

HIDROCARBUROS Y ESTEROIDES EN *Hemispora Stellata*

Por A. Funes y
J. Burgos

La amplia distribución de los esteroideos en la naturaleza, y su fundamental importancia para la vida vegetal y animal, son hechos bien conocidos. Prácticamente todos los hongos sintetizan esteroideos en mayor o menor cuantía, dependiendo ésta más de la especie que de las condiciones ambientales.

El generalmente más abundante de los esteroideos fúngicos, es sin duda el Ergosterol, siendo frecuente que se exprese en términos del mismo el contenido total en esteroideos de los hongos. Es sabido, sin embargo, que en casi todos los hongos existen mezclas más o menos complejas de esteroideos. Así en *Debaryomyces hansenii* aunque dominan ergosterol y estigmasterol, se hallan presentes también otros esteroideos en menor cuantía (MERDINGER & DEVINE, 1965), y en *Aspergillus fumigatus* y *Phycomyces blakesleanus* se han hallado lanosterol, 24-metileno-lanosterol, 14-dimetil 24-metilenelanosterol, y otros (GOULSTON, GOAD & GOODWIN 1967), cuya presencia había sido ya predicha sobre bases biosintéticas (AKHTAR y col. 1966); BARTON y col. (1966), etc.); en *Melanospora lini*, estigmast-7-enol y estigmasta-7,24²⁸-dienol (JACKSON y FREAR 1968).

Menos estudiados que los esteroideos están los hidrocarburos de los hongos, la importancia de algunos de los cuales, sin embargo, no puede monospreciarse, dado el carácter de precursores que poseen en la biosíntesis de los esteroideos. Son muy escasos los estudios al respecto, pero los hongos parecen contener fundamentalmente hidrocarburos saturados de configuración normal y algunos no saturados (MERDINGER y DAVINE, 1965).

En un estudio reciente sobre la composición lipídica de *H. Stellata* (LÓPEZ, 1973) se detectó, además de ergosterol, la presencia de otros esteroides no identificados en los lípidos fácilmente extractables de este hongo, y la de hidrocarburos en los lípidos ligados.

El presente trabajo constituye un intento de identificar y determinar cuantitativamente los esteroides e hidrocarburos de este hongo.

METODOS

Los procedimientos utilizados para la obtención y purificación de esporas y micelio de *H. Stellata*, la procedencia del Hongo, y su mantenimiento, y los sistemas empleados para la extracción de los lípidos, han sido publicados en otros artículos (BURGOS, SALA y LÓPEZ, 1973; SALA y BURGOS, 1972; SALA y BURGOS, 1973).

La saponificación de los lípidos se llevó a efecto hirviendo a refluo durante 45 minutos con metanol y KOH al 60 %, 2/1 (V/V), en presencia de pirogalol (0,25 %). El residuo insaponificable se extrajo con éter etílico libre de peróxidos, se concentró en rotavapor, se liberó totalmente de disolvente bajo corriente de nitrógeno, y se fraccionó en columna de alúmina (Brockman III), con mezclas de éter de petróleo 30-60º/éter etílico, siguiendo el método descrito por GOAD y GOODWIN (1966).

Se obtuvieron así 5 fracciones: número 1, que contiene los hidrocarburos saturados y parte de los no saturados; número 2 con el resto de hidrocarburos no saturados; número 3, con los 4,4-dimetil-esteroides, número 4, que contiene los 4-monometil-esteroides; y número 5, en la que se eluyen los 4-desmetil-esteroides.

Las fracciones 1 y 2 fueron cromatografiadas en lámina fina de alúmina G tipo E, o silicagel PF-254, usando como fase móvil hexano-éter etílico 99,75/0,25 (v/v) según describen KUSHWAHA *et al* (1972). Las fracciones de hidrocarburos separadas, fueron localizadas por fluorescencia bajo luz ultravioleta, o pulverizando una pequeña zona a cada lado de la lámina con MnO₄K al 5 %, y obtenidas mediante raspado de la alúmina y micropercolación de la misma con hexano.

La hidrogenación de los hidrocarburos no saturados se llevó a cabo a la presión atmosférica durante 24 horas, a temperatura ambiente, disueltos en hexano-isopropanol (1/1 v/v), y utilizando platino como catalizador.

La reacción de Liberman-Burchard se llevó a efecto siguiendo la técnica de MOORE y BAUMAN (1951), efectuando lecturas periódicas de la extinción a 460 nm.

Para la cromatografía en fase gaseosa se empleó un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer mod. F-11 con detector de ionización de llama y columnas de vidrio de 1,80 m de longitud y 0,3 mm de diámetro interior, con fase estacionaria de SE-30 al 1 %, sobre Gas-Chrom. Q 100-120 mallas. Como gas portador se utilizó nitrógeno, a un flujo de 120 ml/min.

El análisis de hidrocarburos se llevó a cabo a temperatura programada de

140/-210°C, con incremento de 4°C/min. El de esteroides se realizó isotérmicamente a 211°C.

RESULTADOS

El residuo insaponificable de los lípidos fácilmente extractables representa tanto en esporas como en micelio de 24 y 48 horas valores próximos al 24 % (25,7 % esporas, 25,5 en micelio, de 24 horas y 23,3 % en el de 48 horas).

En la tabla I se recoge el resultado del fraccionamiento cromatográfico del mismo en columna de alúmina.

Hidrocarburos

En conjunto, las fracciones 1 y 2 en las que se eluyen todos los hidrocarburos constituyen entre un 25 y un 35 % del total de insaponificables. La cromatografía en lámina fina de aliquotas de las dos fracciones, permitió separar en ambas cinco manchas de Rf: 0,21, 0,46; 0,57; 0,80 y 0,98. Ninguna de ella mostró reacción positiva frente al reactivo de dipiridilo (Analytical Methods Committee 1959), ni al de p-anisaldehido (METZ, 1961), ni espectro ultravioleta específico.

El análisis por cromatografía en fase gaseosa puso de manifiesto que la mancha de Rf: 0,98 estaba constituida por hidrocarburos saturados, y que todas las demás fracciones excepto la de Rf: 0,21, que fluoresce bajo la luz ultravioleta y no se comporta como hidrocarburo en la cromatografía de gases, contenían cierta cantidad de escualeno y otros hidrocarburos no saturados. Se decidió por ello mezclar las fracciones 1 y 2 de la cromatografía en alúmina, y proceder a separar por croma-

TABLA I
Composición del residuo insaponificable de *H. stellata* fraccionado en columna de alúmina, expresado en %

Fracción	Lípidos libres			Lípidos ligados
	Esporas	Micelio 24 h	Micelio 48 h	Esporas
1. ^a Eter de petróleo	23,4	26,6	17,4	19,6
2. ^a 2 % E. Et.	7,4	10,0	8,4	5,7
—E. petróleo				
3. ^a 6 % E. Et.	5,6	6,4	7,2	7,5
—E. petróleo				
4. ^a 12 % E. Et.	10,02	7,0	5,6	11,5
—E. petróleo				
5. ^a 25 % E. Et.	33,1	32,3	35,3	13,8
—E. petróleo				
6. ^a Eter Etílico	20,2	16,2	16,7	7,1

tografía en lámina fina los hidrocarburos saturados (banda de Rf: 0,98) de los no saturados (resto de las bandas).

TABLA II

Hidrocarburos saturados y no saturados del residuo insaponificable de los lípidos fácilmente extractibles de esporas y micelio de 24 y 48 horas, y de los lípidos ligados de esporas; expresados en % del total de residuo insaponificable.

Lípidos libres	% saturados	% H. no saturados*	% total
Esporas	11,14	18,72	29,86
Micelio 24 horas	8,89	26,53	35,42
Micelio 28 horas	5,67	19,42	25,1
Lípidos ligados de Esporas	0	24,54	24,54

Tanto en los lípidos fácilmente extractibles, como en los ligados, dominan los hidrocarburos no saturados, que representan el 63 % del total de los hidrocarburos en los lípidos libres de las esporas, el 75 % en el micelio de 24 horas y el 77 % en micelio de 48 horas, y el 100 % en los lípidos ligados de las esporas.

En la tabla II se expresa el % en peso respecto al total del residuo insaponificable, de los hidrocarburos saturados de los lípidos estudiados.

En la fracción de hidrocarburos saturados, se halla presente toda la serie de número par de átomos de C desde el de 16 hasta el de 30, y además el C₂₁, C₂₃, C₂₅, (Figs. 1 y 2). El componente mayoritario es el octacosan (C₂₈) que representa el 23 % del total en el micelio de 24 horas y el 30 % en micelio de 48 horas. (Tabla III).

La fracción de hidrocarburos no saturados es mucho menos heterogénea. El escualeno, que es en todos los casos el mayoritario (68,5 % en esporas, 98,8 % en los lípidos de la misma fase de crecimiento; 54,8 % en micelio de 24 horas y 30,6 % en micelio de 48 horas), fue identificado sobre la base de su Rf en lámina fina y su tiempo de retención en la cromatografía de gases, idénticos al del patrón correspondiente. Los demás hidrocarburos no saturados se caracterizaron sólo parcialmente; se determinó la longitud de la cadena carbonada por comparación de los tiempos de retención de sus productos de hidrogenación, con patrones de la misma serie. Ni la cromatografía en lámina fina, ni los intentos de cromatografía en columna siguiendo el método de KUSHIWAHA (1972), permitieron purificar y separar cada uno de los componentes para proceder a su hidrogenación cuantitativa, que hubiera permitido determinar su grado de insaturación.

Además del escualeno, aparecen en proporciones variables (Tabla III) hidrocarburos no saturados de 16, 18, 21 y 25 átomos de carbono, y trazas de otros no identificados. (Figs. 3 y 4).

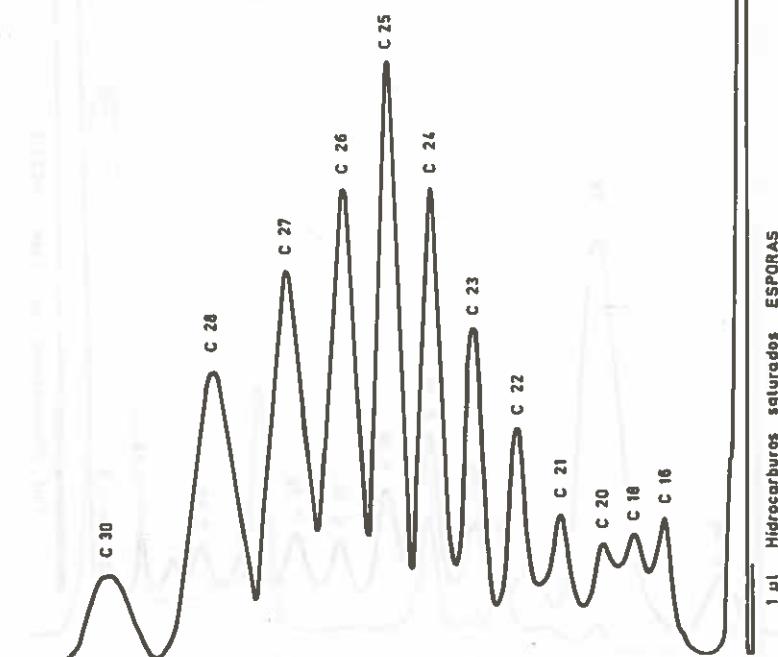


Figura 1.—Separación e identificación de la fracción de hidrocarburos saturados de esporas, por cromatografía en fase gaseosa.

Esteroides

Las fracciones 3, 4 y 5 de la cromatografía en columna de alúmina fueron cromatografiadas analíticamente en lámina fina de silicagel, desarrolladas con éter de petróleo, éter etílico, ácido acético 30/20/1 (v/v), junto con patrones de ergosterol lanosterol y farnesol. Los cromatogramas fueron examinados bajo la luz ultravioleta y revelados con reactivo de vainillina-sulfúrico (MATHEWS, 1963), cloruro férreo y α -dipiridilo, y reactivo de senilhidrazina (BURTON 1951) para grupos ceto. No se observó mancha alguna positiva al reactivo de dipiridilo, ni al de la senilhidrazina. En las fracciones 3 y 4, se observó la presencia de una mancha fluorescente no identificada, presente también en el patrón de lanosterol, y la de poliprenoles (Fig. 5). Esta última se confirmó por cromatografía bidimensional (WALTON y PENNOCK, 1972).

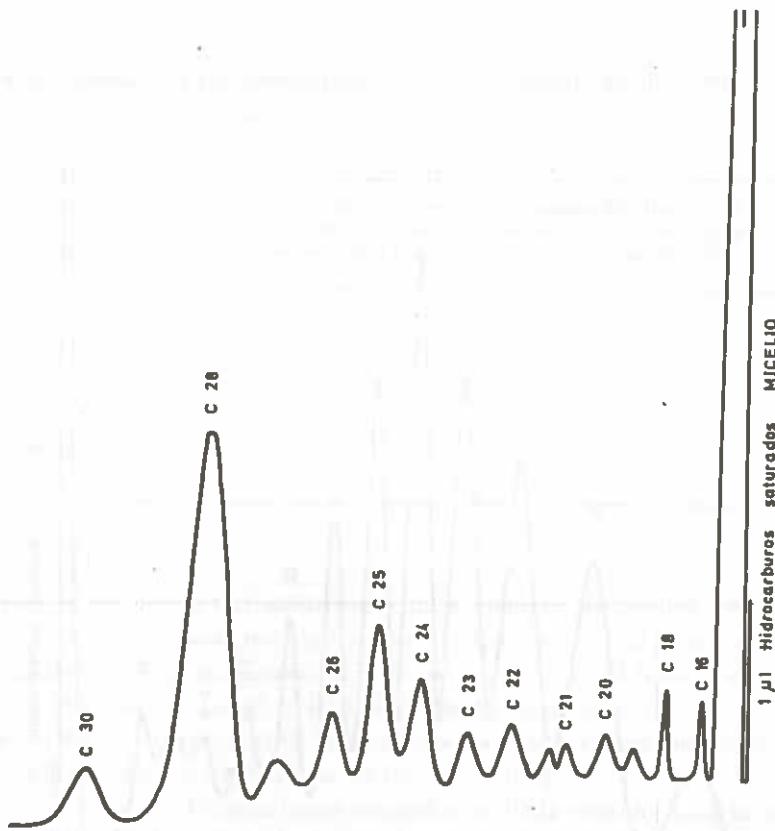


Figura 2.—Cromatograma correspondiente a la separación de los hidrocarburos saturados de micelio de 24 horas.

TABLA III

Composición de la fracción de hidrocarburos de *H. stellata*, esporas y micelio expresada en %

Hidrocarburos	Esporas		Miselio 24 h		Miselio 48 h	
	sat.	no sat.	sat.	no sat.	sat.	no sat.
C ₁₆	0.15	2.15	3.25	5.11	2.58	7.07
C ₁₈	0.75	4.50	3.70	25.90	3.25	30.61
C ₂₀	2.13	—	2.22	—	2.34	—
C ₂₁	4.80	7.45	1.59	7.90	1.82	2.92
C ₂₂	4.80	—	1.18	—	1.88	—
C ₂₃	7.45	—	—	—	3.04	—
C ₂₄	11.00	—	6.51	1.72	5.80	—
C ₂₅	13.90	17.30	11.25	5.21	10.70	5.80
C ₂₆	11.06	—	10.37	—	11.50	—
C ₂₇	—	—	—	—	—	—
(ó Escualano)	13.27	—	11.55	—	10.32	—
C ₂₈	23.12	—	24.00	—	30.00	—
Escualeno	—	68.5	—	54.80	—	53.20
C ₃₀	10.20	—	11.30	—	10.20	—

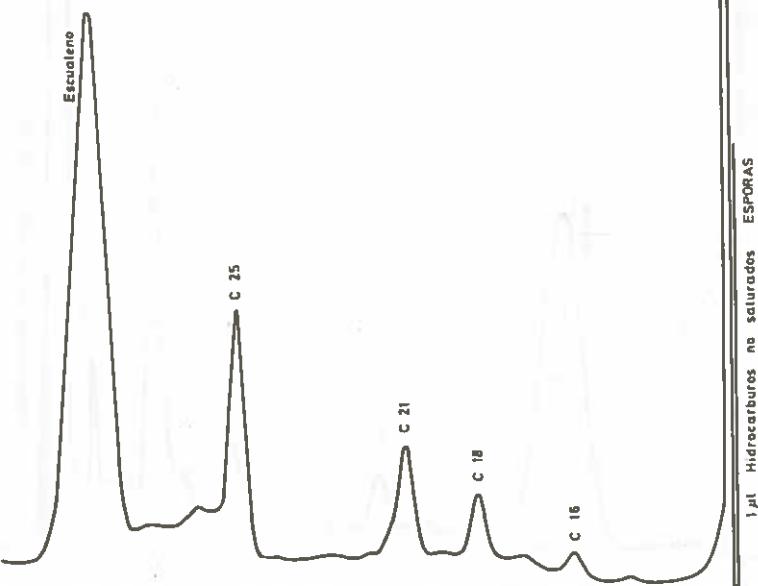


Figura 3.—Cromatograma de los Hidrocarburos no saturados de esporas.

El reactivo de vainillina sulfúrico reveló en la fracción n.^o 3 una mancha de color pardo y Rf algo inferior al de lanosterol. En la fracción n.^o 4 una mancha de color azul violeta y Rf igual al del farnesol, y otra de color pardo y Rf muy similar al del lanosterol. En la fracción n.^o 5 sólo aparece una mancha de color violeta oscuro y Rf idéntico al de ergosterol patrón. (Fig. 5).

a) *Dimetilesteroides*

La cromatografía en fase gaseosa de la fracción n.^o 3 reveló la presencia de un compuesto de tiempo de retención ligeramente superior al de lanosterol patrón (que sólo representa una pequeña parte del total de la fracción; 1,6 % en micelio de 24 horas; 1,2 % en el micelio de 48 horas y sólo indicios en las esporas), y otros dos picos casi imperceptibles y de tiempo de retención 0,65 y 1,3 (relativo al colestanol).

Una alícuota de la fracción completa fue precipitada con digitonina; liberados los esteroides del derivado digitonido, el análisis por cromatografía en fase gaseosa dio los mismos resultados que la inyección directa de la muestra.

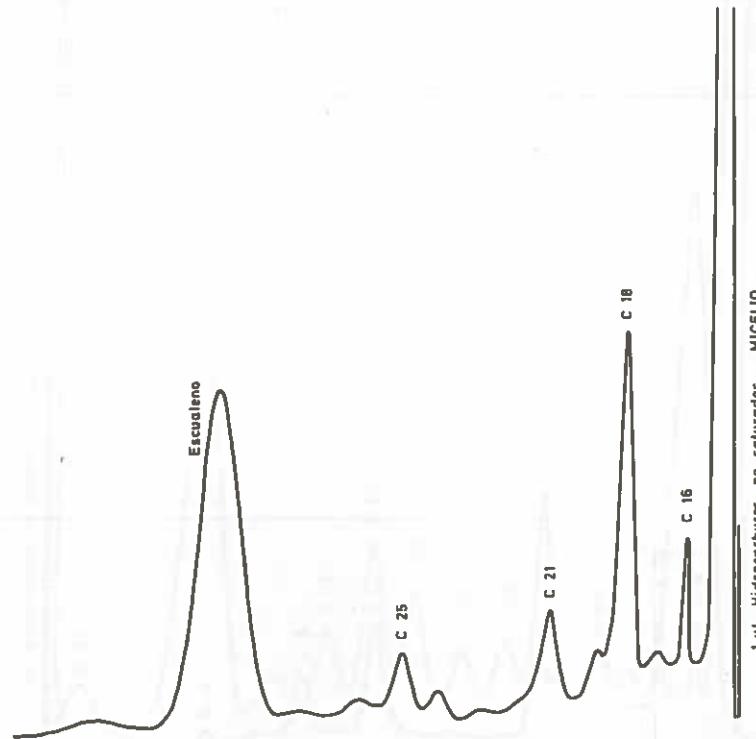


Figura 4.—Cromatograma correspondiente a los hidrocarburos no saturados de micelio.

Sometida esta fracción al test de Liberman-Buchard, dio (igual que el Lanosterol) una coloración máxima medida a 460 mn. al cabo de 33 minutos; se presume que se trata del 24-metileno-Lanosterol. Su espectro infrarrojo muestra bandas características a 887, y 1.640 cm^{-1} que tienden a confirmar este supuesto.

Monometil Esteroides

El análisis por cromatografía en fase gaseosa de la fracción n.^o 4 dio como resultado la presencia de un pico de tiempo de retención semejante al del zimosterol (t. ret. relativo al colesterol 3,52) y que es componente mayoritario en los lípidos libres de esporas y micelio de 24 y 48 horas. También aparecen indicios de ergosterol (producto de contaminación de la fracción 5.^a).

Tras la precipitación con digitonina y el análisis de los esteroides recuperados se obtuvo un resultado idéntico al de la inyección directa de la muestra.

En los lípidos ligados de esporas aparece en esta fracción un compuesto de t. ret. 2,01; el espectro ultravioleta de la fracción ofrece un máximo a 310 y

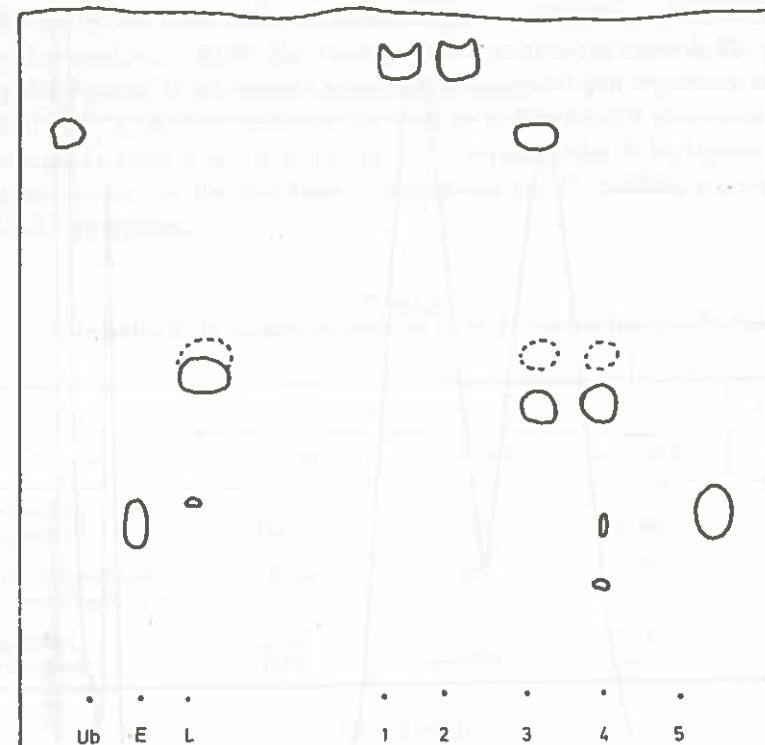


Figura 5.—Cromatografía en lámina fina de Silicagel G, de las fracciones de insaponificables de *H. stellata* procedentes de la cromatografía en columna de aluminio. Patrones: Ub = Ubiquinona, E = Ergosterol, L = Lanosterol.

TABLA IV
Tiempos de retención relativos al colesterol de los esteroides utilizados como patrones y de los identificados en los lípidos de *H. stellata*

Compuesto	Tiempo ret. rel.	Identificado en
Colestanol	1 (patrón)	Esporas y micelio de 24 y 48 horas
Ergosterol	2,64	Esporas
Zimosterol	3,25	—
Lanosterol	3,04	—
Estigmasterol	2,73	—
Campesterol	2,03	—
Sitosterol	2,92	—
24 Metileno-Lanosterol	4,5	Micelio de 24 y 48 horas

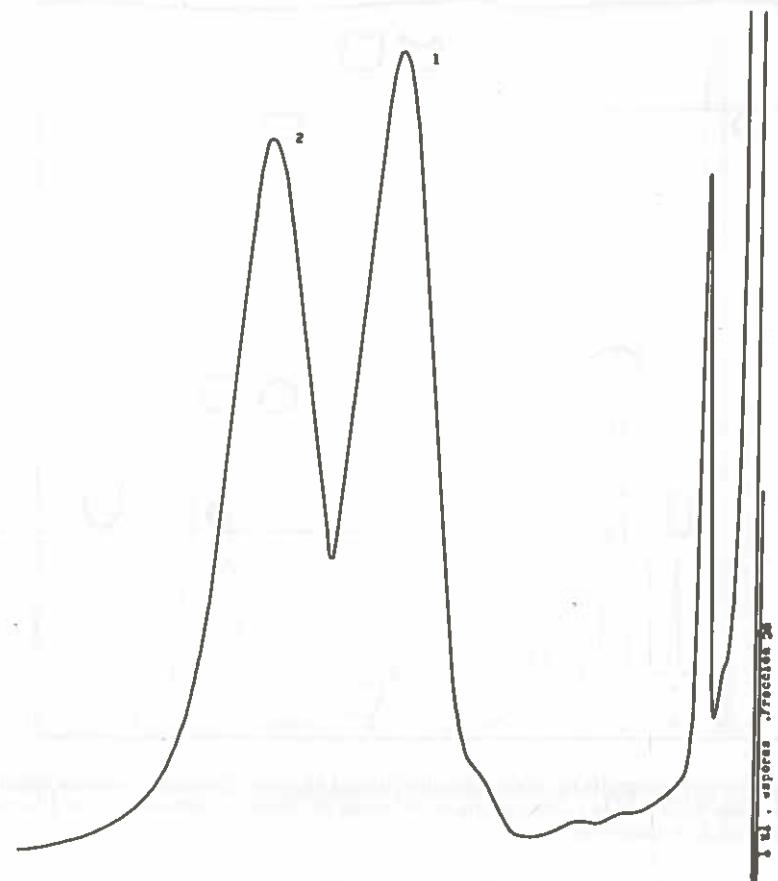


Figura 6.—Cromatografía en fase gaseosa de 4-desmetil esteroides de esporas de *H. stellata*. 1 = Ergosterol, 2 = Zymosterol.

hombros a 320 y 354 nm. El compuesto responsable del pico en la cromatografía en fase gaseosa y (el) del espectro ultravioleta no forman un complejo con la digitonina.

4-desmetil Esteroides

La fracción n.^o 5 de la cromatografía en columna de alúmina, en la que aparecen los 4-desmetil esteroides, es cuantitativamente la más importante de aquellas que contienen esteroides. Fue analizada por cromatografía en fase gaseosa directamente y tras la obtención del derivado digitonido y posterior recuperación de los esteroles. En ambos casos se obtuvieron dos picos de tiempos de retención 2,64 y 3,25, idénticos a los de ergosterol y zimosterol (Fig. 6).

En los lípidos libres de las esporas, el ergosterol representa el 52 % de la fracción y el zymosterol el 48 %. En el micelio, tanto de 24 horas como de 48 horas, y en los lípidos ligados de las esporas aparece sólo ergosterol que representa respectivamente el 57,7 %, 50,7 %, y 27,7 % del total de la fracción 5.^a de la cromatografía de alúmina. La tabla V muestra la composición en esteroides de los lípidos fácilmente extractables de las distintas fases de crecimiento de *H. Stellata*, y de los lípidos ligados de las esporas.

TABLA V
Esteroides de *H. stellata* expresados en % de residuo insaponificable.
(Fracciones 3.^a; 4.^a y 5.^a)

Componente	Lípidos libres			L. ligados Esporas
	Esporas	Micelio 24 h	Micelio 48 h	
2-h-Metileno Lanosterol?	Indicios	0,102	0,086	—
4-Metil-Zymosterol No identificado (??)	2,565	1,427	2,027	3,703
Ergosterol Zymosterol	17,16 15,48	16,54 indicios	17,74	3,823

DISCUSION

Hidrocarburos se han detectados en gran cantidad de microorganismos. MERRINGER y DEVINE (1965) encuentran en *D. Hansenii* solo alcanos, identificando 11, de 16 a 39 átomos de carbono; BIRD *et al.* (1971) hallan también sólo alcanos en *M. capsulatus*, de 20 a 30 átomos de carbono. En *H. cutirrubrum*, (KUSHIWAHA *et al.* 1972) se ha detectado además de escualeno, dihidro, tetrahidro y dehidroescualeno. La fracción hidrocarburos de *H. stellata* difiere bastante de la de estos otros microorganismos; la mayor parte de los mismos posee un número par de átomos de carbono, y ninguno tiene más de 30C. Cuantitativamente dominan los no saturados aunque hay más miembros de la serie de los alcanos. Resulta en cierta medida sorprendente dado el elevado contenido en escualeno, la ausencia de productos con un grado de saturación intermedio.

Los componentes mayoritarios de la fracción esteroides de *H. stellata* son ergosterol y zimosterol en las esporas; con la germinación desaparece el zimosterol. El análisis por cromatografía en fase gaseosa de la fracción 4-monometil esteroides de los lípidos ligados indica la posible existencia de un esteroide no identificado en proporciones similares a aquellas en las que se encuentra el ergosterol; aunque tal sustancia no forma un digitónido, no puede ni mucho menos descartarse su naturaleza esteroídica, dado su comportamiento en los distintos sistemas, cromatográficos utilizados.

A la luz de los resultados obtenidos en estudios previos, es probable que se trate de un producto de descomposición parcial del ergosterol (BURGOS *et al.* 1973)

La identificación del 24-metilenolanosterol ofrece especial interés dado que se cree que el metilo en posición 24 del ergosterol, deriva por transmetilación de la denosilmetionina (ALEXANDER y SWENK 1958), inmediatamente después de la ciclación del escualeno para formar lanosterol. AKTAR, *et al.* 1966) (BARTON *et al* 1966).

RESUMEN

Se estudian los hidrocarburos y esteroides de los lípidos libres de esporas y micelio y de los lípidos ligados de esporas de *H. stellata*.

Tanto en los lípidos fácilmente extractibles como en los ligados dominan los hidrocarburos no saturados, y de ellos el principal componente es el escualeno. En la fracción de los hidrocarburos saturados se halla presente toda la serie de número par de átomos de carbono; desde el C₁₆ hasta el C₃₀.

El principal constituyente esteroídico de *H. stellata* es el ergosterol. También aparece zimosterol en cantidad considerable en las esporas. Otros esteroides detectados en menor cuantía son el 4-metilzimosterol, presente tanto en esporas como en micelio, y el 24-metileno-lanosterol, sólo en micelio de 24 y 48 horas.

RESUME

On étudie les hydrocarbures et les stéroïdes des lipides exempts de spores et de mycélium, et des lipides liés à des spores de *H. stellata*.

Les hydrocarbures non saturés prédominent dans les lipides facilement extractibles aussi bien que dans les lipides liés, le squalène étant leur principal composant. Dans la fraction des hydrocarbures saturés se trouve toute la série de nombres pairs d'atomes de Carbone: depuis le C₁₆ jusqu'au C₃₀.

Le principal constituant stéroïdique de *H. stellata* est l'ergostérol. Il y a aussi une grande quantité de zymostérol dans les spores. D'autres stéroïdes détectés en quantités plus petites sont: le 4-méthylzymostérol, qui se trouve dans les spores aussi bien que dans le mycélium, et le méthylénolanostérol, qui se trouve seulement dans du mycélium de 24 à 28 heures d'âge.

SUMMARY

A study has been carried out on hydrocarbons and steroids contained into spore—and mycelium—free lipids and into lipids ligated to *H. stellata* spores.

Non-saturated hydrocarbons, whose main component is squalene, prevail on easily extractable lipids as well as on ligated lipids. A complete series of pairs numbers of carbon atoms, from C₁₆ to C₃₀, has been found to be present in the fraction of saturated hydrocarbons.

The main steroid component of *H. stellata* is ergosterol. Zymosterol is also present in a considerable quantity in *H. stellata* spores. Other steroids which have been detected are: 4-methylzymosterol, present in spores as well as in mycelium, and 24-methylenolanosterol, present only in mycelium of 24 to 48 h old.

BIBLIOGRAFIA

- AKTAR, M., PARVEZ, A., HUNT, P. E. (1966): *Biochem. J.* **100**, 38 c.
ALEXANDER, G. S. y SWENK, E. (1958): *J. Biol. Che.* **232**, 611.
ANALYTICAL METHODS COMMITTEE (1959): *Analyst*. **84**, 356.
BARTON, D. R., HARRISON, D. y HOSS, G. P. (1966): *Chem. Comm.* **17**, 595.
BIRD, C. W., LYNCH, J. M., PIET, F. S. y REID, W. W. (1971): *Nature*, **230**, 473.
BURGOS, J., SALA, F. y LÓPEZ, A. (1973): *Phytochem.* **12**, 1.201-1.206.
BURTON, R. B., ZAFFARONI, A. y KEUTMANN, E. H. (1951): *J. Biol. Chem.* **188**, 736.
GOAD, L. J. y GOODWIN, T. W. (1966): *Biochem. J.* **99**, 735.
GOUNSTON, G., GOAD, L. S. y GOODWIN, T. W. (1967): *Biochem. J.* **102**, 156.
JACKSON, L. L. y FREAR, S. (1968): *Phytochem.* **7**, 651-654.
KUSHAWA, S. C., PUCH, E. L., KRAMER, J. K. y KATES, H. (1972): *Biochim Biophys. Acta* **282**, 85-92.
LÓPEZ, A: Tesis doctoral, Universidad de Oviedo.
MERDINGER, E. y DEVINE, E. M. (1965): *J. of Bacteriol.* **89**, 1.488.
METZ, R. (1961): *Naturwiss.* **48**, 569.
MOORE, P. R. y BAUMANN, C. A. (1952): *J. Biol. Chem.* **195**, 615-621.
SALA, F. y BURGOS, J. (1972): *Applied Microbiol.* **24**, 3, 504.
SALA, F. y BURGOS, J. (1973): *Arch. Mikrobiol.* **88**, 11-24.
WALTON, M. J. y PENNOK, J. F. (1972): *Biochem. J.* **127**, 3.