CD33 que reconoce los macrófagos, estando conjugado a un fluorocromo rojo.

Los ensayos fueron realizados dos veces con 2 réplicas por cada concentración evaluada y los resultados son expresados como la concentración Letal 50 (CL<sub>50</sub>) para citotoxicidad y como porcentaje de inhibición para la actividad leishmanicida. La CL<sub>50</sub> se calculó mediante el análisis estadístico de regresión lineal Probit empleando el programa CellQuest Pro.

## RESULTADOS

### Derivados de ácidos grasos

19 compuestos se pudieron identificar a través del análisis por CGAR-EM de la fracción de ésteres metílicos de ácidos grasos de *Ganoderma* sp. (tabla 1). La elucidación de los compuestos fue realizada mediante el análisis de las fragmentaciones presentes en los espectros de masas obtenidos por impacto electrónico, también por comparación con información reportada en la bibliografía y con bases de datos de espectros de masas<sup>50</sup>.

El extracto presentó porcentajes de ésteres metílicos saturados, insaturados y dicarboxílicos de 63,2, 26,3 y 10,5 %, en el respectivo orden.

**Tabla 1.** Análisis de datos de los espectros de masas de la fracción de ésteres metílicos de ácidos grasos

Compuesto	tr (min)	M <sup>+</sup>	fm	IDH	Nombre
1	13,16	202	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	2	Éster metílico ácido octanodioico
2	15,55	216	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	2	Éster metílico ácido nonanodioico
3	19,63	242	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	1	Éster metílico ácido tetradecanoico
4	21,87	256	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	1	Éster metílico ácido pentadecanoico
5	23,55	266	C <sub>17</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	3	Éster metílico ácido 7,10 hexadecadienoico
6	23,93	268	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	2	Éster metílico ácido 9-hexedecenoico
7	25,17	270	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	1	Éster metílico ácido 14-metil pentadecanoico
8	25,44	282	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	2	Éster metílico ácido 7-metil-6-hexadecenoico
9	27,65	284	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	1	Éster metílico ácido heptadecanoico
10	30,76	294	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	3	Éster metílico ácido 9,12-octadecadienoico
11	31,15	298	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	1	Éster metílico ácido octadecanoico
12	35,39	322	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	3	Éster metílico ácido 11,13-eicosadienoico
13	36,27	326	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	1	Éster metílico ácido eicosanoico
14	38,99	340	C <sub>22</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	1	Éster metílico ácido heneicosanoico
15	41,69	354	C <sub>23</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	1	Éster metílico ácido docosanoico
16	44,87	368	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	1	Éster metílico ácido tricosanoico
17	47,87	382	C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	1	Éster metílico ácido tetracosanoico
18	50,25	396	C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	1	Éster metílico ácido pentacosanoico
19	52,88	410	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	1	Éster metílico ácido hexacosanoico

a) fm: fórmula molecular; b) tr: tiempo de retención; c) M<sup>+</sup>: catión radical; d) IDH: índice de deficiencia de hidrogeno

### Fracción de esteroides

El compuesto elucidado (ergosterol) mostró un tr de 52,43 min, su espectro de masas muestra un catión radical  $M^+$  a  $m/z = 396$ , consistente con una fórmula condensada  $C_{28}H_{44}O$  con un IDH = 7, que corresponde a 7 insaturaciones, donde 4 de ellas pertenecen a los cierres de anillos y las restantes se deben a la presencia de 3 dobles enlaces en la molécula. Este compuesto presenta fragmentaciones a  $m/z$ : 396( $M^+$ ), 381( $M^+$ -Metilo), 378( $M^+$ -H<sub>2</sub>O), 363( $M^+$ -Metilo-H<sub>2</sub>O), 337( $M^+$ -59), 271( $M^+$ -Cadena lateral), 253( $M^+$ -Cadena lateral-H<sub>2</sub>O), 211(Fisión anillo D-H<sub>2</sub>O) y 143( $M^+$ -H<sub>2</sub>O-Fisión anillo C-metilo). El perfil del espectro de masas es típico de un esteroide con núcleo  $\Delta^{5,7}$ -3-Hidroxiandrostadieno. La diferencia entre el ion molecular y el ion a  $m/z = 271$  indicó una composición para esta cadena de  $-C_9H_{17}$  con la presencia de una insaturación ubicada en el carbono 22, además las señales coinciden con las reportadas para el ergosterol.

### Fracción triterpenoidal

Al ser reveladas las placas de esta fracción en CCD con ácido sulfúrico en etanol al 5 % (mancha roja), al igual que con solución de vainillina, vapores de yodo y observada a las longitudes de onda de 254 y 395 nm, se evidenció en todos los casos, una sola mancha, la cual fue tratada obteniéndose 10 mg de un sólido cristalino en forma de agujas.

El cromatograma obtenido por CGAR-EM mostró la presencia de un compuesto mayoritario (denominado compuesto A) con un tr de 56,26 min. Por su parte en el espectro de masas, se pudo observar un  $M^+$  a  $m/z = 454$ , que corresponde con la fórmula molecular de  $C_{30}H_{47}O_3$ , la cual tiene un IDH = 8 equivalente a la presencia de los 4 anillos del núcleo esteroide y a 4 insaturaciones distribuidas en la molécula.

El espectro de RMN <sup>13</sup>C mostró 30 señales, consistentes con los 30 átomos de carbono de la fórmula molecular ( $C_{30}H_{47}O_3$ ), 7 de estas señales se encuentran desplazadas a campo bajo lo que indica la presencia de grupos carbonílicos cetónicos (C3: 214,698 y C7: 198.103 ppm), hidroxílicos (C26: 69,088 ppm) y de dobles enlaces (C8: 139,590, C9: 162,733, C24: 126,874 y C25: 134,4 ppm).

El análisis de DEPT 135 permitió clasificar los diferentes átomos de carbono en 5 grupos metínicos "CH", 8 grupos metílicos "CH<sub>2</sub>", 7 grupos metilos "CH<sub>3</sub>" y por consiguiente 15 Carbonos cuaternarios.

Del espectro de RMN <sup>1</sup>H se observó a campo bajo dos señales fundamentales que justifican la estructura de la cadena lateral en las posiciones 24 y 26. La primera a  $\delta$  5,39 ppm característica de la región de protones olefínicos y la segunda a  $\delta$  4,00 ppm propia de la zona de átomos de hidrógenos unidos a carbonos que están enlazados a través de enlaces sencillos a heteroátomos.

Al realizar una ampliación de dichas señales se evidenció que 5,39 ppm (1H, t, J = 5,4 Hz), forma un triplete que integra para un protón que corresponde al hidrógeno olefínico que está acoplado con una J = 5,4 Hz propia de protones vecinales, con los dos protones de la posición 23 y la señal 4.00 ppm (2H, s), es un singlete debido a los dos protones (equivalentes) de la posición 26, cuyo átomo de carbono está unido a un grupo hidroxilo.

Los datos espectrales para el compuesto A (tabla 2), coinciden en su totalidad con los valores reportados para la Ganoderona A (5 $\alpha$ -Lanosta-8,24-dien-26-hidroxi-3,7-diona), aislada a partir de *Ganoderma pfeifferi*<sup>1</sup>.

**Tabla 2.** Datos espectroscópicos de RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  y DEPT 135

N° C	Compuesto A		
	$^{13}\text{C}$	DEPT 135	$^1\text{H}$ $\delta$ /ppm
1	35,4	CH	1,76m- 2,08 m
2	34,4	CH	2,45 dd - 2,70 m
3	214,7	C	--
4	47,2	C	--
5	50,4	CH	2,10 m
6	37,1	CH <sub>2</sub>	2,35m - 2,52 m
7	198,1	C	--
8	139,6	C	--
9	162,7	C	--
10	39,4	C	--
11	23,9	CH <sub>2</sub>	2,30 m
12	30,1	CH <sub>2</sub>	1,76m - 1,80m
13	44,9	C	--
14	47,8	C	--
15	31,9	CH <sub>2</sub>	1,65m - 2,05m
16	28,7	CH <sub>2</sub>	1,38 m - 2,01m
17	49,0	CH	1,47 m
18	15,9	CH <sub>3</sub>	0,68 s
19	17,9	CH <sub>3</sub>	1,34 s
20	36,2	CH	1,40 m
21	18,7	CH <sub>3</sub>	0,95 d
22	35,9	CH <sub>2</sub>	1,10 m - 1,53 m
23	24,5	CH <sub>2</sub>	1,89m - 2,07m
24	126,9	CH	5,39 t (5,4)
25	134,4	C	--
26	69,0	CH <sub>2</sub>	4,00s
27	13,7	CH <sub>3</sub>	1,67 s
28	25,4	CH <sub>3</sub>	1,09 s
29	21,4	CH <sub>3</sub>	1,11 s
30	24,9	CH <sub>3</sub>	0,93 s

#### Actividad antioxidante

Al realizar la evaluación de la actividad antioxidante del extracto etanólico mediante los métodos DPPH y ABTS se encontraron valores de  $\text{IC}_{50} = 85,63 \mu\text{g/mL}$  y  $62,28 \mu\text{g/mL}$  respectivamente. Estos fueron expresados como capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC;  $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de muestra) y capacidad antioxidante equivalente al ácido ascórbico (AAEAC;  $\mu\text{mol}$  de ácido ascórbico/g de muestra) obteniéndose valores de  $229,656 \mu\text{mol/g}$  y  $275,682 \mu\text{mol/g}$ , en el respectivo orden.

Actividades citotóxica y leishmanicida *in vitro*

A los compuestos se les realizaron evaluaciones *in vitro* de citotoxicidad sobre la línea celular promonocítica humana U-937, así como de actividad leishmanicida en intracelulares de *L. panamensis* (cepa UA140 pirGFP) utilizando el micrométodo enzimático MTT para las U-937 y citometría de flujo para los intracelulares. tabla 3

**Tabla 3.** Actividad citotóxica y leishmanicida *in vitro* del extracto etanólico

Sustancia a Evaluar	CL <sub>50</sub> (µg/mL) X ± SD	% de inhibición X ± SD 20 µg/mL
	U-937	Amastigotes intracelulares
Extracto EtOH <i>Ganoderma</i> sp.	> 200,0	21,5 ± 4,4
Anfotericina B	38,6 ± 0,2	62,7 ± 1,4

DISCUSIÓN

Este estudio fue diseñado con el propósito de determinar los constituyentes de origen lipídico presentes en el extracto etanólico del basidioma de *ganoderma* sp. (MG Torres-Torres 997), evaluando sus actividades antioxidante y leishmanicida. Los resultados mostraron que 21 compuestos se identificaron, principalmente a través del análisis hecho por Cromatografía de Gases de alta Resolución Acoplada a Espectrometría de Masas. Dentro de estos metabolitos se encuentran 19 ácidos grasos, 1 esteroide con núcleo ergostano y 1 compuesto triterpenoidal con núcleo lanostano, este último además elucidado utilizando técnicas espectroscópicas como Resonancia Magnética de Protones y Carbono.<sup>13</sup>

En el organismo estudiado fue evidenciada la presencia de ácidos grasos de cadena hidrocarbonada larga, en compuestos de esta clase como el ácido heptadecanoico, se ha encontrado que tienen actividad antitumoral sobre varias líneas de células cancerosas.<sup>52-54</sup>

En este estudio se identificaron compuestos como el éster metílico del ácido nonanodioco y el éster metílico del ácido 7-metil-6-hexadecenoico, metabolitos secundarios que se reportan por primera vez en especies de hongos del género *Ganoderma*. También se observaron ácidos grasos saturados cuya presencia en la naturaleza es abundante y habitual, tales como los ácidos: mirístico (14:0), pentadecílico (15:0), esteárico (18:0), araquídico (20:0), heneicosílico (21:0), behénico (22:0), tricosílico (23:0) y lignocérico (24:0).

Dentro de los ácidos grasos insaturados está el ácido linoleico (ácido 9,12-octadecadienoico 18:2(n-6)), ácido graso esencial relacionado con la prevención de enfermedades cardiovasculares, presente en otras especies del género *Ganoderma* como: *G. sinense*, *G. lucidum* y *G. australe*<sup>55</sup>.

Otra de las sustancias químicas identificadas fue el ergosterol (Ergosta-5,7,22, trien-3-ol), es lógico encontrar este compuesto debido principalmente a que se encuentra formando parte de las paredes celulares de los hongos macromicetos.

Con referencia a la sustancia identificada como Ganoderona A (5 $\alpha$ -Lanosta-8,24-dien-26-hidroxi-3,7-diona), es reconocida como un compuesto triterpenoidal que conforme a la bibliografía consultada presenta actividad antiviral frente al *virus del herpes simple tipo 1* (VHS-1).<sup>51</sup>

Los IC<sub>50</sub> obtenidos en la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos fueron significativos, principalmente para valores determinados a través del método de ABTS en donde todos los resultados son menores si se les compara con los del método de DPPH. Este comportamiento sugiere que en el extracto se encuentran presentes compuestos antioxidantes tanto de naturaleza hidrofílica como lipofílica que pueden estabilizar el radical catiónico. Estos datos son consistentes con los reportados en diversos estudios para la actividad antioxidante de hongos del género *Ganoderma*<sup>56</sup>.

El extracto etanólico de *Ganoderma* sp. no presentó citotoxicidad frente a la línea celular promonocítica humana U937 (CL<sub>50</sub> > 200,0  $\mu$ g/mL) y tampoco mostró actividad leishmanicida, factor que posiblemente este asociado a la ausencia de compuestos heterocíclicos nitrogenados, los cuales son los que comúnmente se relacionan con este tipo de actividad.<sup>57,58</sup>

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Córdoba por la financiación del trabajo

A la Universidad Tecnológica de Chocó "BIOINNOVA"

Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET de la Universidad de Antioquía.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bishop KS, Kao CH, Xu Y, Paterson RR, Glucina MP, Ferguson LR. From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry*. 2015;114:56-65.
2. Cilerdžić J, Vukojević J, Stajić M, Stanojković T, Glamočlija J. Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate. *J Ethnopharmacology*. 2014;155(1):312-319
3. Sabulal B, Anil JJ, Balaji G. Secondary metabolites from *Ganoderma*. *Phytochemistry*. 2015;114:66-101.
4. Tran HB, Yamamoto A, Matsumoto S, Ito H, Igami K, Miyazaki T, et al. Hypotensive Effects and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Peptides of Reishi (*Ganoderma lingzhi*) Auto-Digested Extract. *Molecules*. 2014;19(9):13473-13485.
5. Nguyen VT, Tung NT, Cuong TD, Hung TM, Kim JA, Woo MH, et al. Cytotoxic and anti-angiogenic effects of lanostane triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Phytochem Lett*. 2015;12:69-74.

6. Liu Z, Xing J, Zheng S, Bo R, Luo L, Huang Y, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharides encapsulated in liposome as an adjuvant to promote Th1-bias immune response. *Carbohydr Polym.* 2016;142:141-48.
7. Huang J, Nie Q, Liu X, Zhang S, Nie S, Huang D, et al. *Ganoderma atrum* polysaccharide modulates TNF- $\alpha$  secretion and mRNA expression in macrophages of S-180 tumor-bearing mice. *Food Hydrocollo.* 2016;53:24-30.
8. Liu Z, Xing J, Huang Y, Bo R, Zheng S, Luo L, et al. Activation effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides liposomes on murine peritoneal macrophages. *Int J Biol Macromol.* 2016;82:973-78.
9. Pi CC, Chu CL, Lu CY, Zhuang YJ, Wang CL, Yu YH, et al. Polysaccharides from *Ganoderma formosanum* function as a Th1 adjuvant and stimulate cytotoxic T cell response in vivo. *Vaccine.* 2014;32(3):401-08.
10. Liu Z, Ma X, Deng B, Huang Y, Bo R, Gao Z, et al. Development of liposomal *Ganoderma lucidum* polysaccharide: Formulation optimization and evaluation of its immunological activity. *Carbohydr Polym.* 2015;117:510-17.
11. Ma JQ, Liu CM, Qin ZH, Jiang JH, Sun YZ. *Ganoderma applanatum* terpenes protect mouse liver against benzo(a)pyren-induced oxidative stress and inflammation. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2011;31(3):460-68.
12. Liu YJ, Du JL, Cao LP, Jia R, Shen YJ, Zhao CY, et al. Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio* L.) . *Int Immunopharmacol.* 2015;25(1):112-20.
13. Liu LY, Chen H, Liu C, Wang HQ, Kang J, Li Y, et al. Triterpenoids of *Ganoderma theaeecolum* and their hepatoprotective activities. *Fitoterapia.* 2014;98:254-59.
14. Peng XR, Liu JQ, Han ZH, Yuan XX, Luo HR, Qiu MH. Protective effects of triterpenoids from *Ganoderma resinaceum* on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced toxicity in HepG2 cells. *Food Chem.* 2013;141(2):920-26.
15. Chien RC, Yen MT, Tseng YH, Mau JL. Chemical characteristics and anti-proliferation activities of *Ganoderma tsugae* polysaccharides. *Carbohydr Polym.* 2015;128:90-8.
16. Ferreira I, Heleno SA, Reis FS, Stojkovic D, Queiroz MJ, Vasconcelos MH, Sokovic M. Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. *Phytochemistry.* 2014;114:38-55.
17. Zhang S, Nie S, Huang D, Huang J, Feng Y, Xie M. *Ganoderma atrum* polysaccharide evokes antitumor activity *via* cAMP-PKA mediated apoptotic pathway and down-regulation of Ca<sup>2+</sup>/PKC signal pathway. *Food Chem Toxicol.* 2014;68:239-46.
18. Wang JH, Zhou YJ, Zhang M, Kan L, He P. Active lipids of *Ganoderma lucidum* spores-induced apoptosis in human leukemia THP-1 cells via MAPK and PI3K pathways. *J Ethnopharmacol.* 2012;139(2):582-89.

19. Zhu K, Nie S, Gong D, Xie M. Effect of polysaccharide from *Ganoderma atrum* on the serum metabolites of type 2 diabetic rats. *Food Hydrocoll.* 2016;53:31-36.
20. Qiu J, Wang X, Song C. Neuroprotective and antioxidant lanostanoid triterpenes from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. *Fitoterapia.* 2016;109:75-79.
21. Huang Y, Li N, Wan JB, Zhang D, Yan D. Structural characterization and antioxidant activity of a novel heteropolysaccharide from the submerged fermentation mycelia of *Ganoderma capense*. *Carbohydr Polym.* 2015;134:752-60.
22. Li K, Yu M, Hu Y, Guangming Ren, Tingting Zang, Xiuhong Xu, Juanjuan Qu. Three kinds of *Ganoderma lucidum* polysaccharides attenuate DDC-induced chronic pancreatitis in mice. *Chem Biol Interact.* 2016;247:30-38.
23. Choi S, Nguyen VT, Tae N, Lee S, Sungwoo Ryoo, Byung-Sun Min, Jeong-Hyung Lee. Anti-inflammatory and heme oxygenase-1 inducing activities of lanostane triterpenes isolated from mushroom *Ganoderma lucidum* in RAW264.7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;280(3):434-42.
24. Hasnat MA, Pervin M, Cha KM, Kim SK, Lim BO. Anti-inflammatory activity on mice of extract of *Ganoderma lucidum* grown on rice via modulation of MAPK and NF- $\kappa$ B pathways. *Phytochemistry.* 2015;114:125-36.
25. Zhang W, Tao J, Yang X, Yang Z, Zhang L, Liu H, Wu K, Wu J. Antiviral effects of two *Ganoderma lucidum* triterpenoids against enterovirus 71 infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;449(3):307-12.
26. Ma K, Li L, Bao L, He L, Sun C, Zhou B, Si S, Liu H. Six new 3,4-seco-27-norlanostane triterpenes from the medicinal mushroom *Ganoderma boninense* and their antiplasmodial activity and agonistic activity to LXR. *Tetrahedron.* 2015;71(12):1808-14.
27. Ma K, Ren J, Han J, Bao L, Li L, Yao Y, Sun C, Zhou B, Liu H. Ganoboninketals A-C, Antiplasmodial 3,4-seco-27-Norlanostane Triterpenes from *Ganoderma boninense*. *J Nat Prod.* 2014;77(8):1847-52.
28. Isaka M, Chinthanom P, Sappan M, Danwisetkanjana K, Boonpratuang T, Choeyklin R. Antitubercular Lanostane Triterpenes from Cultures of the Basidiomycete *Ganoderma* sp. BCC 16642. *Jo Nat Prod.* 2016;79(1):161-69.
29. Gokce EC, Kahveci R, Atanur OM, Gürer B, Aksoy N, Gokce A, Sargon MF, Cemil B, Erdogan B, Kahveci O. Neuroprotective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides against traumatic spinal cord injury in rats. *Injury.* 2015;46(11):2146-55.
30. Ma HT, Hsieh JF, Chen ST. Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry.* 2015;114:109-13.
31. Benito-Román O, Alonso E, Cocero MJ, Goto M.  $\beta$ -Glucan recovery from *Ganoderma lucidum* by means of pressurized hot water and supercritical CO<sub>2</sub>. *Food and Bioproducts Processing.* 2016;98:21-28.
32. Lin KW, Maitraie D, Huang AM, Wang JP, Lin CN. Triterpenoids and an alkamide from *Ganoderma tsugae*. *Fitoterapia.* 2016;108:73-80.

33. Dai WF, Guo PX, Tu ZC, Li RT, Cheng YX. Five new compounds from the fungus *Ganoderma petchii*. *Fitoterapia*. 2015;106:68-71.
34. Peng XR, Liu JQ, Xia JJ, Wang CF, Li XY, Deng YY, Bao NM, Zhang ZR, Qiu MH. Lanostane triterpenoids from *Ganoderma hainanense* J. D. Zhao. *Phytochemistry*. 2015;(114):137-45.
35. Zhao ZZ, Chen HP, Li ZH, Dong ZJ, Bai X, Zhou ZY, Feng T, Liu JK. Leucocontextins A-R, lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma leucocontextum*. *Fitoterapia*. 2016;109:91-98.
36. Lindequist U, Jülich WD, Witt S. *Ganoderma pfeifferi* - A European relative of *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*. 2015;114:102-08
37. Hu LL, Ma QY, Huang SZ, Guo ZK, Ma HX, Guo JC, Dai HF, Zhao YX. A new nortriterpenoid from the fruiting bodies of *Ganoderma tropicum*. *Phytochem Lett*. 2014;7:11-13.
38. Zhao XR, Huo XK, Dong PP, Wang C, Huang SS, Zhang BJ, Zhang HL, Deng S, Liu KX, Ma XC, Inhibitory Effects of Highly Oxygenated Lanostane Derivatives from the Fungus *Ganoderma lucidum* on P-Glycoprotein and-Glucosidase. *J Nat Prod*. 2015;78(8):1868-76.
39. Wang K, Bao L, Xiong W, Ma K, Han J, Wang W, Yin W, Liu H. Lanostane Triterpenes from the Tibetan Medicinal Mushroom *Ganoderma leucocontextum* and Their Inhibitory Effects on HMG-CoA Reductase and  $\alpha$ -Glucosidase. *J Nat Prod*. 2015;78(8):1977-89.
40. Zhao ZZ, Yin RH, Chen HP, Feng T, Li ZH, Dong ZJ, Cui BK, Liu JK. Two new triterpenoids from fruiting bodies of fungus *Ganoderma lucidum*. *J Asian Nat Prod*. 2015;17(7):750-5.
41. Wang XF, Yan YM, Wang XL, Ma XJ, Fu XY, Cheng YX. Two new compounds from *Ganoderma lucidum*. *J Asian Nat Prod Res*. 2015;17(4):329-32.
42. Zhao ZZ., Chen HP, Dong ZJ, Liu JK, Feng T, Li ZH. Lucidimine A-D, four new alkaloids from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *J Asian Nat Prod*. 2015;17(12):1160-65.
43. Fraga I, Coutinho J, Bezerra RM, Dias AA, Marques G, Nunes FM. Influence of culture medium growth variables on *Ganoderma lucidum* exopolysaccharides structural features. *Carbohydr Polym*. 2014;111:936-46.
44. Sudheer S, Yeoh WK, Manickam S, Ali A. Effect of ozone gas as an elicitor to enhance the bioactive compounds in *Ganoderma lucidum*. *Postharvest Biol Technol*. 2016;117:81-88.
45. Yang J, Chen YW, Leong NI, Zhao J, Duan, JA, Tang YP, Li SP. Quality evaluation of different products derived from *Ganoderma*. *J. Med. Plant Res*. 2012;6(10):1969-74.
46. Torres-Torres MG, Guzmán-Dávalos L, De Mello Gugliotta A. *Ganoderma* in Brazil: Known Species and New Records. *Micotaxon*. 2012;121(40):93-132.

47. García-Bustos MF, González-Prieto G, Ramos F, Mora MC, Hashiguchi Y, Parodi C, et al. Clinical and epidemiological features of leishmaniasis in northwestern-Argentina through a retrospective analysis of recent cases. *Act Trop.* 2016;154:125-32.
48. Bar-Or D, Bar-Or R, Rael LT, Brody EN. Oxidative stress in severe acute illness. *Redox Biol.* 2015;4:340-45.
49. Guzmán M, Santafé G, Torres O, Angulo A. Chemical study and antioxidant and Bactericide activities from *Ganoderma applanatum*. *Rev Bio Agro.* 2013;11(1):88-93.
50. Christie W. Mass Spectrometry of Fatty Acid Derivatives. The AOCS Lipid Library [citado 22 ago 2014]; 2009. Disponible en: <http://lipidlibrary.aocs.org/ms/masspec.html>.
51. Niedermeyer T, Lindequist U, Mentel R, Gordes D, Schmidt E, Thurow K, Lalk M. Antiviral Terpenoid Constituents of *Ganoderma pfeifferi*. *J Nat Prod.* 2005;68:1728-31.
52. Fukuzawa M. Possible involvement of long chain fatty acids in the spores of *Ganoderma lucidum* (Reishi Houshi) to its anti-tumor activity. *Biol Pharm Bull.* 2008;31:1933-37.
53. Gao P. Isolation and identification of C-19 fatty acids with anti-tumor activity from the spores of *Ganoderma lucidum* (reishi mushroom). *Fitoterapia.* 2012;83:490-99.
54. Zhang J, Zheng L, Magnusson K, Wang J, Liu X. Lipid extract from completely sporoderm-broken germinating *Ganoderma sinensis* spores elicits potent antitumor immune responses in human macrophages. *Phytotherapy Research.* 2009;23(6):844-50.
55. Lv GP, Zhao J, Duan JA, Tang, YP, Li SP. Comparison of sterols and fatty acids in two species of *Ganoderma*. *Chem Cent J.* 2012;6(1):10-18.
56. Zhen H, Zhang Z, Chen H, Tian Z. Antioxidant activity of ethanol extract from *Ganoderma lucidum* cultivated in the medium supplemented with herbs. *AJMP.* 2013;1(1):006-013.
57. Sánchez E, Santafé G, Torres O, Robledo S. Compuestos sintéticos del tipo estirilquinolinas con actividades leishmanicida y citotóxica. *Biomédica.* 2014;34:605-611.
58. No JH. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta Trop.* 2016;155:113-23

Recibido: 1 de julio de 2015.

Aprobado: 20 de abril de 2016.

*Gilmar Santafé Patiño*: Departamento de Química, Universidad de Córdoba. Montería, Colombia. Correo electrónico: [gsantafe@correo.unicordoba.edu.co](mailto:gsantafe@correo.unicordoba.edu.co)

---