

DERIVADOS NATURALES DE 2,5-DICETOPIPERAZINA A PARTIR DE LA BIOMASA DEL HONGO *Pleurotus djamor*, NATIVO DEL NOR-OCCIDENTE DEL PACÍFICO COLOMBIANO.

NATURAL DERIVED OF 2,5-PIPERAZINDIONE ABOUT MUSHROOM *Pleurotus djamor*, NATIVE FROM NOR-OEST OF COLOMBIAN PACIFIC.

María del Carmen Benítez C.^{1,3}, Ana Julia Colmenares D.¹, Julio César Montoya V.^{1,2*}

¹. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Química, Grupo de Investigación en Productos Naturales y Alimentos-GIPNA. mcbenitezc@gmail.com, anacolme@univalle.edu.co.

². Universidad Autónoma de Occidente, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Ciencias Ambientales. Grupo de Estudios Ambientales y Desarrollo Sostenible-GEADES. jcmontoya@uao.edu.co.

³. I.E. La Buitrera. Área de Ciencias Naturales. Km 3, El Plan vía La Buitrera. mcbenitezc@gmail.com

Recibido: Agosto 31 de 2012

Aceptado: Octubre 26 de 2012

*Correspondencia del autor . Universidad Autónoma de Occidente, km 2, vía a Jamundí. Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Ciencias Ambientales. Email: jcmontoya@uao.edu.co.

RESUMEN

De la fracción etanólica de la biomasa de la cepa del hongo comestible *Pleurotus djamor* rosado, se obtuvo un extracto que se llevó a proceso de Cromatografía de Gases acoplada a Espectro de Masas (GC-MS). Se realizó un análisis de los espectros de masas obtenidos, según cromatograma, observando la elución de una familia de compuestos cíclicos, para los cuales, mediante la biblioteca del equipo y el análisis de las principales fragmentaciones, se proponen los compuestos ciclo(Ileu-Pro), dos isómeros de ciclo(Leu-Pro), L-Leucil-D-Leucina, ciclo(Phe-Leu) y dos isómeros de ciclo(Phe-Pro). Con base en la información de la biblioteca de espectros, parece que las estructuras de estos compuestos, se caracterizan por presentar el enlace alfa entre las funciones amino y carboxilo, de tal forma que se presenta la unión alfa-aminoácido, denominada enlace péptido; caracterizado por presentar actividad biológica y muchas de estas actividades, con propiedades fisiológicas como: enzimas, anticuerpos, neurotransmisores y funciones enzimáticas. Aunque en la naturaleza, algunos componentes tóxicos de plantas y animales, presentan estructura de péptidos. La mezcla de compuestos encontrada, se presume como una familia de dipéptidos cíclicos pertenecientes al grupo de las 2,5-dicetopiperazinas, que son conocidos por sus diversas actividades biológicas tales como antibióticos, control de producción hormonal y reguladores de crecimiento en plantas. También, se han utilizado para estudiar la conformación péptida en muchos compuestos.

Palabras claves: *Pleurotus*, *Pleurotus djamor*, hongos, hongos comestibles, metabolitos secundarios, dicetopiperazinas, piperazinadiona.

ABSTRACT

The ethanol fraction extract of the biomass of the edible mushroom pink *Pleurotus djamor*, obtained by HPLC (High Performance Liquid Chromatography), carry to analice by GC-MS (Gas Chromatography with Mass Spectrometry) and generates a chromatogram with the running of dipeptides family derived of 2,5-diketopiperazine: cycle(Ileu-Pro), two isomeros of cycle(Leu-Pro), L-Leucil-D-Leucina, cycle(Phe-Leu) and two ismeros of cycle(Phe-Pro), with chemical structures supposed means the spectrums library of device GC-EIMS, similar indexes and main split analysis. Based on the information in the library of spectra, it appears that the structures of these compounds are characterized by the bond between the alpha amino and carboxyl functions, such that binding to alpha-amino acid peptide called, characterized to present biological activity and many of these activities are fisilógicas properties as enzymes, antibodies, neurotransmitters and enzymatic functions. Although in nature, some toxic components of plants and animals, presented peptide structure. The mixture of compounds found, presumably as a family of cyclic dipeptides from the group of the 2,5-diketopiperazines, which are known for its various biological activities such as antibiotics, control hormonal production and plant growth regulators. Have also been used to study the peptide conformation in many compounds.

Keywords: *Pleurotus*, *Pleurotus djamor*, fungi, edible mushrooms, secondary metabolites, diketopiperazines.

INTRODUCCIÓN

Colombia presenta diversidad de especies nativas de hongos comestibles y medicinales (1), algunas de las cuales ya se han clasificado, como es el caso de la especie *P. djamor* rosado, aunque se conoce poco acerca de estudios concernientes al contenido de metabolitos secundarios. Lo anterior, motivó para seleccionar la especie *Pleurotus djamor* rosado, suministrada por el Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia. En cuanto al género *Pleurotus*, se conoce de la presencia de algunos metabolitos secundarios tales como peróxido de ergosterol en *P. ostreatus* (2), ergosterol, zimosterol, fungisterol y ergosta-5,7,22,24(28)-tetraenol en varias especies del género *Pleurotus* (3), ergosta-4,6,8,22-tetraen-3-ona en *P. ostreatus* (4), polisacáridos tipo β -glucanos en *P. ostreatus* (5), tiamina (entre 4.8 y 7.8 mg/kg), riboflavina (4.7-4.9 mg/kg), niacina (55-109 mg/kg) y vitamina C (36-58 mg/kg) en *P. ostreatus* (6). Los compuestos 1-octanol, 3-octanol y 3-octanona, sustancias con actividad antiinflamatoria y antibacteriana en *P. ostreatus* (7). En el carpóforo de *P. ostreatus* se identificó el compuesto 1-octen-3-ol, componente volátil con actividad antibacterial y en el micelio, el compuesto 4-metoxibenzaldehído que inhibe el crecimiento de bacterias y hongos (8). También en *P. ostreatus* se identificó una lecitina con actividad hepatoprotectora y actividad antitumoral (9, 10 y 11). Se ha encontrado también presencia de α -tocoferol y β -caroteno en *P. ostreatus* y *P. cystidiosus* (12). En *P. griseus* se aisló el compuesto Pleurotin, que posee propiedades antibióticas y controla el nivel de crecimiento de la proteína

thioredoxin, en células con carcinoma linfoide y mario (13). En las especies *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* se identificó el compuesto lovastatina (14) que tiene como función inhibir la enzima responsable de la biosíntesis del colesterol (HMG CoA reductasa) (15). En el micelio de *P. ostreatus*, *P. eringii* y *P. pulmonarius*, *P. japonicus*, y *P. cornucopiae*, se estableció la presencia de polisacáridos de bajo peso molecular, citoquininas como Zeatina y ácido glutámico (16). Los polisacáridos de bajo peso molecular contribuyen a fortalecer el sistema inmune (17), la citoquininas tienen efectos antivirales contra el virus del herpes, influenza y encefalitis equina del oeste. El ácido glutámico es un estimulante del sistema inmunológico. En *P. florida*, se ha identificado una unidad repetitiva conformada por uniones glicosídicas de glucopiranosas-galactopiranosas-manopiranosas (18) y otro β -glucano en *P. ostreatus* y *P. eringii*, Dichos glucanos con propiedades antitumorales, se consideran estimulantes de la actividad fagocítica de macrófagos. La quitina se considera el polisacárido más abundante en *P. ostreatus* (19) y se ha confirmado su propiedad antitumoral mediante estudio con ratones. En *P. pulmonarius*, se identificó el compuesto hidroxitirosol, con propiedades antioxidantes (20) y en el extracto etanólico de *P. djamor* se han identificado trece compuestos esteroidales con posible actividad antioxidante (21). Una vez revisado el estado del arte, referente a metabolitos secundarios en la especie *Pleurotus*, se planteó como objetivo general, contribuir al conocimiento de las propiedades y comportamiento del hongo comestible *Pleurotus djamor* rosado, nativo del nor-occidente del Pacífico colombiano. En el marco

de este trabajo, los objetivos específicos fueron obtener el extracto etanólico de las fructificaciones del hongo *P. djamor* rosado, separar y purificar las fracciones del extracto etanólico para identificar algunos metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico del hongo nativo.

MATERIALES Y METODOS

Proceso productivo para el cultivo del hongo comestible.

El proceso para el cultivo del hongo comestible inició con la inoculación de la cepa nativa *P. djamor* rs en el medio de cultivo sólido SDA y generación de semilla sobre *Sorghum halepense* (sorgo). La semilla se sembró en una mezcla de residuos agroindustriales (22) y se controló el proceso de fructificación en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología, de la Universidad Autónoma de Occidente, Cali.

Técnicas cromatográficas

Cromatografía en capa fina (CCF)

Se desarrolló el proceso de CCF en cromatofolios con sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck Kiesegel 0.25 mm de espesor e indicador fluorescente. Se definió la proporción de disolventes con polaridad creciente adecuada, que permitieron eluir componentes de interés. Los disolventes grado HPLC utilizados fueron hexano (Hex), etanol (EtOH) y metanol (MeOH). Se observó con lámpara UV referencia UVGL-58 Mineral Light Lamp Multiband 254 nm y 366 nm. Se empleó yodo sublimado como revelador de placas.

Cromatografía en columna (CC)

El extracto seco se depositó como cabeza sólida (preparada sobre la gel de sílice 230-240 mesh, hasta formar papilla con el disolvente de menor polaridad que en este caso fue el hexano) sobre la gel de sílice, en columna cromatográfica empacada con sílica gel Merck 230-240 mesh como fase estacionaria. La columna fue realizada a presión atmosférica de 657.62 mmHg y temperatura ambiente de 23 °C. La fase móvil que se utilizó fue Hex-EtOH en mezclas de polaridad creciente y de los extractos se separaron fracciones que se controlaron por CCF, para someter a proceso de purificación por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, CLAE (HPLC).

Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Las fracciones se analizaron por HPLC en cromatógra-

fo Shimadzu serie prominece con software LC Solution, horno CTO-20A, bomba LC-20AD, RID-10A (detector de índice de refracción), SPD-M20A (Detector UV con arreglo de diodos). Se empleó columna analítica Macherey Nagel C18 protec I de dimensiones 0.5x25 cm con fase estacionaria nucleosil y relleno de 5 µm.

Se usaron como fase móvil los disolventes acetonitrilo, metanol y agua (AcCN:CH₃OH:H₂O) en varias proporciones hasta obtener la proporción adecuada de separación de compuestos, la cual fue acetonitrilo-agua (AcCN:H₂O) 7:3. En este proceso de fase reversa se inyectaron 20µL (en forma sucesiva) de fase móvil conteniendo el analito, a 1700 PSI de presión por cada corrida a un flujo de 1 mL/min. La temperatura fue de 40 oC y el límite de detección en un rango de 200-300nm por detector con arreglo de diodos SPD-M20A con lámparas de W y D2O. La fase móvil se preparó con eluentes Merck y Mallinckrof para HPLC, pasados por filtro Millipore de 0.22 µm al momento de ser usados. El agua destilada se pasó por deionizador y la conductividad fue de 0.5 µS. Al momento de ser usada se filtró en membrana estéril Pall con tamaño de poro 0.22 µm. El analito se preparó a partir de la fracción seca y se disolvió en la fase móvil. Se pasó por filtro de 0.22 µm previo a la inyección en el cromatógrafo HPLC.

Espectrometría de Masas (GC-EIMS)

Para el extracto obtenido por HPLC, de la fracción del fructificado en etanol, se utilizó GC-MS con las siguientes condiciones: temperatura del horno de 80 °C, temperatura de inyección de 300 °C, modo de inyección Split de 25, flujo total de 52.20 ml/min, flujo en columna de 1.93 ml/min con velocidad lineal de 36.2 cm/s y flujo de purga de 2 mL/min.

Obtención del extracto del fructificado del hongo *Pleurotus djamor* rs.

Una vez se obtuvo la semilla del hongo nativo *P. djamor* rs, se procedió al proceso de siembra en desechos agroindustriales, preparados a partir de hojas y tallos de plátano, maíz, sorgo y caña de azúcar en proporciones iguales. Estos desechos previamente se secaron al sol, se picaron finamente, y se llevaron al proceso de esterilización y empaque en bolsas de polipapel con capacidad para 2 kg. Las bolsas de polipapel recién inoculadas se cerraron, se les realizaron algunas perforaciones con el fin de favorecer el proceso aeróbico y se dejaron en oscuridad durante tres días en cuarto oscuro a temperatura de 25 °C. Se pasaron a estantes hasta que brotaron los primeros primordios y se trasla-

daron a cuarto con temperatura controlada de 28 °C y luz día. Cada bolsa de polipapel con 2 kg de sustrato, generó fructificaciones con un peso de 85.0 g en promedio. En total se obtuvieron 800.00 g de fructificaciones que, después del proceso de secado, generaron 72 g de materia seca (89% de humedad), con los cuales se inicia el proceso de extracción, figura 1.

Obtención de fracciones en fructificado del hongo *Pleurotus djamor rs.*

Las fructificaciones se secaron en sombra y se desmenuzaron hasta obtener un tamaño de partícula pequeño que se trituró en mortero. Se maceró en hexano con agitación constante. De aquí se obtuvo un extracto al rotaevaporar el solvente, y la biomasa (64.71 g) se maceró en etanol seguido de metanol. De estos extractos obtenidos se observa, mayor cantidad a partir de la maceración en etanol, tabla 1.

Tabla 1. Extractos obtenidos por maceración, del fructificado de *P. djamor rs*

Solvente	Gramos de fructificado seco	miligramos de extracto
Hexano	72.00	14.4
Etanol	64.71	23.0
Metanol	37.59	1.20

El extracto crudo obtenido de la maceración con etanol, se llevó como cabeza sólida, a una columna de 10x0.5 cm soportado en sílica gel. El fraccionamiento se inició con eluyente hexano, se aumentó polaridad con etanol hasta eluir sólo etanol (EtOH) seguido de metanol (MeOH). En este proceso se obtuvieron fracciones que se analizaron por CCF, en cromatofolios con sílica gel 60 GF₂₅₄ de 0.25 mm de espesor e indicador fluorescente. Se observó con lámpara ultravioleta a longitudes de onda de 254 nm y 366 nm. Las placas se revelaron con vapores de yodo. Las fracciones se analizaron por HPLC, en cromatógrafo Shimadzu serie prominence con software LC Solution, columna analítica Macherey Nagel C18 protec I de dimensiones 0.5x25 cm con fase estacionaria nucleosil y tamaño de partícula de 5 µm. Se usaron como fase móvil acetonitrilo-agua (AcCN:H₂O) 7:3. En este proceso, el analito se preparó a partir de la fracción seca y se disolvió en la fase móvil. Se colectó una fracción a un tiempo de retención de 5.8 min. Al recolectar de nuevo, por HPLC, se obtuvo la fracción (0.5 mg), con la que se realizó el estudio espectroscópico de Cromatografía de Gases acoplada a Espectro de Masas (GC- MS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Espectrometría de masas para el extracto del fructificado del hongo *Pleurotus djamor rs.*

De la fracción del extracto etanólico de la biomasa, obtenida por HPLC, se obtuvo un extracto que se llevó a proceso de Cromatografía de Gases acoplada a Espectro de Masas (GC-MS). Dicho proceso mostró un cromatograma con la elución de siete compuestos, para los cuales, mediante la biblioteca del equipo y el análisis de las principales fragmentaciones, se proponen los compuestos ciclo(Ileu-Pro), dos isómeros de ciclo(Leu-Pro), L-Leucil-D-Leucina, ciclo(Phe-Leu) y dos isómeros de ciclo(Phe-Pro), figura 2. Con base en la información de la biblioteca de espectros, parece que las estructuras de estos compuestos, se caracterizan por presentar el enlace alfa entre las funciones amino y carboxilo, de tal forma que se presenta la unión alfa-aminoácido, denominada enlace péptido (23); caracterizado por presentar actividad biológica y muchas de estas actividades, con propiedades fisiológicas como: enzimas, anticuerpos, neurotransmisores y funciones enzimáticas. En la naturaleza, algunos componentes tóxicos de plantas y animales, presentan estructura de péptidos. La mezcla de compuestos encontrada, se presume como una familia de dipéptidos cíclicos pertenecientes al grupo de las 2,5-dicetopiperazinas.

Dipéptidos derivados de 2,5-dicetopiperazinas

Los dipéptidos cíclicos naturales derivados de 2,5-piperazinadiona, son conocidos por sus diversas actividades biológicas tales como antibióticos, control de producción hormonal y reguladores de crecimiento en plantas, se han utilizado para estudiar la conformación péptida y se han preparado por varios métodos (método de Fischer, método Nitecki y reflujo-metanol) (24).

En el año 2000, se obtuvo un compuesto tetrahydroderivado de 2,5-dicetopiperazina (albonoursin), que es un metabolito secundario presente en la naturaleza con amplia bioactividad (25). Dicho compuesto lo aislaron de un cultivo de células de *Streptomyces albulus* y, presentó actividad inhibitoria para fusión pronuclear en huevos de erizo marino. Así mismo, se reportó un nuevo sistema enzimático en *Streptomyces albulus* que convierte muchos dipéptidos cíclicos en sus correspondientes dehidroderivados, de los que se espera presenten actividad biológica (26).

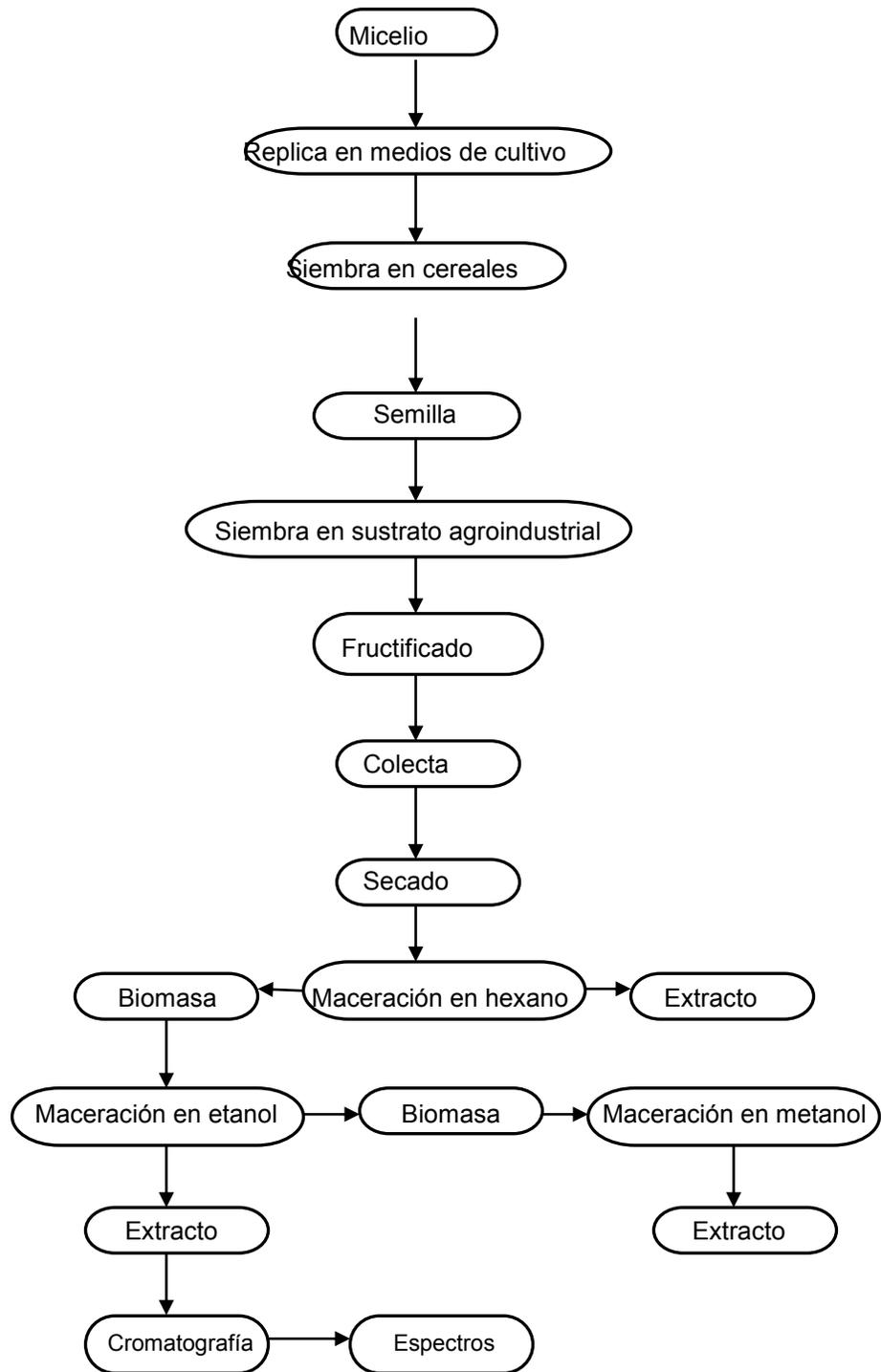


Figura 1. Protocolo para obtener el extracto de las fructificaciones del hongo *P. djamors*, con etanol (EtOH).

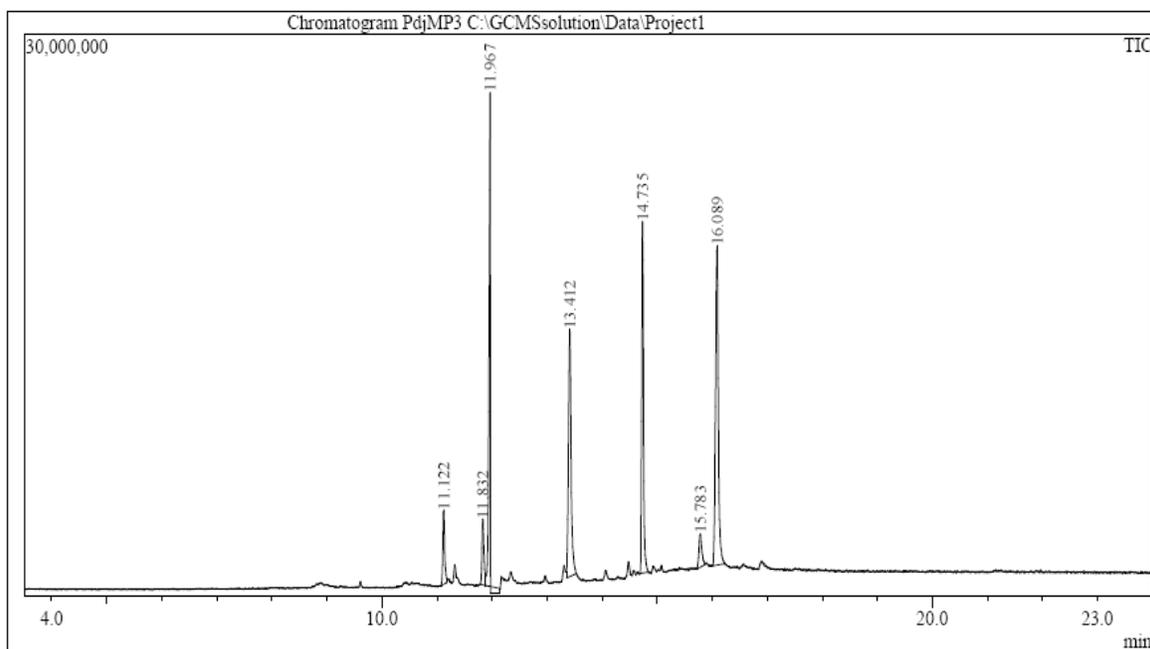


Figura 2. Cromatograma obtenido mediante el proceso GC-EIMS. Universidad del Valle.

En el 2002, se reportó un dipéptido (N- γ -Glutamil-boletina) en el hongo comestible *Tylophilus sp.* (Boletaceae), que presentó actividad antibacteriana moderada contra la bacteria *Rhodospirillum salexigens*. Y, reportan un compuesto tóxico (2-butyl-1-azaciclohexeno imino) aislado del extracto acuoso en etanol, probado en ratones (27) y se aisló de *Lactobacillus plantarum*, por primera vez, dos dipéptidos que ya se habían reportado con propiedades antibacteriana y antifúngica: ciclo(L-Phe-L-Pro) y ciclo(L-Phe-trans-OH-L-Pro) (28). En *Lactobacillus plantarum* se ha encontrado otro dipéptido cíclico antifúngico, ciclo (Gly-L-Leu) (29).

En el 2005, un estudio sobre una familia de 18 inhibidores de quitinasa, hace referencia al dipéptido ciclo (L-Arg-D-Pro), generado por la bacteria marina *Pseudomonas sp* (30). El dipéptido fue identificado como un inhibidor de quitinasa y evaluado contra quitinasa de *Bacillus sp.* Mostró también inhibición para separación de células en *Saccharomyces cerevisiae* y bloqueo de cambios morfológicos en *Candida albicans*, posiblemente por inhibición de quitinasa en esos organismos.

En el 2006, se purificaron cuatro moléculas bioactivas de un cultivo aislado de *Streptomyces sp.* Dos de los compuestos son los derivados de dicetopiperazinas, *cis*-ciclo(L-Phe-L-Pro) y *cis*-ciclo(Leucil-Prolil), con los que realizaron pruebas de actividad antimicrobiana contra *M. luteus*, *E. coli* y *V. dahliae* (31).

En el 2007, se reportó un estudio realizado para con-

trolar la acción de un nemátodo que afecta al pino japonés negro (*P. thunbergii*). Se encontró que el nemátodo (*Bursaphelenchus xylophilus*) transporta dos dipéptidos cíclicos de *Pseudomonas fluorescens*, que son ciclo(-Pro-Val-) y ciclo(-Pro-Tyr-). Los compuestos resultaron tóxicos para la suspensión de células y espinas del pino [32]. En el mismo año se aislaron varios compuestos con actividad antifúngica de cultivos de propionibacterias de lecherías (*Propionibacterium acidipropionici*). Dos de los compuestos aislados fueron identificados como dipéptidos cíclicos pertenecientes al grupo de las dicetopiperazinas, ciclo(Phe-Pro) y ciclo(Ile-Pro) (33).

Fragmentaciones en 2,5-dicetopiperazinas

El pico predominante en los espectros de masas de los aminoácidos es el pico amino $[R-CH=NH_2]^+$ y la presencia de otros sustituyentes incrementa la tendencia a rompimientos de otros enlaces en la molécula y en el fragmento amino (32). Los dipéptidos cíclicos también presentan el pico dominante amino y ocurren otros de la eliminación de CO y HNC. Si en el C-4 respecto al carbonilo hay hidrógenos, se favorece el rearrreglo de Mc-Lafferty y pérdida de olefina en reacción concertada. Por otro lado, si las cadenas laterales de las 2,5-dicetopiperazinas, presentan longitudes diferentes, el grupo de mayor tamaño se elimina preferencialmente (34) y en algunos casos se da pérdida secuencial de las dos cadenas (35).

De acuerdo con la revisión bibliográfica sobre la presencia de dipéptidos cíclicos en productos naturales, y conociendo acerca de las posibles fragmentaciones que ocurren sobre los dipéptidos, se realizó un análisis de los espectros de masas obtenidos para los siete compuestos, según cromatograma, observando lo siguiente (tabla 2).

Una posible estructura para el primer espectro, según la biblioteca del equipo, con índice de similaridad de 78% y relaciones de m/z [154]⁺ (34%), 125 [M-C₂H₅]⁺ (20%) y 70 [ión amino]⁺ (100%), es la del compuesto ciclo (Ileu-Pro), figura 3; como también puede ser el compuesto 5-pirrolidina-2-pirrolidona (figura 4), con índice de similaridad de 79%, aunque se sale del patrón de dipéptidos pero el esquema de fragmentaciones muestra una lógica que inicia con la fisión del enlace C-C unido al carbonilo, seguido de una transposición Mc Lafferty, de hidruro, con pérdida de etilo, C₂H₅ (Δm

29), ruptura del enlace CO-N con pérdida de CO (Δm 28) y ruptura del enlace N-HCN con pérdida de HCN (Δm 27), dando lugar a la formación del [ión amino]⁺.

Los espectros 1, 2 y 3 tienen como patrón de fragmentación los picos a m/z 154, 125 y 70. Los espectros de masas de los compuestos 2 y 3 presentan las mismas fragmentaciones, con igual intensidad y tiempos de retención cercanos (11.831 y 11.937 min), por lo que se supone, son isómeros (figura 5). El índice de similaridad reportado por el equipo de GC-MS, fue de 86 y 89% con respecto al compuesto ciclo(Leu-Pro); Pirrol [1,2- α]-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil) pirazina. Para el compuesto 1 este índice fue de 78%, razón por la cual se planteó otra estructura para el primer compuesto, ciclo(Ileu-Pro). Los compuestos 2 y 3 presentaron fragmentaciones a m/z 154 [M-56]⁺ (55%), 125 [M-85]⁺ (13%) y 70 [ión amino]⁺ (100%), figura 6.

Tabla 2. Posibles compuestos presentes en el extracto de *P. djamor* rs en EtOH, obtenidos por GC/EIMS.

Pico No.	Tiempo de retención (min)	Nombre
1	11.122	ciclo(Ileu-Pro) o 5-Pirrolidina-2-pirrolidona
2	11.832	ciclo(Leu-Pro)
3	11.967	Isómero de ciclo(Leu-Pro)
4	13.412	L-Leucil-D-Leucina o ciclo(Leu-Leu)
5	14.735	ciclo(Phe-Pro)
6	15.783	ciclo(Phe-Leu)
7	16.089	Isómero de ciclo(Phe-Leu)

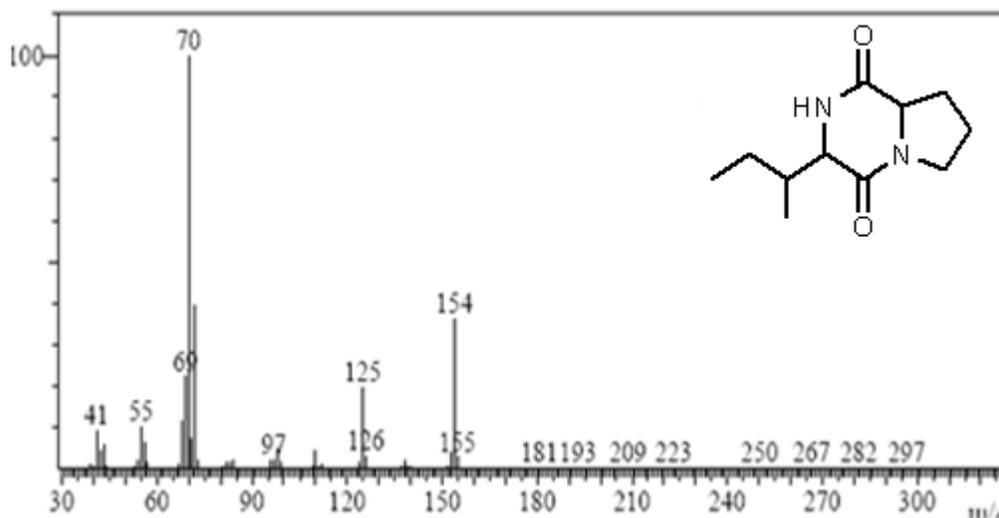


Figura 3. Espectro de masas para el compuesto ciclo (Ileu-Pro).

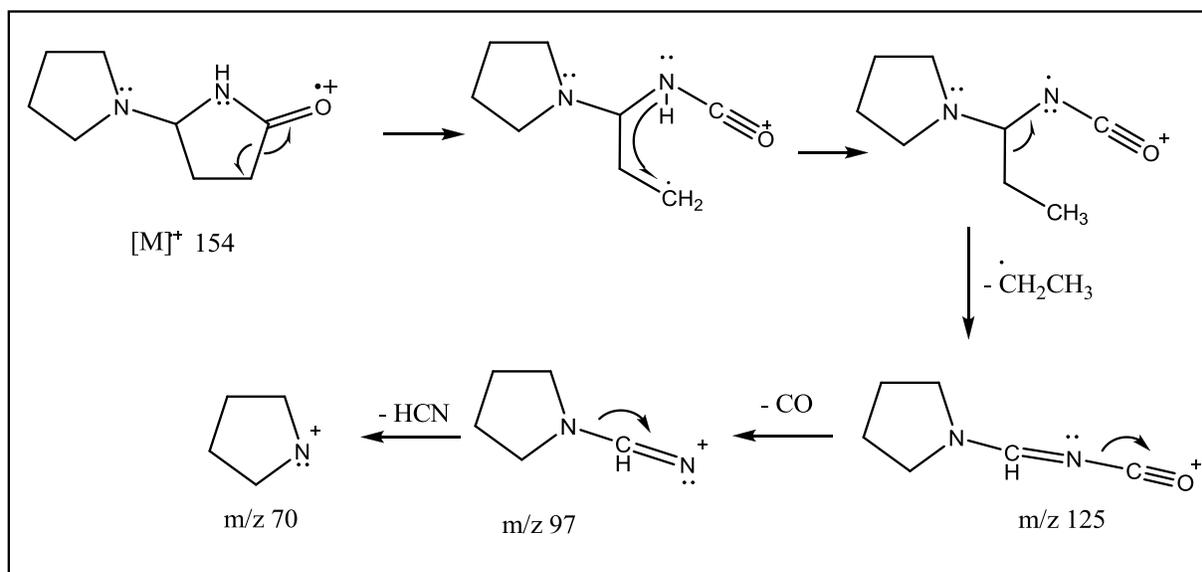


Figura 4. Posibles fragmentaciones para del compuesto 5-pirrolidina-2-pirrolidona.

Para el espectro 4, la biblioteca de espectros del equipo sugiere la estructura del compuesto L-Leucil-D-Leucina (figura 7), con un índice de similaridad de 84%. Presentó un tiempo de retención de 13.412 min y fragmentaciones a m/z 86 [(CH₃)₂CHCH₂CH=NH₂]⁺ (100%) y 170 [M-18-56]⁺ (55%). Parece que este compuesto sufre deshidratación térmica antes de ionizarse e, inmediatamente, pérdida de la especie 2-metilbuteno, ya que el espectro de masas no registra el pico de ión molecular (figura 8).

Para el espectro 5, la biblioteca de espectros del equipo propone la estructura de ciclo(Phe-Pro); Pirrol [1,2-α]-1,4-diona,hexahidro-3-(fenilmetil) pirazina, figura 9. Con un índice de similaridad de 86%. Presentó un tiempo de retención de 14.735 min y el espectro de masas mostró fragmentaciones a [244]⁺. (20%), 153 [M-91]⁺ (20%), 125 [M-91-28]⁺ (100%), 91 [ion tropilio]⁺ (60%) y 70 [ion amino]⁺ (98%), figura 10.

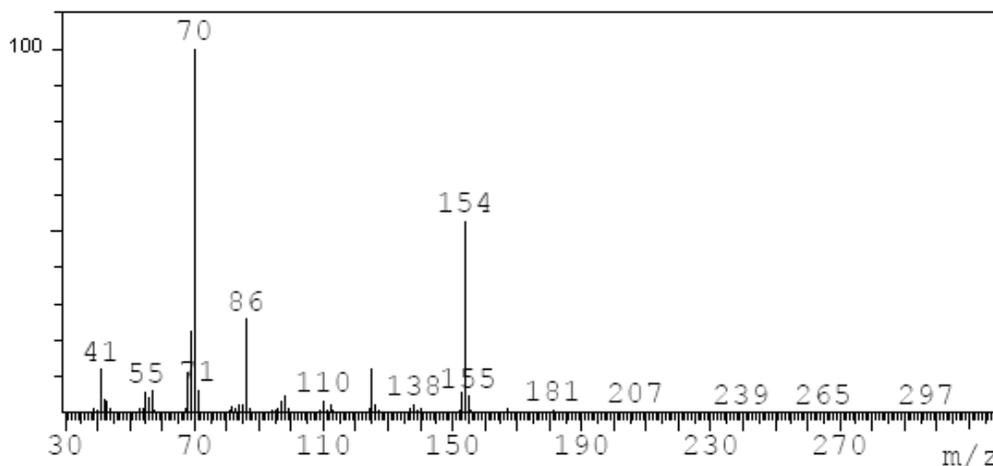


Figura 5. Espectro de masas para del compuesto ciclo (Leu-Pro) y su isómero.

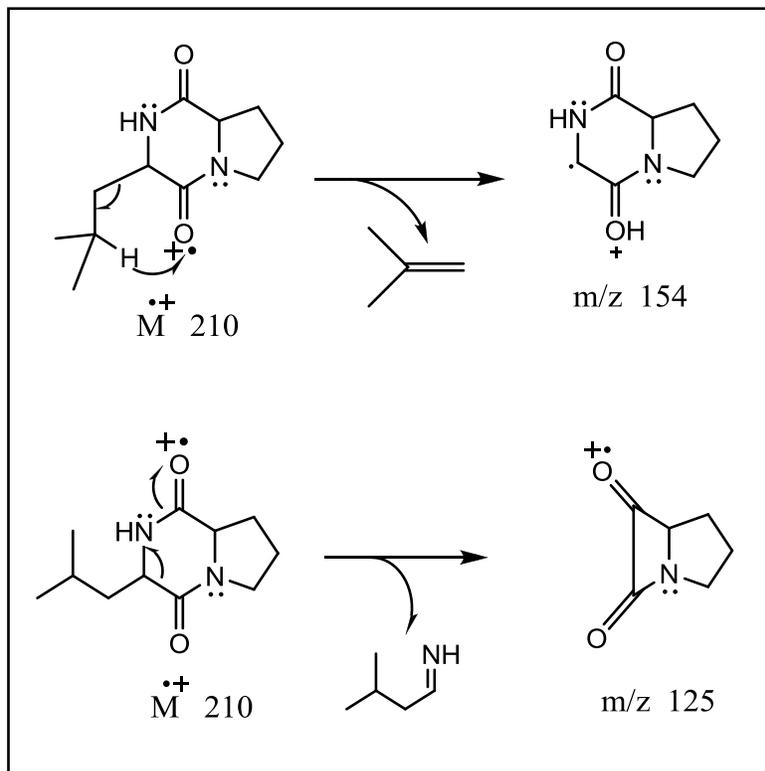


Figura 6. Fragmentaciones para el compuesto ciclo (Leu-Pro).

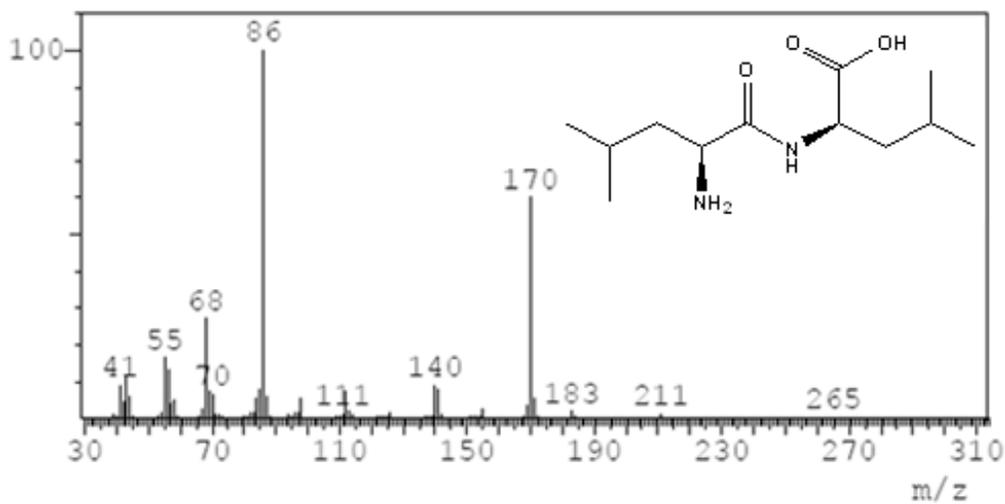


Figura 7. Espectro de masas para el compuesto L-Leucil-D-Leucina.

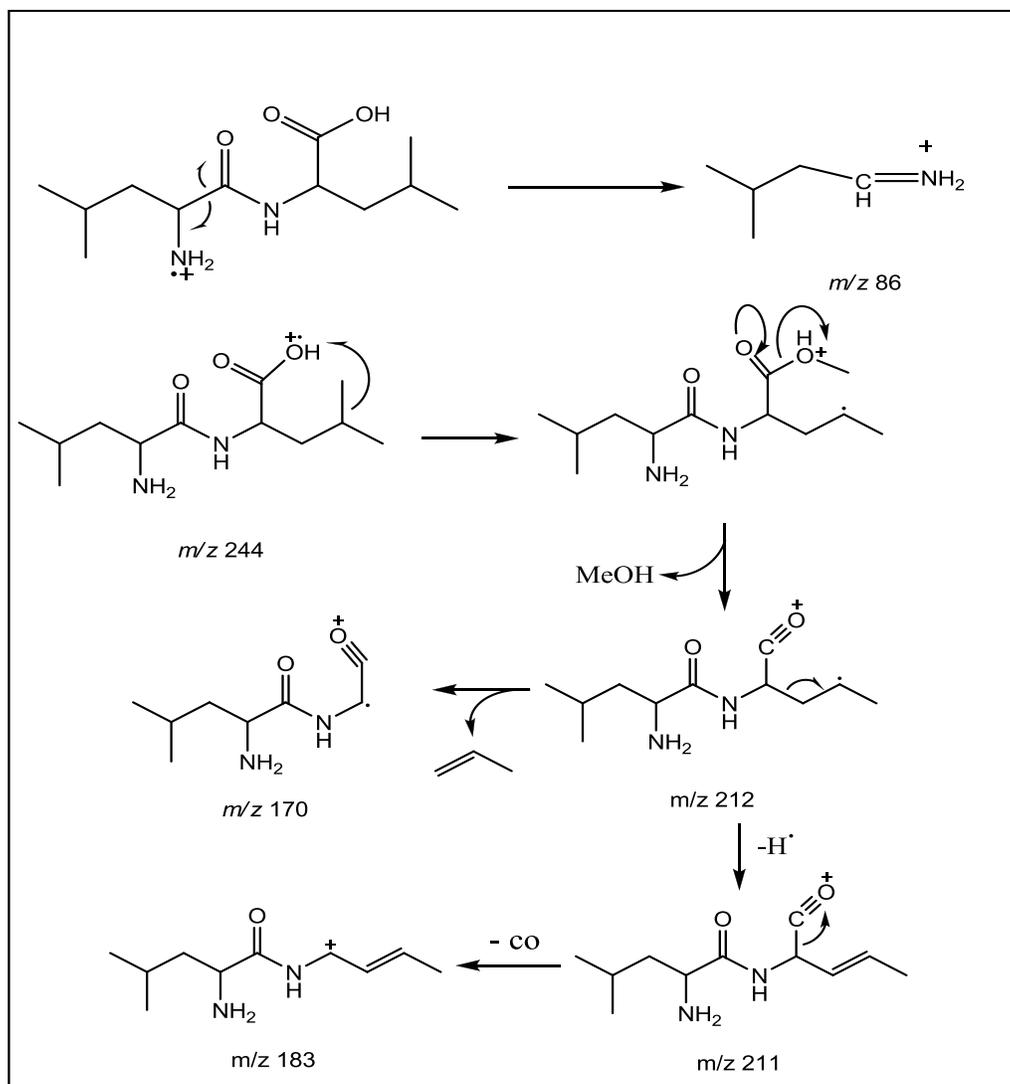


Figura 8. Posibles fragmentaciones para del compuesto L-Leucil-D-Leucina.

Una de las fragmentaciones se iniciará con la escisión del ión bencilio $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ (Δm 91), con posterior pérdida de CO (Δm 28) y formación del ión amino, $[\text{R}_1\text{NHR}_2]^+$ (m/z 125). Otra fragmentación importante es la formación del catión tropilio (m/z 91), la cual ocurre mediante fisión homolítica del bencilo cuando la carga está sobre el anillo aromático, con posterior rearrreglo.

Los espectros 6 y 7, son similares y la biblioteca de espectros del equipo propone la estructura del ciclo(Leu-Phe), figura 11, con índices de similaridad de 71 y 76% respectivamente. Estos compuestos presentaron tiempos de retención de 15.783 y 16.089 minutos, mostraron $[\text{M}]^+$ a m/z 260 (20%), 169 $[\text{M}-91]^+$ (30%), 141 $[\text{M}-91-28]^+$ (92%), 91 [ión tropilio] $^+$ (100%), figura 12.

CONCLUSIONES

La fracción etanólica del extracto de la biomasa del hongo comestible *Pleurotus djamor* rosado, llevada a análisis por GC-MS, generó un cromatograma con la elución de una familia de dipéptidos cíclicos derivados de 2,5-dicetopiperazina: ciclo(Ileu-Pro), dos isómeros de ciclo(Leu-Pro), ciclo(Leu-Leu) o L-Leucil-D-Leucina, ciclo(Phe-Leu) y dos isómeros de ciclo(Phe-Pro), cuyas estructuras químicas, se han previsto mediante la biblioteca de espectros del equipo, los índices de similaridad y el análisis de las principales fragmentaciones. Algunos de estos compuestos se han reportado en organismos como *Lactobacillus plantarum*; ciclo(L-Phe-L-Pro), *Streptomyces* sp.; *cis*-ciclo(L-Phe-L-Pro) y *cis*-ciclo(Leucil-Prolil), y en *Propionibacterium acidipropionici*; ciclo(Phe-Pro) y ciclo(Ile-Pro). Sin

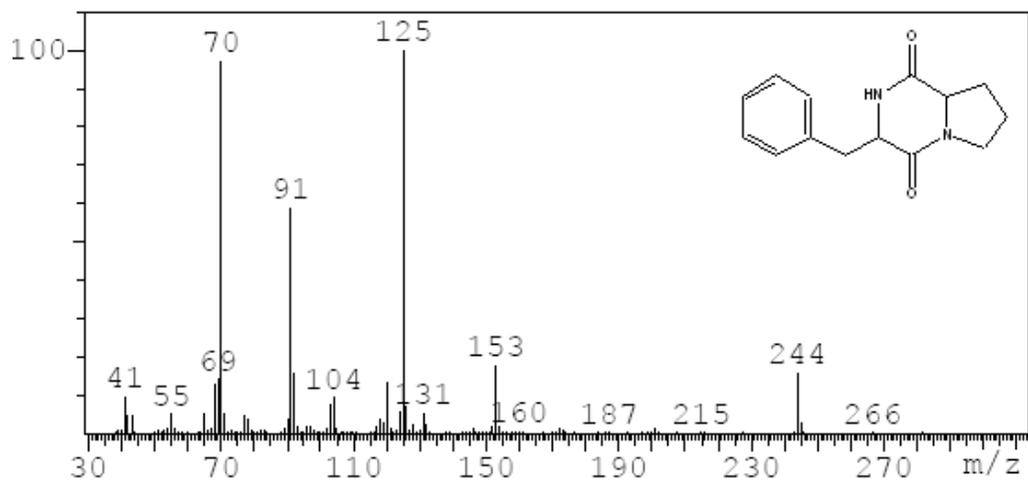


Figura 9. Espectro de masas para del compuesto ciclo(Phe-Pro).

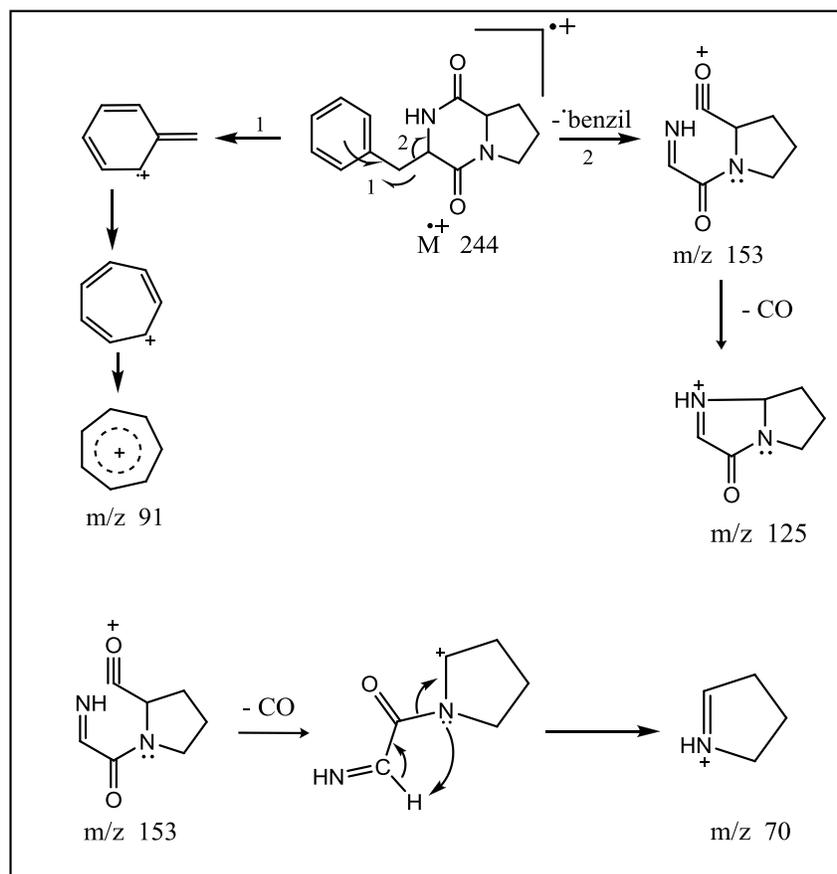


Figura 10. Fragmentaciones para el compuesto ciclo(Phe-Pro).

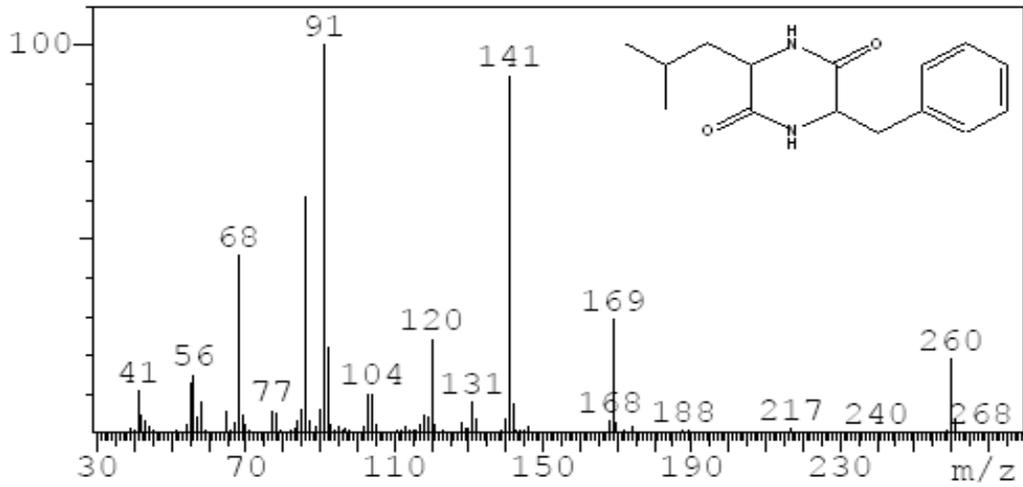


Figura 11. Espectro de masas para el compuesto isómero de ciclo (Leu-Phe).

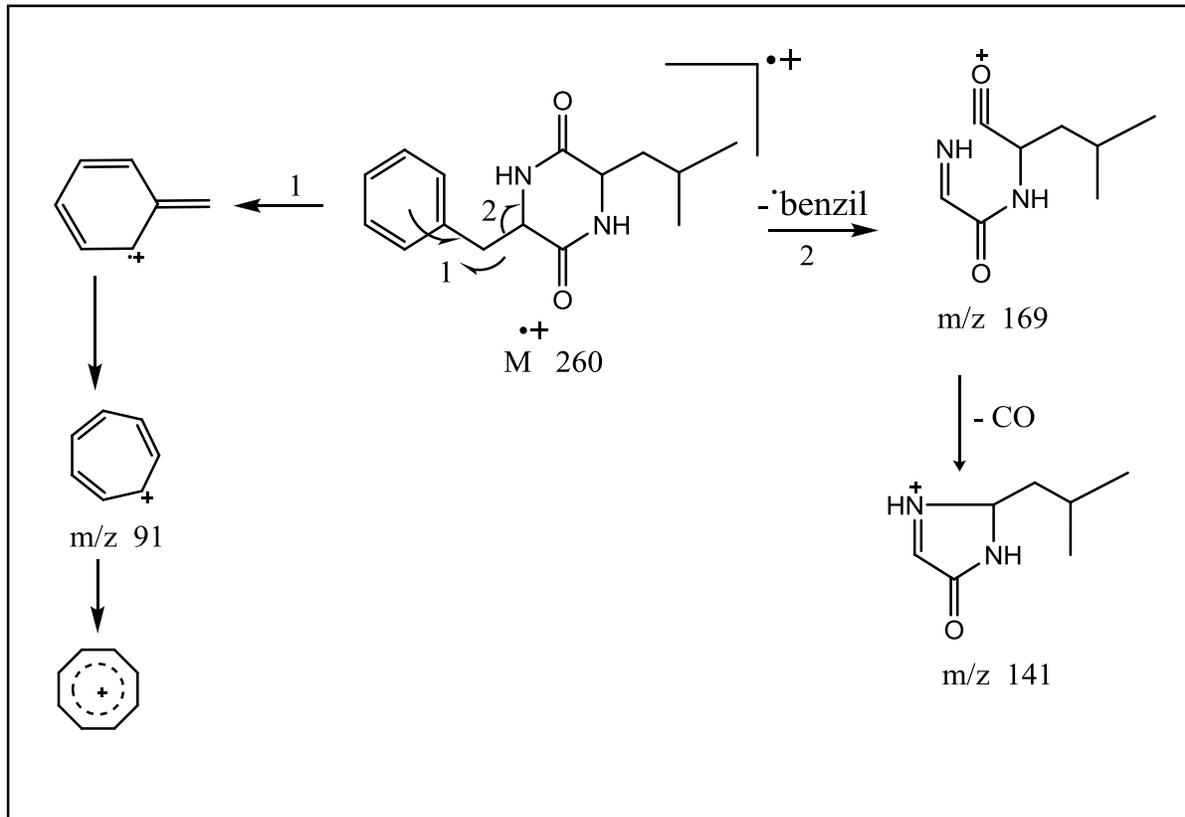


Figura 12. Fragmentaciones para el compuesto ciclo(Leu-Phe).

embargo, los compuestos aquí propuestos ((ciclo(Ileu-Pro), ciclo(Leu-Pro), ciclo(Leu-Leu), ciclo(Phe-Leu) y ciclo(Phe-Pro)), no se encuentran reportados para hongos del género *Pleurotus*, ni en los hongos comestibles más conocidos (*Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes* y *Pleurotus ostreatus*). Hasta ahora, se ha reportado un compuesto análogo (N- γ -Glutamyl-boletine), encontrado en el hongo comestible *Tylopilus* sp.

Las estructuras arriba propuestas, a partir de la información obtenida de la base de espectros del equipo de GC-MS, son una posibilidad que debe confirmarse en estudios espectroscópicos posteriores, para aclarar principalmente si se trata de una familia de dipéptidos cíclicos o están presentes dipéptidos lineales como L-Leucil-D-Leucina u otros compuestos como 5-pirrolidina-2-pirrolidona.

También, se hace necesario realizar un estudio para determinar la procedencia de estos dipéptidos presentes en el extracto etanólico, ya que no se descarta una posible absorción de ellos por parte del fructificado, a través del medio de cultivo y los sustratos empleados en el proceso de fructificación.

Con la realización de este trabajo, se abre la posibilidad de profundizar en estudios referentes a identificar compuestos presentes en el hongo comestible *Pleurotus djajmor*, en otros hongos comestibles u otros organismos vivos, así como la identificación de compuestos nuevos.

AGRADECIMIENTOS

Este informe hace parte de un proyecto de investigación conjunta entre las universidades del Valle y Autónoma de Occidente en Cali-Valle, Colombia. Se agradece a los profesores Julio César Julio César Molina B. y Julio César Wilches R., por el apoyo con toda la infraestructura de los laboratorios de Biotecnología y Química de la Universidad Autónoma de Occidente. Especial agradecimiento al Profesor José Hipólito Isaza, de la Universidad del Valle por las orientaciones oportunas en el desarrollo y análisis de estos resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Torres, T. M., Rios, A. Potencial de Micobiótica Nativa comestible y medicinal en el de Quibdo. Grupo de investigación en Recursos Vegetales. Universidad Tecnológica del Chocó. Chocó, Colombia. (2003).
2. Trigos A., Martínez-Carrera D. Ergosterol content in fruit of *Pleurotus ostreatus*. Micol. Neotrop. Apl. 1992;10:93-96.
3. Ortuño H. L. Comparación del contenido de ergosterol en diferentes cepas cultivadas del género *Pleurotus*. Tesis para obtener título de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química Farmacéutica Biológica. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. México.
4. Chobot V., Opletal L., Jahodar L. and Patel A. Ergosta-4,6,8,22-tetraen-3-one from the edible fungus, *Pleurotus ostreatus* (oyster fungus). Phytochemistry, 1997;45:1669-1671.
5. Trigos A., Amezcua S., Reyna S., Carrión G. Cerevistrol from cultures of *Verticillium lecanii*. Micol. Neotrop. Apl. 1997;10:57-62.
6. Chang S. T., Miles G. Biología de las setas. Fundamentos básicos y acontecimientos actuales. World Scientific. Hong Kong. 1999.
7. Beltrán M. J., Estarrón M., y Ogura, T. Volatile compounds secreted by oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) and their bacterial activities. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry (USA). 1997;45(10):4049-4052.
8. Okamoto K., Narayama S., Katsuo A. and Shigematsu. I. Biosynthesis of p-Anisaldehyde by the White-Rot Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002;93:207-210.
9. Wang H., Gao J. A New Lectin with Highly Potent Antihepatoma and Antisarcoma Activities from the Oyster Mushroom *Pleurotus Ostreatus*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000;275: 810-816.
10. Kawagishi H., Suzuki H., Watanabe H., Nakamura H. and Hashimoto Y. A lectin from an edible mushroom *Pleurotus ostreatus* as a food intake-suppressing substance. Biochimica et Biophysica Acta. 2000;1474:299-308.
11. Kobayashi Y., Nakamura H., Sekiguchi T., Takanami R. Analysis of the carbohydrate binding specificity of the mushroom *Pleurotus ostreatus* lectin by surface plasmon resonance. Analytical Biochemistry. 2005;336:87-93.
12. Yang J. H., Lin H. C. and Mau J. L. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. Food Chemistry. 2002;77 (2) 229-235.
13. Welsh S. J., Williams R. R., Birmingham A., Newman D. J. 2003. The Thioredoxin Redox Inhibitors 1-Methylpropyl 2-Imidazolyl Disulfide and Pleurotin Inhibit Hypoxia-induced Factor 1 α and Vascular. 2003.

14. Alarcón J., Agulia S., Arancivia-Avila P., Fuentes O., Zamorano-Ponce E. Hernández M. Production and Purification of Statins from *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycetes) Strains. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung. 2003;58c:62-64.
15. Gunde-CIMERMAN N., PLEMENITAS A. Hyporcholesterolemic Activity of the Genus *Pleurotus* (Fr.) Karst. (Agaricales s.l., Basidiomycetes). Perspectives of Medicinal Mushrooms in Healthcare and Nutrition in the 21st Century. 12-14 Septemeber Kiev, Ukraine. Abstract in International Journal of Medicinal Mushrooms. 2001;3:91.
16. Cohen R., Persky. Biotechnological Applications and Potential of Wood-degrading Mushrooms of the Genus *Pleurotus*. Appl Environ Microbiol. 2004;62:1151–1158.
17. Rout D., Mondal S., Chakraborty I., Pramanik M. Chemical analysis of a new (13)-(16)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida*. Carbohydrate Research, 2005;340:2533–2539.
18. Carbonero E. R., Gracher A. H., Smiderle F. and Rosado F. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. Carbohydrate Polymers, 2006;66: 252–257.
19. Vetter J. Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. Food Chemistry, 2007;102:6–9.
20. Aranda E., García I., Ocampo J. y Carbone V. Reusing ethyl acetate and aqueous exhausted fractions of dry olive mill residue by saprobe fungi. Chemosphere, 2007;66, 67–74.
21. Guzmán M., Zúñiga N., Santafé G., Torres O., Angulo A. Actividad antioxidante y estudio químico del hongo *Pleurotus djamor* recolectado en Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Química. Universidad de Córdoba, Colombia. 2009, Col 7 No. 2 Julio-Diciembre.
22. Acevedo M. M. C., Jiménez L. M. I., Molina B. J. C., Montoya V. J. C. y Wilches R. J. C. Evaluación del tamo de arroz como sustrato para la producción del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, como alternativa para el mejoramiento de la seguridad alimentaria en comunidades de escasos recursos En: III Encuentro Departamental de Semilleros de Investigación. Memorias. Cali: Red Colsi. 2005;1:1 – 5.
23. Dewick P. M. . Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. 2nd ed. School of Pharmaceutical Sciences University of Nottingham, UK. 2002. Ed. John Wiley and Sons, LTD.
24. Ueda T., Saito M., Kato T., Izumiya N. 1983. Facile Synthesis of Cyclic and Detection of Racemization. Bull. Chem. Soc. Jpn. 56, 2:568-572.
25. Kanzaki K., Imura D., Nitoda T., Kawazu K. Enzymatic Conversion of Cyclic Dipeptides to Dehydro Derivatives That Inhibit Cell Division. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2000;90(1): 86-89.
26. Prasad C. Bioactive cyclic dipéptidos. Peptides. 1995;1:151-164.
27. Watanabe R., Masaki K., Uemura D. A novel dipeptide, N- γ -glutamyl boletine, and a cyclic iminium toxin from the mushroom *Tylopilus* sp. (Boletaceae). Tetrahedron letters. 2002;43, 6501-6504.
28. Ström K., Sjögren J., Broberg A., Schnürer. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 Produces the Antifungal Cyclic Dipeptides Cyclo(L-Phe-L-Pro) and Cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic Acid. Applied and Environmental Microbiology. 2002;68:4322-4327.
29. Niku-Paavola M. L., Laitila A., Attila-Sandjöl, T., Haikara A. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. J Appl. Microbiol. 1999;86:29-35.
30. Ole A. A., Dixon M. J., Eggleston I. M., Daan M. F. Natural product family chitinase inhibitors. Nat. Prod. Rep. 2005;22:563-579.
31. Ameur M., R., Sioud S., Ben F., L., Bejar S., Mellouli. Purification and structure derermination of four bioactive molecules from a newly isolated *Strptomyces* sp. TN97 strain. Process Biochemistry. 2006;41:1506-1516.
32. Guo Q., Guo D., Zhao B., Xu K., Li R. Two Cyclic Dipeptides from *Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A Carried by the Pine Wood Nematode and Their Toxicities to Japanese Black Pine Suspension Cells and Seedlings in vitro. Journal of Nematology. 2007;39(3):243-247.
33. Lind H., Sjögren J., Gohil S., Kenne L., Schnürer J., Broberg A. Antifungal compounds from cultures of dairy propionibacteria type strains. FEMS Microbiol Lett. 2007 ;271:310-315.
34. Svend E., Irving S. F. Mass Spectra of Some Cyclic Dipeptides (2,5-diketopiperazines). J. Agric. Food Chem. 1976 ;24(6):1242.
35. Wabnitz P., Russell J. W., Eckersley S. D., Blumenthal T., Bowie J. H. The negative ion mass spectra of deprotonated 2,5-diketopiperazines. Int. J. Mass Spectrometry and Ion Processes. 1996;154, 193-201.