



Composición química del hongo basidiomiceto cubano, *Trametes versicolor*

Chemical composition from Cuban basidiomycete *Trametes versicolor*

Vivian Leliebre-Lara* y Clara Nogueiras Lima

RESUMEN

*
Autor para correspondencia:
leliebre@fq.uh.cu

Se realizó un estudio de la composición química del hongo basidiomiceto cubano, *Trametes versicolor* (L.) Lloyd. Mediante el empleo de métodos extractivos y columnas cromatográficas se aislaron doce metabolitos fúngicos entre los principales constituyentes de este hongo. Además, otros 51 compuestos se identificaron mediante sus espectros de masas; empleando cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Esta investigación constituye el primer estudio de composición química de hongos basidiomicetos, que se realiza en Cuba.

Centro de Estudio de Productos
Naturales, Facultad de Química,
Universidad de La Habana, Zapata
y G, La Habana 10400, Cuba.

Palabras clave: esteroides, hongos basidiomicetos, triterpenos

ABSTRACT

Recibido: 08/08/2018
Aceptado: 21/12/2018

In this work, we report the chemical composition of Cuban basidiomycete *Trametes versicolor* (L.) Lloyd. Through extractive methods and chromatographic columns twelve fungal metabolites were isolated as main components from this mushroom; amount other 51 compounds which were identified by their mass spectra using Gas Chromatography coupled to a Mass Spectrometry (GC-MS). This research represents the first Chemotaxonomic study from basidiomycete mushroom done in Cuba.

Key words: basidiomycete mushrooms, steroids, triterpenes

INTRODUCCIÓN

Se conocen múltiples y complejas interacciones químicas entre plantas como alelopatía (Chou, 1989), entre estas y animales: toxinas, hormonas, etc. (Harborne, 1982) y también entre estos últimos: feromonas, venenos, etc. (Barbier, 1976). Las sustancias responsables de estas funciones son complejas estructuras químicas conocidas como metabolitos secundarios. La biosíntesis de estos productos naturales se desarrolla como una respuesta defensiva en la lucha adaptativa de las especies.

En este contexto, los hongos constituyen atractivos objetos de estudio debido a la diversidad de sustancias que de estos se derivan, las cuales les confieren propiedades como biorremediadores y monitores de la contaminación (Jaikaran *et al.*, 2017). Además de que constituyen una fuente inagotable de compuestos biológicamente activos con las más variadas acciones farmacológicas (Lindequist *et al.*, 2005; Jayachandran *et al.*, 2017).

Trametes versicolor (L.) Lloyd es uno de los hongos basidiomicetos más conocidos, apreciados y utilizados tanto en medicina tradicional como en prácticas clínicas modernas principalmente en países asiáticos. Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en toda la geografía

global. Generalmente crece sobre árboles débiles o muertos y troncos secos. En Cuba *T. versicolor*, también conocido como cola de pavo, se localiza a través de todo el archipiélago y su población se encuentra difundida en zonas que constituyen reservas de la biosfera, como son las pertenecientes a la Cordillera de la Sierra Maestra y también en el Jardín Botánico Nacional (Cabarro *et al.*, 2008). Igualmente aparecen en parques y jardines formando parte del proceso de descomposición de la materia orgánica muerta.

Trametes versicolor debe su notoriedad a la presencia del polisacaropéptido Krestín (PSK), un potente agente antitumoral aislado por primera vez en Japón, a finales del año 1960, en el extracto acuoso y caliente de los cuerpos fructíferos de este hongo (Tsukagoshi *et al.*, 1984; Cui y Chisti, 2003). El PSK, es responsable de un potente efecto inmunomodulador que lo hace idóneo para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (Mizutani y Yoshid, 1991; Hayakawa *et al.*, 1993; Ooi y Liu, 2000; Kanazawa *et al.*, 2005). La relevancia de este extracto acuoso, hizo que disminuyera el interés en el estudio de la composición química de los extractos de mediana y baja polaridad.

Hace apenas unos años se publicaron los primeros datos acerca de la composición química de los cuerpos

fructíferos de *T. versicolor*, de procedencia iraní (Habibi *et al.*, 2015). Estudios anteriores solo hacen referencia a la composición de las fermentaciones de sus extractos (Valisolalao *et al.*, 1983). No obstante, se debe tener en cuenta que los hongos producen metabolitos secundarios a través de enzimas, como respuesta al daño externo. Factores bióticos como ataques de insectos, patógenos, etc., y abióticos como la radiación, la temperatura, el estrés hídrico y nutricional inducen cambios fisiológicos que alteran las vías metabólicas y en consecuencia los compuestos sintetizados (Olivoto *et al.*, 2017). Como consecuencia de ello, la composición química de estos organismos depende en gran medida del medio donde se desarrollan (Stadler y Sterner, 1998).

Es por ello, que el objetivo de esta investigación fue aislar e identificar los principales constituyentes químicos del *T. versicolor* cubano. Estos resultados constituirán un aporte al conocimiento de la composición química de este hongo.

MATERIALES Y METODOS

Materiales y Reactivos

En este trabajo se utilizaron los disolventes: *n*-hexano (*n*-hex), cloroformo (CHCl₃), diclorometano (CH₂Cl₂), acetato de etilo (EtOAc), etanol (EtOH), metanol (MeOH) y acetonitrilo (ACN); algunos de calidad puro para análisis (PA) provenientes de diferentes marcas registradas y otros de calidad comercial, previamente destilados. Como reveladores se utilizaron solución de vainillina, preparada al 1% de ácido perclórico al 70% (HClO₄) (v:v) y solución de *p*-anisaldehído/Ác. Acético/Ác. sulfúrico/etanol, (2,5:0,5:2,5:45).

Las columnas cromatográficas se prepararon tanto por vía seca como húmeda. Se emplearon como fases estacionarias, gel de sílice de 70-230 mesh, 35 -70 mesh y gel de sílice 60 (0.04-0.01mm). Las muestras fueron adsorbidas en gel de sílice 60 (0.063-0.2 mm); todas provenientes de la firma (Merck®). Las columnas secas se montaron aplicando vacío para garantizar la uniformidad de la fase estacionaria. La mezcla a fraccionar fue aplicada en el lecho de la columna, adsorbida en gel de sílice en algunas ocasiones y en otras el producto fue aplicado disuelto sobre el lecho. Las columnas húmedas se montaron con gel suspendido en disolvente, con posterior compactación por presión o golpes mecánicos, colocando la muestra a fraccionar disuelta en la mínima cantidad de disolvente o adsorbida en gel de sílice gruesa, de 0.2 - 0.5 mm de diámetro, según el caso. Luego se eluye con la mezcla de disolventes apropiada, generalmente con gradiente de polaridad creciente.

En la preparación de la columna de exclusión por tamaño, se mezcló el Sephadex LH-20 con metanol y se dejó en reposo durante 24 h. A la columna cromatográfica abierta, provista de un algodón en su extremo inferior, se le añadió el gel hinchado de metanol. El metanol se hace descender hasta que se compacte el Sephadex, sin dejar secar la columna. Luego se añadió la mezcla de disolventes a utilizar *n*-hexano: cloroformo: metanol en proporción (2:1:1), hasta reemplazar el metanol. Seguidamente se añadió la muestra problema, disuelta en la mínima cantidad de la mezcla de disolventes, en el lecho de la columna. Finalmente, se eluye la columna con la mezcla de disolventes antes mencionada. Las fracciones son cromatografiadas mediante capa delgada (CCD).

Equipos utilizados

Los compuestos volátiles fueron detectados mediante un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A equipado con detectores selectivos de masa series 7683B y 7975C. Se empleó la columna HP5-MS; Agilent Technologies #19091S-433: 30 m × 250 μm, con un espesor de capa de 0,25 μm. El gradiente de temperatura fue de 2 min 40°C; 40–10°C, 2°C/min; 100–300°C, 10°C/min. Inyección modo dividido (1:20); la temperatura del inyector fue 240°C; la fase móvil gas helio (0,9 mL/min) e interface temperaturas 280°C. Las muestras sin derivatizar fueron disueltas en *n*-hexano (1mg/mL); para la derivatización se empleó 50 μg del extracto seco disueltos en 50 μL de trimetilxilano, Sigma-SilA (Sigma-Aldrich, Viena, Austria, Cat. No. 1391).

Los extractos y fracciones, fueron concentrados a presión reducida en evaporador rotatorio con baño termostático marca Büchi de Suiza, en un rango de temperaturas entre 0 -50°C. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear protónica y de Carbono 13 (RMN-¹H y ¹³C) mono y bidimensionales fueron obtenidos en varios equipos: de ellos dos espectrómetros RMN Varian VXR-Unity a 400 y 600 MHz y un Brüker BioSpin GmbH de 400 MHz y de 600 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Las temperaturas de fusión fueron determinadas en un equipo Electrothermal 9100.

Material fúngico, obtención de extractos

Los cuerpos fructíferos del hongo basidiomiceto *T. versicolor* (TV), se recolectaron en febrero de 2009, del tronco muerto de un árbol de *Citrus reticulata* (mandarina) ubicado en el Parque Ecológico del Pico Real del Turquino en la Sierra Maestra, Santiago de Cuba. Del material utilizado se conservó una muestra en el herbario del Jardín Botánico Nacional con número de identificación: 9805. La identificación del material fúngico se realizó por el M.Sc. Jorge Luis Ortiz Medina, perteneciente a la

Subdirección de Micología del Instituto de Ecología y Sistemática de La Habana, Cuba. Esta identificación se realizó de acuerdo con el método descrito por Decock y Herrera, (2000). La recolección del material fúngico se realizó siguiendo las recomendaciones de Stamets y Shilton (1983).

Se emplearon 240 g de cuerpos fructíferos del hongo *T. versicolor*, para la obtención de los extractos de gradiente de polaridad, estos se cortaron en pedazos, se secaron en estufa a 30°C durante 8 h. El material fúngico seco, se trituró en un molino de cuchillas con tamiz de 5 mm y se maceró con 2 L de disolvente (*n*-hexano, (CH₂Cl₂), (EtOAc) y EtOH) durante 1 semana cada vez, con agitación ocasional. La mezcla se filtró a presión reducida, la fase orgánica se evaporó hasta sequedad, para obtener los crudos correspondientes (*n*-hexano (820 mg), CH₂Cl₂(970 mg), EtOAc (272 mg) y EtOH (3136 mg).

Fraccionamiento de extractos

El crudo de *n*-hexano se fraccionó mediante cromatografía de exclusión por tamaño, con Sephadex LH-20 como fase estacionaria y la mezcla *n*-hex/CHCl₃/MeOH (2:1:1) como fase móvil. Se colectaron 30 fracciones, que fueron agrupadas de acuerdo con el perfil cromatográfico en TV- *n*-hex (I), 90 mg; TV- *n*-hex (II) 310 mg y TV- *n*-hex (III) 418 mg. La fracción volátil TV- *n*-hex (I), (90 mg); de apariencia aceitosa se sometió a análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Las fracciones II y III de *n*-hexano se sometieron a sucesivas columnas cromatográficas de gel de sílice 60. Ambas fueron eluidas con mezclas de disolventes de polaridad creciente *n*-hex/EtOAc de (100:0 - 80:20) y *n*-hex/EtOAc de (100:0 - 65:35) respectivamente; que permitieron la obtención de los compuestos puros: **1** (12,3 mg), **2** (9,1 mg), **3** (9,0 mg), **4** (6,7 mg) y **5** (7,9 mg). El extracto crudo de CH₂Cl₂, se eluyó con la mezcla de polaridad creciente CH₂Cl₂/MeOH, desde (100:0 - 90:10), mediante una columna cromatográfica de gel de sílice 60. Dicha elusión permitió la obtención de 72 eluatos que fueron agrupados de acuerdo con la similitud de su composición en 8 fracciones, de las cuales se aislaron también los compuestos **1**, **3**, **5** además del compuesto **6** (5,6 mg). El crudo de EtOAc, se fraccionó mediante columna cromatográfica de gel de sílice (0.063-0.200 mm) y como fase móvil se empleó *n*-hex/CH₂Cl₂/EtOAc de (90:10:0 - 0:70:30). La muestra se añadió a la columna disuelta en CH₂Cl₂. Se colectaron diez fracciones, de una de estas, se aisló el compuesto **7** (6,0 mg). El crudo de etanol se obtuvo mediante varias maceraciones: con

agitación ocasional, con agitación magnética y con agitación magnética y calentamiento a reflujo; que constituyeron las fracciones I, II y III de etanol respectivamente. Los crudos I y II se fraccionaron a través de columnas cromatográficas de gel de sílice 60. Ambas se eluyeron con mezclas de disolventes de polaridad creciente *n*-hex/CH₂Cl₂/EtOAc desde (100:0:0) hasta (0:20:80), para el crudo I, lo que permitió aislar el compuesto **8** (5,7 mg). Para el crudo II se empleó la mezcla de *n*-hex/EtOAc/Acetona desde (80:20:0) hasta (0:10:90); de donde se obtuvo el compuesto **9** (5,6 mg). El extracto crudo III, se fraccionó en columna RP-18, y se eluyó con mezclas de polaridad decreciente desde H₂O/MeOH (1:0 - 0:1), MeOH/EtOAc (1:0 - 0:1) hasta EtOAc/CH₂Cl₂ (1:0 - 0:1); para dar lugar a 10 fracciones (A-J). A la fracción B (12,6 mg) se le añadió acetona y se enfrió en baño de hielo, lo que permitió obtener el compuesto **10** (2,4 mg). La fracción D se extrajo con la mezcla *n*-hex/MeOH de donde se obtuvo el compuesto **11** (8,3 mg) en la fase de metanol. Las fracciones semisólidas G y H se mezclaron, la mezcla se recristalizó con *n*-hexano, de donde se obtuvo una sola mancha en la CCD que correspondió al compuesto **12** (5,1 mg).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de la fracción volátil TV- *n*-hex (I) mediante CG-EM; permitió detectar ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, aldehídos, hidrocarburos y algunos esteroides como componentes mayoritarios. (Tabla 1). Estos compuestos fueron identificados por comparación de sus espectros de masas, con los correspondientes, contenidos en la base de datos del equipo.

Los métodos cromatográficos utilizados permitieron el aislamiento de doce metabolitos secundarios. Las estructuras químicas de los compuestos aislados se muestran en la Figura 1. Los datos espectroscópicos de RMN ¹H (ppm), se describen a continuación y los correspondientes a RMN de ¹³C (ppm) se muestran en la Tabla 2.

Compuesto 1: 7, 22-ergostadien-3β-ol (CDCl₃, 600 MHz)
Masa 12,3 mg, **Tf** = 168-170 °C, **Rf** = 0,6, **SD:** *n*-hex/EtOAc (1:1), **FG** = C₂₈H₄₆O
RMN ¹H (d, ppm): (δ, ppm) 0,82 (s, CH₃-18), 0,82 (d, J = 6,7 Hz, CH₃-26), 0,84 (d, J = 6,6 Hz, CH₃-27), 0,89 (s, H-19), 0,92 (d, 7,0 Hz, CH₃-28), 1,07 (d, J = 6,6 Hz, CH₃-21), 3,6 (m, CH-3), 5,19 (m, CH-7), 5,15 (m, 2H, CH-22, CH -23). **ESI-MS:** m/z 398.
Compuesto 2: 5, 7, 22-ergostatrien-3β-ol (Ergosterol) (CDCl₃, 600MHz)

Tabla 1. Compuestos volátiles presentes en el extracto (I) de *n*-hexano.**Table 1.** Volatile constituents from *n*-hexan (I) extract.

No	Compuesto	Tr (min)	% de Coinc	No	Compuesto	Tr (min)	% de Coinc
1	Pentadecanal	15.50	95	27	Hexadecanoato de 2-metilpropilo	19.86	98
2	Tetradecanal	15.60	95	28	Laureato de Isobutilo	19.92	97
3	Tetradecanoato de metilo	15.71	97	29	Ácido octadecanoico	19.99	98
4	9-metil tetradecanoato de metilo	16.39	98	30	Octadecanoato de etilo	20.29	97
5	Ácido tetradecanoico	16.08	96	31	1-octadeceno	20.42	98
6	Pentadecanoato de metilo	16.78	97	32	Ciclopropil-2-hexil decanoato- de metilo.	20.48	99
7	9-decen-1-ol			33	Eicosanoato de metilo	21.44	98
8	Ácido (S)12-metiltetradecanoico	16.83	95	34	9,12-octadecadienoato (Z,Z) de metilo	21.56	99
9	1-hexadecino	16.82	96	35	9-octadecenamida	21.73	98
10	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	16.96	95	36	9,12-octadecadienoato (E,E) de metilo	21.81	99
11	Pentadecanoato de etilo	16.98	95	37	Ácido hexanodioico, octil éster	22.06	95
12	Ácido pentadecanoico	17.10	98	38	Ácido hexanodioico bis-(2-etilhexil) éster	22.08*	96
13	Ácido 1,2-bencenodicarboxílico, bis (2-metilpropil) éster	17.13	98	39	Heneicosanoato de metilo	22.27	95
14	14-metil pentadecanoato de metilo	17.24	95	40	Docosanoato de metilo	23.07	98
15	7.9-ditertbutil-1-oxaspiro-(4.5)-deca-6.9-dien-2,8-diona	17.42*	96	41	Ácido 1,2-bencenodicarboxílico mono (2-etilhexil) éster	23.24	95
16	Hexadecanoato de metilo	17.80	99	42	Ácido 1,2-bencenodicarboxílico	23.26	95
17	Tetradecanoato de isobutilo	17.83	99	43	Ácido 1,2-bencenodicarboxílico, diisooctil éster	23.32	95
18	Ácido hexadecanoico	18.14	96	44	Tricosanoato de metilo	23.83	96
19	Hexadecanoato de etilo	18.47	99	45	Tetracosanoato de metilo	24.55	98
20	15-metilhexadecanoato de metilo	18.75	98	46	Pentacosanoato de metilo	25.26	99
21	2-hidroxihexadecanoato de metilo	18.95	98	47	Bencenamina-4-octil-N-(4-octilfenil)	26.12	99
22	(Z) 9-octadecenoato de metilo	19.47	99	48	7.22-ergostadienona	28.31	99
23	11-octadecenoato de metilo	19.48	99	49	3 β -hidroxi-5 α -ergosta-7,22-dieno	28.85*	98
24	(E) 9-octadecenoato de metilo	19.53	99	50	3 β -acetato-5 α -ergosta-7,22-dieno	29.17*	95
25	Octadecanoato de metilo	19.72	99	51	4-estigmasten-3-ona	30.2*	98
26	(Z)-2,3-dihidroxi-9-octadecenoato de propilo	19.81	95				

*También derivatizado, %Coinc, = % de coincidencia, Tr = Tiempo de retención

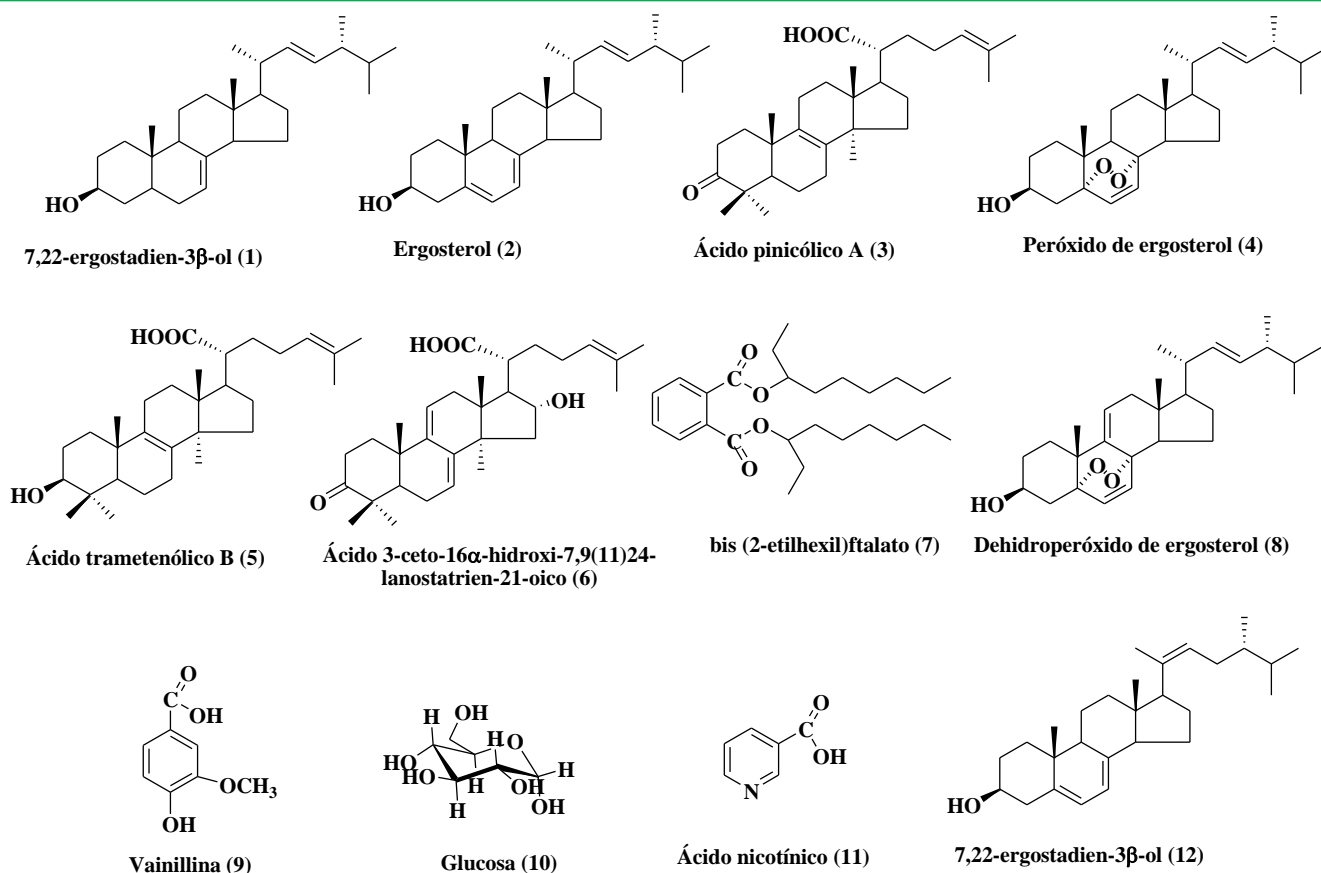


Figura 1. Estructura química de los metabolitos aislados.

Figure 1. Chemical structure of the isolated metabolites

Masa 9.1 mg, **Tf** = 156-158 °C, **Rf** = 0,64, **SD:** *n*-hex/EtOAc (1:1), **FG** = C₂₈H₄₄O

RMN ¹H (d, ppm): 5,38(*d*, H-7); 5,57 (*d*, *J*= 5,7, 2,4Hz, H-6); 5,17 (*m*, H-22); 5,20 (*m*, H-23); 3,63 (*m*_{ancho}, H-3b); 1,03 (*d*, *J*=6,5 Hz, CH₃-21); 0,92 (*d*, *J*=6,5 Hz, CH₃-28); 0,82 (*dd*, *J*=7,0 Hz, CH₃-26); 0,84 (*dd*, *J*=7,3 Hz, CH₃-27); 0,94 (*s*, CH₃-19); 0,62 (*s*, CH₃-18). **ESI-MS:** *m/z* 396.

Compuesto 3: Ácido 3-ceto-8,24-lanostadien-21-oico. (Ácido pinicólico A) (CDCl₃, 400 MHz)

Masa 9,0 mg **Tf** = 197-201 °C, **Rf** = 0,45, **SD:** *n*-hex/EtOAc (2.5:2), **FG** = C₃₀H₄₆O₃.

RMN ¹H (d, ppm): 2,45 (*q*, H-17); 1,09 (*s*, H-18); 1,10 (*s*, 6H, H-19 y H-30); 2,31 (*m*, H-20); 1,79-1,98 (*m*, 2H, H-22); 2,30 -2,39 (*m*, 2H, H-23); 5,1 (*t*, *J*=7,1Hz, H-24); 1,58 (*s*, H-26); 1,67 (*s*, H-27); 1,26 (*s*, H-28); 1,08 (*s*, H-29). **ESI-MS:** *m/z* 454,3.

Compuesto 4: (22E) -5 α ,8 α -epidioxiergosta-6,22-dien-3 β -ol. (Peróxido de ergosterol) (CDCl₃, 400 MHz)

Masa 6,7 mg, **Tf** = 179-182 °C, **Rf** = 0,4, **SD:** *n*-hex/EtOAc (1:1), **FG** = C₂₈H₄₄O₃

RMN ¹H (d, ppm): 0,82 (*s*, CH₃-18), 0,82 (*d*, *J* = 6,6 Hz, CH₃-26), 0,84 (*d*, *J* = 6,6 Hz, CH₃-27), 0,89 (*s*, H-19), 0,92 (*d*, *J* = 7,0 Hz, CH₃-28), 1,05 (*d*, *J* = 6,6 Hz, CH₃-21), 3,97 (*m*, CH-3), 5,15 (*dd*, *J*₁ = 15,0 Hz, *J*₂ = 8,4 Hz, CH-23),

5,20 (*dd*, *J*₁ = 15,0 Hz, *J*₂ = 7,8 Hz, CH-22), 6,55 (*d*, *J* = 8,4 Hz, CH-7), 6,26 (*d*, *J* = 8,4 Hz, CH-6). **ESI-MS:** *m/z* 428,3.

Compuesto 5: Ácido 3 β -hidroxi-8,24-lanostadien-21-oico (Ácido trametenólico B) (Py-d₅, 600 MHz)

Masa 7,9 mg **Tf** = 258-260 °C, **Rf** = 0,3, **SD:** *n*-hex/EtOAc (2.5 : 2), **FG** = C₃₀H₄₈O₃

RMN ¹H (d, ppm): 1,09 (*s*, CH₃-18), 1,26 (*s*, CH₃-28), 1,02 (*s*, CH₃-19), 1,03 (*s*, CH₃-30), 1,08 (*s*, CH₃-29), 1,63 (*s*, CH₃-26), 1,68 (*s*, CH₃-27), 2,65 (*dd*, *J*₁ = 11,1, *J*₂ = 8,2 Hz, H-20), 3,45 (*t*, *J*₁ = 8,7 Hz, H-3a), 5,32 (*t*, *J* = 7,1 Hz, H-24). **ESI-MS +:** *m/z* 457,3 [M+H]⁺; 439,4 [M+H-H₂O]⁺ 421,4: [M+H-2H₂O]⁺

Compuesto 6: Ácido 3-ceto-16 α -hidroxi-7,9(11),24-lanostatrien-21-oico.

Masa 5,6 mg, **Tf** = mezcla, **Rf** = 0,3; **SD:** *n*-hex/EtOAc (2.5: 2), **FG** = C₃₀H₄₃O₄

RMN ¹H (d, ppm) (CDCl₃, 600 MHz): 0,65 (*s*, CH₃-18), 1,07 (*s*, CH₃-28), 1,21 (*s*, CH₃-19), 1,08 (*s*, CH₃-30), 1,14 (*s*, CH₃-29), 1,74 (*s*, CH₃-26), 1,64 (*s*, CH₃-27), 2,35 (*m*, H-20), 5,52 (*d*, *J* = 5,6 Hz, H-11), 5,20 (*t*, H-24) 5,57 (*d*, *J* = 6,1 Hz, H-7). **ESI-MS:** *m/z* 469,42 [M+H].

Tabla 2. Corrimientos químicos de ^{13}C (ppm) de los compuestos aislados del hongo *Trametes versicolor*.**Table 2.** ^{13}C chemical shifts of the isolated compounds from *Trametes versicolor* mushroom.

C	1 CHCl ₃	2 CHCl ₃	3 CHCl ₃	4 CHCl ₃	5 Py	6 CHCl ₃	7 CHCl ₃	8 CHCl ₃	9 CHCl ₃	10 D ₂ O	11 Py	12 CHCl ₃
1	37.97	38.54	36.30	34.66	36.49	36.10	131.03	32.50	127.50	93.36	151.47	38.54
2	31.46	32.17	34.80	30.08	29.08	34.40	128.96	30.60	108.77	71.20	129.40	32.17
3	71.06	70.63	217.80	66.46	78.38	217.30	132.63	66.30	147.15	72.60	137.61	71.21
4	37.12	40.97	47.30	36.89	39.90	46.90	167.90	36.10	151.67	71.09	123.75	40.80
5	49.43	139.95	51.40	79.41	51.28	50.50	68.32	78.40	114.37	69.70	153.21	139.90
6	21.53	119.75	19.50	135.39	19.09	23.20	38.90	135.30	129.90	60.60	167.80	121.00
7	117.45	116.45	26.40	130.72	27.19	120.10	30.53	132.10	190.87			117.30
8	139.55	141.52	133.40	82.14	134.66	142.10	29.09	82.70	56.14			141.00
9	40.25	46.42	135.20	51.06	135.54	144.20	23.14	142.60				46.40
10	34.21	37.19	37.10	36.94	37.77	37.00	14.20	37.90				36.20
11	29.70	21.28	21.40	20.61	21.64	116.70	23.92	119.80				21.30
12	39.43	39.25	30.60	39.31	29.78	35.30	11.12	41.20				39.60
13	43.29	43.00	44.40	44.54	45.28	43.80		43.60				42.30
14	55.10	54.72	49.80	51.65	50.22	48.30		51.10				54.60
15	22.90	23.15	29.80	23.38	31.25	43.30		20.80				23.10
16	28.63	28.44	27.20	28.63	27.87	75.00		28.60				28.30
17	55.94	55.91	47.70	56.17	49.40	56.20		56.50				54.10
18	12.08	12.21	16.20	12.85	16.77	16.90		12.85				12.210
19	13.03	16.44	19.50	19.62	19.79	21.80		18.20				18.40
20	40.50	40.57	47.50	39.71	48.12	46.90		39.90				132.10
21	21.10	20.11	182.00	20.86	179.00	177.20		20.70				24.00
22	135.66	135.73	31.50	135.18	33.68	31.80		135.40				136.40
23	131.87	132.14	25.80	132.28	27.12	26.00		132.50				26.70
24	42.80	42.98	123.70	42.75	125.26	124.20		42.75				42.80
25	33.10	33.25	132.50	33.04	132.08	131.10		33.10				33.50
26	17.58	17.76	17.80	19.62	18.09	25.60		19.62				17.30
27	19.63	19.80	26.10	19.93	26.14	17.60		19.93				19.60
28	19.94	21.26	21.10	17.54	28.99	25.40		17.54				21.30
29			26.40		16.73	22.10						
30			24.50		24.89	25.80						

Compuesto 7: bis(2-etilhexil)ftalato (CDCl₃, 600 MHz),

Masa 6.0 mg, (semisólido) **Rf** = 0,81, **SD:** *n*-hex/EtOAc (1:1), **FG** = C₂₄H₃₈O₄

RMN ¹H (d, ppm): 7,7 (*q*, 2H, CH), 7,5 (*q*, 2H, CH), 4,22 (*m*, 4H, CH₂), 1,67 (*m*, 2H, CH), 0,89 (*t*, *J* = 7,2, 6H, CH₃), 0,92 (*t*, *J* = 7,2, 6H, CH₃), 1,29 – 1,36 (*m*, 16H, 8CH₂)

ESI-MS: *m/z* 390,3.

Compuesto 8: (22E)-5 α ,8 α -Epidioxiergosta-6,9(11)22-trien-3 β -ol (CDCl₃, 600MHz)

Masa 5,7 mg, **Tf** (mezcla), **Rf** = 0,54, **SD:** *n*-hex/EtOAc (2 : 1,5), **FG** = C₂₈H₄₂O₃

RMN ¹H (d, ppm): 0,74 (*s*, CH₃-18), 0,82 (*d*, *J* = 6,6 Hz, CH₃-26), 0,84 (*d*, *J* = 6,6 Hz, CH₃-27), 1,09 (*s*, H-19), 0,92 (*d*, *J* = 7,0 Hz, CH₃-28), 1,0 (*d*, *J* = 6,6 Hz, CH₃-21), 3,97 (*m*, CH-3), 5,15 (*dd*, *J*₁ = 15,0 Hz, *J*₂ = 8,4 Hz, CH-23), 5,20 (*dd*, *J*₁ = 15,0 Hz, *J*₂ = 7,8 Hz, CH-22), 6,6 (*d*, *J* = 8,4 Hz, CH-7), 6,3 (*d*, *J* = 8,4 Hz, CH-6), 5,43 (*dd*, *J*₁ = 6,0 Hz, *J*₂ = 2,1 Hz, CH-11) **ESI-MS:** *m/z* 426,3.

Compuesto 9: 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (Vainillina) (CDCl₃)

Masa 5,6 mg, **Tf** = 78,9 – 80,1 °C, **Rf** = 0,79, **SD:** EtOAc/MeOH (3: 0.01), **FG** = C₈H₈O₃

RMN ¹H (d, ppm): 3,97 (*s*, OCH₃), 7,05 (*d*, *J* = 9 Hz, H-5), 7,41 (*d*, *J* = 1,8 Hz, H-6), 7,42 (*s*, H-2), 9,83 (*s*, CHO)

ESI-MS: *m/z* 152,05.

Compuesto 10: D-glucosa (D₂O, 600MHz)

Masa 2,4 mg, **Tf:** (semisólido) **Rf** = 0,63, **SD:** Acetona/MeOH/Ác. fórmico (2:4:0.05), **FG** = C₆H₁₂O₆

RMN ¹H (d, ppm): 5,19 (*d*, *J* = 3,6 Hz, 1H), 3,81 (*d*, *J* = 1,8 Hz, 1H), 3,82 (*d*, *J* = 2,4 Hz, 1H), 3,72 (*dd*, *J* = 5,4 y 12 Hz 1H), 3,61 (*dd*, *J* = 3,6 y 10,2 Hz, 1H), 3,40 (*t*, *J* = 10,2 Hz 1H), **ESI-MS:** *m/z* 180,1.

Compuesto 11: Ácido nicotínico (Py-d₅, 600MHz)

Masa 8,3 mg, **Tf** 223-224 °C, **Rf** = 0,3, **SD:** EtOAc /MeOH (3:2), **FG** = C₆H₅NO₂

RMN ¹H (d, ppm): 9,72 (*s*, H-1), 8,88 (*dd*, *J* = 1,8 Hz, H-5), 8,54 (*dt*, *J* = 1,8 Hz, H-3), 7,4 (*q*, 7,6 y 4,8 H-4),

ESI-MS: *m/z* 123,0.

Compuesto 12: 5, 7,20(22)-ergostatrien-3 β -ol+ Ergosterol

Masa 4,1 mg, **Tf** (mezcla), **Rf** = 0,54 (mezcla), **SD:** *n*-hex/EtOAc (2:1.5), **FG** = C₂₈H₄₂O

RMN ¹H (d, ppm) (CDCl₃, 600 MHz): 5,40 (*d*, *J* = 4,8, H-7); 5,54 (*d*, *J* = 4,8, H-6); 5,15 (*m*, H-22) 2.21, 2.34 (2 H₂-23); 3,61 (*m*_{ancho}, H-3b); 1,54 (*s*, CH₃-21); 0,92 (*d*, *J* = 6,5 Hz, CH₃-28); 0,87 (*d*, *J* = 7,0 Hz, CH₃-26); 0,84 (*d*, *J* = 7,3 Hz, CH₃-27); 0,95 (*s*, CH₃-19); 0,68 (*s*, CH₃-18).

ESI-MS: *m/z* 396,3.

Los hongos basidiomicetos presentan una amplia gama de compuestos esteroideos dentro de sus constituyentes. Los esteroides específicamente, son sustancias esenciales para la correcta estructura y funcionamiento de la membrana celular de los organismos Eucariotas. Cada

reino viviente posee su propia forma de biosíntesis de esteroides, los hongos la realizan a partir del ergosterol, **2** (Czub y Baginski, 2006). Por ello, se encuentran ampliamente distribuidos en este reino. De este compuesto se han descrito efectos antitumorales en ratones y en cultivos celulares (Takaku *et al.*, 2001) y se ha descrito como potencial agente anticancerígeno frente al cáncer de mamas (Kikuchi *et al.*, 2017). El 7,22-ergostadien-3 β -ol, **1** se aisló del hongo *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat, entre otros hongos y ha mostrado ser ligeramente activo frente varios microorganismos Gram positivos y Gram negativos (Ramos-Ligonio *et al.*, 2012).

Por otra parte, el ácido pinicólico A, **3** ha sido aislado de los hongos *Ganoderma lucidum* (Fr.) Rick y *Ganoderma tsugae* (var.) jannieae. Esta es la primera comunicación de su aislamiento del hongo *T. versicolor*. Para este compuesto se ha descrito un potente efecto inhibitorio de la producción de óxido nítrico (NO) en procesos inflamatorios. Esto le convierte en un excelente candidato en el tratamiento y prevención de enfermedades inflamatorias periféricas y centrales; asociadas con el incremento de la formación del anión superoxidasa y el exceso de acumulación de NO en células inflamatorias (Ko *et al.*, 2008). De la resina del tronco de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) también se aisló este triterpeno y mostró actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Malca-García *et al.*, 2017).

El peróxido de ergosterol **4**, ha sido aislado de una amplia variedad de hongos, levaduras y líquenes (Kahols *et al.*, 1989; Millot *et al.*, 2007). Posee actividad inmunosupresora (Fujimoto *et al.*, 1994), antiviral (Lindequist *et al.*, 1989), antiinflamatoria, antitumoral (Nakanish *et al.*, 1998; Bok *et al.*, 2000), entre otras actividades evaluadas *in vitro*. También ha mostrado efecto tripanocida (Ramos-Ligonio *et al.*, 2012) en la forma intracelular del parásito *Tripanosoma cruzi*, con una (IC₅₀) 6.74 μ g/mL. Este ergostano, ha sido evaluado frente a nueve tipos de células cancerígenas incluyendo leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, colon, SNC, ovarios, renal, próstata y cáncer de mamas. Todo lo anterior, hace de esta sustancia una diana potencial para el desarrollo de fármacos. Además; constituye un promotor de efectos saludables en los hongos medicinales. El dehidroperóxido de ergosterol **8**, su homólogo estructural, también fue evaluado ante las células tumorales antes mencionadas. A pesar de que comparten el mismo sistema 5,8-epidioxo y difieren en un doble enlace adicional, en el caso del compuesto **8**; los resultados exhibidos fueron bien distintos. De lo anterior se infiere que, si la actividad mostrada es debida al enlace peróxido, también el resto de la molécula es importante pues la presencia de otro doble enlace disminuye considerablemente la actividad

(Njue *et al.*, 2018). Este esteroide se ha aislado de otros hongos basidiomicetos, generalmente asociado al compuesto **4** (Hybelbauerova *et al.* 2008).

El ácido trametenólico B **5** ha sido aislado de otros hongos superiores con anterioridad, no obstante; solamente se ha descrito su aislamiento del hongo *T. versicolor* cubano y mostró resultados prometedores como agente antileishmania (Leliebre-Lara *et al.*, 2016). Este triterpeno posee actividad citotóxica, antimicrobiana y anticancerígena; ensayadas *in vitro* (Horng-Huey *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Mediante estudios realizados por Mosa *et al.* (2011) se demostró que induce agregación plaquetaria.

El ácido 3-ceto-16 α -hidroxi-7,9(11), 24-lanostatrien-21-oico **6**, hasta el momento solo había sido aislado del hongo basidiomiceto *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. de Sri Lanka. Por tanto, es la primera vez que se aísla del hongo del hongo *T. versicolor*. En estudios realizados con éste y otros triterpenos, sobre citotoxicidad contra la línea celular de leucemia murina P388, fue el único compuesto ligeramente activo (111 mg/mL; 237 mM).

El bis(2-etilhexil)ftalato **7**, derivado del ácido ftálico, fue considerado por mucho tiempo como resultado del uso de utensilios plásticos en los laboratorios. Sin embargo, ha quedado demostrado que estas sustancias aparecen en los suelos, en las aguas de ríos, mares, en organismos marinos como las algas y las medusas; en plantas, microbios, hongos, etc. (Namikoshi *et al.*, 2006). Hasta nuestros días no ha podido ser probado si estos organismos producen ftalatos o si por el contrario la presencia de estos es debida a la acumulación, por absorción del medio ambiente. Por otra parte, en la literatura se ha descrito el aislamiento de otros ftalatos de plantas medicinales, de la corteza del árbol de guayaba y de helechos; que han mostrado excelente actividad antiviral contra los virus del dengue, influenza humana y Chikungunya (Velmurungan *et al.*, 2012; Uddin *et al.*, 2013). Este ftalato **7** se aisló recientemente del hongo *Aspergillus awamori* (var.) hominis Bat. & Maia y mostró actividad frente al hongo *Candida albicans* y ante la bacteria Gram positiva *Sarcina lutea*, además exhibió actividad citotóxica contra algunas líneas celulares de carcinoma (Lotfy *et al.*, 2018).

La vainillina **9**, ha sido identificada en el hongo basidiomiceto *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilát. Es conocido que compuestos fenólicos como este, contribuyen significativamente a las propiedades antioxidantes, tanto de los hongos medicinales como de los comestibles (Kim *et al.*, 2008).

El ácido nicotínico (niacina o vitamina B3) **11** ha sido considerado como potencial inhibidor terapéutico para el tratamiento y prevención de melanomas y desórdenes de hiperpigmentación de la piel (Gheibi *et al.*, 2015). Este ácido se ha aislado del hongo comestible *Pleurotus citrinopileatus* (Singer,) y es reconocido como ideal para el tratamiento de una amplia variedad de trastornos de los lípidos, incluida la hipertrigliceridemia. También reduce significativamente los niveles de colesterol (Hu *et al.*, 2006).

Entre los metabolitos más reconocidos de este hongo, se encuentran los polisacáridos y polisacaropéptidos de elevada acción antitumoral, antidiabetes, antioxidante, inmunoestimulante, entre otras. Por lo anterior es usual encontrar en la composición de estos hongos azúcares simples como el caso de la glucosa **10** (Friedman, 2016).

Hasta el momento, muy poco se conoce de las funciones de cada una de las sustancias sintetizadas por los hongos superiores. No obstante, se sabe que muchas son originadas como resultado de la defensa química frente a microorganismos, en la lucha por la supervivencia. Los humanos y los hongos comparten microbios antagonistas comunes tales como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, entre otros. Por ello, los metabolitos secundarios aislados de hongos, constituyen blanco de estudio, pues el hombre se beneficia de la producción natural de antibióticos para defenderse de la infección ocasionada en humanos por agentes patógenos similares.

CONCLUSIONES

De los extractos de mediana y baja polaridad del hongo *Trametes versicolor*, fue posible extraer doce metabolitos secundarios; tres de los cuales (ácido pinicólico A, ácido trametenólico B y ácido 3-ceto-16 α -hidroxi-7,9(11),24-lanostatrien-21-oico.); se aíslan por primera vez del hongo *T. versicolor*. Se identificaron 51 compuestos de la fracción volátil, mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), hecho que también aportó información acerca de la composición química de este hongo.

AGRADECIMIENTOS

El autor principal agradece la ayuda recibida, durante el trabajo de aislamiento e identificación de los metabolitos, de los Institutos de Farmacia y Farmacognosia de la Universidad Karl Franzens de Graz, Austria y el Instituto de Farmacia y Farmacognosia del Centro de Química y Biomedicina de la Universidad Leopold Franzens de Innsbruck (CCB) también de Austria.

LITERATURA CITADA

- Barbier M. 1976.** Introduction á L'Ecologie Chimique. Masson, Paris.
- Bok JW, Lerner L, Chilton J, Klingeman HG, Towers NGH. 2000.** Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry*. 51:891-898.
- Cabarroi Hernández M, Maldonado González SG y del Castillo Suárez L. 2008.** Hongos del Jardín Botánico Nacional de Cuba. I. Basidiomycota. *Revista del Jardín Botánico Nacional*. 29: 161-169.
- Chou CH. 1989.** Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable Agriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 18: 609-636.
- Cui J, Chisti Y. 2003.** Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances*. 21:109-22.
- Czub J, Baginski MJ. 2006.** Comparative molecular dynamics study of lipid membranes containing cholesterol and ergosterol. *Biophysical Journal*. 90: 2368-2382.
- Decock C, Herrera S. 2000.** Studies in *Perenniporia Navisporus ortizii*, a synonym of *Perenniporia martius*, and a note on *Navisporus* and *Perenniporia* in Cuba. *Cryptogamie Mycologie*. 21: 153-162.
- Dilip de Silva E, van der Sar SA, Lalith Santha RG, Wijesundera RLC, Cole ALJ, Blunt JL, Munro MHG. 2006.** Lanostane Triterpenoids from the Sri Lankan Basidiomycete *Ganoderma applanatum*. *Journal of Natural Products*. 69:1245-1248.
- Friedman M. 2016.** Mushroom Polysaccharides: Chemistry and Antiobesity, Antidiabetes, Anticancer, and Antibiotic Properties in Cells, Rodents, and Humans. *Foods*. 5(4). pii: E80. DOI: 10.3390/foods5040080.
- Fujimoto H, Nakayama Y, Yamazaki M. 1994.** Isolation and characterization of immunosuppressive components of three mushrooms, *Pisolithus tinctorius*, *Microporus flabelliformis* and *Lenzites betulina*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 42: 694-697.
- Habibi E, Sadat-Ebrahimi SE, Mousazadeh SA, y Amanzadeh Y. 2015.** Mycochemical Investigation of the Turkey Tail Medicinal Mushroom *Trametes versicolor* (Higher Basidiomycetes): A Potential Application of the Isolated Compounds in Documented Pharmacological Studies. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 17: 255-265.
- Harborne JB. 1982.** Introduction to ecological biochemistry. Academic Press, London.
- Gheibi N, Taherkhani N, Ahmadi A, Haghbeen K, Ilghari D. 2015.** Characterization of inhibitory effects of the potential therapeutic inhibitors, benzoic acid and pyridine derivatives, on the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 18: 122-129.
- Hayakawa K, Mitsuhashi N, Saito Y, Takahashi M, Katano S, Shiojima K, Furuta M, Niibe H. 1993.** Effect of krestin (PSK) as adjuvant treatment on the prognosis after radical radiotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Research*. 13:1815-20.
- Hong-Huey K, Chi-Feng H, Jih-Pyang W, Chun-Nan L. 2008.** Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry*. 69:234-239.
- Hu SH, Liang ZC, Chia YC, Lien JL, Chen KS, Lee MY, Wang JC. 2006.** Antihyperlipidemic and Antioxidant Effects of Extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 2103-2110.
- Hybelbauerova S, Sejbala J, Dracinsky M, Hahnova A, Koutek K. 2008.** Chemical Constituents of *Stereum subtomentosus* and Two Other Birch-Associated Basidiomycetes: An Interspecies Comparative Study. *Chemistry and Biodiversity*. 5: 743-750.
- Jaikaran S, Seecharran D, Ansari AA. 2017.** Growth and bioremediation properties of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) using gold and bauxite mining soils in Guyana. *Mushroom Research*. 26: 57-67.
- Jayachandran M, Xiao J, Xu B. 2017.** A Critical Review on Health Promoting Benefits of Edible Mushrooms through Gut Microbiota. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(9): 1934 doi: 10.3390/ijms18091934.
- Kahols K, Kangas L, Hiltunen R. 1989.** Ergosterol peroxide, an active compound from *Inonotus radiatus*. *Planta Medica*. 55: 389-390.
- Kanazawa M, Yoshihara K, Abe H, Iwadate M, Watanabe K, Suzuki S, Endoh Y, Takita K, Sekikawa K, Takenoshita S, Ogata T, Ohto H. 2005.** Effects of PSK on T and dendritic cells differentiation in gastric or colorectal cancer patients. *Anticancer Research*. 25: 443-449.
- Kikuchi T, Motoyashiki N, Yamada T, Shibatani K, Ninomiya K, Morikawa T, Tanaka R. 2017.** Ergostane-type sterols from king trumpet mushroom (*Pleurotus eryngii*) and their inhibitory effects on aromatase *International Journal of Molecular Sciences*. 18:2479; DOI: 10.3390/ijms18112479.
- Kim MY, Seguin P, Ahn JK, Kim JJ, Chun SC, Kim EH, Seo SH, Kang EY, Kim SL, Park YJ, Ro HM, Chung IM. 2008.** Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 7265-7270.
- Ko HH, Hung CF, Wang JP, Lin CN. 2008.** Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry*. 69: 234-239.
- Leliebre-Lara V, Monzote Fidalgo L, Pferschy-Wenzig EM, Kunert O, Nogueiras Lima C, Bauer R. 2016.** *In vitro* antileishmanial activity of sterols from *Trametes versicolor* (Bres. Rivarden). *Molecules*. 21:1045; DOI:10.3390/molecules21081045.
- Lindequist U, Lesnau, A, Teuscher E, Pilgrim H. 1989.** Antiviral activity of ergosterol peroxide. *Die Pharmazie*. 44:579-580.
- Lindequist U, Niedermeyer THJ, Jülich WD. 2005.** The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2: 285-299.
- Lotfy MM, Hassan HM, Ahmed MH, El-Gendy AO, Mohammed R. 2018.** Di-(2-ethylhexyl) Phthalate, a major bioactive metabolite with antimicrobial and cytotoxic activity isolated from River Nile derived fungus *Aspergillus awamori*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 263-269 DOI: 10.1016/j.bjbas.2018.02.002.
- Ma L, Chen H, Dong P, Lu X. 2013.** Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Chemistry*. 139: 503-508.
- Malca-García GR, Hennig L, Ganoza-Yupanqui ML, Piña-Iturbe A, Bussmann RW. 2017.** Constituents from the

- bark resin of *Schinus molle*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 7:67-69.
- Merdivan S, Lindequist U. 2017.** Ergosterol Peroxide: A mushroom-derived compound with promising biological activities-A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 19:93-105.
- Millot M, Tomasi S, Articus K, Rouaud I, Bernard A, Boustie J. 2007.** Metabolites from the lichen *Ochrolechia parella* growing under two different heliotropic conditions. *Journal of Natural Products*. 2:316-318.
- Mizutani Y, Yoshid O. 1991.** Activation by the protein-bound polysaccharide PSK (krestin) of cytotoxic lymphocytes that act on fresh autologous tumor cells and T24 human urinary bladder transitional carcinoma cell line in patients with urinary bladder cancer. *Journal of Urology*. 145:1082-1087.
- Mosa RA, Oyedeji AO, Shode FO, Singh M, Opoku AR. 2011.** Triterpenes from the stem bark of *Protorhus longifolia* exhibit anti-platelet aggregation. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 5: 2698-2714.
- Muthukumaran J, Jianbo X, Baojun X. 2017.** A critical review on health promoting Benefits of edible mushrooms through gut microbiota. *International Journal of Molecular Sciences*. 18:1934. DOI:10.3390/ijms18091934.
- Nakanishi T, Murata H, Inatomi Y, Inada A, Murata J, Lang FA, Yamasaki K, Nakano M, Kawahata T, Mori H. 1998.** Screening of anti-HIV-1 activity of North American plants. Anti-HIV-1 activities of plant extracts and active components of *Lethalia vulpina* (L.) Hue. *Natural Medicines*. 52: 521-526.
- Namikoshi M, Fujiware T, Nishikawa T, Ukai K. 2006.** Natural abundance ¹⁴C content of Dibutyl Phthalate (DBP) from three marine algae. *Marine Drugs*. 4: 290-297.
- Njue AW, Omolo JO, Cheplogoi PK, Langat MK, Mulholland DA. 2018.** Cytotoxic ergostane derivatives from the edible mushroom *Termitomyces microcarpus* (Lyophyllaceae). *Biochememical Systematics and Ecology*. 76:12-14.
- Olivoto T, Nardino M, Carvalho IR, Follmann DN, Szareski VJ, Ferrari M, de Pelegrin AJ, Queiróz de Souza V. 2017.** Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: A review. *African Journal of Agricultural Research*. 12: 71-84.
- Ooi VE, Liu F. 2000.** Immunomodulation and anti-cancer activity of poly-saccharide-protein complexes. *Current Medicinal Chemistry*. 7: 715-29.
- Ramos-Ligonio A, López-Monteón A, Trigos A. 2012.** Trypanocidal activity of ergosterol peroxide from *Pleurotus ostreatus*. *Phytotherapy Research*. 26: 938-943.
- Smania A, Jr Delle Monache F, Smania EFA, Cuneo RS. 1999.** Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (Aphyllophoromycetidae) fruit body. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1: 325-330.
- Stadler M, Sterner, O. 1998.** Production of bioactive secondary metabolites in the fruit bodies of macrofungi as response to injury. *Phytochemistry*. 49:1013-1019.
- Stamets P, Chilton JS. 1983.** The Mushroom Cultivator: A practical guide to growing mushrooms at home; Agarikon Press: Olympia, WA.
- Takaku T, Kimura Y, Okuda H. 2001.** Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *Journal of Nutrition*. 131:1409-1413.
- Tsukagoshi S, Hashimoto Y, Fujii G, Kobayashi H, Nomoto K, Orita K. 1984.** Krestin (PSK). *Cancer Treatment Review*. 11:131-55.
- Uddin SJ, Bettadapura J, Guillon P, Grice D, Mahalingam S, Tiralongo E. 2013.** *In vitro* antiviral activity of a novel phthalic acid ester derivative isolated from Bangladeshi Mangrove fern *Acrostichum aureum*. *Journal of Antivirals and Antiretrovirals*. 5: 139-144.
- Valisollalao J, Luu B, Ourisson G. 1983.** Steroids cytotoxiques de *polyporus versicolor*. *Tetrahedron*. 39: 2779-2785.
- Velmurungan S, Babu MM, Punitha SMJ, Viji VT, Citarasu T. 2012.** Screening and characterization of antiviral compounds from *Psidium guajava* linn. Root bark against white spot syndrome virus. *Indian Journal of Natural Product Research*. 3: 208-214.
- Zhang Q, Huang N, Wang J, Luo H, He H, Ding M, Deng WQ, Zou K. 2013.** The H⁺/K⁺-ATPase inhibitory activities of Trametenolic acid B from *Trametes lactinea* (Berk.) Pat, and its effects on gastric cancer cells. *Fitoterapia*. 89: 210-217.