



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA.

ESCUELA DE QUÍMICA

LENTINOIDES, NUEVOS PRODUCTOS NATURALES AISLADOS DEL HONGO *Lentinus strigellus*

ASESOR: DR. LUIS CUBILLA RÍOS

PRESENTADO POR: ROGER VÁSQUEZ

PANAMÁ

2022

PAGINA PARA LA FIRMA DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Asesor: Dr. Luis Cubilla Ríos.

Jurado: Dra. Lilia Chérigo.

Jurado: Dr. Héctor Montenegro.

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a:

Mis padres Clarisa y Roger, quienes a lo largo de mi carrera me brindaron todo su amor, esfuerzo y apoyo incondicional para hacer realidad este sueño.

A mis hermanos Eric, Adrián y Samir por estar siempre apoyándome para seguir adelante.

A mi Tía Fani y mi abuela Digna por todo el amor, esfuerzo y confianza que me brindaron durante todos estos años de estudio.

AGRADECIMIENTOS

Quiero Comenzar por agradecer a Dios, por mantenerme enfocado y en el camino correcto porque sin su gracia, nada de esto sería posible.

Gracias a mis padres por todo el apoyo, esfuerzo y confianza depositados en mí porque sin su esfuerzo no habría podido llegar aquí.

Gracias al Dr. Luis Cubilla, Profesor de la universidad de Panamá, departamento de química orgánica, por permitirme formar parte de su equipo de investigación, por acogerme como estudiante y por todos los conocimientos que me transmitió durante la investigación.

Gracias a la Lic. Madeleine Aguilar por preparar los cultivos de *Lentinus strigellus* y por ser una excelente compañera.

Gracias a la Profesora Nivia Ríos por formar parte de nuestro equipo de trabajo y preparar los bioensayos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HONGOS	3
2.1. HONGOS: GENERALIDADES.....	3
2.2. GÉNERO LENTINUS.....	3
2.3. LENTINUS STRIGELLUS.	5
2.4. METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE <i>LENTINUS STRIGELLUS</i> . 5	
3. ANTECEDENTES	7
3.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL FÚNGICO:.....	7
3.2. ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE <i>LENTINUS STRIGELLUS</i> : SELECCIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO.....	7
3.3. ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE <i>LENTINUS STRIGELLUS</i> : ADICION DE ELICITORES Y MODIFICACIÓN DEL pH.	7
3.4. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	8
3.5. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO	8
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	9
4.1. MATERIALES Y REACTIVOS.....	9
4.2. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN C (ACETATO DE ETILO).	9
4.3. AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS	11
4.3.1. OBTENCIÓN DEL COMPUESTO 6 Y 7.....	11
4.3.2. OBTENCIÓN DEL COMPUESTO 1 Y 5.....	13
4.3.3. OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS 2, 3 Y 4.	16
4.4. ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL.....	19
4.4.1. PREPARACIÓN DE ESTÁNDAR DE TURBIDEZ MC FARLAND 0.5. ..	19
4.4.2. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO IN VITRO.....	20
4.4.3. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC).	20

5. RESULTADOS.....	20
5.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS PANEPOXIDONA, ISOPANEPOXIDONA Y ESTRIGUELONA A.....	21
5.2. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DEL LENTINOIDE A.	23
5.3. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DEL LENTINOIDE B.	28
5.4. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DEL LENTINOIDE C.	35
5.5. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DEL LENTINOIDE D.	41
5.6. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL.	42
5.7. RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC).....	43
CONCLUSIONES.	44
RECOMENDACIONES	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.	Gradiente utilizado en HPLC para separar los compuestos 6 y 7.....	12
Tabla 2.	Gradiente utilizado en HPLC para purificar Striguellona A.	14
Tabla 3.	Gradiente utilizado en HPLC para separar los compuestos 1 y 5.....	15
Tabla 4.	Gradiente HPLC utilizado para separar Lentinoide B, C y D.	16
Tabla 5.	Comparacion de desplazamientos ¹H-RMN de estriguelona A, panepoxidona e isopanepoxidona.	21
Tabla 6.	Datos RMN para el lentinoide A en MeOH-<i>d</i>₄, (<i>J</i> en Hz; ¹H-RMN a 400 MHz; ¹³C-RMN a 100 MHz).....	24
Tabla 7.	Datos RMN para el lentinoide B en MeOH-<i>d</i>₄, (<i>J</i> en Hz; ¹H-RMN a 400 MHz; ¹³C-RMN a 100 MHz).....	29
Tabla 8.	Datos RMN para el lentinoide C en MeOH-<i>d</i>₄, (<i>J</i> en Hz; ¹H-RMN a 600 MHz; ¹³C-RMN a 150 MHz).....	35
Tabla 9.	Actividad antibacterial de los compuestos 1–3 y 5–7, diámetros de inhibición (mm). 42	
Tabla 10.	Actividad antibacterial de los lentinoides A, B y C, MIC (µg/mL).....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructuras de los compuestos aislados 1-7.....	2
Figura 2.	Metabolitos secundarios del Género <i>Lentinus</i>	4
Figura 3.	Metabolitos secundarios aislados de <i>Lentinus strigellus</i>	6
Figura 4.	Platos Petri (145 mm) con <i>Lentinus strigellus</i> después del periodo de incubación. 8	8
Figura 5.	Diagrama de fracciones obtenidas del extracto de <i>Lentinus strigellus</i>	10
Figura 6.	Separación de metabolitos de la fracción C (Acetato de etilo).	10
Figura 7.	Diagrama de fracciones (C1-C8) agrupadas de la fracción C.....	10
Figura 8.	Vista UV de algunas de las fracciones recogidas de la columna cromatográfica de la fracción C (Acetato de etilo).....	11
Figura 9.	Agrupación de fracciones obtenidas de columna cromatográfica de la fracción C (Acetato de etilo).	11
Figura 10.	Diagrama de separación de la fracción C6 (izquierda), Cromatograma HPLC del aislamiento de los compuestos 6 y 7 (derecha).....	12
Figura 11.	Diagrama de separación de la fracción C7.....	13
Figura 12.	Diagrama de separación de la fracción C7.8 (izquierda), Cromatograma HPLC del aislamiento del compuesto 5 (derecha).....	14
Figura 13.	Diagrama de separación de la fracción C7.9 (izquierda), Cromatograma HPLC del compuesto 5, Tr: 26 min y compuesto 1, Tr: 32 min (derecha).	15
Figura 14.	Cromatograma HPLC del compuesto 1 purificado.	16
Figura 15.	Diagrama de separación de la fracción C7.10 (izquierda), Cromatograma HPLC de la fracción C7.10 (derecha).....	17
Figura 16.	Cromatograma HPLC del compuesto 2 puro.	17
Figura 17.	Cromatograma HPLC de la fracción C7.10.5.....	18
Figura 18.	Cromatograma HPLC del aislamiento del compuesto 3.....	18
Figura 19.	Cromatograma HPLC del aislamiento del compuesto 4.....	19
Figura 20.	Espectro ¹ H RMN (400 MHz, cloroformo- <i>d</i> ₁) de Panepoxidona.....	22
Figura 21.	Espectro ¹ H RMN (400 MHz, metanol- <i>d</i> ₄) de Isopanepoxidona.....	22
Figura 22.	Espectro ¹ H RMN (400 MHz, metanol- <i>d</i> ₄) de estriguelona A.	23
Figura 23.	(A) Correlación espectroscópica (COSY) (marcado en azul), (HMBC) (Flechas negras) y (B) (NOESY) (Flechas negras) del lentinoide A.....	24
Figura 24.	Espectro ¹ H RMN (400 MHz, metanol- <i>d</i> ₄) del lentinoide A.	25

Figura 25.	Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, methanol- d_4) del lentinoide A.	25
Figura 26.	Espectro ^1H - ^{13}C HSQC RMN (en methanol- d_4) del lentinoide A.	26
Figura 27.	Espectro ^1H - ^{13}C HMBC RMN (en methanol- d_4) del lentinoide A.	26
Figura 28.	Espectro ^1H - ^1H COSY RMN (en methanol- d_4) del lentinoide A.	27
Figura 29.	Espectro ^1H - ^1H NOESY RMN (en methanol- d_4) del lentinoide A.	27
Figura 30.	ESIMS (modo positivo) del lentinoide A.	28
Figura 31.	(A) Correlación espectroscópica (COSY) (marcado en azul), (HMBC) (Flechas negras) y (B) (NOESY) (Flechas negras) del lentinoide B.	29
Figura 32.	Espectro ^1H RMN (400 MHz, methanol- d_4) del lentinoide B.	30
Figura 33.	Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, methanol- d_4) del lentinoide B.	30
Figura 34.	Espectro ^1H - ^{13}C HSQC RMN (en methanol- d_4) del lentinoide B.	31
Figura 35.	Espectro ^1H - ^{13}C HMBC RMN (en methanol- d_4) del lentinoide B.	31
Figura 36.	Espectro ^1H - ^1H COSY RMN (en methanol- d_4) del lentinoide B.	32
Figura 37.	Espectro ^1H - ^1H NOESY RMN (en methanol- d_4) del lentinoide B.	32
Figura 38.	Expansión de ^1H - ^1H NOESY para las correlaciones entre H4-H5 en el lentinoide B.33	
Figura 39.	ESIMS (modo positivo) del lentinoide B.	34
Figura 40.	(A) COSY (en Azul), HMBC (flechas negras) y (B) ROESY (flechas negras) del lentinoide C.	35
Figura 41.	Espectro ^1H RMN (a 600 MHz, en methanol- d_4) del lentinoide C.	36
Figura 42.	Espectro ^{13}C RMN (a 150 MHz, en methanol- d_4) del lentinoide C.	37
Figura 43.	Datos ^1H - ^{13}C HSQC RMN (en methanol- d_4) del lentinoide C.	37
Figura 44.	Datos ^1H - ^{13}C HMBC RMN (en methanol- d_4) del lentinoide C.	38
Figura 45.	Datos ^1H - ^1H COSY RMN (en methanol- d_4) del lentinoide C.	38
Figura 46.	Datos ^1H - ^1H ROESY RMN (en methanol- d_4) del lentinoide C.	39
Figura 47.	ESIMS (modo positivo) del lentinoide C.	40
Figura 48.	Espectro ^1H RMN (400 MHz, methanol- d_4) del lentinoide D.	41
Figura 49.	Halos de inhibición obtenidos de la difusión en disco de los Lentinoides, control positivo y negativo.	42

RESUMEN

El presente trabajo muestra los resultados obtenidos del estudio del hongo *Lentinus strigellus*, a lo largo de esta investigación se aislaron y caracterizaron cuatro lentinoides nuevos (**1–4**), y se identificaron los compuestos conocidos estriguelona A (**5**), isopanepoxidona (**6**) y panepoxidona (**7**).

Las estructuras de **1** a **4** se han establecido mediante análisis de RMN y MS-1D y 2D. Los compuestos (**1, 2, 3, 5, 6** y **7**) se probaron contra *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. Estos compuestos mostraron diámetros de inhibición que oscilaron entre 7,5 y 9,5 mm, sin embargo, cuando se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC), solo el compuesto **1** mostró una actividad significativa de 200 µg / mL.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos constituyen uno de los grupos de organismos más extensos y se estima que hay entre 1,5 y 5,1 millones de especies (Raja, Miller, Pearce, & Oberlies, 2017). Su capacidad para producir metabolitos secundarios con un amplio espectro de actividades biológicas provoca un alto nivel de interés en la comunidad científica (Hoffmeister & Keller, 2007). Algunos de ellos son comestibles y/o se han utilizado en la medicina tradicional, como el hongo *Lentinus strigellus* (Zheng, Zhao, Lu, Lin, & Zheng, 2009). En su etapa inicial de crecimiento, cambios en las condiciones de cultivo pueden conducir a la producción de nuevos compuestos, los cuales podrían poseer propiedades importantes; permitiendo el desarrollo de aplicaciones. Estos cambios pueden incluir el aumento o disminución de la temperatura de incubación, insertando o eliminando la iluminación, agregando algún elicitador como sales o aminoácidos, o modificando el pH del medio de cultivo. En la medicina son fuente de varios medicamentos, como, por ejemplo: la penicilina, un antibiótico ampliamente utilizado, el cual fue aislado del hongo *Penicillium notatum* y reforzó la investigación en el área de productos naturales con actividad farmacológica obtenidos a partir de hongos (Pinto, Silva, Bolzani, & Lopes, 2002).

Los géneros *Lentinus* y *Panus* tienen algunas similitudes que han generado controversia en algunos casos (Senthilarasu, 2015). *L. strigellus* también se ha descrito como *Panus strigellus* y *Panus rudis var strigellus* (Guzmán & Piepenbring, 2011). Compuestos como striguellona A (5), isopanepoxidona (6), panepoxidona (7), lentinoide E y otros análogos se han informado de *L. strigellus* (Barros-Filho B. , de Oliveira, Mafezoli, Barbosa, & Rodrigues-Filho, 2012). A lo largo de los años se ha demostrado la importancia de los metabolitos secundarios producidos por los hongos, ya que un gran número de compuestos antimicrobianos y antitumorales ha sido aislado de los mismos, resultando así en que muchos de ellos son actualmente utilizados como medicamentos.

En 1994, seis de los veinte medicamentos más vendidos fueron obtenidos de hongos o producidos a través de transformaciones químicas de metabolitos secundarios de hongos, como, por ejemplo: la lovastatina, un fármaco utilizado para reducir el colesterol y prevenir enfermedades cardiovasculares, cuya comercialización mundial es de aproximadamente mil millones de dólares por año (Pinto, Silva, Bolzani, & Lopes, 2002).

No obstante, todo lo que los hongos producen no es beneficioso para el hombre, algunos de ellos pueden producir metabolitos citotóxicos como las micotoxinas, que pueden causar diversas enfermedades en las personas y animales, además, son capaces de infectar plantas, cereales y alimentos, causando pérdidas en su producción (Bergamin-Filho & Kimati, 1995).

Objetivo General:

- Explorar el potencial del hongo *Lentinus strigellus* para producir metabolitos secundarios con estructuras novedosas.

Objetivos Específicos:

- Obtener un extracto del cultivo de *Lentinus strigellus* (LC46)
- Aislar nuevos metabolitos secundarios producidos por *Lentinus strigellus*.
- Proponer estructuras para los compuestos aislados utilizando sus datos de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.
- Probar la actividad antimicrobiana de los metabolitos aislados de *Lentinus strigellus*.

Continuando con el estudio de *Lentinus strigellus*, en este trabajo se presentan las metodologías utilizadas para la obtención del extracto, aislamiento de los compuestos y los resultados de la investigación, por lo tanto, se describe el aislamiento y la determinación estructural de cuatro nuevos lentinoides (**1-4**) junto con los compuestos conocidos (**5-7**) que mostraron propiedades antibacterianas (figura 1).

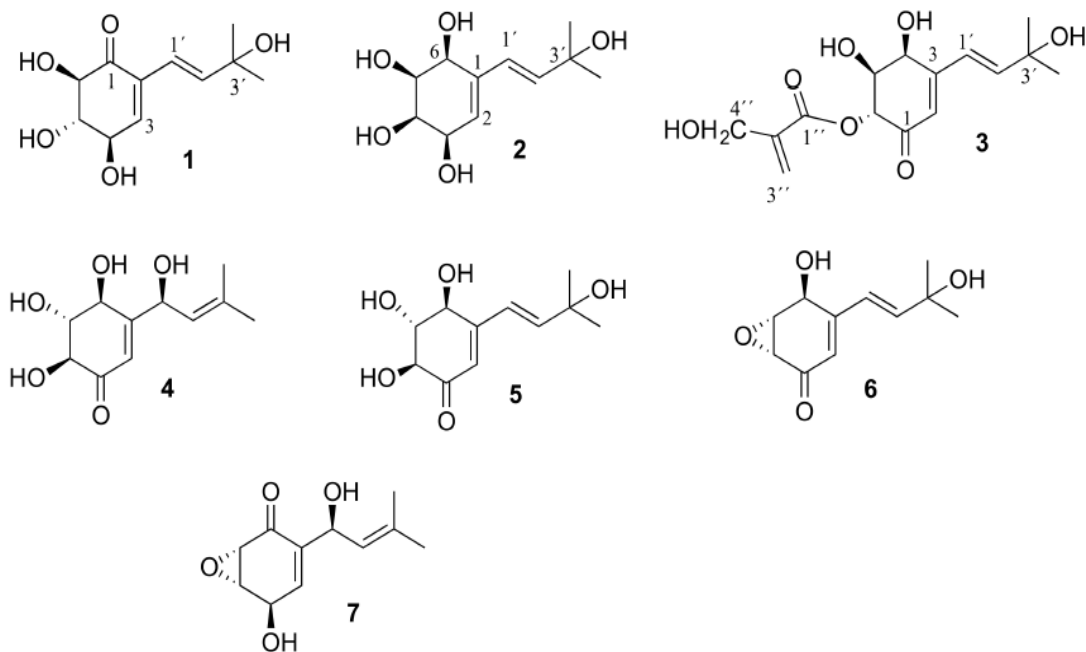


Figura 1. Estructuras de los compuestos aislados **1-7**.

2. HONGOS

2.1. HONGOS: GENERALIDADES.

Los hongos son organismos ricos en fibra dietética, vitaminas y minerales, debido a eso, estos se muestran como una fuente de alimentos bastante atractiva para el hombre, así como para la obtención y desarrollo de nuevos medicamentos (Pizzoferrato, Manzi, & Aguzzi, 2001). Algunos componentes de los hongos pueden reducir los niveles de colesterol, modular el sistema inmunológico e incluso inhibir el crecimiento tumoral (Smith, Rowan, & Sullivan, 2002).

Los hongos no son plantas ni animales, sino que están agrupados en un reino aparte, el Reino Fungi. La cantidad de formas, colores y tamaños que tienen los hongos es muy variada. Se pueden observar creciendo en forma de “sombrero” como, por ejemplo, el champiñón (*Agaricus bisporus*), de “estante” como *Trametes versicolor* o *Pycnoporus sanguineus* sobre troncos de árboles en pie o caídos, en forma de “copas” como *Cookeina colensoi* o *Ascobolus scatigenus*, o incluso en forma de “estrella” como en el caso de *Geastrum saccatum*. Sin embargo, el verdadero cuerpo del hongo, conocido como micelio, está compuesto por largos filamentos denominados hifas. Lo que comúnmente se llama “hongo”, son los cuerpos fructíferos de los mismos, encargados de producir las esporas cuya función es la reproducción sexual (Kuhar, Castiglia, & Papinutti, 2013).

La mayoría de los hongos, así como las bacterias, juegan un papel importante en la economía y en la naturaleza. Estos organismos, en busca de su alimento, descomponen las plantas muertas que recubren el suelo de las regiones boscosas y degradan los restos de otros organismos, en este proceso, producen dióxido de carbono, que pasa a la atmósfera y diversas sustancias minerales que se disuelven en el suelo a causa de la lluvia y humedad, los cuales constituyen alimento para otras plantas. Los hongos destruyen materiales que, de otro modo, se acumularían en cantidades incalculables (Bergamin-Filho & Kimati, 1995).

2.2. GÉNERO LENTINUS

El género *Lentinus* tiene una distribución mundial, pero sus especies se encuentran más abundantemente en las regiones tropicales. Los basidiocarpos suelen ser duros, casi con consistencia leñosa, y son más persistentes que los miembros típicos de agaricales. Esta característica es la principal causa de su abundancia en la naturaleza y con frecuencia representa el grupo dominante de hongos agaricoides en los bosques tropicales, siendo resistentes incluso a periodos adversos de sequía (Vargas-Isla & Ishikawa, 2008).

Los hongos del género *Lentinus* tienen una gran importancia económica y biológica debido a que muchas de las especies del género son consumidas y utilizadas en la medicina tradicional. Más de 40 especies del género *Lentinus* son conocidas en países tropicales, donde también son

consumidas, como, por ejemplo: la especie *Lentinus crinitus* L. Fr, *Lentinus velutinis* Fr, *Lentinus glabratus* Mont, *Lentinus cubensis* Berk y *Lentinus strigosus* schwein. Fr; los cuales son consumidos por el grupo indígena Yanomani en la amazona brasileña (Vargas-Isla & Ishikawa, 2008), así como también *Lentinus strigellus* (Lin, Lai, Huang, & Xie, 2004).

Una variedad de metabolitos secundarios ha sido reportada de hongos del género *Lentinus*, se destacan las siguientes clases: **benzopiranos**, **benzoquinonas**, **esteroides**, **sesquiterpenos**, **ciclohexanonas α - β epoxidadas** y **otros**. Entre estos se encuentran los compuestos 5-metil-2-metoxi-1,4-benzoquinona (**I**), el cual actúa como receptor antagonista del tromboxano A₂, aislado de *Lentinus adhaerens* y *Lentinus lepideus* (Lauer, Anke, & Hansske, 1991), Peróxido de ergosterol (**II**), aislado de *Lentinus giganteus* Berk (Gan, Zeng, Mei, & Dai, 2007), 2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona (**III**), aislado de *Lentinus crinitus* y *Lentinus connatus* (Abraham & Abate, 1995), 7-Desoxipaneoxidol (**IV**) y panepoxidiona (**V**), aislados de *Lentinus torulosus* (Kis, Closse, Sigg, Hruban, & Snatzke, 1970), Neopanepoxidona (**VI**), aislado de *Lentinus strigosus* (Kis, Closse, Sigg, Hruban, & Snatzke, 1970) y otros (Figura 2).

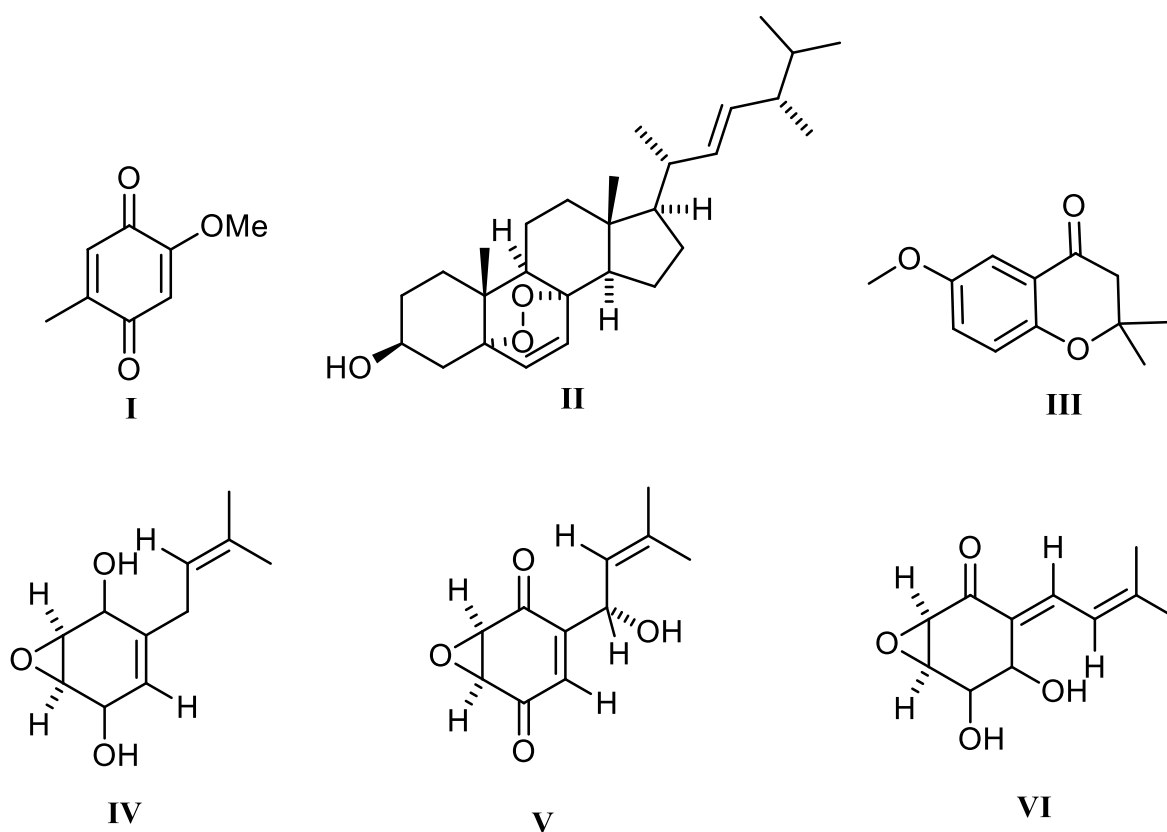


Figura 2. Metabolitos secundarios del Género *Lentinus*.

2.3. LENTINUS STRIGELLUS.

Lentinus strigellus Berk, cuyo basónimo es *Panus strigellus* Berk (nombre con el que fue originalmente aceptado por el código internacional de nomenclatura botánica) y sinónimo de *Panus rudis* var. *strigellus* Berk., es un hongo comestible perteneciente a la subclase Agaricomycetidae. Suele crecer con fructificaciones en forma de embudo, de 2 a 6 cm de ancho y más de 5 cm de alto, de color café-amarillento, café-violáceo, café-rojizo o café-canela, excepto sus laminas que son blanquecinas. Normalmente crecen sobre troncos podridos en la vegetación tropical (Guzmán & Piepenbring, 2011).

Este basidiomiceto se encuentra con frecuencia en países tropicales, principalmente en América latina (México, Brasil, Cuba, Colombia, Paraguay, Guadalupe, Perú, Argentina, Venezuela y Panamá) y suelen crecer en madera podrida o enterrada. En comparación con otros hongos comestibles como *Lentinula edodes* (Berk) mejor conocido como shiitake, este macro hongo, es considerado un nuevo miembro de la familia de hongos medicinales (Lin, Lai, Huang, & Xie, 2004).

Lentinus strigellus se caracteriza por su color violáceo, fue colectado en Panamá por primera vez en 1908 (Guzmán & Piepenbring, 2011)

2.4. METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE *LENTINUS STRIGELLUS*.

Con el pasar de los años, los microorganismos se han destacado como una fuente promisoriosa de metabolitos secundarios biológicamente activos, con estructuras variadas y aplicaciones en el desarrollo de nuevos agentes farmacéuticos (Jang, Kanoh, Adachi, & Shizuri, 2006).

Varias especies de hongos han sido evaluadas, tanto por su valor nutricional, como por sus propiedades farmacológicas, ya que son alimentos fisiológicamente beneficiosos. Además, algunas especies tienen efectos terapéuticos, enfrentando diversos tipos de enfermedades. Entre las diversas propiedades fisiológicas presentes, se destacan: mantenimiento de la homeostasis, la prevención de enfermedades como el cáncer y las enfermedades cardíacas, bajar la presión arterial y disminuir los niveles de colesterol en sangre (Wasser & Weis, 1999).

El hongo *Lentinus strigellus* no es la excepción y del mismo se han aislado variados metabolitos secundarios entre los cuales se pueden mencionar: Panepoxidona (I), isopanepoxidona (II), 2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona (III), (3S,4S)-3,4-dihidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano (IV), antraquinona fuscione (V), echinulina (VI) (Barros-Filho B. A., de Oliveira, Mafezoli, Barbosa, & Rodrigues-Filho, 2012), estriguelolida A (VII), estriguelol A (VIII), estriguelona A (IX), 3,4-*trans*-dihidroxi-6-metoxi-2,2-dimetilcromano (X), 3-hidroxi-6-metoxi-2,2-dimetilcroman-4-ona (XI), y 3-hidroxi-6-metoxi 2,2-dimetilcromano (XII) (Zheng, Zhao, Lu, Lin, & Zheng, 2009) y Lentinoide E (XIII) (Julca-Canto, Aguilar-Pérez, Ríos, Sousa, & Cubilla-Ríos, 2016) (Figura 3).

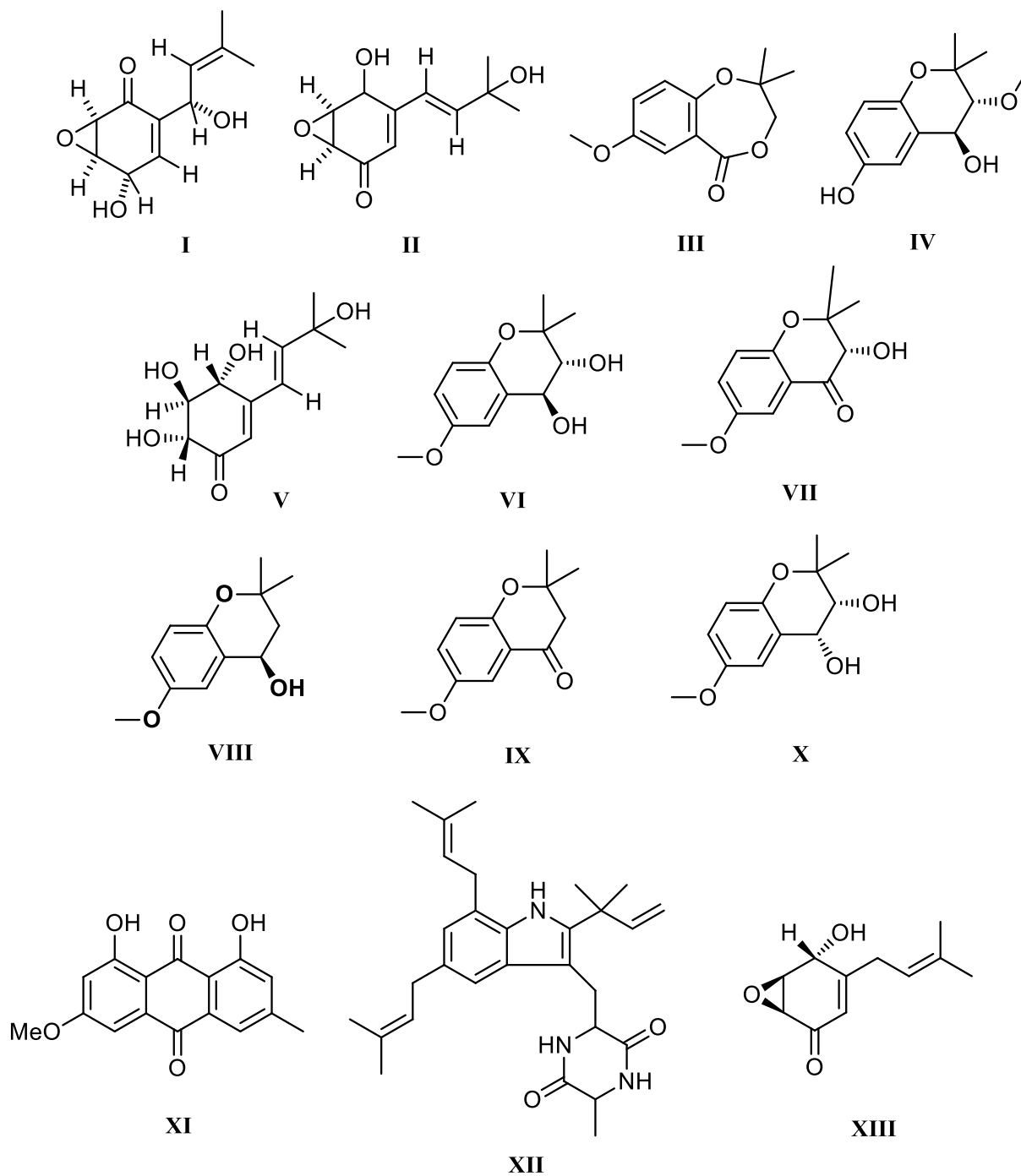


Figura 3. Metabolitos secundarios aislados de *Lentinus strigellus*.

El aislamiento de 4 nuevos productos naturales (Lentinoides A-D) obtenidos de los extractos de cultivos de *Lentinus strigellus*, y el hecho de que algunos de ellos mostraron propiedades antibacteriales, justificó la realización de esta tesis.

3. ANTECEDENTES

3.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL FÚNGICO:

Los cuerpos fructíferos de *Lentinus strigellus* (número de colección LC46), fueron recolectados en madera quemada cerca de la carretera La Nevera en Boquete, una región de la provincia de Chiriquí en Panamá. El espécimen fue identificado como *Lentinus strigellus* usando análisis filogenético molecular (Guzmán & Piepenbring, 2011). Los especímenes secados al aire se depositaron en el Herbario Nacional de la Universidad de Panamá (PMA115711) y en el Herbario de la Universidad Autónoma de Chiriquí (UCH7481), Panamá (Julca-Canto, Aguilar-Pérez, Ríos, Sousa, & Cubilla-Rios, 2016).

3.2. ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE *LENTINUS STRIGELLUS*: SELECCIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO.

Inicialmente, *Lentinus strigellus* se cultivó a pequeña escala en 3 medios de cultivo; Agar de dextrosa de papa (ADP), Agar de extracto de malta (AEM) y Agar de dextrosa de Sabouraud (ADS), usando 6 platos Petri (145 mm) para cada uno e incubándose por un periodo de 15 días a una temperatura de 26 °C con el objetivo de determinar cuál de los 3 cultivos producía mayor variedad de especies químicas, esto se verificó utilizando cromatografía de capa fina y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Se determinó que el medio con ADS producía la mayor diversidad de especies químicas (Julca-Canto, Aguilar-Pérez, Ríos, Sousa, & Cubilla-Rios, 2016).

3.3. ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE *LENTINUS STRIGELLUS*: ADICION DE ELICITORES Y MODIFICACIÓN DEL pH.

Los cultivos con ADS se evaluaron más a fondo incluyendo la adición de distintos tipos de elicitores (Ácido Glutámico, Arginina, CaCl₂, CuSO₄ y FeSO₄), así como 3 valores de pH distintos (4.6, 5.6 y 6.6) para observar el comportamiento del mismo con el fin de verificar si los elicitores y el cambio en el pH aumentaban o disminuían la producción de biomasa y si aumentaba o disminuía la diversidad de especies químicas, los periodos de incubación de 15 días a 26 °C fueron los mismos para todos los cultivos. Se encontró que el cultivo de SDA con el elicitador CaCl₂ y pH 4.6 produjo el mayor rendimiento de biomasa. Atendiendo a los resultados, finalmente se procedió a realizar un cultivo de 67 platos Petri (145 mm) en SDA + CaCl₂ + pH 4.6 (Julca-Canto, Aguilar-Pérez, Ríos, Sousa, & Cubilla-Rios, 2016).

3.4. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

Para obtener el extracto crudo, se tomó el contenido de 15 platos Petri, se cortó con una espátula en varios pedazos y se transfirió a un vaso químico de 1 L, se le agregó 400 mL de acetato de etilo y se agitó por 20 minutos utilizando un sonicador ultrasónico, este procedimiento se realizó hasta extraer todo el material de los 67 platos Petri. El disolvente acetato de etilo se evaporó utilizando un rotaevaporador obteniéndose así una masa de 3.10 g de extracto crudo (Julca-Canto, Aguilar-Pérez, Ríos, Sousa, & Cubilla-Rios, 2016).



Figura 4. Platos Petri (145 mm) con *Lentinus strigellus* después del periodo de incubación.

3.5. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO

3,0 g del extracto se separaron por medio de cromatografía en columna abierta utilizando una columna de 4,0 cm de diámetro interno y silica gel (200-400 mesh, 100 g) y 1 L de cada uno de los siguientes disolventes: n-hexano, diclorometano, acetato de etilo, Acetonitrilo y agua respectivamente, resultando en 5 nuevas fracciones A (419 mg), B (872,8 mg), C (1561,4 mg), D (27,7 mg) y E (53,6 mg) (Julca-Canto, Aguilar-Pérez, Ríos, Sousa, & Cubilla-Rios, 2016). Las 5 fracciones obtenidas fueron analizadas por TLC y RMN – ¹H.

Los resultados obtenidos del análisis de la fracción B (cloroformo), se presentan en el artículo **Additional new natural products produced by *Lentinus strigellus*: a biotechnological approach** (Julca-Canto, Aguilar-Pérez, Ríos, Sousa, & Cubilla-Rios, 2016).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MATERIALES Y REACTIVOS

La cristalería de laboratorio empleada corresponde a la marca Pyrex y Chemglass, los disolventes orgánicos empleados (Hexano, Isopropanol, Diclorometano, Acetato de etilo y Aceto nitrilo) corresponden a la marca Tedia (Tedia Company Inc.) Las rotaciones ópticas se midieron en metanol en un polarímetro automático Autopol V Plus (Washington, NJ, USA) en celdas de 10 cm. Los espectros ultravioletas se determinaron con un detector PDA Waters 2996 (Waters, Milford, MA, USA). Los espectros infrarrojos se determinaron en un espectrofotómetro con transformada de Fourier (FTIR) Agilent Cary 630 (film) (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Los espectros RMN, incluyendo los experimentos 1D y 2D, se registraron en equipos de RMN Bruker a 400 MHz (JEOL, Ltd. Tokyo, Japan) y 600 MHz (Bruker, Billerica, MA, USA), utilizando metanol y cloroformo deuterado (CD_3OD y CDCl_3) como solventes con tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los espectros de masas de alta resolución se adquirieron con un equipo Bruker con inyección directa microTOF-QIII (ESI-TOF) (Bruker, Billerica, MA, USA). Las columnas cromatográficas se realizaron utilizando silica gel 100 (70–230 mesh ASTM, Merck, Darmstadt, Germany) y silica gel (200–400 mesh, 60 Å, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), las fracciones colectadas se monitorearon por cromatografía de capa fina Sigma-Aldrich TLC 3110 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y las manchas fueron detectadas utilizando p-anisaldehído (reactivo en espray). Las separaciones por HPLC (Waters Delta 600) se llevaron a cabo utilizando una columna de fase normal semi-preparativa (YMC-Pack Sil, S-5 μm , 12 nm, 150 x 10 mm ID), una columna quiral (QuiralPack IA, 5 μm 150 x 4.6 mm ID, Daicel Corporation, Tokyo, Japan) y un detector de arreglo de fotodiodos Waters 2996. El inyector fue equipado con un loop de 200 μL . las estructuras químicas 1D y 3D se dibujaron utilizando el software Chemdraw (Perkin Elmer, Waltham, USA), versión: 16.0.1.4.

4.2. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN C (ACETATO DE ETILO).

Continuando con los estudios de *Lentinus strigellus* presentados por (Julca-Canto, Aguilar-Pérez, Ríos, Sousa, & Cubilla-Rios, 2016), se obtuvo el perfil cromatográfico de la fracción C (Obtenida con acetato de etilo) por cromatografía de capa fina y se analizó el espectro RMN- ^1H , los cuales mostraron una diversidad química de interés, de esta se obtuvo una masa de 1 561,4 mg. 1,0 g se sometió a cromatografía en columna abierta utilizando una columna con diámetro interno de 4 cm y silica gel (200-400 mesh, 70 g), se utilizó como disolvente un gradiente de cloroformo - acetato de etilo desde 100 % cloroformo – 0% acetato de etilo hasta 0% cloroformo - 100% acetato de etilo bajando de 10% en 10% cada 100 mL de disolvente y otro gradiente de 100 % acetato de etilo – 0% metanol hasta 0% acetato de etilo y 100% metanol bajando de 20% en 20% cada 150 mL.

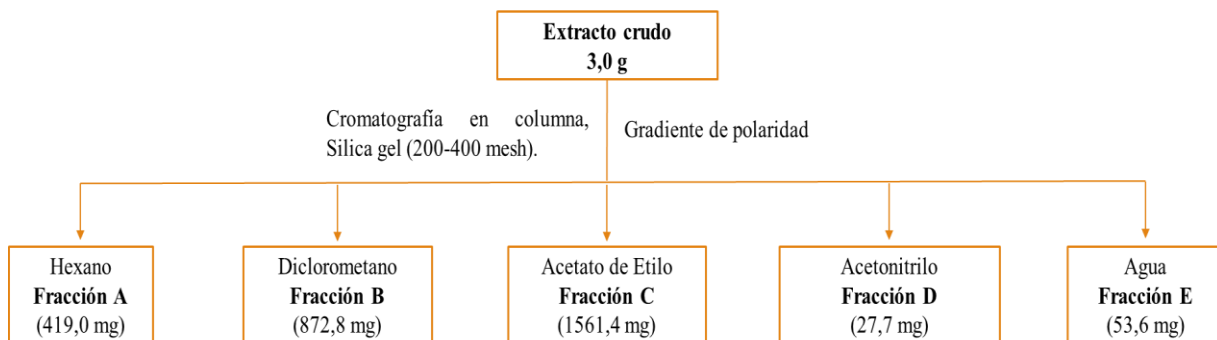


Figura 5. Diagrama de fracciones obtenidas del extracto de *Lentinus strigellus*.

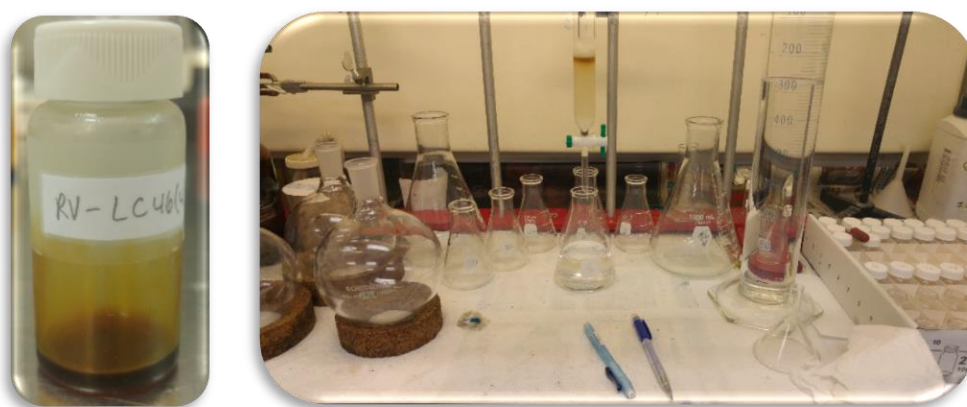


Figura 6. Separación de metabolitos de la fracción C (Acetato de etilo).

Todas las fracciones recogidas se analizaron por cromatografía de capa fina; las similares se reunieron, resultando en un total de ocho fracciones (C1-C8).

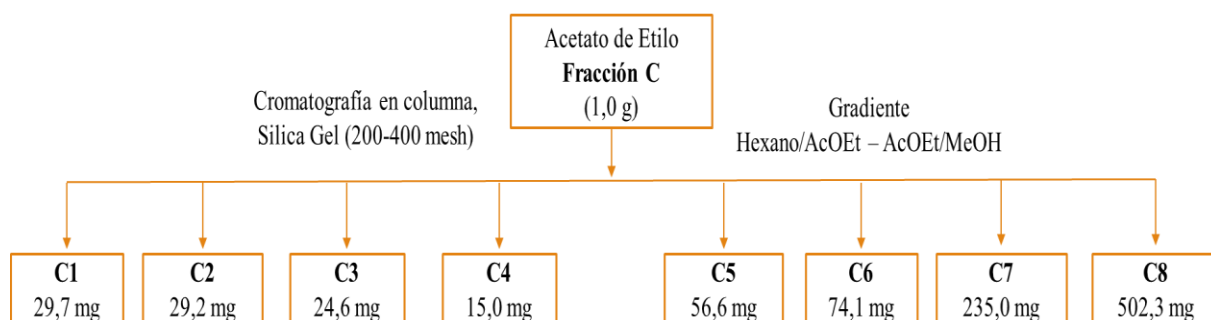


Figura 7. Diagrama de fracciones (C1-C8) agrupadas de la fracción C.

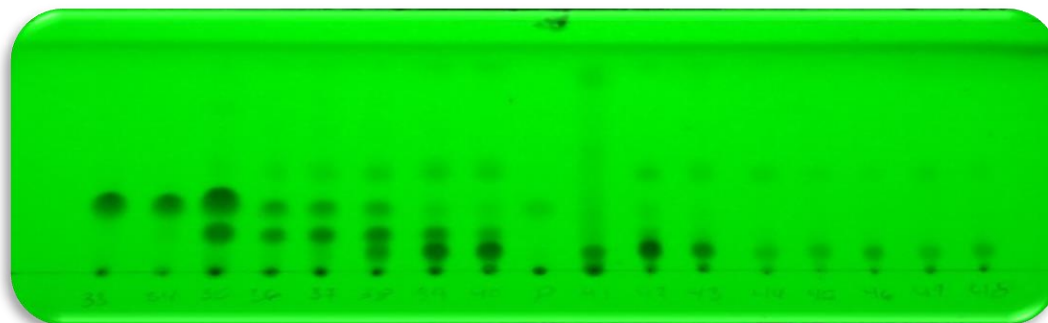


Figura 8. Vista UV de algunas de las fracciones recogidas de la columna cromatográfica de la fracción C (Acetato de etilo).

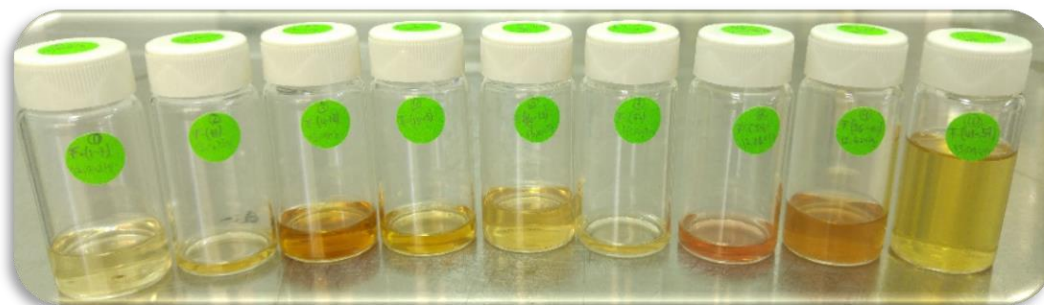


Figura 9. Agrupación de fracciones obtenidas de columna cromatográfica de la fracción C (Acetato de etilo).

4.3. AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS

4.3.1. OBTENCIÓN DEL COMPUESTO 6 Y 7

Se tomó 55,1 mg de la fracción C6 (74,1 mg) y se preparó una solución con concentración de 6,12 mg/mL, de la cual se procedieron a inyectar alícuotas de 50 μ L en una columna semi preparativa (SP-YMC Pack Sil 150 x 10 mm D.I) y empleando como fase móvil un gradiente lineal de n-Hexano – Isopropanol, con una velocidad de flujo de 1 mL/min como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Gradiente utilizado en HPLC para separar los compuestos 6 y 7.		
Tiempo (min)	Hexano (%)	Isopropanol (%)
0	75	25
15	70	30
25	65	35
35	60	40
40	60	40
45	75	25
55	75	25

Se obtuvieron dos fracciones principales (figura 10): C6.1 (Tr: 17 min; 8,1 mg) y C6.2 (Tr: 21,5 min; 12,3 mg).

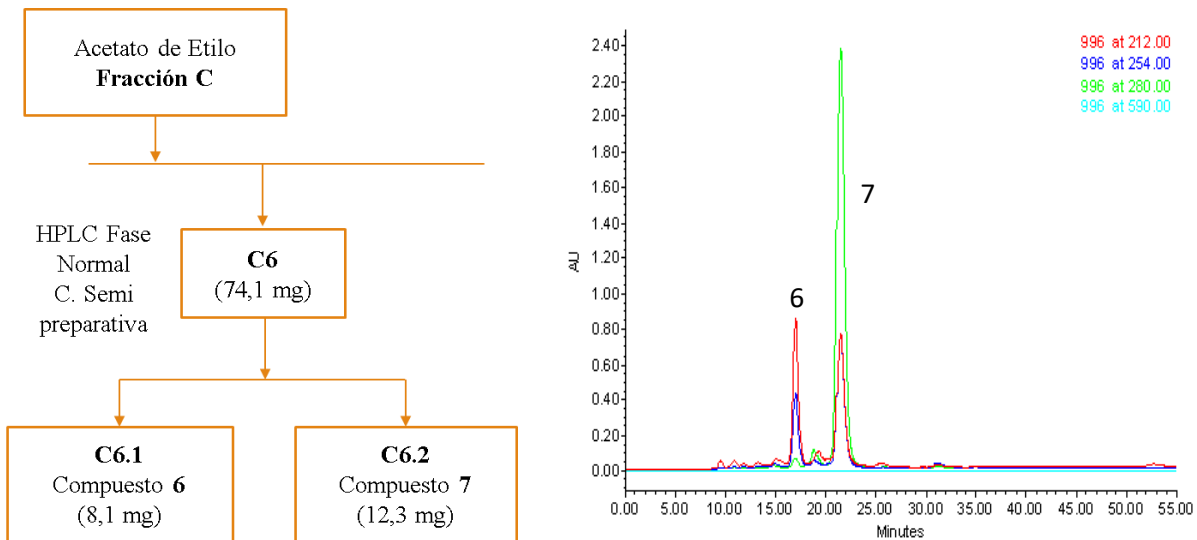


Figura 10. Diagrama de separación de la fracción C6 (izquierda), Cromatograma HPLC del aislamiento de los compuestos 6 y 7 (derecha).

4.3.2. OBTENCIÓN DEL COMPUESTO 1 Y 5

La fracción C7 (235,0 mg) se analizó mediante TLC logrando determinar las condiciones adecuadas para realizar un fraccionamiento por cromatografía en columna abierta fase normal. Se utilizó una columna de 2,0 cm de D.I con silica gel de fase normal (70-230 mesh, 22g) y como eluyente (elución por gradiente) Hexano (300 mL), Hx/AcOEt (8:2) 300 mL, Hx/AcOEt (6:4) 500 mL, Hx/AcOEt (1:1) 500 mL, Hx/AcOEt (3:7) 500 mL, AcOEt 500 mL, AcOEt/MeOH (8:2) 300 mL, AcOEt/MeOH (1:1) 300 mL.

De este fraccionamiento se obtuvieron 98 fracciones, que luego de un análisis por TLC se reagruparon las similares resultando 13 fracciones C7.1 a C7.13 (figura 11).

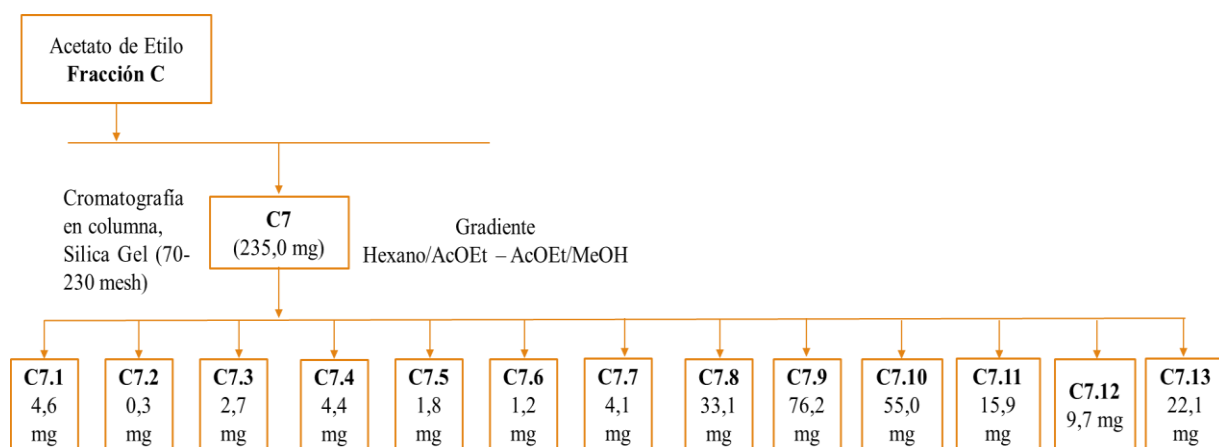


Figura 11. Diagrama de separación de la fracción C7.

Con la fracción C7.8 (33,7 mg) se preparó una solución con concentración de 4,81 mg/mL, de la cual se procedieron a inyectar alícuotas de 50 μ L en una columna semi preparativa (SP-YMC Pack Sil 150 x 10 mm D.I) y como fase móvil un gradiente lineal de n-Hexano – Isopropanol, con una velocidad de flujo de 1 mL/min como se muestra en la tabla 2. Resultando un componente principal (figura 12) C7.8.1 (Tr: 28 min, 24,2 mg).

Tabla 2. Gradiente utilizado en HPLC para purificar el compuesto 5.		
Tiempo (min)	Hexano (%)	Isopropanol (%)
0	85	15
10	80	20
15	77	23
20	75	25
23	75	25
30	70	30
35	85	15
40	85	15

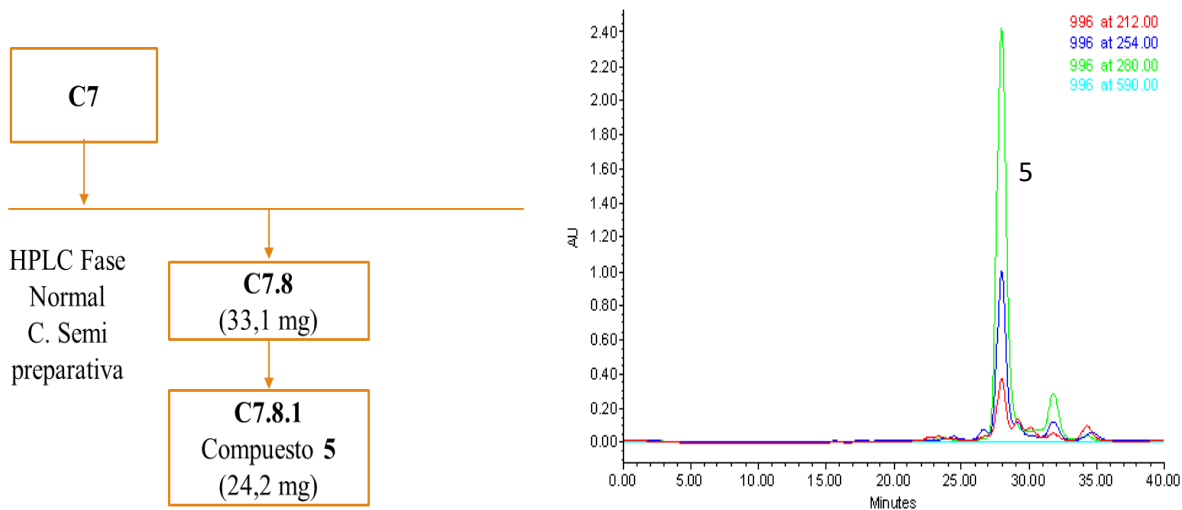


Figura 12. Diagrama de separación de la fracción C7.8 (izquierda), Cromatograma HPLC del aislamiento del compuesto 5 (derecha).

De la fracción C7.9 (76,2 mg), se preparó una solución con concentración de 5,0 mg/mL, de la cual se procedieron a inyectar alícuotas de 50 μ L en una columna semi preparativa (SP-YMC Pack Sil 150 x 10 mm D.I) y como fase móvil un gradiente lineal de n-Hexano – Isopropanol, con una velocidad de flujo de 1 mL/min como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Gradiente utilizado en HPLC para separar los compuestos 1 y 5.		
Tiempo (min)	Hexano (%)	Isopropanol (%)
0	85	15
10	80	20
15	77	23
20	75	25
23	75	25
30	70	30
33	85	15
38	85	15

Se recogieron 2 componentes principales (figura 13) Tr: 26 min, C7.9.1 (10,2 mg) y Tr: 32 min, C7.9.4 (10,6 mg).

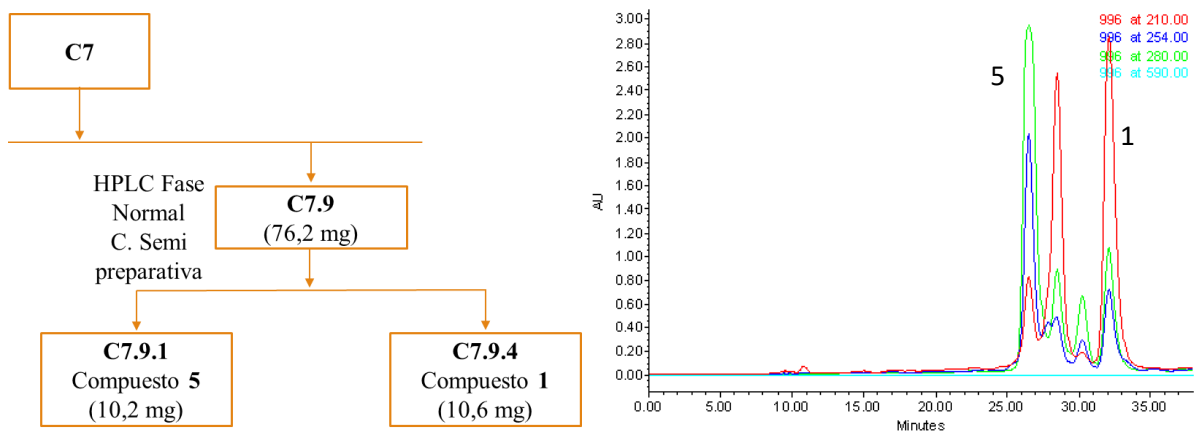


Figura 13. Diagrama de separación de la fracción C7.9 (izquierda), Cromatograma HPLC del compuesto 5, Tr: 26 min y compuesto 1, Tr: 32 min (derecha).

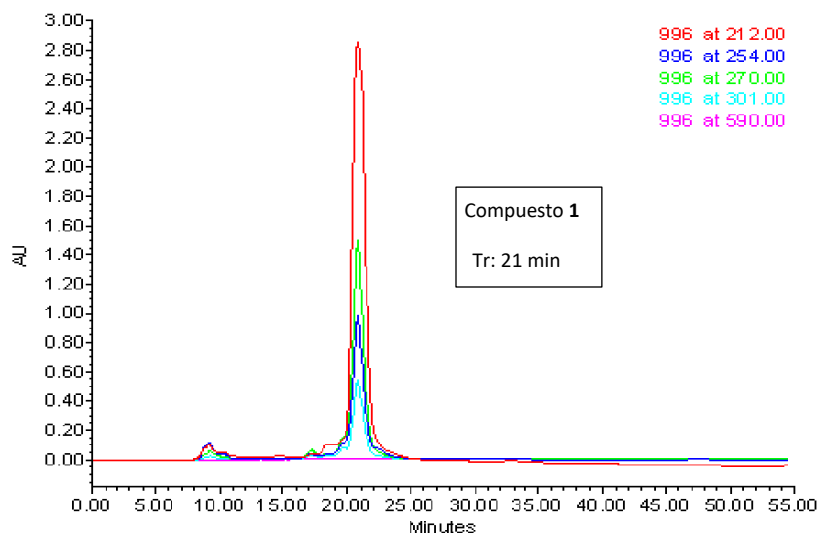


Figura 14. Cromatograma HPLC del compuesto 1 purificado.

4.3.3. OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS 2, 3 Y 4.

Con la fracción C7.10 (55,0 mg), se preparó una solución de 5,5 mg/ mL y se inyectó alícuotas de 50 μ L en una columna semi preparativa (SP-YMC Pack Sil 150 x 10 mm D.I) y como fase móvil un gradiente lineal de n-Hexano – Isopropanol, con una velocidad de flujo de 1 mL/min como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Gradiente HPLC utilizado para separar compuestos 2, 3 y 4.		
Tiempo (min)	Hexano (%)	Isopropanol (%)
0	85	15
15	80	20
25	77	23
35	75	25
38	75	25
43	70	30
50	85	15
55	85	15

Se recogieron 6 nuevas fracciones C7.10.1 a C7.10.6 (figura 15), donde el pico a Tr. 33 min corresponde al compuesto **2** (7,4 mg).

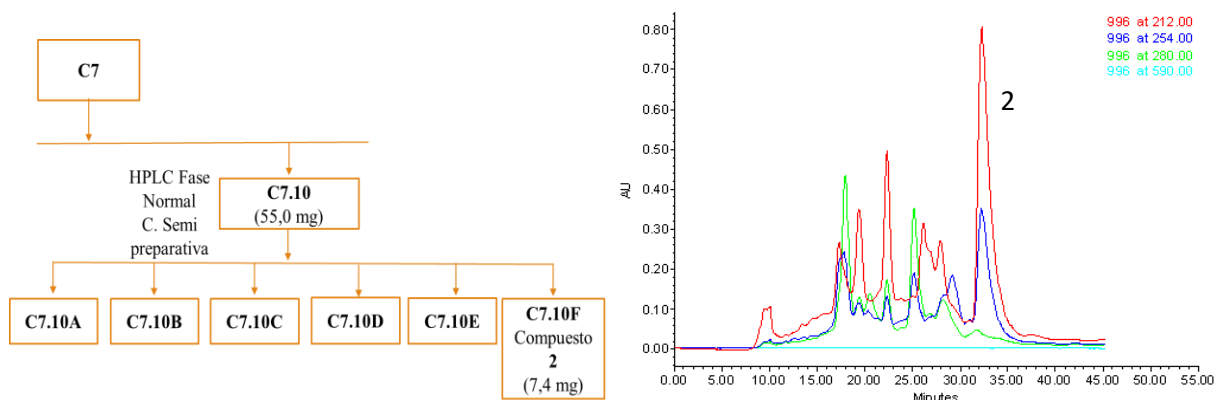


Figura 15. Diagrama de separación de la fracción C7.10 (izquierda), Cromatograma HPLC de la fracción C7.10 (derecha).

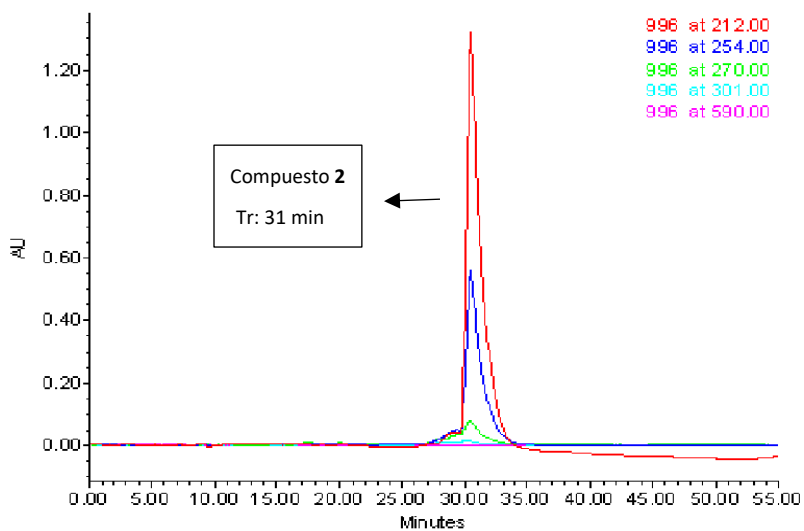


Figura 16. Cromatograma HPLC del compuesto **2** puro.

Con la fracción C7.10.5 (26,0 mg) se preparó una solución de 5,2 mg/mL y se procedió a inyectar alícuotas de 50 μ L en una columna semi preparativa (SP-YMC Pack Sil 150 x 10 mm D.I) y como fase móvil un gradiente lineal de n-Hexano – Isopropanol, con una velocidad de flujo de 1 mL/min (tabla 4). Como resultado se obtuvieron 3 nuevas fracciones (C7.10.5.1-3) las cuales se muestran en la figura 17.

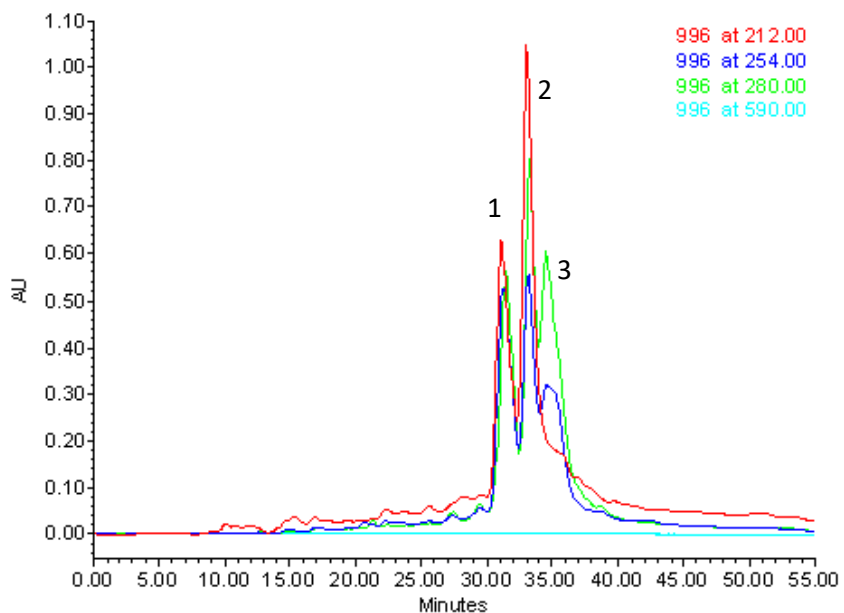


Figura 17. Cromatograma HPLC de la fracción C7.10.5.

De la fracción C7.10.5.1 (7,3 mg) se preparó una solución de 3,65 mg/mL, se inyectó alícuotas de 50 μ L y se purificó utilizando una columna analítica (Chiral pack IA 5 μ m, 150x4,6 mm D.I) y un eluyente isocrático n-Hexano (85%) – Isopropanol (15%) a una velocidad de flujo de 0,5 mL / min, obteniéndose el compuesto **3** a Tr: 17 min (2,6 mg), figura 18.

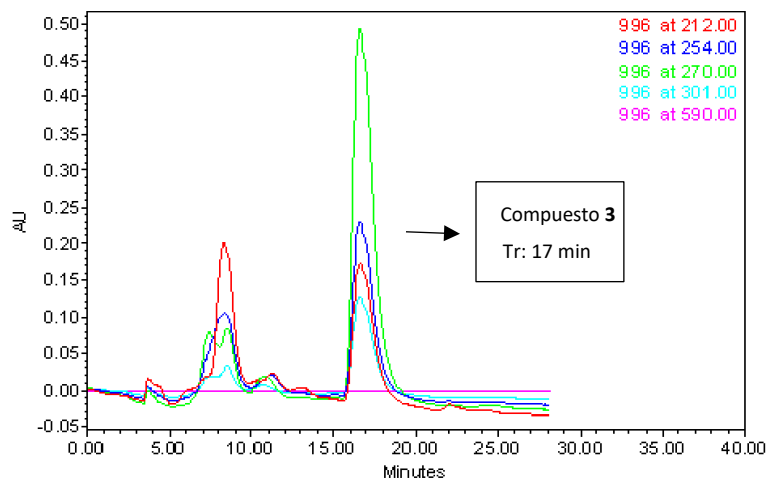


Figura 18. Cromatograma HPLC del aislamiento del compuesto **3**.

La fracción C7.10.5.2 (8,0 mg) se preparó una solución de 4,0 mg/mL, se inyectó alícuotas de 50 μ L y se purificó utilizando una columna analítica (Chiral pack IA 5 μ m, 150x4,6 mm D.I y un eluyente isocrático n-Hexano (85%) – Isopropanol (15%) a una velocidad de flujo de 0,5 mL / min, obteniéndose el compuesto (**4**) a Tr: 12 min; (1,0 mg), figura 19.

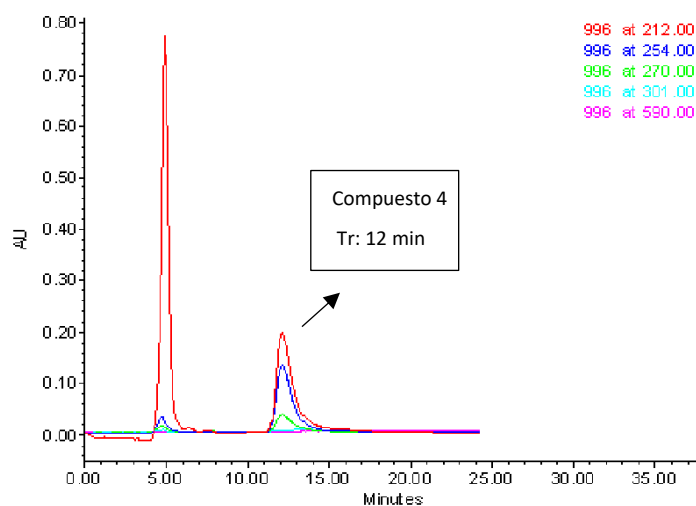


Figura 19. Cromatograma HPLC del aislamiento del compuesto 4.

4.4. ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL.

La actividad antibacteriana se determinó a través de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de la sociedad británica de quimioterapia antimicrobiana (BSAC) (Andrews & Testing, 2009), (Wotton, 2013)

4.4.1. PREPARACIÓN DE ESTÁNDAR DE TURBIDEZ MC FARLAND 0.5.

El estándar de turbidez fue preparado usando 0.5 mL de solución de BaCl₂ (BaCl₂.2H₂O; 0.048 M) en un tubo con 99.5 mL de H₂SO₄ (0.18 M). La absorbancia del estándar Mc Farland (entre 0.08 y 0.10 a 625 nm) fue verificada utilizando un espectrofotómetro. La solución fue almacenada a una temperatura de 24 \pm 2 °C sin luminosidad.

4.4.2. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO IN VITRO.

La inhibición del crecimiento bacteriano fue evaluada in vitro por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) utilizando agar de tripticasa de soya (ATS) en platos Petri (145 mm) y colocando un disco (6 mm de diámetro) con 50 µg de cada compuesto a probar disuelto en DMSO. El plato se incubó por 18 horas a 37 °C y se midió el diámetro del halo de inhibición. Para el control positivo se utilizó sulfato de gentamicina (10 µg/mL) y para el control negativo DMSO. El diámetro de la zona de inhibición alrededor del disco (ZOI) fue medido en mm (incluyendo el diámetro del disco).

4.4.3. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC).

La concentración mínima inhibitoria (MIC) fue determinada usando una solución stock preparada añadiendo 300 µg de cada compuesto en 3 mL de caldo de tripticasa de soya (TSB). Se realizó una serie de diluciones de los compuestos evaluados y el control para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC). Las concentraciones evaluadas para cada compuesto fueron: 100.0, 40.0, 33.3, 11.1 y 5.6 µg/mL. Cada solución fue después inoculada con 50 µL (0.5 Mc Farland) de un cultivo de *E. faecalis* y *P. aeruginosa* e incubado a 37 °C por 18 horas. Adicionalmente, se usaron 2 blancos, uno de medio de cultivo y otro de DMSO. Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado.

5. RESULTADOS.

Un total de 7 compuestos fue aislado de la fracción de acetato de etilo del extracto de *Lentinus strigellus*, de los cuales 4 de ellos corresponde a compuestos nuevos (Lentinoideas A-D) y los otros 3 son compuestos conocidos identificados como panepoxidona, isopanepoxidona y estriguelona A.

5.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS PANEPOXIDONA, ISOPANEPOXIDONA Y ESTRIGUELONA A.

Para identificar y comprobar que dichas fracciones se trataban de los compuestos conocidos panepoxidona, isopanepoxidona y striguellona A, se obtuvieron los espectros ¹H-RMN de cada uno de los compuestos y se observó que las señales de los espectros eran iguales a los desplazamientos reportados en **Die Struktur von Panepoxydon und verwandten Pilzmetaboliten** (Kis, Clossé, Sigg, Hruban, & Snatzke, 1970) y **Secondary Metabolite Production by the Basidiomycete, *Lentinus strigellus*, under Different Culture Conditions** (Barros-Filho B. A., de Oliveira, Mafezoli, Barbosa, & Rodrigues-Filho, 2012), cabe mencionar que los espectros se realizaron bajo las mismas condiciones descritas en los artículos mencionados anteriormente, esta tarea se realizó para los 7 compuestos aislados resultando así en la caracterización de los 3 compuestos (Panepoxidona, Isopanepoxidona y Estriguellona A) y 4 nuevos compuestos, la comparación de los desplazamientos de los compuestos mencionados se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Comparación de desplazamientos ¹H-RMN de estriguellona A, panepoxidona e isopanepoxidona.				
Posición	Estriguellona A	Posición	Panepoxidona	Isopanepoxidona
	δ H		δ H	δ H
1		1		4.76/4.76 (1H, d)
2	6.04 /6.04 (1H, s)	2	3.42/3.47 (1H, d)	3.85/3.85 (1H, t)
3		3	3.73/3.80 (1H, bt)	3.41/3.41 (1H, dd)
4	4.79/4.75 (1H, d)	4	4.62/4.60 (1H, d)	
5	3.96/3.86 (1H, dd)	5	6.63/6.70 (1H, m)	5.90/5.90 (1H, s)
6	4.74/4.70 (1H, d)	6		
1'	6.52/6.45 (1H, d)	7	5.27/5.30 (1H, d)	6.35/6.35 (1H, d)
2'	6.73/6.70 (1H, d)	8	4.95/5.02 (1H, bd)	6.67/6.67 (1H, d)
3'		9		
4'	1.34/1.34 (3H, s)	10	1.68/1.72 (3H, s)	1.32/1.32 (3H, s)
5'	1.34/1.34 (3H, s)	11	1.67/1,71 (3H, s)	1.33/1.33 (3H, s)

A continuación, se muestran los espectros ¹H-RMN de panepoxidona, isopanepoxidona y striguellona A.

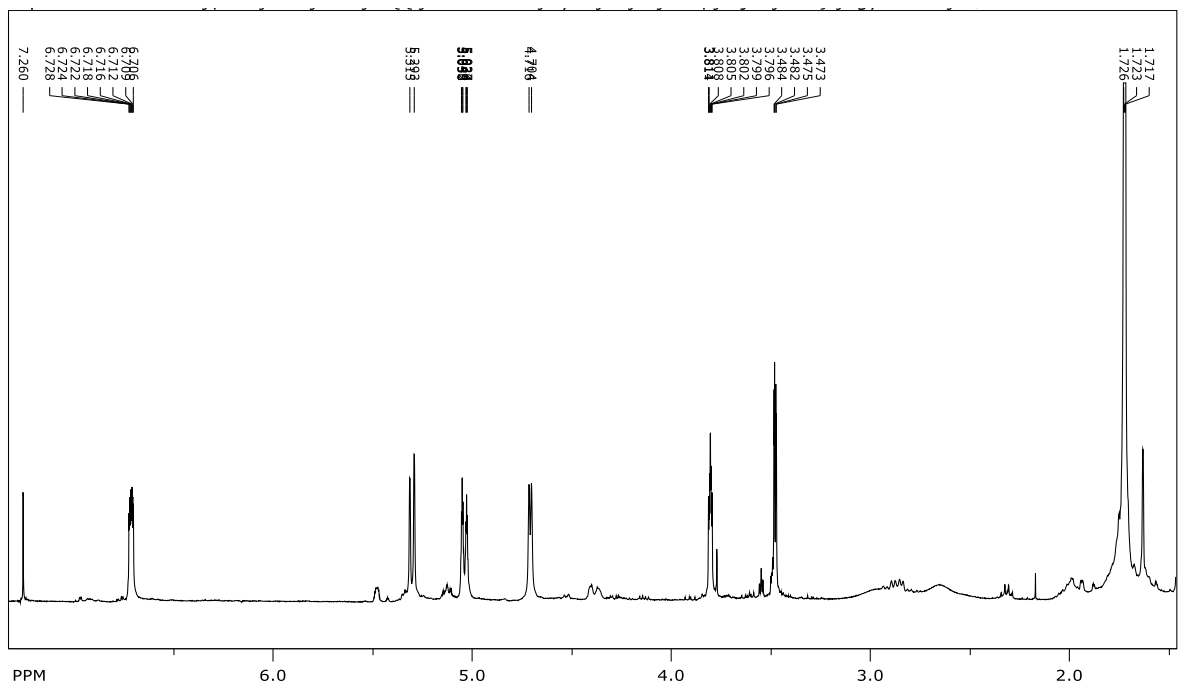


Figura 20. Espectro ^1H RMN (400 MHz, cloroformo- d_1) de Panepoxidona.

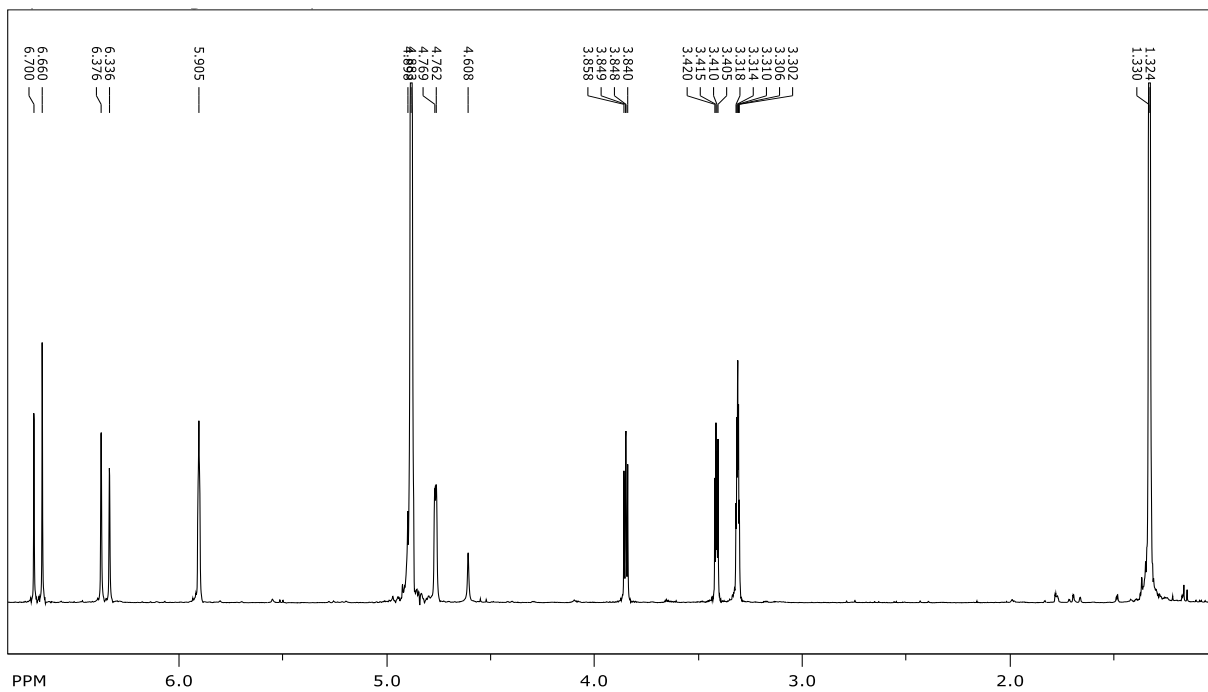


Figura 21. Espectro ^1H RMN (400 MHz, metanol- d_4) de Isopanepoxidona.

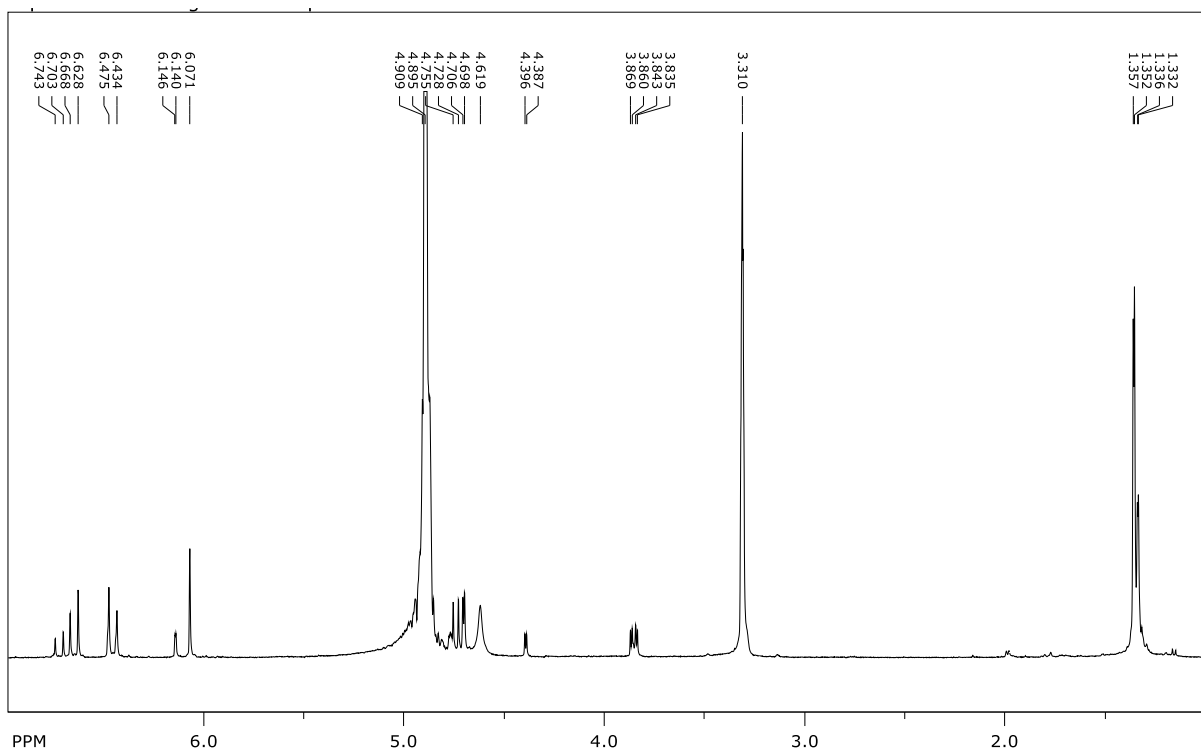


Figura 22. Espectro ^1H RMN (400 MHz, methanol- d_4) de estriguelona A.

5.2. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DEL LENTINOIDE A.

El Lentinoide A (compuesto **1**), se obtuvo como un líquido viscoso chocolate, cuya fórmula molecular ($\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_5$) fue determinada utilizando Espectrometría de masas de alta resolución de ionización por electroespray (HR-ESITOF-MS) sobre la base de su pico molecular cationizado $[\text{M} + \text{Na}^+]$ con una relación m/z de 251,089. El ion en m/z 269,0568 (100%) correspondió a $[\text{M} + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}^+]$ y el espectro de masas tándem mostró que este se deriva del clúster $[2\text{M} + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}^+]$, m/z 497.0824. El espectro de infrarrojo mostró bandas a $3\,350\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a grupos hidroxilos y $1\,690\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a grupos carbonilos en la molécula. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron utilizando metanol deuterado como disolvente, los mismos revelaron la existencia de un grupo isoprenilo, 2 grupos metilo [δ_{H} 1.30 (s); δ_{C} 29.7], un oxicarbon sp^3 cuaternario [δ_{C} 71.4] y 2 metinos sp^2 [δ_{H} 6.36, 6.44 (d); δ_{C} 120.1, 143.1] como en la estriguelona A (Zheng, Zhao, Lu, Lin, & Zheng, 2009), esto se confirmó con el experimento de correlación COSY. El espectro ^{13}C -RMN mostró un carbono cuaternario a δ_{C} 191.8 correspondiente a una cetona alfa beta insaturada, El desplazamiento químico para el protón olefínico en C-3 mostró un cambio de campo bajo a 6.89 ppm y apareció como un doblete debido al acoplamiento entre H-3 y H-4, mientras que en la estriguelona A, esto aparece como un singlete en 6.04 ppm (C-2) debido a la ausencia de este acoplamiento.

El carbono olefínico cuaternario (δ_{C} 135.2) en la posición α de la cetona α - β insaturada mostró un desplazamiento de campo alto en comparación con C-3 (δ_{C} 155.7) en la estriguelona A;

además, el carbono metino (δ_c 145.4) muestra su desplazamiento en campo bajo ocupando la posición β . El espectro COSY reveló correlaciones entre H-3/H-4, H-4/H-5, H-5/H-6 y H-1'/H-2' (Figura 17A). La posición del grupo carbonilo fue confirmada por el experimento (HMBC) (Figura 17B). El experimento (NOESY) mostró claramente, la Correlación entre H-1'/H-2' con H-3 y H-4'/H-5', por otro lado, también se observó una Correlación entre H-3/H-4 (Figura 8B). No se observó Correlación entre H-4/H-5 y H-5/H-6 colocándolos en ambos casos en lados opuestos, lo cual fue confirmado por las constantes de acoplamiento (8.4 y 11.6 Hz, respectivamente).

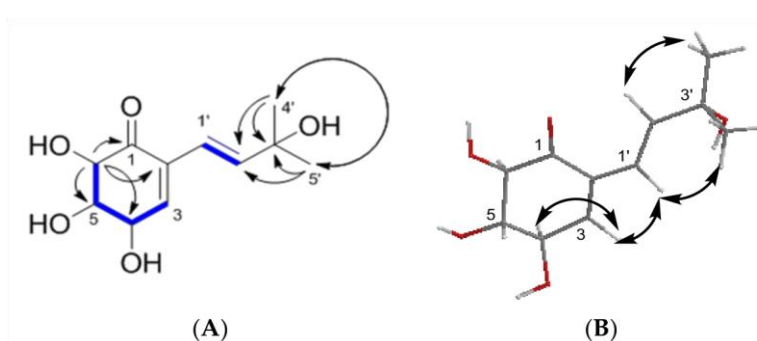


Figura 23. (A) Correlación espectroscópica (COSY) (marcado en azul), (HMBC) (Flechas negras) y (B) (NOESY) (Flechas negras) del lentinoide A.

Tabla 6. Datos RMN para el lentinoide A en MeOH-*d*₄, (*J* en Hz; ¹H-RMN a 400 MHz; ¹³C-RMN a 100 MHz).

Posición	Lentinoide A	
	δC	δH
1	191.8, C	
2	135.2, C	
3	145.4, CH	6.89 (d; 2.4)
4	73.1, CH	4.41 (dd; 2.4, 8.4)
5	79.3, CH	3.63 (dd; 8.4, 11.6)
6	68.8, CH	4.60 (d; 11.6)
1'	120.1, CH	6.36 (d; 16.0)
2'	143.1 CH	6.44 (d; 16.0)
3'	71.4, C	
4'	29.7, CH ₃	1.30 (s)
5'	29.7, CH ₃	1.30 (s)

A continuación, se muestran los espectros ^1H , ^{13}C RMN y espectro de masas del lentinoide A.

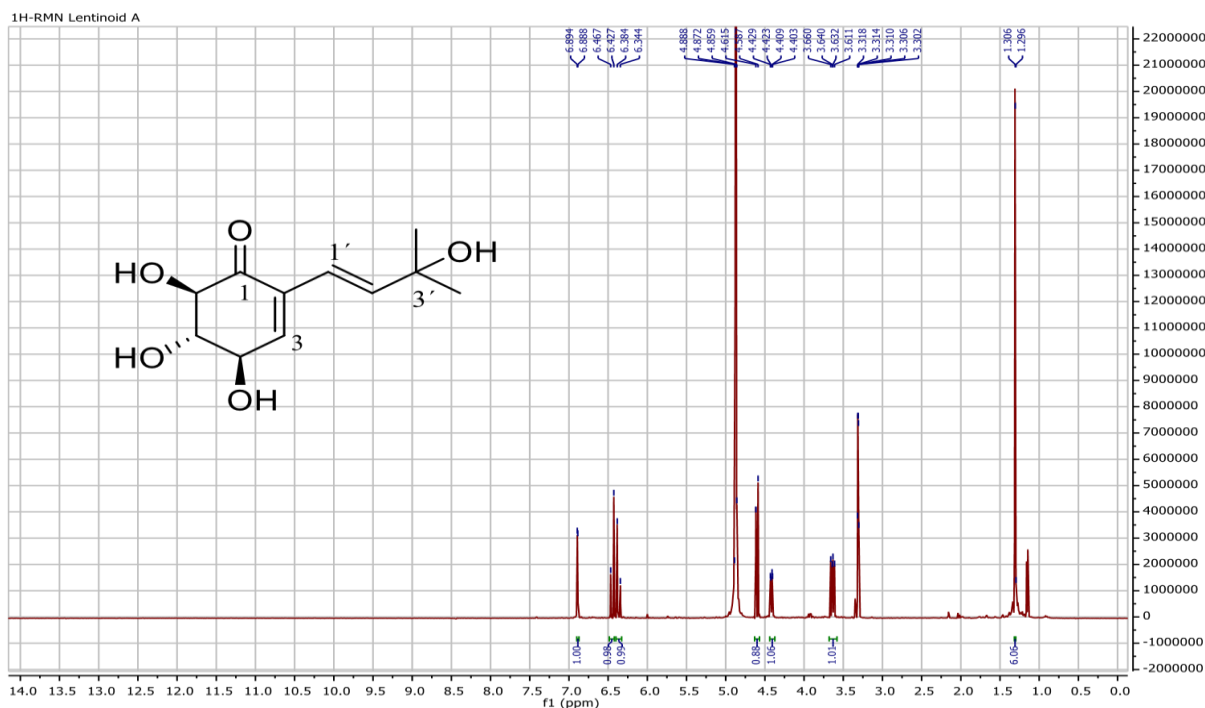


Figura 24. Espectro ^1H RMN (400 MHz, metanol- d_4) del lentinoide A.

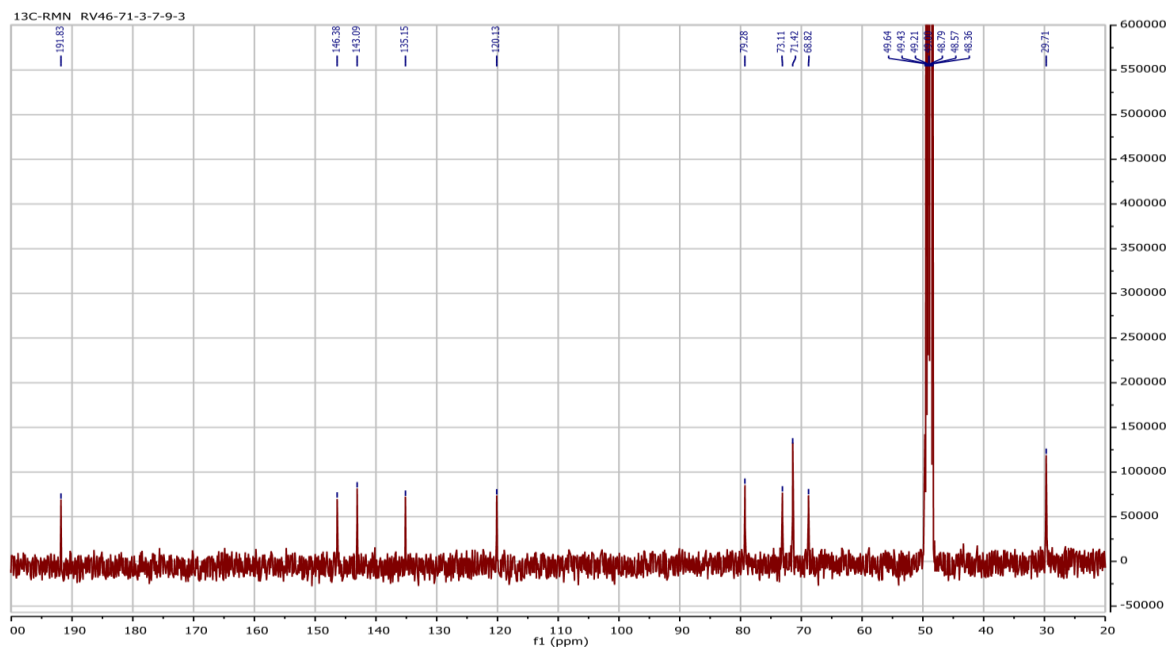


Figura 25. Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, metanol- d_4) del lentinoide A.

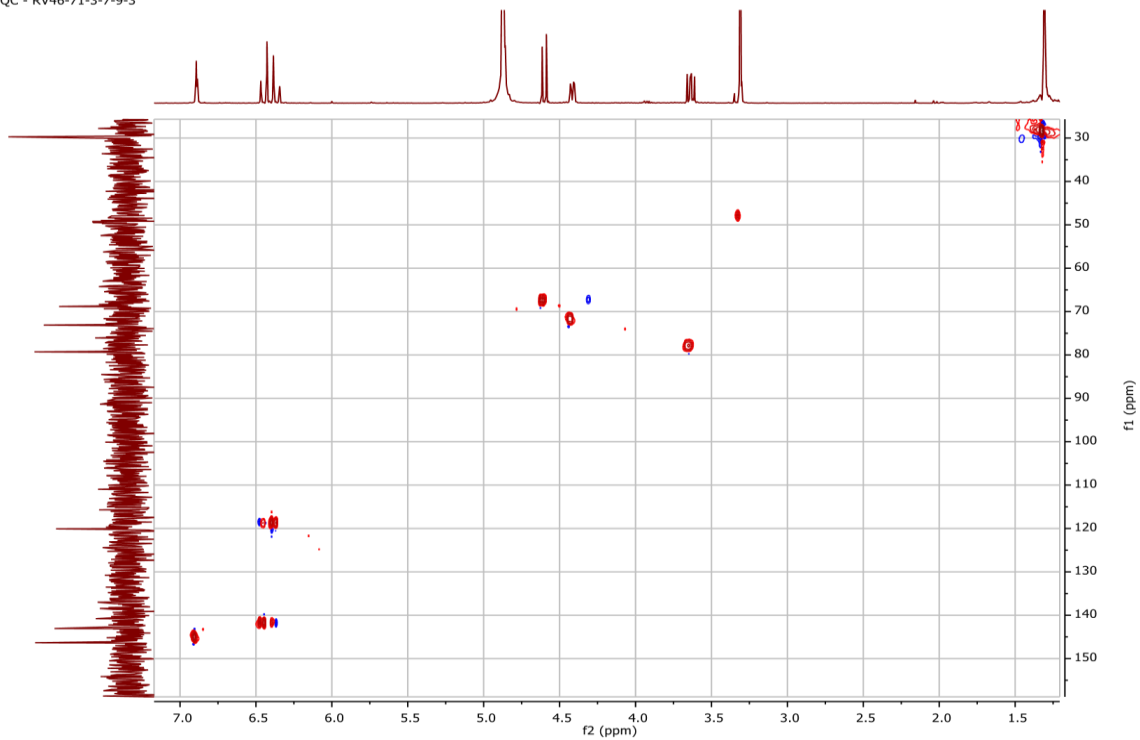


Figura 26. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC RMN (en $\text{methanol-}d_4$) del lentinoide A.

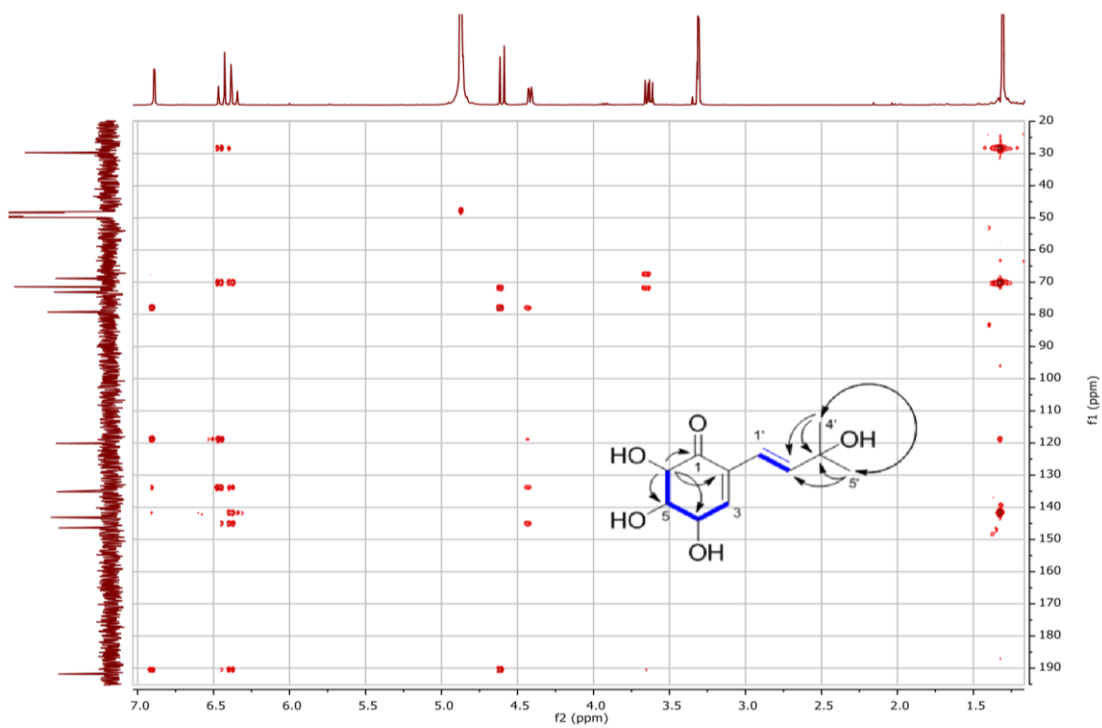


Figura 27. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC RMN (en $\text{methanol-}d_4$) del lentinoide A.

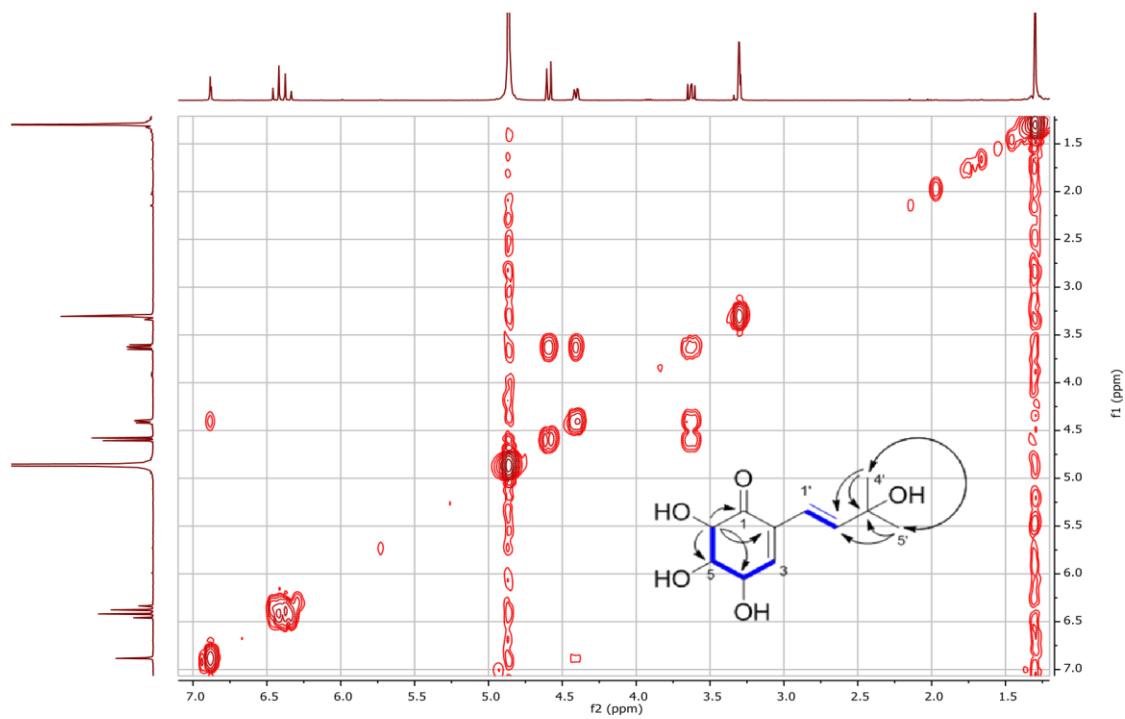


Figura 28. Espectro ^1H - ^1H COSY RMN (en $\text{methanol-}d_4$) del lentinoide A.

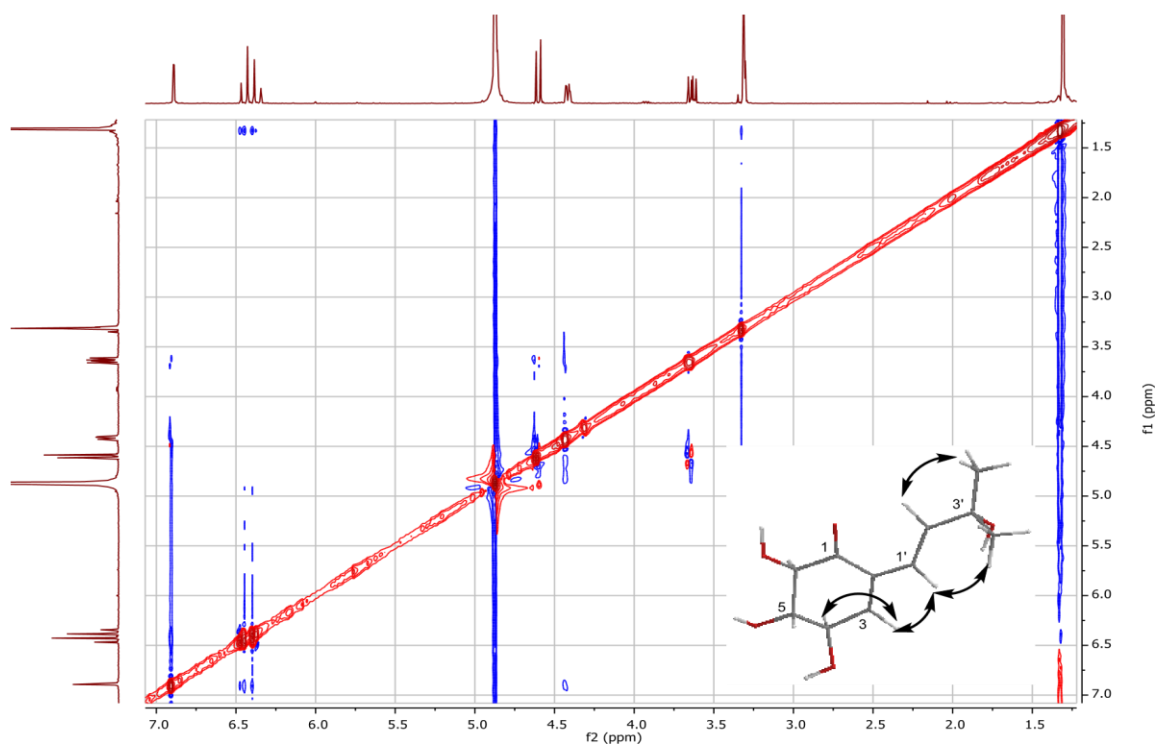


Figura 29. Espectro ^1H - ^1H NOESY RMN (en $\text{methanol-}d_4$) del lentinoide A.

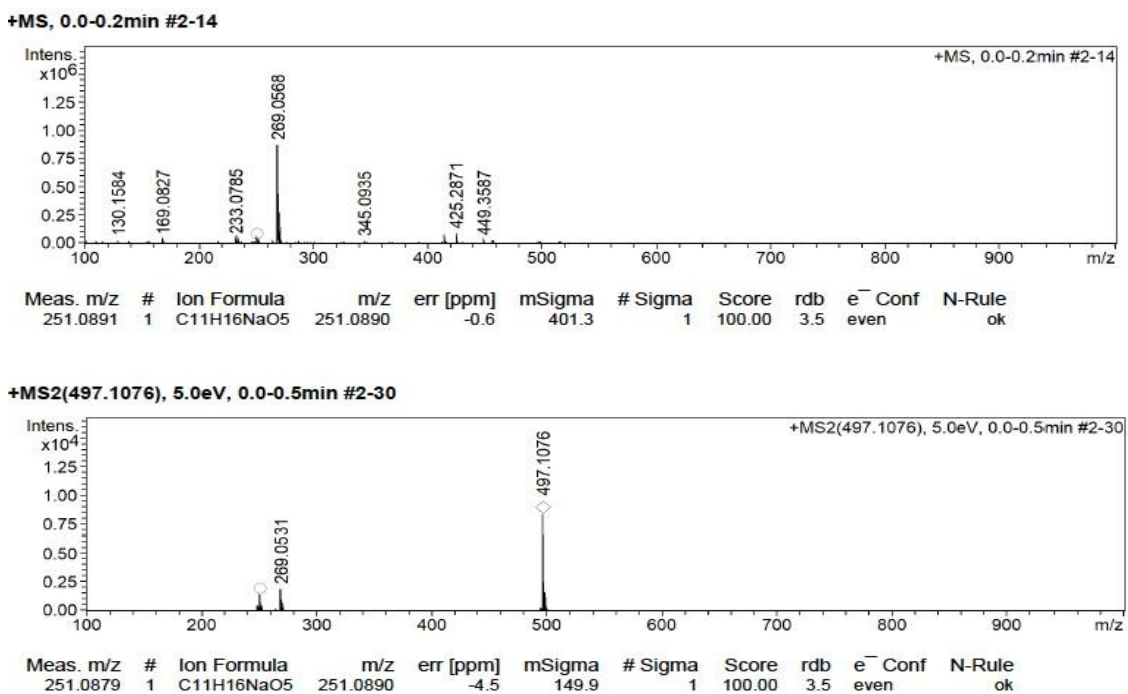


Figura 30. ESIMS (modo positivo) del lentinoide A.

5.3. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DEL LENTINOIDE B.

El Lentinoide B (Compuesto **2**), se obtuvo como un líquido viscoso chocolate, cuya fórmula molecular (C₁₁H₁₈O₅) con 3 grados de insaturación, fue determinada utilizando Espectrometría de masas de alta resolución de ionización por electroespray (HR-ESITOF-MS) sobre la base de su pico molecular cationizado [M + Na⁺] con una relación m/z de 253.1034. El ion a m/z 235.0940 (100%) en el espectro de masas corresponde a la pérdida de agua [M + Na - H₂O]⁺, esto fue confirmado por el experimento MS². El espectro de infrarrojo mostró bandas a 3 300 cm⁻¹ correspondientes a grupos hidroxilos, no se observaron señales correspondientes a grupos carbonilos. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron utilizando metanol deuterado como disolvente. Los experimentos COSY y HMBC (Figura 25A) revelaron la existencia de un grupo isoprenilo como en el lentinoide A, [δ_H 1.30 (s); δ_C 29.9], un oxicarbon sp³ cuaternario [δ_C 71.4] y 2 metinos sp² [δ_H 6.15, 6.24 (d); δ_C 126.5, 140.9]. Además, el lentinoide B mostró un carbono sp² cuaternario (δ_C 136.5), un metino sp² (δ_H 5.67 (br t); δ_C 125.9) y 4 oximetinos sp³ (δ_H 3.37 (t), 3.49 (br m), 4.35 (d), 4.59 (br d); δ_C 57.1, 56.0, 63.9, 65.3).

La unión de los oximetinos fue establecida basado en los resultados obtenidos del experimento COSY, observándose correlaciones entre H-2/H-3, H-3/H-4, H-4/H-5 y H-5/H-6, y sus correspondientes constantes de acoplamiento. La estereoquímica relativa fue determinada tomando en cuenta las siguientes correlaciones del experimento NOESY (Figura 25B) H-3/H-

4, H-4/H-5 y H-5/H-6, así como con los valores de las constantes de acoplamiento (todas por debajo de 4.6 Hz) entre los hidrógenos de la unidad ciclo exilo. Por lo tanto, se determinó que todos los grupos hidroxilo están del mismo lado de la molécula.

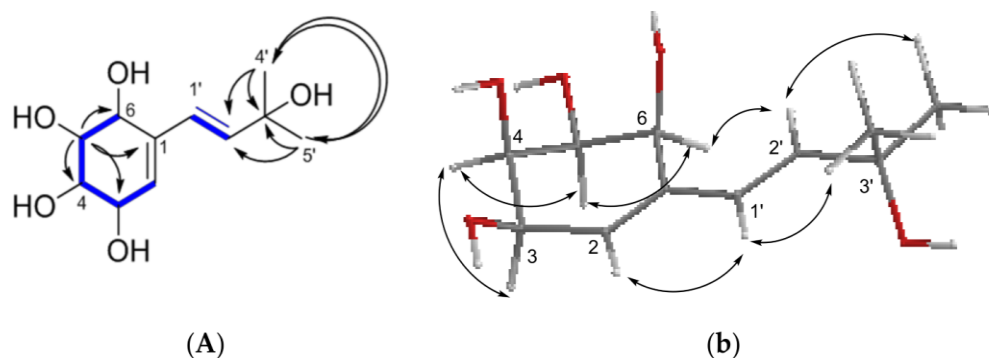


Figura 31. (A) Correlación espectroscópica (COSY) (marcado en azul), (HMBC) (Flechas negras) y (B) (NOESY) (Flechas negras) del lentinoide B.

Tabla 7. Datos RMN para el lentinoide B en MeOH- d_4 , (J en Hz; ^1H -RMN a 400 MHz; ^{13}C -RMN a 100 MHz).

Posición	Lentinoide B	
	δC	δH
1	136.5, C	
2	125.9, CH	5.67 (br t; 4.0)
3	63.9, CH	4.35 (d; 4.4)
4	57.1, CH	3.37 (t; 4.0)
5	56.0, CH	3.49 (br m)
6	65.3, CH	4.59 (br d; 4.6)
1'	126.5, CH	6.15 (d; 16.0)
2'	140.9, CH	6.24 (d; 16.0)
3'	71.4, C	
4'	29.9, CH ₃	1.30 (s)
5'	29.9, CH ₃	1.30 (s)

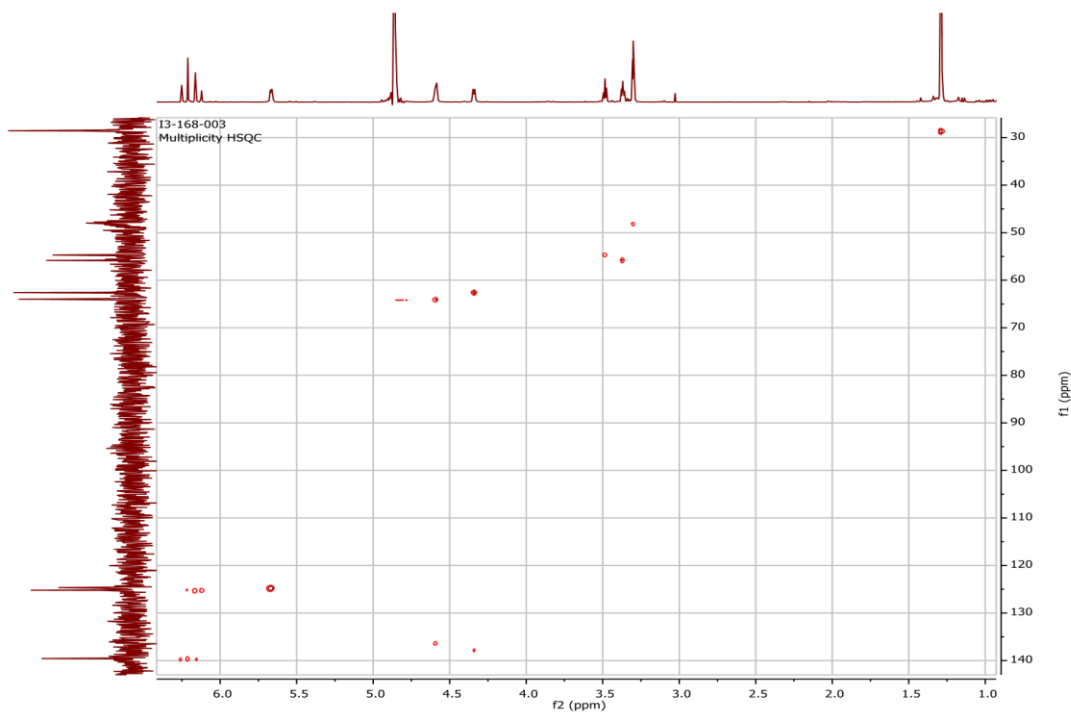


Figura 34. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC RMN (en metanol- d_4) del lentinoide B.

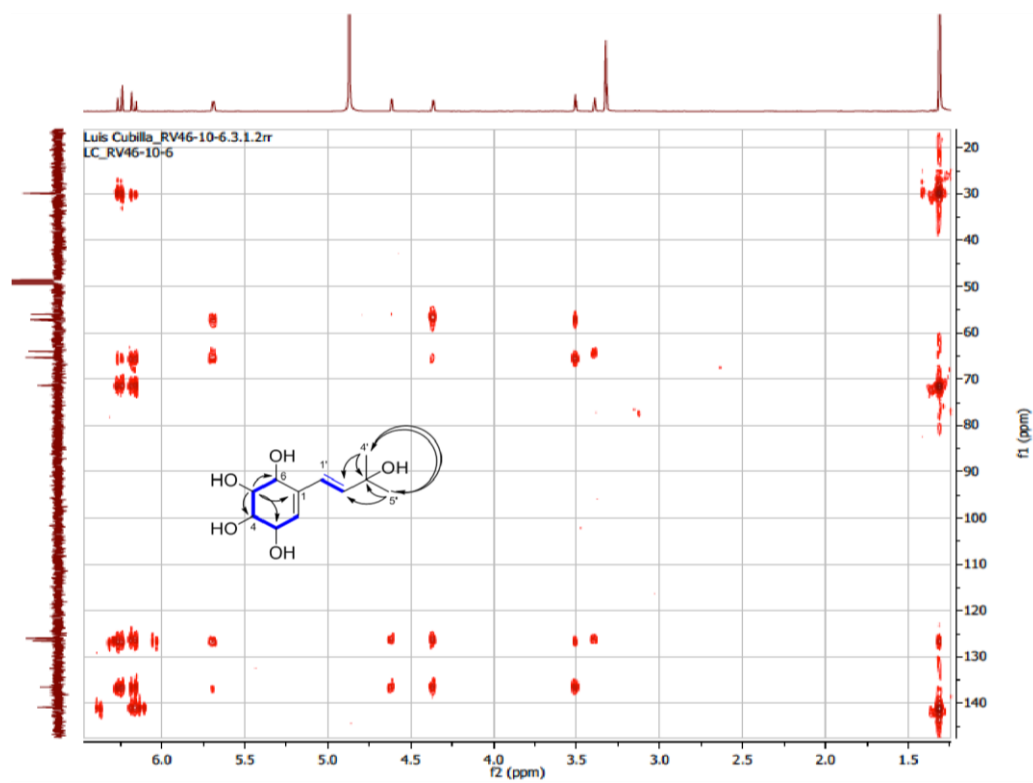


Figura 35. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC RMN (en metanol- d_4) del lentinoide B.

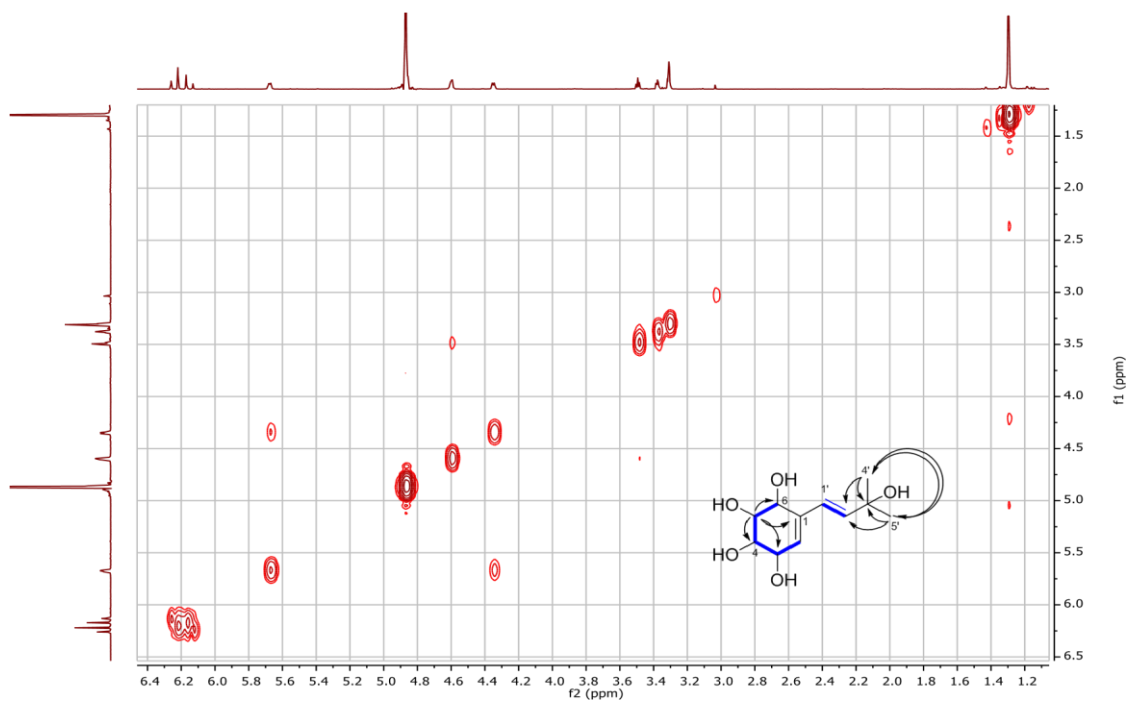


Figura 36. Espectro ^1H - ^1H COSY RMN (en methanol- d_4) del lentinoide B.

NOESY - RV46-73-3-7-10-6

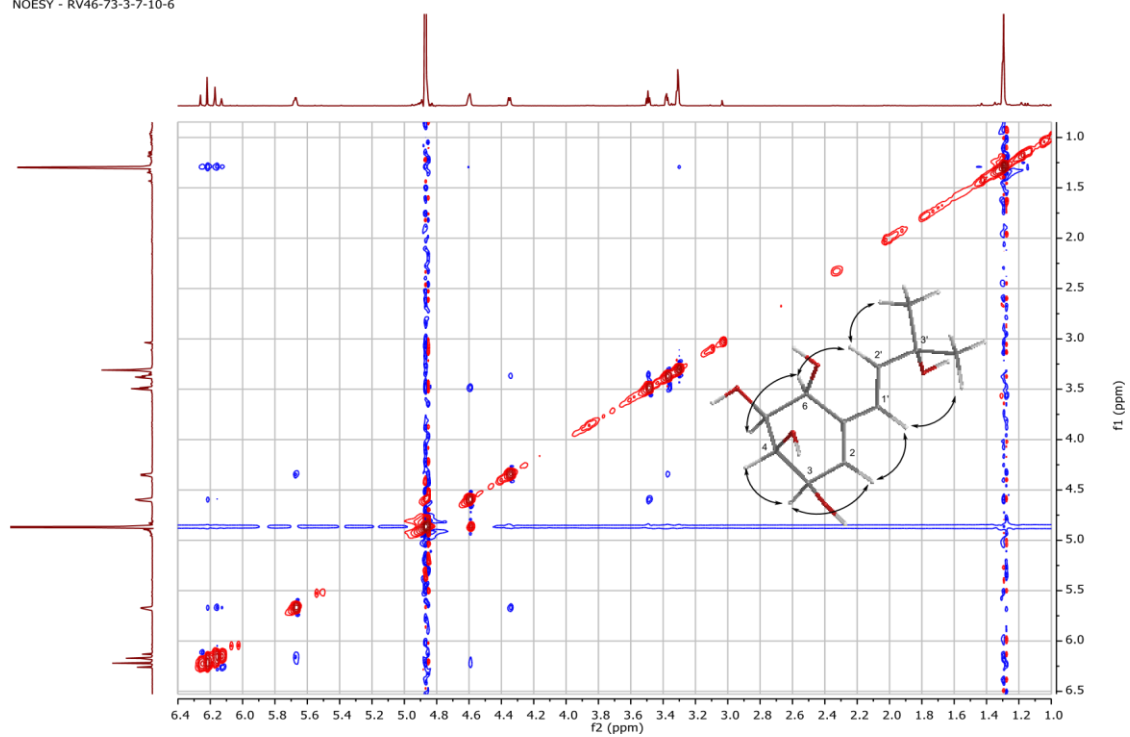


Figura 37. Espectro ^1H - ^1H NOESY RMN (en methanol- d_4) del lentinoide B.

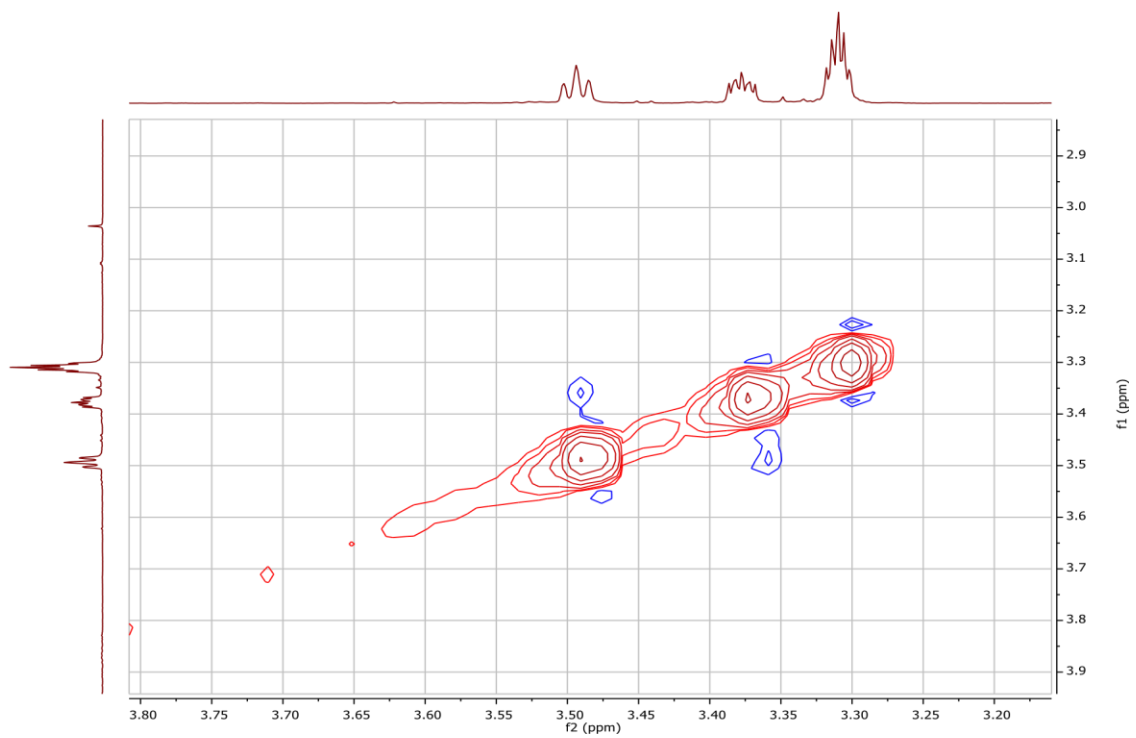
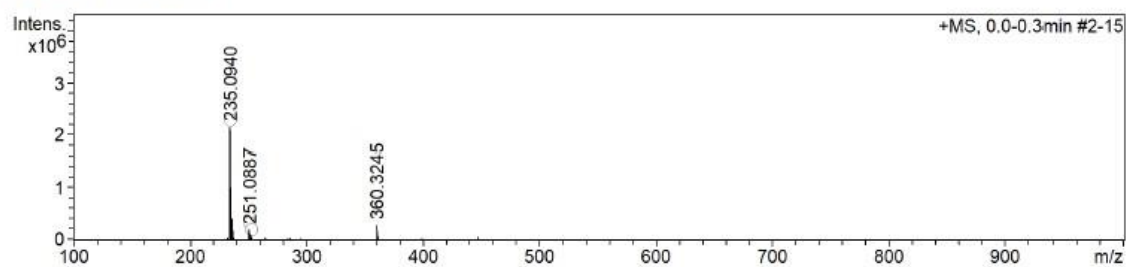


Figura 38. Expansión de ¹H-¹H NOESY para las correlaciones entre H4-H5 en el lentinoide B.

+MS, 0.0-0.3min #2-15



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# Sigma	Score	rdb	e ⁻ Conf	N-Rule
235.0940	1	C ₁₁ H ₁₆ NaO ₄	235.0941	0.4	42.5	1	100.00	3.5	even	ok
251.0887	1	C ₁₁ H ₁₆ NaO ₅	251.0890	1.3	155.6	1	100.00	3.5	even	ok
253.1034	1	C ₁₁ H ₁₈ NaO ₅	253.1046	-4.9	19.2	1	100.00	2.5	even	ok

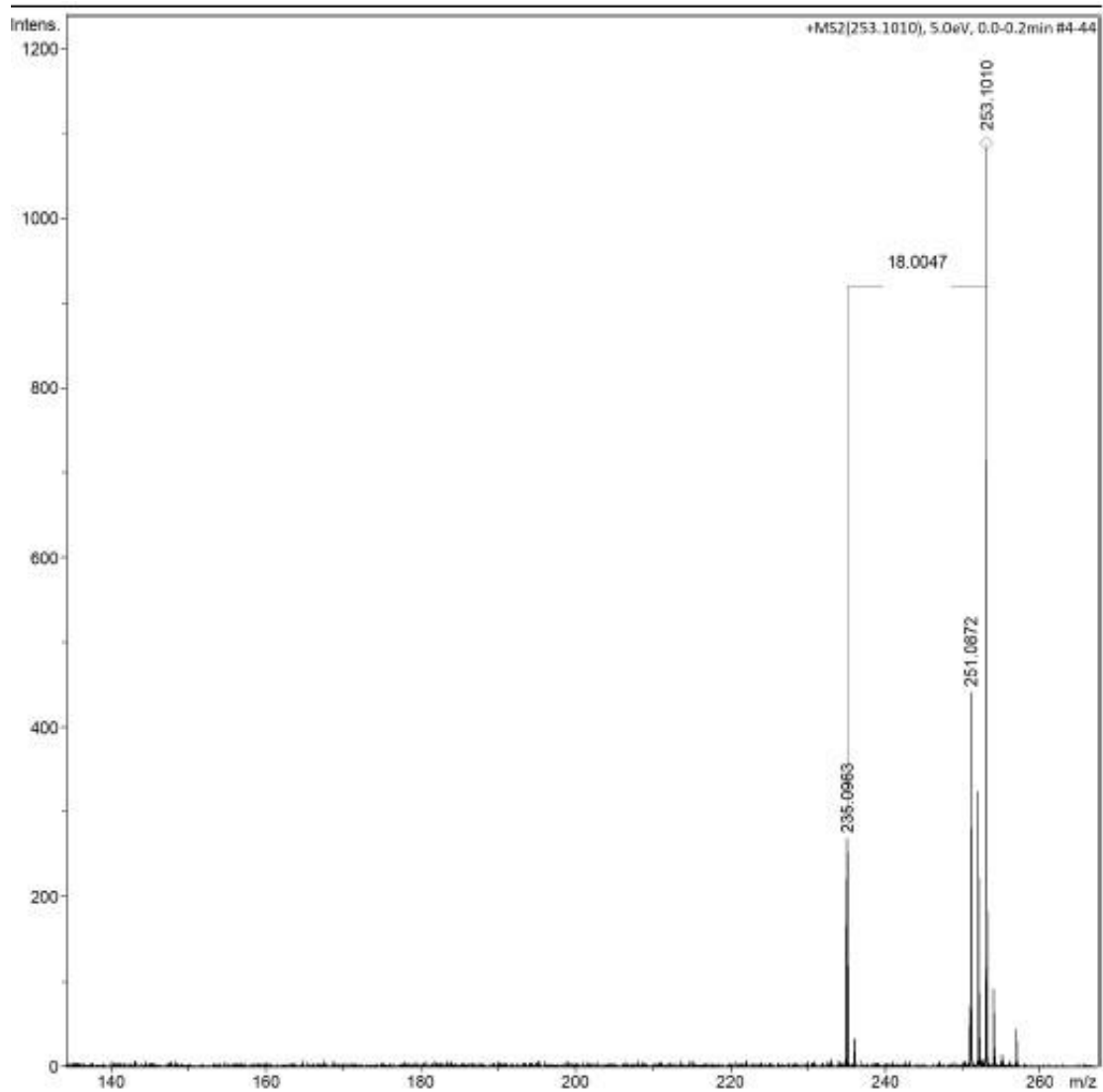


Figura 39. ESIMS (modo positivo) del lentinoide B.

5.4. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DEL LENTINOIDE C.

Para el lentinoide C (Compuesto **3**), la fórmula molecular $C_{15}H_{20}O_7$ fue asignada con 6 grados de insaturación de acuerdo con los datos obtenidos de los espectros de masas HR-ESI-TOF-MS, $[M + Na]^+$, m/z 335.1109 (calculado. 335.1101 para $C_{15}H_{20}O_7Na$), con el ion bimolecular en m/z 647.2311. El Espectro IR mostró bandas a 3400 cm^{-1} correspondiente a grupos OH, y 2 bandas para grupos carbonilos: 1632 cm^{-1} para una cetona α - β insaturada y 1649 cm^{-1} para un éster α - β insaturado. El lentinoide C mostró datos RMN similares a los de la estriguelona A (Tabla 8), incluyendo la unidad prenil (2 metilos (δ_C 29.6 and 29.7), un carbono cuaternario oxigenado (δ_C 71.6), 2 carbonos sp^2 (δ_C 126.6 and 149.5)) y una cetona α - β insaturada (grupo carbonilo (δ_C 194.9), un carbono cuaternario sp^2 (δ_C 156.9) y un metino sp^2 (δ_C 125.9)). Además, 3 carbonos sp^3 oxigenados están presentes (δ_C 76.6, 71.8 and 67.9)., en conjunto, las señales se asemejan al grupo prenilo y a la ciclohexenil cetona característica de los lentinoides.

Tabla 8. Datos RMN para el lentinoide C en MeOH- d_4 , (J en Hz; 1H -RMN a 600 MHz; ^{13}C -RMN a 150 MHz).

Lentinoide C					
Pos.	δ_C	δH	Pos.	δ_C	δH
1	194.9		3'	71.6	
2	125.9	6.02 (1H, s)	4'	29.7	1.37 (3H, s)
3	156.9		5'	29.6	1.36 (3H, s)
4	67.9	4.72 (1H, d; 3.6)	1''	167.0	
5	71.8	4.05 (1H, dd; 3.6, 10.8)	2''	141.6	
6	76.6	5.72 (1H, d; 10.8)	3''	125.5	5.96 (1H, m) 6.35 (1H, m)
1'	126.6	6.46 (1H, d; 16,0)	4''	61.6	4.34 (2H, m)
2'	149.5	6.64 (1H, d; 16,0)			

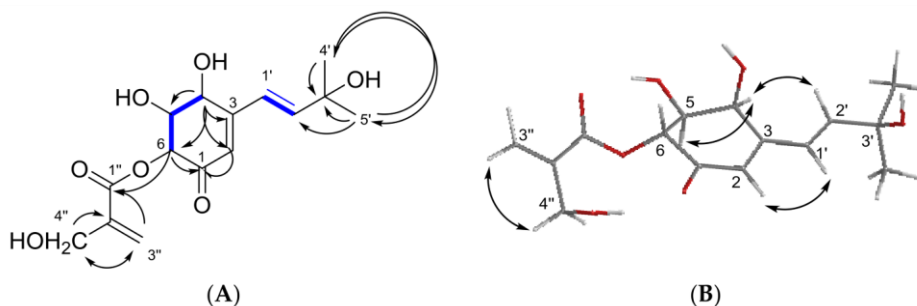


Figura 40. (A) COSY (en Azul), HMBC (flechas negras) y (B) ROESY (flechas negras) del lentinoide C.

Adicionalmente, los datos RMN revelaron la existencia de un metileno terminal (δ_C 125.5, δ_H 5.96 y 6.35), un hidroximetileno (δ_C 61.6, δ_H 4.34) y 2 carbonos cuaternarios (δ_C 141.6 y δ_C 167.0), este último con las características de un grupo carboxiéster. Los datos RMN en 2 dimensiones del COSY (Figura 34A) mostraron correlaciones entre todos los protones y carbonos para este fragmento del lentinoide C., además, las conexiones del grupo carboxi y el anillo ciclohexenilo fue establecida a través de las correlaciones con H-6 (δ_H 5.72, δ_C 76.6) y ambos grupos carbonilos (δ_C 167.0 y 194.9) en igual intensidad.

El experimento espectroscópico ROESY (Figura 34B) mostró correlaciones entre H-4 y H-5, indicando que se encuentran en el mismo sitio de la molécula, y esto fue confirmado por la constante de acoplamiento de 3.6 Hz. No se observó correlación entre H-5 y H-6, indicando que se encuentran en posición axial, con una constante de acoplamiento de 10.8. por lo tanto, se estableció la estereoquímica relativa del lentinoide C.

A continuación, se muestran los espectros 1H , ^{13}C RMN y espectro de masas del lentinoide C.

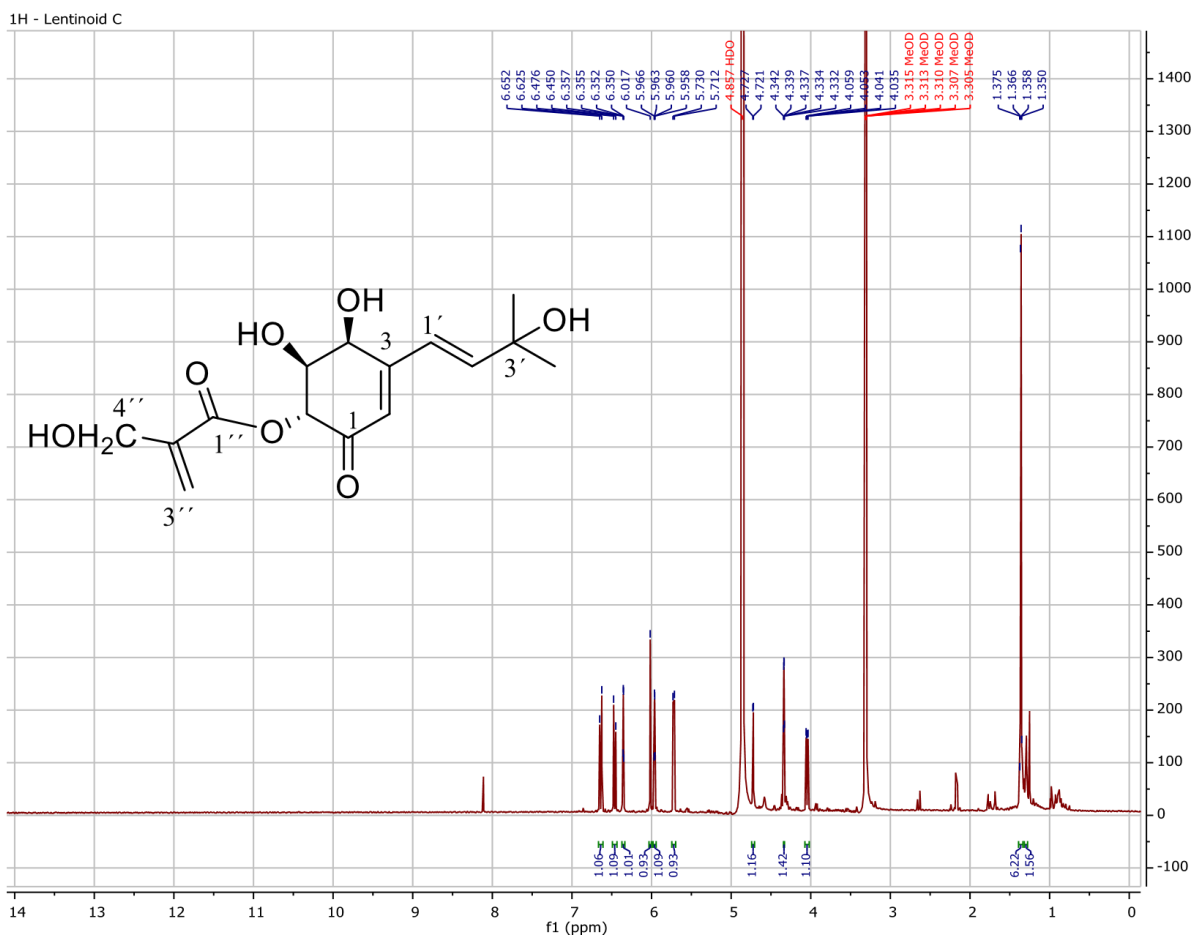


Figura 41. Espectro 1H RMN (a 600 MHz, en methanol- d_4) del lentinoide C.

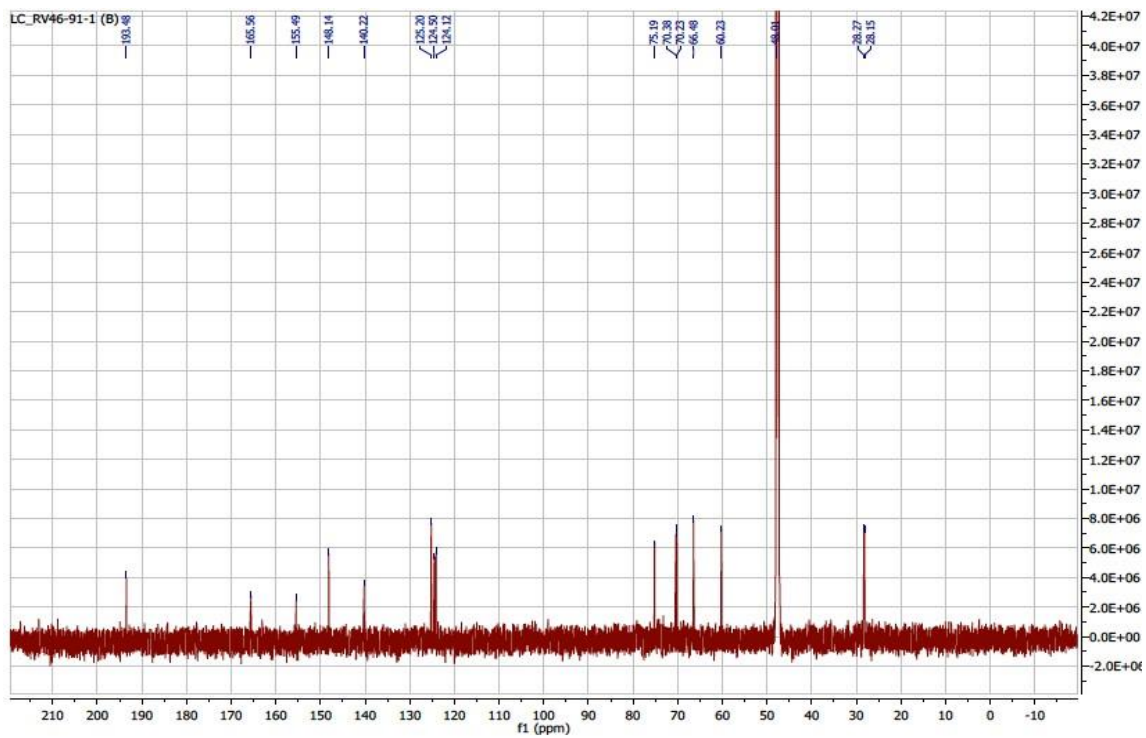


Figura 42. Espectro ^{13}C RMN (a 150 MHz, en methanol- d_4) del lentinoide C.

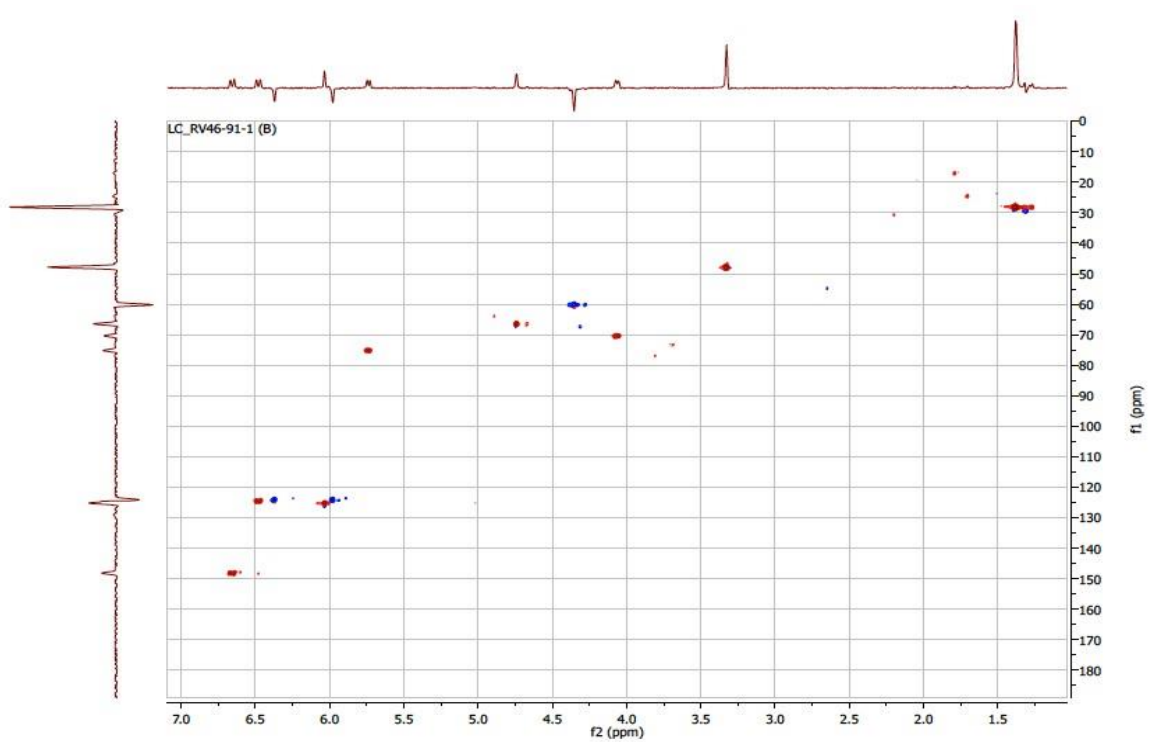


Figura 43. Datos ^1H - ^{13}C HSQC RMN (en methanol- d_4) del lentinoide C.

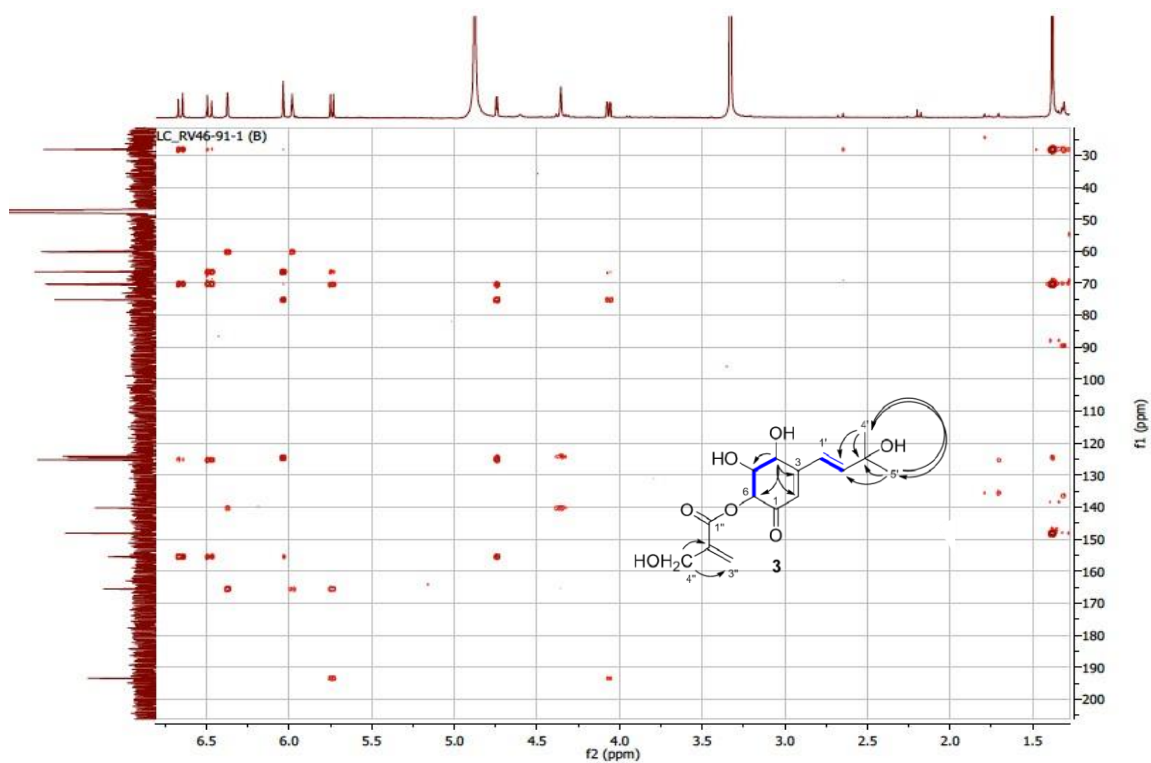


Figura 44. Datos ^1H - ^{13}C HMBC RMN (en metanol- d_4) del lentinoide C.

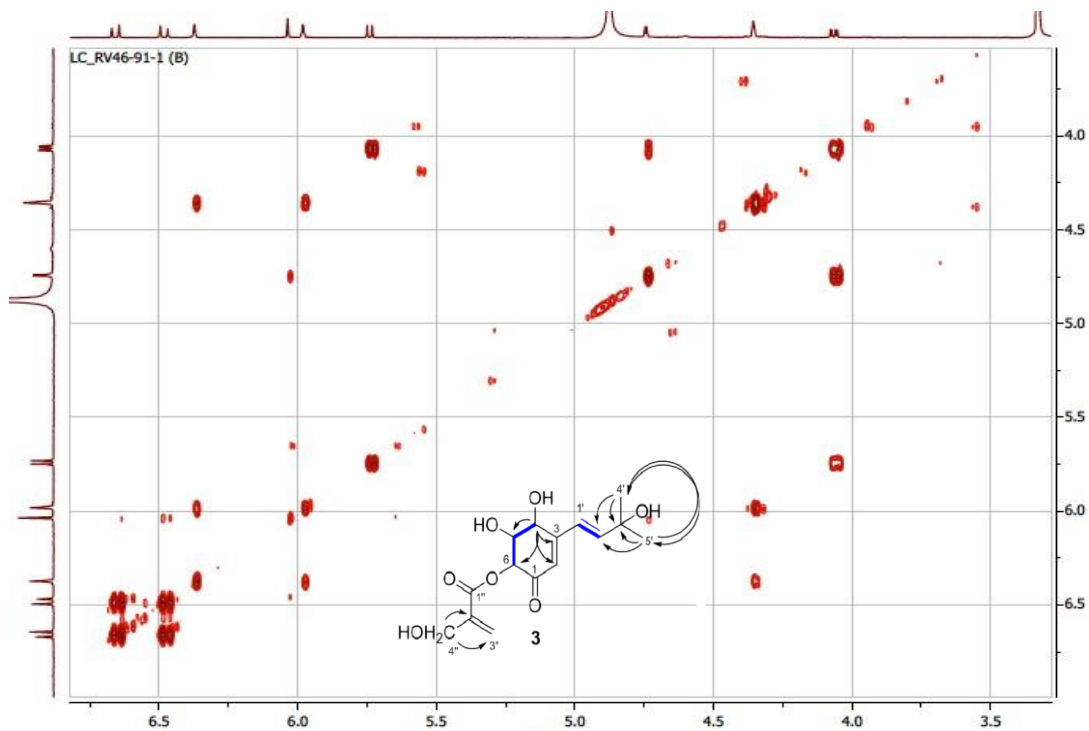


Figura 45. Datos ^1H - ^1H COSY RMN (en metanol- d_4) del lentinoide C.

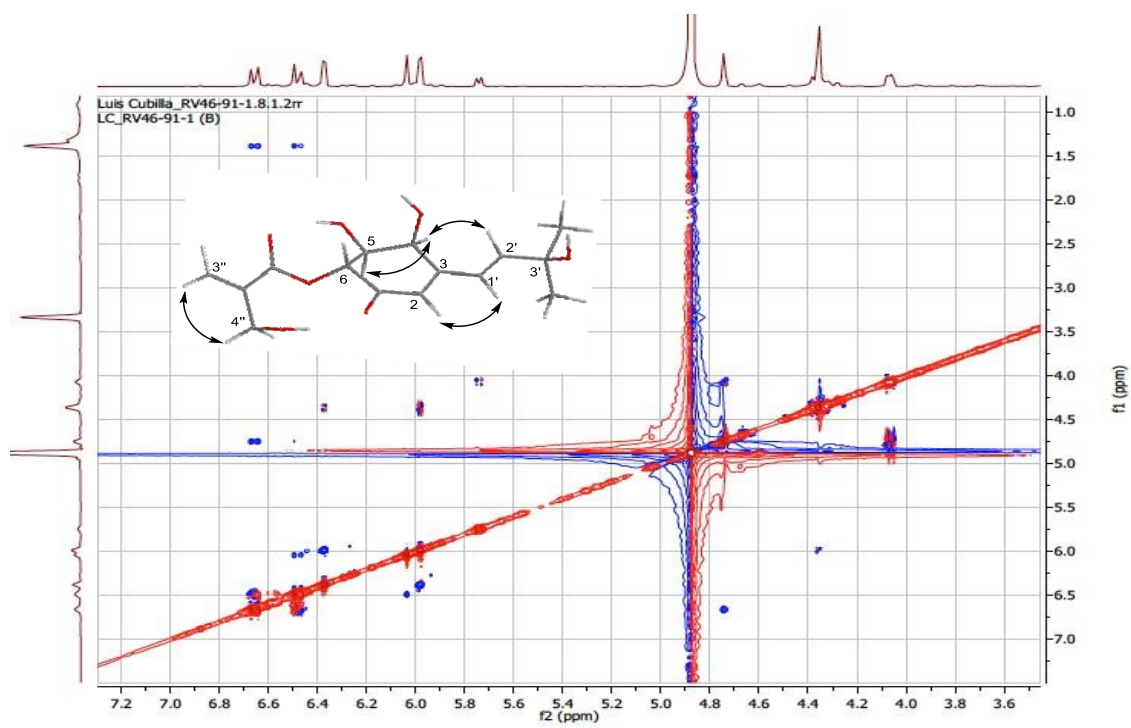
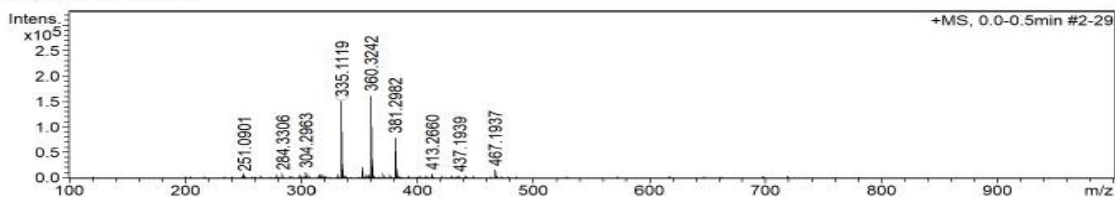


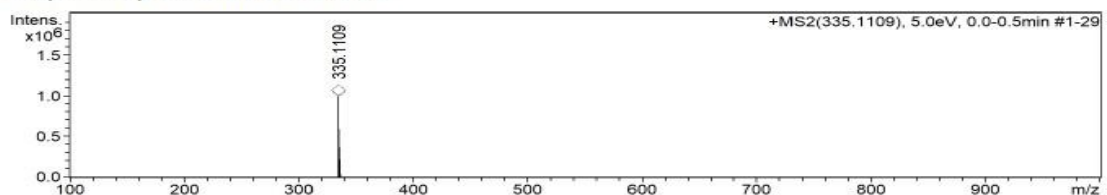
Figura 46. Datos ^1H - ^1H ROESY RMN (en methanol- d_4) del lentinoide C.

+MS, 0.0-0.5min #2-29



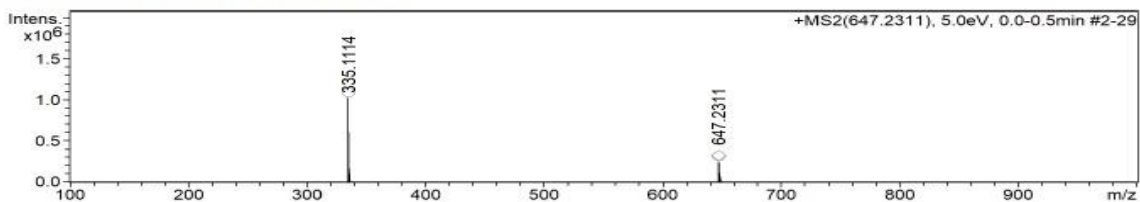
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# Sigma	Score	rdB	e ⁻ Conf	N-Rule
335.1119	1	C ₁₅ H ₂₀ NaO ₇	335.1101	-5.3	8.4	1	100.00	5.5	even	ok

+MS2(335.1109), 5.0eV, 0.0-0.5min #1-29



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# Sigma	Score	rdB	e ⁻ Conf	N-Rule
335.1109	1	C ₁₅ H ₂₀ NaO ₇	335.1101	-2.4	119.6	1	100.00	5.5	even	ok

+MS2(647.2311), 5.0eV, 0.0-0.5min #2-29



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# Sigma	Score	rdB	e ⁻ Conf	N-Rule
335.1114	1	C ₁₅ H ₂₀ NaO ₇	335.1101	-3.7	9.5	1	100.00	5.5	even	ok
647.2311	1	C ₃₀ H ₄₀ NaO ₁₄	647.2310	-0.1	33.7	1	100.00	10.5	even	ok

Figura 47. ESIMS (modo positivo) del lentinoide C.

5.5. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DEL LENTINOIDE D.

Debido a la posible inestabilidad y la pequeña cantidad obtenida del lentinoide D (Compuesto 4), su estructura, fue determinada por su espectro ^1H -RMN. El lentinoide D mostró señales para el grupo isoprenilo como las de la panepoxidona, caracterizado por 2 grupos metilo (δ_{H} 1.69 y 1.70), unidos a un carbono sp^2 , un metino (δ_{H} 5.29, d, $J = 8.8$ Hz) y un hidroximetino (δ_{H} 5.00, d, $J = 8.8$ Hz). Basado en los desplazamientos químicos para los otros 3 hidroximetinos, las constantes de acoplamiento (H-6: δ_{H} 3.96, d, 12.0; H-5: δ_{H} 3.63, dd, 8.4 y 12.0; H-4: δ_{H} 4.36, d, 8.4), y el protón olefínico (δ_{H} 6.89) con un desplazamiento químico característico de un α -protón en una cetona α - β insaturada, se propone la estructura para el Nuevo lentinoide D.

A continuación, se muestra el espectro ^1H RMN del lentinoide D.

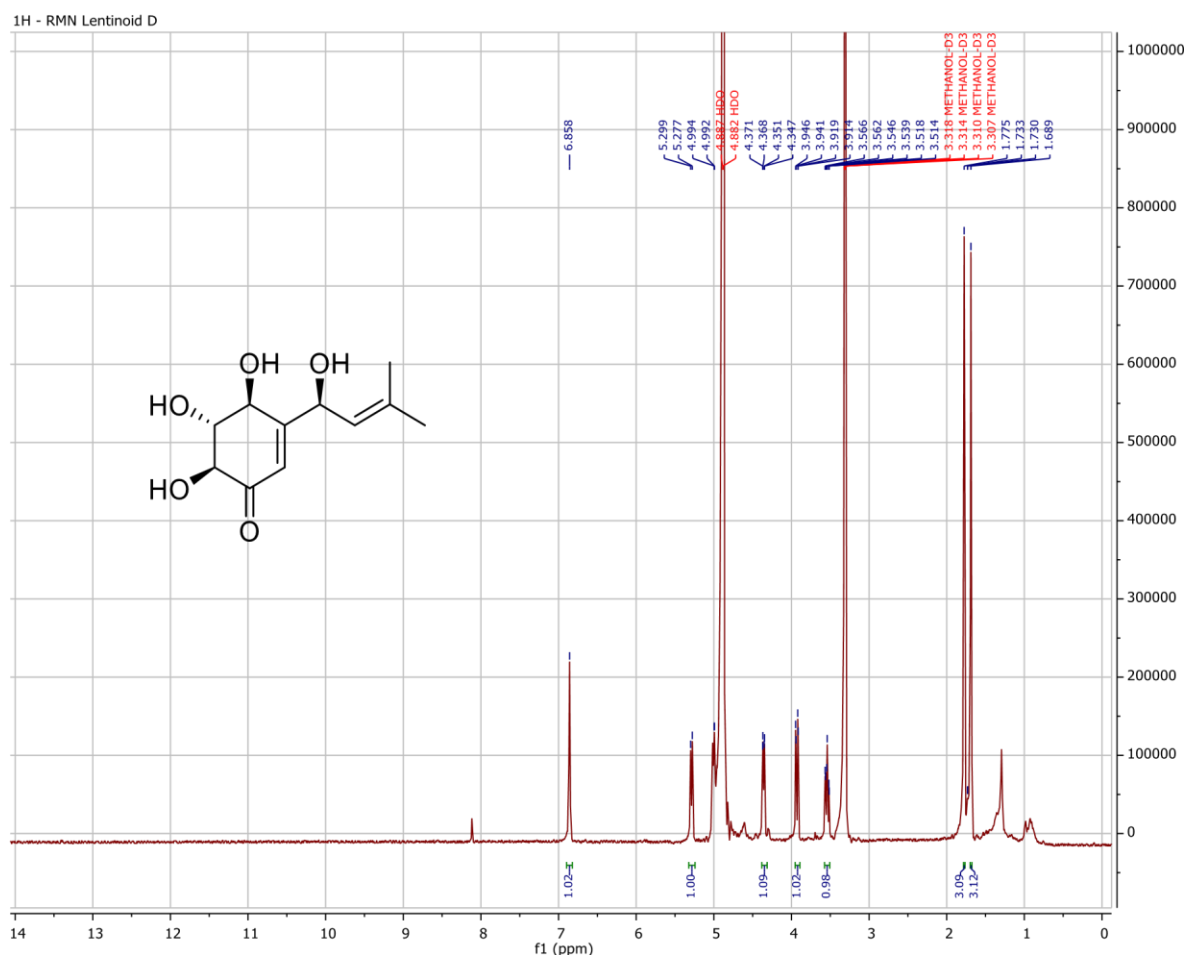


Figura 48. Espectro ^1H RMN (400 MHz, methanol- d_4) del lentinoide D.

5.6. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL.

La inhibición del crecimiento bacteriano fue evaluada in vitro por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) (Swainsbury, Zhou, Oldroyd, & Bornemann, 2012).

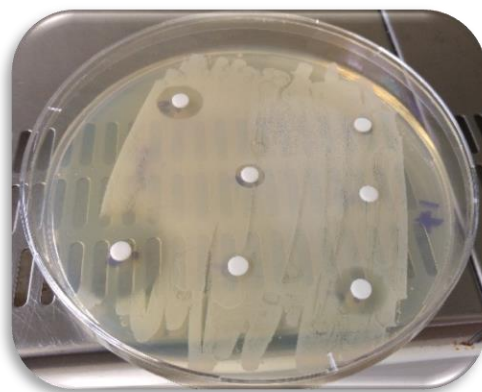


Figura 49. Halos de inhibición obtenidos de la difusión en disco de los Lentinoides, control positivo y negativo.

Los compuestos 1–3 y 5–7 fueron probados con una concentración de 6.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ frente a *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. Las primeras 3 bacterias fueron inhibidas por al menos uno de los compuestos con un diámetro de inhibición entre 7.5–9.5 mm. No se detectó actividad antibacteriana frente a *K. pneumoniae*. El control positivo usado fue sulfato de gentamicina a una concentración de 1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ obteniéndose diámetros de inhibición entre 15-25 mm (Tabla 8).

Tabla 9. Actividad antibacteriana de los compuestos 1–3 y 5–7, diámetros de inhibición (mm).

Especies de Bacterias	Compuestos						C. Positivo
	1	2	3	5	6	7	Sulfato de Gentamicina
<i>Listeria monocytogenes</i>	I	I	I	I	7.5	I	25
<i>Enterococcus faecalis</i>	9	9	8	8	9.5	I	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I	9.5	I	7.5	8.5	I	20

I= Inactivo.

5.7. RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC).

La concentración mínima inhibitoria (MIC) fue determinada para los lentinoides A, B y C usando *E. faecalis* y *P. aeruginosa* (Tabla 10) no obstante, solo el lentinoide A presentó una concentración mínima inhibitoria significativa para inhibir a *E. faecalis*. Esto indica que la presencia del grupo carbonilo es necesaria para la actividad antibacterial del lentinoide A comparado con el lentinoide B.

Tabla 10. Actividad antibacterial de los lentinoides A, B y C, MIC ($\mu\text{g/mL}$).

Especies de Bacterias	Lentinoides			Control positivo
	A	B	C	Sulfato de Gentamicina
<i>E. faecalis</i>	200	—	—	100
<i>P. aeruginosa</i>	—	160	—	33

— (no se detectó actividad)

CONCLUSIONES.

Para terminar con este trabajo de investigación se puede decir que se han caracterizado exitosamente 4 nuevos lentinoides producidos por *Lentinus strigellus* como una respuesta a los cambios en las condiciones de cultivo, estos representan nuevas adiciones a la química y demuestran parte de la diversidad de metabolitos secundarios producidos por este hongo. Los compuestos representados en la figura 1, aislados del género *Lentinus*, podrían tener precursores similares. Adicionalmente, las mejoras en las condiciones de cultivo experimental y el uso de herramientas analíticas adicionales podrían conducir al aislamiento de nuevos compuestos de esta clase y, por tanto, de nuevas moléculas activas. Es más, 3 de estos mostraron actividad antibacteriana en un ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano midiendo sus zonas de inhibición en mm. Sin embargo, cuando se determinó la concentración mínima inhibitoria, solo uno de ellos mostró una actividad significativa de 200 µg/mL.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda seguir con los trabajos y llevar a cabo cultivos a mayor escala para aislar compuestos de las fracciones de las que se obtuvo poca cantidad.
- Se recomienda probar los compuestos aislados contra otras especies de bacterias por ejemplo las que han desarrollado resistencias a los antibióticos.
- Se recomienda investigar el medio de acción por el cual los compuestos aislados ejercen su actividad sobre las bacterias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, W. R., & Abate, D. (1995). Chromanones from *Lentinus crinitus* (Basidiomycetes). *Zeitschrift für Naturforschung*, 50, 748-750.
- Andrews, J. M., & Testing, B. W. (2009). BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 8). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 64(3), 454-489. doi:<https://doi.org/10.1093/jac/dkp244>
- Barros-Filho, B. A., de Oliveira, M. C., Mafezoli, J., Barbosa, F. G., & Rodrigues-Filho, E. (2012). Secondary metabolite production by the basidiomycete, *Lentinus strigellus*, under different culture conditions. *Natural product communications*, 7(6), 771-773. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22816304/>
- Bergamin-Filho, A., & Kimati, H. &. (1995). *Manual de fitopatologia: principios y conceptos*. São Paulo: Agronomica Ceres.
- Gan, Y., Zeng, Y., Mei, W., & Dai, H. (2007). Isolation and Identification of the Chemical Constituents from *Lentinus giganteus* Berk. *Chinese Journal of medicinal chemistry*, 17, 104-107.
- Guzmán, G., & Piepenbring, M. (2011). *Los Hongos de Panamá-Introducción a la identificación de los Macroscópicos* (Primera ed.). (I. d. Ecología, Ed.) Xalapa, Veracruz, Mexico.
- Hoffmeister, D., & Keller, N. (2007). Natural products of filamentous fungi: Enzymes, genes, and their regulation. *Natural Products Reports*(24), 393-416. <https://doi.org/10.1039/B603084J>
- Jang, Kanoh, K., Adachi, K., & Shizuri, Y. (2006). Awajanomycin, a Cytotoxic γ -Lactone- δ -lactam Metabolite from Marine-Derived *Acremonium* sp. AWA16-1. *Journal of Natural Products*, 1358-1360. doi:10.1021/np060170a
- Julca-Canto, M., Aguilar-Pérez, M. M., Ríos, N., Sousa, J. P., & Cubilla-Rios, L. (2016). Additional new natural products produced by *Lentinus strigellus*: a biotechnological approach. *Tetrahedron Letters*, 57, 650-653. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.12.104>
- Kis, Z., Close, A., Sigg, H., Hruban, L., & Snatzke, G. (1970). Die Structure von Panepoxydon und verwandten Pilzmetaboliten. *Helv. Chim. Acta*, 53(7), 1577-1597. <https://doi.org/10.1002/hlca.19700530704>
- Kuhar, F., Castiglia, V., & Papinutti, L. (2013). Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos. *Boletín Biológica*(28), 11-18.
- Lauer, U., Anke, T., & Hansske, F. (1991). Antibiotics from basidiomycetes. XXXVIII. 2-Methoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone, a thromboxane A2 receptor antagonist from *Lentinus adhaerens*. *The Journal of antibiotics*, 44(1), 59-65. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.44.59>

- Lin, Y., Lai, P., Huang, Y., & Xie, H. (2004). Immune-Competent Polysaccharides from the Submerged Cultured Mycelium of Culinary—Medicinal Mushroom *Lentinus strigellus* Berk. et Curt. (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 6(1), 1521-9437. doi:10.1615/IntJMedMushr.v6.i1.50
- Pinto, C., Silva, D., Bolzani, V., & Lopes, N. &. (2002). Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, 25, 45-61. doi:https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000800009
- Pizzoferrato, L., Manzi, P., & Aguzzi, A. (2001). Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*, 321-325. doi:https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00304-6
- Raja, H., Miller, A., Pearce, C., & Oberlies, N. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 756-770. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b01085.
- Senthilarasu, S. (2015). The lentinoid fungi (*Lentinus* and *panaus*) from Western Ghats, India. *IMA Fungus*, 119-128. doi:10.5598/imafungus.2015.06.01.06
- Smith, J., Rowan, N., & Sullivan, R. (2002). Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnology Letters*(24), 1839–1845. doi:https://doi.org/10.1023/A:1020994628109
- Swainsbury, D. J., Zhou, L., Oldroyd, G. E., & Bornemann, S. (2012). Calcium ion binding properties of *Medicago truncatula* calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Biochemistry*, 51(35), 6895–6907. doi:https://doi.org/10.1021/bi300826m
- Vargas-Isla, R., & Ishikawa, N. (2008). Optimal conditions of in vitro mycelial growth of *Lentinus strigosus*, an edible mushroom isolated in the Brazilian Amazon. *Mycoscience*, 49(215), 215-219. doi:https://doi.org/10.1007/s10267-007-0404-2
- Wasser, S. P., & Weis, A. L. (1999). Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical reviews in immunology*, 65-96.
- Wotton, M. (2013). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing;. *British Society of Antimicrobial Chemotherapy*.
- Zheng, Y., Zhao, B., Lu, C., Lin, X., & Zheng, Z. y. (2009). Isolation, structure elucidation and apoptosis-inducing activity of new compounds from the edible fungus *Lentinus striguellus*. *Natural Products Communication*.(4), 501-506. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19475993/