

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESTEROLES DE UNA CEPA COMERCIAL DE *Pleurotus* sp.**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF STEROLS IN A COMMERCIAL STRAIN OF *Pleurotus* sp.****Olivia Márquez-Fernández; Luis Á. Juárez Pacheco; Ángel Trigos*.**

Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa (LATEX), Universidad Veracruzana.

Calle Médicos 5, col. Unidad del Bosque, C. P. 91010. Xalapa, Veracruz. MÉXICO.

Correo-e: atrigos@uv.mx Tel.: 228 8404255 (* Autor para correspondencia).

RESUMEN

Cinco compuestos de una cepa comercial del hongo *Pleurotus* sp. se obtuvieron a partir de extracciones con acetato de etilo y metanol. Los compuestos se aislaron por medio de técnicas como la cromatografía en columna y en capa fina. Los siguientes esteroides fueron identificados mediante espectroscopía RMN ¹H: 1) ergosta-5, 7, 22-trien-3β-ol (ergosterol), 2) 5α, 8α-epidioxi-22E-ergosta-6, 22-dien-3β-ol (peróxido de ergosterol), 3) 3β, 5α, 6β, 9α-tetrahidroxi-ergosta-7, 22-dieno, 4) 3β, 5α, 6β, 9α-tetrahidroxi-ergosta-7, 22-dien y 5) 3β, 5α, 9α-trihidroxi-ergosta-7, 22-dien-6-ona.

PALABRAS CLAVE: Setas, alimentos funcionales, metabolitos secundarios activos.

ABSTRACT

Five compounds in a commercial strain of the mushroom *Pleurotus* sp. were obtained from ethyl acetate and methanol extracts. The compounds were isolated using techniques such as column and thin layer chromatography. The following sterols were identified by ¹H NMR spectroscopy: 1) ergosta-5,7,22-trien-3β-ol (ergosterol), 2) 5α, 8α-epidioxy-22E-ergosta-6, 22-dien-3β-ol (ergosterol peroxide), 3) 3β,5α,6β,9α-tetrahydroxi-ergosta-7,22-dieno, 4) 3β, 5α, 6β, 9α-tetrahydroxi-ergosta-7, 22-dien and 5) 3β, 5α, 9α-trihidroxi-ergosta-7,22-dien-6-one.

KEYWORDS: Mushrooms, functional foods, active secondary metabolites.



Recibido: 01 de diciembre, 2013
Aceptado: 28 de mayo, 2014
doi: 10.5154/r.rchscfa.2013.12.044
<http://www.chapingo.mx/revistas>

INTRODUCCIÓN

Los hongos basidiomicetos de podredumbre blanca, entre los que figuran casi todas las especies de *Pleurotus*, se caracterizan por la degradación eficiente de lignina en los tejidos leñosos (Eriksson, Blanchette, & Ander, 1990). Varias especies de hongos se consideran protagonistas importantes en los ciclos biológicos debido a que pueden modificar o degradar completamente los componentes de la madera. En este sentido, algunas especies del género *Pleurotus* se han investigado por su contenido de enzimas oxidativas y por su participación primaria como degradadores leñosos (Tuor, Winterhalter, & Fiechter, 1995).

La seta ostra o *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. es la variedad comestible más sencilla de cultivar, además presenta buenas propiedades culinarias y medicinales. En México se comercializan dos especies: *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* (Fr.) Quél, que son cultivadas por los productores de hongos comestibles tanto a pequeña como mediana escala. La producción industrial se realiza con cepas importadas de Europa, Norteamérica y el suroeste de Asia (Mora & Martínez-Carrera, 2007). Estos hongos están ganando gran importancia biotecnológica y ambiental, debido a su capacidad de crecer sobre residuos lignocelulósicos agrícolas. Cabe señalar, que casi todas las producciones agrícolas generan cantidades enormes de rastrojo, que puede ser aprovechado para el cultivo de setas (Cohen, Persk, & Hadar, 2002; Ghorai et al., 2009). Por otro lado, durante la década pasada, *P. ostreatus* fue catalogado como alimento funcional, al igual que otros hongos, dados sus efectos benéficos para la salud. La propiedad principal que se atribuye a la especie es la capacidad de reducir el colesterol debido a la presencia de lovastatina (Alarcón et al., 2003; Trigos & Suárez, 2010; Wasser, 2011). Asimismo, los extractos de dicho hongo han sido investigados por sus propiedades hipoglucemiante, antitrombótica, antiinflamatoria, antioxidante e inmunomoduladora, lo que le confiere potencial terapéutico para el tratamiento de varias enfermedades crónico-degenerativas (Chegwin-Angarita, Nieto-Ramirez, Atehortúa, & Sepúlveda, 2012). Sin embargo, los estudios sobre la composición química del hongo se han dejado de lado, ya que la mayoría de los estudios se enfocan en la optimización de los procesos de producción de biomasa utilizando diferentes sustratos y en la producción de enzimas lignocelulósicas. Por tal razón, el objetivo principal de este trabajo fue conocer los componentes minoritarios, provenientes del metabolismo secundario de una especie comercial del género *Pleurotus*; asimismo, autenticar la existencia de componentes que lo posicionan como alimento funcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

El material de estudio se adquirió en un supermercado local, proveniente de Hongos San Miguel (Amycel Co) (Figura 1), en

INTRODUCTION

White-rot basidiomycete fungi, which include almost all *Pleurotus* species, are characterized by efficient degradation of lignin in woody tissues (Eriksson, Blanchette, & Ander, 1990). Several mushroom species are considered important players in biological cycles because they can modify or completely degrade wood components. In this sense, some species of the genus *Pleurotus* have been investigated for their oxidative enzyme content and their primary role as wood degraders (Tuor, Winterhalter, & Fiechter, 1995).

The oyster mushroom or *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. is the easiest to grow edible variety, and it has good culinary and medicinal properties. In Mexico, two species are marketed: *P. ostreatus* and *P. pulmonarius* (Fr.) Quél, which are cultivated by edible mushroom growers on both a small and medium scale. Industrial production is done with strains imported from Europe, North America and Southwest Asia (Mora & Martínez-Carrera, 2007). These mushrooms are gaining great biotechnological and environmental importance due to their ability to grow on lignocellulosic agricultural waste. It should be pointed out that almost all agricultural operations generate enormous amounts of stubble, which can be used for mushroom growing (Cohen, Persk, & Hadar, 2002; Ghorai et al., 2009). On the other hand, *P. ostreatus* was classified in the past decade, like other mushrooms, as a functional food due to its beneficial health effects. The main property attributed to this species is the ability to lower cholesterol due to the presence of lovastatin (Alarcón et al., 2003; Trigos & Suárez, 2010; Wasser, 2011). In addition, extracts of this mushroom have been investigated for their hypoglycemic, antithrombotic, anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory properties, which give it therapeutic potential for the treatment of several chronic degenerative diseases (Chegwin-Angarita, Nieto-Ramirez, Atehortúa, & Sepúlveda, 2012). However, studies on the mushroom's chemical composition have been left aside, since most studies focus on the optimization of biomass production processes using different substrates and on the production of lignocellulosic enzymes. For this reason, the main aim of this study was to determine the minority components in the secondary metabolism of a commercial species of the genus *Pleurotus*, and to verify the existence of components that position it as a functional food.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

The study material was purchased in February 2012 at a local supermarket, supplied by Hongos San Miguel (Amycel Co) (Figure 1). The mushrooms were grown in corn and barley stubble. Shelf life was two days at temperatures between 3 and 7 °C. A lyophilized sample was deposited in the LATEX macroscopic mushroom collection.



FIGURA 1. *Pleurotus* sp. utilizado para el aislamiento e identificación de esteroides. Cortesía Hongos San Miguel.
 FIGURE 1. *Pleurotus* sp. used for isolation and identification of sterols. Courtesy of Hongos San Miguel.

febrero de 2012. Las setas fueron cultivadas en rastrojo de maíz y cebada. La vida de anaquel fue de dos días a una temperatura entre 3 a 7 °C. Una muestra liofilizada se mantiene en resguardo en la colección de hongos macroscópicos de LATEX.

Extracción de compuestos

Los cuerpos fructíferos (1.5 kg) fueron macerados en una solución de HCl (2 L, 0.1 N, pH 2-3) durante 24 h en agitación (Alarcón et al., 2003). La extracción de compuestos se hizo con acetato de etilo (1 L) hasta agotamiento. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida, obteniendo un peso de 5.07 g de extracto. Otra muestra de 1.5 kg fue liofilizada y extraída con metanol (1.5 L); el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida. El extracto obtenido se sometió a una segunda extracción con acetato de etilo (1 L) y se llevó a sequedad consiguiendo un peso seco de 6.6 g.

Separación y purificación de compuestos

Los compuestos se separaron y purificaron a través de cromatografía en columna, utilizando gel de sílice (Merck tamaño de malla 0.2-0.5 mm y 0.040-0.062 mm) como soporte y un gradiente de polaridad hexano/acetato de etilo como fase móvil y, posteriormente, otro gradiente de acetato de etilo/metanol. El proceso se monitoreó mediante cromatografía en capa fina (CCF) (aluminio y gel de sílice 60 GF254, marca Merck de 0.2 mm de espesor) utilizando luz ultravioleta (254-365 nm), vapores de yodo, y solución de ácido fosfomolibdico al 10 % como reveladores.

Extraction of compounds

Fruiting bodies (1.5 kg) were macerated in an HCl solution (2 L, 0.1 N, pH 2-3) for 24 h with stirring (Alarcón *et al.*, 2003). Compound extraction was done with ethyl acetate (1 L) until exhaustion. The solvent was removed by distillation under reduced pressure, obtaining a 5.07 g extract weight. Another 1.5 Kg sample was lyophilized and extracted with methanol (1.5 L); the solvent was distilled off under reduced pressure. The extract obtained was subjected to a second extraction with ethyl acetate (1 L) and brought to dryness, obtaining a 6.6 g dry weight.

Separation and purification of compounds

The compounds were separated and purified by column chromatography using silica gel (0.2-0.5 mm and 0.040-0.062 Merck mesh size) as a support and a hexane/ethyl acetate polarity gradient as the mobile phase and, subsequently, another gradient of ethyl acetate/methanol. The process was monitored by thin layer chromatography (TLC) (aluminum and 0.2-mm thick Merck silica gel 60 GF254) using ultraviolet light (254-365 nm), iodine vapor and 10 % phosphomolybdic acid solution as developers.

Structural characterization of compounds

Melting points were determined on a Fisher-Johns apparatus (Cole Parmer, 12-144, USA). Proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectra were obtained on a Varian Gemini 300 MHz spectrometer (USA) and a Bruker AVAN-

Caracterización estructural de compuestos

Los puntos de fusión se tomaron en un aparato tipo Fisher-Johns (Cole Parmer, 12-144, USA). Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN¹H) se obtuvieron en un espectrómetro Varian Gemini de 300 MHz (USA) y en un Bruker AVANCE AMX de 500 MHz (USA), empleando cloroformo y dimetil-sulfóxido deuterados (DMSO) como disolventes, y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos de las señales (δ) de los espectros se expresaron en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz). Las señales en los espectros fueron: señal simple (s), señal doble (d), señal doble de doble (dd) y señal compleja (c).

1) Ergosterol. Sólido cristalino con punto de fusión de 166-170 °C que se descompone con la luz, obtenido a partir del extracto etil-acético y metanólico en las fracciones de 9:1 hexano-acetato de etilo. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 5.57 ppm (dd, J = 5.6, 2.3 Hz, H-6), 5.38 (dd, J = 5.3, 2.2 Hz, H-7), 5.19 (c, H-22-23), 3.63 (c, H-3), 1.03 (d, J = 6.8 Hz, H-21), 0.94 (s, H-19), 0.92 (d, J = 6.8 Hz, H-28), 0.85 (d, J = 6.7 Hz, H-27), 0.83 (d, J = 6.7 Hz, H-26), 0.63 (s, H-18).

2) Peróxido de ergosterol. Sólido cristalino con punto de fusión de 154-156 °C, obtenido a partir del extracto etil-acético y metanólico en las fracciones de 7:3, hexano-acetato de etilo. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 6.50 ppm (d, J = 8.5 Hz, H-7), 6.25 (d, J = 8.5 Hz, H-6), 5.20 (c, H-22-23), 3.97 (c, H-3), 0.99 (d, J = 6.6 Hz, H-21), 0.91 (d, J = 6.6 Hz, H-28), 0.88 (s, H-19), 0.83 (d, J = 6.9 Hz, H-27), 0.82 (s, H-18), 0.81 (d, J = 6.9 Hz, H-26).

3) Cerevisterol. Sólido blanco con punto de fusión de 242-245 °C, aislado a partir del extracto etil-acético en las fracciones de 1:1, hexano-acetato de etilo. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5.35 ppm (d, J = 5.3 Hz, H-7), 5.19 (c, H-22), 5.19 (c, H-23), 4.08 (c, H-3), 3.63 (c, H-6), 1.08 (s, H-19), 1.03 (d, J = 6.6 Hz, H-21), 0.92 (d, J = 6.8 Hz, H-28), 0.84 (d, J = 7.4 Hz, H-27), 0.82 (d, J = 7.4 Hz, H-26), 0.60 (s, H-18).

4) 3 β ,5 α ,6 β ,9 α -tetrahidroxiergosta-7,22-dieno. Sólido amorfo obtenido a partir del extracto metanólico en las fracciones con polaridad de 1:9, hexano-acetato de etilo. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-D₆): δ 5.20 ppm (c, H-22), 5.17 (c, H-23), 5.08 (c, H-7), 3.79 (s, H-3), 3.60 (c, H-6), 0.99 (d, J = 6.9 Hz, H-21), 0.90 (s, H-19), 0.88 (d, J = 6.9 Hz, H-28), 0.81 (d, J = 3.9 Hz, H-26), 0.79 (d, J = 3.9 Hz, H-27), 0.54 (s, H-18).

5) 3 β ,5 α ,9 α -trihidroxiergosta-7,22-dien-6-ona. Sólido amorfo purificado a partir del extracto etil-acético en las fracciones con polaridad de 1:1, hexano-acetato de etilo. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5.69 ppm (d, J = 2.0 Hz, H-7), 5.26 (c, H-22), 5.19 (c, H-23), 4.06 (c, H-3), 1.06 (d, J = 7.3 Hz, H-21), 1.05 (s, H-19), 0.95 (d, J = 7.3 Hz, H-28), 0.87 (d, J = 6.8 Hz, H-27), 0.85 (d, J = 6.8 Hz, H-26), 0.65 (s, H-18).

CE AMX 500 MHz spectrometer (USA), using deuterated chloroform and dimethyl sulfoxide (DMSO) as solvents, and tetramethylsilane (TMS) as internal standard. Chemical shifts of the spectrum signals (δ) were expressed in parts per million (ppm) and coupling constants (J) in Hertz (Hz). The signals in the spectra were: singlet (s), doublet (d), doublet of doublets (dd) and complex (c) signals.

1) Ergosterol. Crystalline solid with a melting point of 166-170 °C that is decomposed with light, obtained from ethyl acetate and methanol extract in fractions of 9:1 hexane-ethyl acetate. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.57 ppm (dd, J = 5.6, 2.3 Hz, H-6), 5.38 (dd, J = 5.3, 2.2 Hz, H-7), 5.19 (c, H-22-23), 3.63 (c, H-3), 1.03 (d, J = 6.8 Hz, H-21), 0.94 (s, H-19), 0.92 (d, J = 6.8 Hz, H-28), 0.85 (d, J = 6.7 Hz, H-27), 0.83 (d, J = 6.7 Hz, H-26), 0.63 (s, H-18).

2) Ergosterol peroxide. Crystalline solid with a melting point of 154-156 °C, obtained from ethyl acetate and methanol extract in fractions of 7:3 hexane-ethyl acetate. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.50 ppm (d, J = 8.5 Hz, H-7), 6.25 (d, J = 8.5 Hz, H-6), 5.20 (c, H-22-23), 3.97 (c, H-3), 0.99 (d, J = 6.6 Hz, H-21), 0.91 (d, J = 6.6 Hz, H-28), 0.88 (s, H-19), 0.83 (d, J = 6.9 Hz, H-27), 0.82 (s, H-18), 0.81 (d, J = 6.9 Hz, H-26).

3) Cerevisterol. White solid with a melting point of 242-245 °C, isolated from ethyl acetate in fractions of 1:1 hexane-ethyl acetate. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5.35 ppm (d, J = 5.3 Hz, H-7), 5.22 (c, H-22), 5.19 (c, H-23), 4.08 (c, H-3), 3.65 (c, H-6), 1.08 (s, H-19), 1.03 (d, J = 6.6 Hz, H-21), 0.92 (d, J = 6.8 Hz, H-28), 0.84 (d, J = 7.4 Hz, H-27), 0.82 (d, J = 7.4 Hz, H-26), 0.60 (s, H-18).

4) 3 β ,5 α ,6 β ,9 α -tetrahidroxiergosta-7,22-dien. Amorphous solid obtained from methanol extract in fractions with 1:9 hexane-ethyl acetate polarity. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆): δ 5.20 ppm (c, H-22), 5.17 (c, H-23), 5.08 (c, H-7), 3.79 (s, H-3), 3.60 (c, H-6), 0.99 (d, J = 6.9 Hz, H-21), 0.90 (s, H-19), 0.88 (d, J = 6.9 Hz, H-28), 0.81 (d, J = 3.9 Hz, H-26), 0.79 (d, J = 3.9 Hz, H-27), 0.54 (s, H-18).

5) 3 β ,5 α ,9 α -trihidroxiergosta-7,22-dien-6-one. Purified amorphous solid from ethyl acetate extract in fractions with 1:1 hexane-ethyl acetate polarity. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5.69 ppm (d, J = 2.0 Hz, H-7), 5.26 (c, H-22), 5.19 (c, H-23), 4.06 (c, H-3), 1.06 (d, J = 7.3 Hz, H-21), 1.05 (s, H-19), 0.95 (d, J = 7.3 Hz, H-28), 0.87 (d, J = 6.8 Hz, H-27), 0.85 (d, J = 6.8 Hz, H-26), 0.65 (s, H-18).

RESULTS AND DISCUSSION

Five sterols of a commercial strain of the mushroom *Pleurotus* sp. were purified from the acid extraction with ethyl acetate (5.07-g extract) and from the extraction with methanol (6.6-g extract). Through proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) spectral data and by comparison to the literature, the sterols were identified as: 1) ergosterol, 2) ergosterol per-

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinco esteroides de una cepa comercial del hongo *Pleurotus* sp. se purificaron a partir de la extracción ácida con acetato de etilo (5.07 g de extracto) y de la extracción con metanol (6.6 g de extracto). A través de los datos espectrales de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) y mediante comparación con la literatura, los esteroides fueron identificados como: 1) ergosterol, 2) peróxido de ergosterol, 3) cerevisterol, 4) $3\beta,5\alpha,6\beta,9\alpha$ -tetrahidroxiergosta-7,22-dieno y 5) $3\beta,5\alpha,9\alpha$ -trihidroxiergosta-7,22-dien-6-ona (Figura 2) (Kawagishi et al., 1988; Trigos, Amezcua, Reyna, & Carrión, 1997; Trigos & Ortega-Regules, 2002; Trigos, Zayas, Ortuño, Sobal, & Morales, 1994).

Así, en todos los espectros de resonancia RMN ^1H (Cuadro 1) se aprecian, a campo alto, las seis señales características de los grupos metilos de este tipo de compuestos; es decir,

oxide, 3) cerevisterol, 4) $3\beta,5\alpha,6\beta,9\alpha$ -tetrahidroxiergosta-7,22-dien and 5) $3\beta,5\alpha,9\alpha$ -trihidroxiergosta-7,22-dien-6-one (Figure 2) (Kawagishi et al., 1988; Trigos, Amezcua, Reyna, & Carrión, 1997; Trigos & Ortega-Regules, 2002; Trigos, Zayas, Ortuño, Sobal, & Morales, 1994).

Thus, in all the ^1H NMR resonance spectra (Table 1), at high field, the six characteristic signals of the methyl groups of these compounds are seen; that is, two singlets comprising three protons each, attributable to the two angular methyls, and four doublets that also comprise three protons each, corresponding to the four existing methyls in their side chains. Similarly, in all spectra a complex signal between approximately 3.5 and 4.5 ppm, corresponding only to the geminal proton of the hydroxyl group at C-3, which by its width, indicates the stereochemistry in b of the mentioned hydroxyl, is seen. Practically, the ^1H NMR spectra of ergosterol and its peroxide are very similar and

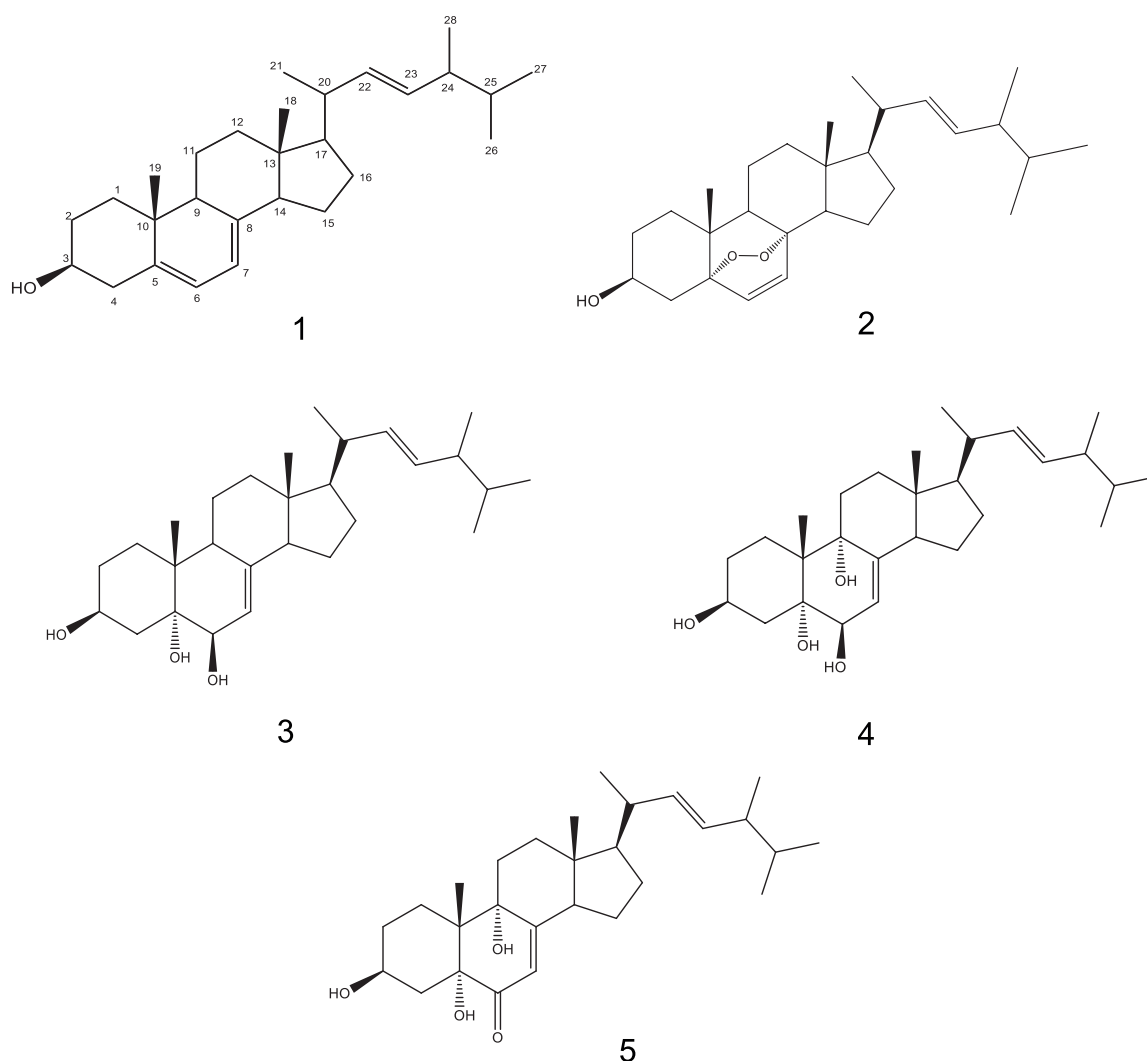


FIGURA 2. Estructuras de los esteroides purificados a partir de los extractos obtenidos de *Pleurotus* sp.: 1) Ergosterol, 2) Peróxido de ergosterol, 3) Cerevisterol, 4) $3\beta,5\alpha,6\beta,9\alpha$ -tetrahidroxiergosta-7,22-dieno y 5) $3\beta,5\alpha,9\alpha$ -trihidroxiergosta-7,22-dien-6-ona.

FIGURE 2. Structures of sterols purified from extracts obtained from *Pleurotus* sp: 1.) Ergosterol, 2) Ergosterol peroxide, 3) Cerevisterol, 4) $3\beta,5\alpha,6\beta,9\alpha$ -tetrahydroxyergosta-7,22-dien and 5) $3\beta,5\alpha,9\alpha$ -trihydroxyergosta-7,22-dien-6-one.

CUADRO 1. Comparación de los desplazamientos en RMN ¹H de los esteroides caracterizados estructuralmente, aislados de *Pleurotus* sp.
 TABLE 1. Comparison of the shifts in ¹H NMR of the structurally characterized sterols, isolated from *Pleurotus* sp.

Protón / Proton	Ergosterol (300 MHz)	Peróxido de ergosterol (300 MHz) / Ergosterol peroxide (300 MHz)		Cerevissterol (500 MHz)	3β,5α,6β,9α-Tetrahidroxi ergosta- 7,22-dienov/ 3β,5α,6β,9α-Tetrahydroxy ergosta- 7,22-dien (300 MHz)		3β,5α,9α-trihidroxi ergosta- 7,22-dien-6-ona / 3β,5α,9α-trihidroxi ergosta- 7,22-dien-6-ona (500 MHz)	
		δ	J		δ	J	δ	J
H-3	δ 3.63 (c)	δ 3.97 (c)		δ 4.08 (c)	δ 3.79 (s)		δ 4.06 (c)	
H-6	δ 5.57 (dd, J = 5.6, 2.3)	δ 6.25 (d, J = 8.5)		δ 3.65 (c)	δ 3.6 (c)			
H-7	δ 5.38 (dd, J = 5.3, 2.2)	δ 6.50 (d, J = 8.5)		δ 5.35 (d, J = 5.3)	δ 5.08 (c)		δ 5.69 (d, J = 2.0)	
Me-18	δ 0.63 (s)	δ 0.82 (s)		δ 0.60 (s)	δ 0.54 (s)		δ 0.65 (s)	
Me-19	δ 0.94 (s)	δ 0.88 (s)		δ 1.08 (s)	δ 0.90 (s)		δ 1.05 (s)	
Me-21	δ 1.03 (d, J = 6.6)	δ 0.99 (d, J = 6.6)		δ 1.03 (d, J = 6.6)	δ 0.99 (d, J = 6.9)		δ 1.06 (d, J = 7.3)	
H-22	δ 5.19 (c)	δ 5.20 (c)		δ 5.19 (c)	δ 5.20 (c)		δ 5.26 (c)	
H-23	δ 5.19 (c)	δ 5.20 (c)		δ 5.19 (c)	δ 5.17 (c)		δ 5.19 (c)	
Me-26	δ 0.83 (d, J = 6.7)	δ 0.81 (d, J = 6.9)		δ 0.82 (d, J = 7.4)	δ 0.81 (d, J = 3.9)		δ 0.85 (d, J = 6.8)	
Me-27	δ 0.85 (d, J = 6.7)	δ 0.83 (d, J = 6.9)		δ 0.84 (d, J = 7.4)	δ 0.79 (d, J = 3.9)		δ 0.87 (d, J = 6.8)	
Me-28	δ 0.92 (d, J = 6.8)	δ 0.91 (d, J = 6.6)		δ 0.92 (d, J = 6.8)	δ 0.88 (d, J = 6.9)		δ 0.95 (d, J = 7.3)	

Espectros de RMN ¹H realizados en disolvente CDCl₃ (cloroformo deuterado): Ergosterol, peróxido de ergosterol, cerevissterol y 3β,5α,9α-Trihidroxi ergosta-7,22-dien-6-ona. Espectro de RMN ¹H realizado en disolvente DMSO-D₆ (dimetil-sulfóxido deuterado): 3β,5α,6β,9α-Tetrahydroxy ergosta-7,22-dien.

Desplazamiento químico de la señal: δ (ppm).

Constante de acoplamiento: J (Hz).

Multiplicidad de las señales: señal simple (s), señal doble (d), señal doble de doble (dd) y señal compleja (c).

¹H-NMR spectra obtained in CDCl₃ (deuterated chloroform) solvent: Ergosterol, ergosterol peroxide, cerevissterol and 3β,5α,9α-Trihydroxy ergosta-7,22-dien-6-ona. ¹H NMR spectrum obtained in DMSO-D₆ (deuterated dimethyl sulfoxide) solvent: 3β,5α,6β,9α-Tetrahydroxy ergosta-7,22-dien.

Chemical shift of the signal: δ (ppm).

Coupling constant: J (Hz).

Signal multiplicity: singlet signal (s), doublet signal (d), doublet of doublets (dd) and complex signal (c).

dos singuletes que integran cada uno a tres protones, atribuibles a los dos metilos angulares, y cuatro dobletes que integran también cada uno a tres protones, correspondientes a los cuatro metilos existentes en sus cadenas laterales. Igualmente, en todos los espectros se aprecia una señal compleja entre 3.5 y 4.5 ppm aproximadamente, correspondiente al protón geminal al grupo hidroxilo en C-3, que por su anchura indica la estereoquímica en β del hidroxilo mencionado. Prácticamente, los espectros de RMN ^1H del ergosterol y su peróxido son muy parecidos y sólo difieren en los protones vinílicos del anillo B ya que en el caso de ergosterol aparecen en δ 5.57 ppm (1H, $J = 5.6, 2.3$ Hz) y 5.38 ppm (1H, $J = 5.3, 2.2$ Hz) y en el peróxido a δ 6.50 ppm (1H, $J = 8.5$ Hz) y 6.25 ppm (1H, $J = 8.5$ Hz). En el caso del cerevisterol y el $3\beta,5\alpha,6\alpha,9\alpha$ -tetrahidroxiergosta-7,22-dieno (espectro realizado en dimetil sulfóxido deuterado), también sus espectros de RMN ^1H son prácticamente iguales, difiriendo estructuralmente en el grupo hidroxilo en C-9 adicional en el compuesto $3\beta,5\alpha,6\alpha,9\alpha$ -tetrahidroxiergosta-7,22-dieno. Esto se evidencia, entre otras señales, con los desplazamientos de H-7 que en el cerevisterol se observa en 5.35 ppm y en $3\beta,5\alpha,6\alpha,9\alpha$ -tetrahidroxiergosta-7,22-dieno en 5.08 ppm; mientras que el metilo angular en C-10 se observa en 1.11 y 0.90 ppm, respectivamente. Finalmente, en el espectro de RMN ^1H realizado en cloroformo deuterado, la estructura del $3\beta,5\alpha,9\alpha$ -trihidroxiergosta-7,22-dien-6-ona se evidencia principalmente en relación con los compuestos anteriores, por el desplazamiento a campo bajo del protón H-7 en 5.69 ppm.

Cabe señalar que son varios los estudios donde se ha demostrado que el ergosterol y el peroxi-ergosterol pueden contribuir con beneficios potenciales para la salud, incluyendo la reducción de dolor relacionado con la inflamación por inhibición de la enzima ciclooxigenasa (Takaku, Kimura, & Okuda, 2001), la reducción de accidentes por enfermedad cardiovascular e inhibición del crecimiento tumoral favoreciendo la apoptosis (Bok, Lermer, Chilton, Klingeman, & Towers, 1999; Subbiah & Abplanalp, 2003; Yazawa, Yokota, & Sugiyama, 2000). También existen reportes de que dichos compuestos inhiben directamente la angiogénesis (Takaku et al., 2001) y actúan como antioxidantes o como agentes antiinflamatorios (Wiseman, 1993). Adicionalmente, el peróxido de ergosterol ha demostrado actividad antitripanocida y antitumoral (Kobori, Yoshida, Ohnishi-Kameyama, & Shinmoto, 2007; Ramos-Ligonio, López-Monteón, & Trigos, 2012). En cuanto al cerevisterol, existen reportes donde se informa su actividad citotóxica al inhibir la actividad del α -ADN polimerasa, impidiendo la replicación celular (Kawagishi et al., 1998; Mizushina et al., 1999).

CONCLUSIONES

Nuestros resultados confirman que el hongo comercial *Pleurotus* sp. contiene esteroides reportados como bioactivos y potencialmente anticancerígenos; sin embargo, dado que

only differ in the vinyl protons of the B ring since in the ergosterol they appear at δ 5.57 ppm (1H, $J = 5.6, 2.3$ Hz) and 5.38 ppm (1H, $J = 5.3, 2.2$ Hz) and in the peroxide at δ 6.50 ppm (1H, $J = 8.5$ Hz) and 6.25 ppm (1H, $J = 8.5$ Hz). In the case of cerevisterol and $3\beta,5\alpha,6\alpha,9\alpha$ -tetrahydroxyergosta-7,22-dien (spectrum obtained in deuterated dimethyl sulfoxide), their ^1H NMR spectra are virtually the same, structurally differing in the additional hydroxyl group at C-9 in the compound $3\beta,5\alpha,6\alpha,9\alpha$ -tetrahydroxyergosta-7,22-dien. This is evident, among other signals, with the H-7 shifts that in the cerevisterol are seen at 5.35 ppm and in $3\beta,5\alpha,6\alpha,9\alpha$ -tetrahydroxyergosta-7,22-dien at 5.08 ppm, while the angular methyl at C-10 is observed at 1.11 and 0.90 ppm, respectively. Finally, in the ^1H NMR spectrum obtained in deuterated chloroform, the structure of $3\beta,5\alpha,9\alpha$ -trihydroxyergosta-7,22-dien-6-one is mainly evident in relation to the above compounds, due to the downfield shift of proton H-7 at 5.69 ppm.

It should be noted that several studies have shown that ergosterol and ergosterol peroxide can provide potential health benefits, including reducing pain related to inflammation by inhibiting the enzyme cyclooxygenase (Takaku, Kimura, & Okuda, 2001), reducing events due to cardiovascular disease and inhibiting tumor growth by promoting apoptosis (Bok, Lermer, Chilton, Klingeman, & Towers, 1999; Subbiah & Abplanalp, 2003; Yazawa, Yokota, & Sugiyama, 2000). There are also reports that these compounds directly inhibit angiogenesis (Takaku et al., 2001) and act as antioxidants or as anti-inflammatory agents (Wiseman, 1993). Additionally, ergosterol peroxide has demonstrated antitripanocidal and antitumor activity (Kobori, Yoshida, Ohnishi-Kameyama, & Shinmoto, 2007; Ramos-Ligonio, López-Monteón, & Trigos, 2012). Regarding cerevisterol, there are studies where its cytotoxic activity is reported to inhibit the activity of DNA polymerase- α , preventing cell replication (Kawagishi et al., 1998; Mizushina et al., 1999).

CONCLUSIONS

Our results confirm that the commercial mushroom *Pleurotus* sp. contains sterols reported to have bioactive and potentially anticarcinogenic properties; however, since the amounts of the compounds were not quantified and because there are not enough clinical studies of the application *in vivo*, it cannot be said that the consumption of the mushroom studied is the solution to chronic degenerative conditions, among others. Nonetheless, it is believed that regular inclusion of this mushroom in one's diet can provide health benefits and, as a result, the demand for it in the food and producer sector is ever increasing. On the premise that food contributes greatly to health and well-being, nowadays food should not only meet a vital need but also prevent disease and provide physical wellness to consumers, which defines a functional food.

las cantidades de los compuestos no fueron cuantificadas y que no existen estudios clínicos suficientes de la aplicación *in vivo*, no se puede afirmar que el consumo del hongo estudiado sea la solución para afecciones crónico-degenerativas, entre otras. Ahora bien, se cree que la inclusión regular de este hongo en la dieta nos puede aportar beneficios para la salud y, en este contexto, la demanda en el sector alimentario y productor cada vez aumenta. Con la premisa de que la alimentación contribuye en gran medida a la salud y al bienestar; hoy en día, los alimentos no sólo deben satisfacer una necesidad vital, sino prevenir enfermedades y proveer de bienestar físico a los consumidores, lo cual define a un alimento funcional.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de CONACYT mediante el proyecto de Ciencia Básica 2012: 181820, así como a la empresa Hongos San Miguel por el apoyo técnico.

REFERENCIAS

- Alarcón, J., Águila, S., Arancibia-Ávila, P., Fuentes, O., Zamorano-Ponce, E., & Hernández, M. (2003). Production and purification of statin from *Pleurotus ostreatus* (basidiomycetes) strains. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58, 62–64.
- Bok, J. W., Lermer, L., Chilton, J., Klingeman, H. G., & Towers, G. H. N. (1999). Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry*, 51, 891–898. doi: 10.1016/S0031-9422(99)00128-4
- Chegwin-Angarita, C., Nieto-Ramírez, I., Atehortúa, L., & Sepúlveda, A. L. (2012). Las estatinas: Actividad biológica y producción biotecnológica. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 157–178. Obtenido de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/37418/39788>
- Cohen, R., Persky, L., & Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 58, 582–594. doi: 10.1007/s00253-002-0930-y
- Eriksson, K. E. L., Blanchette, R. A., & Ander, P. (1990). *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Berlin, Germany: Springer-Verlag
- Ghorai, S., Prosad, B. S., Verma, D., Chowdhury, S., Mukherjee, S., & Khowala, S. (2009). Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*, 42, 577–587. doi:10.1016/j.foodres.2009.02.019
- Kawagishi, H., Katsumi, R., Sazawa, T., Mizuno, T., Hagiwara, T., & Nakamura, T. (1988). Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*. *Phytochemistry*, 27(9), 2777–2779. doi: 10.1016/0031-9422(88)80662-9
- Kobori, M., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama, M., & Shinmoto, H. (2007). Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. *British Journal of Pharmacology*, 150, 209–219. doi: 10.1038/sj.bjp.0706972

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support provided by CONACYT, Mexico's National Science and Technology Council, through the 2012: 181820 Basic Science project, and also thank *Hongos San Miguel* (the San Miguel Mushroom Company) for its technical assistance.

End of English Version

- Mizushima, Y., Takahashi, N., Hanashima, L., Koshino, H., Esumi, Y., Uzawa, J., ... Sakaguchi, K. (1999). Lucidenic acid O and lactone, new terpene inhibitors of eukaryotic DNA polymerases from a basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 7(9), 2047–2052. Obtenido de <http://ac.els-cdn.com/S0968089699001212/1-s2.0-S0968089699001212-main.pdf>
- Mora, V. M., & Martínez-Carrera, D. (2007). Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas (*Pleurotus*) en México. En E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata, & H. Leal (Eds.), *El cultivo de setas Pleurotus spp. en México* (pp. 69–110). Obtenido de <http://hongoscomestibles-latinoamerica.com/P/P/8.pdf>
- Ramos-Ligonio, A., López-Montes, A., & Trigos, Á. (2012). Trypanocidal activity of ergosterol peroxide from *Pleurotus ostreatus*. *Phytotherapy Research*, 26(6), 938–943. doi: 10.1002/ptr.3653
- Subbiah, M. T. R., & Abplanalp, W. (2003). Ergosterol (major sterol of baker's and brewer's yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells *in vitro* and the potential role of its oxidation products. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 73, 19–23. doi: 10.1024/0300-9831.73.1.19
- 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. Obtenido de <http://jn.nutrition.org/content/131/5/1409.full.pdf+html>
- Trigos, Á., Amezcua, C., Reyna, S., & Carrión, G. (1997). Cerevissterol from cultures of *Verticillium lecani*. *Micología Neotropical Aplicada*, 10, 56–62.
- Trigos, Á., & Ortega-Regules, A. (2002). Selective destruction of microscopic fungi through photo-oxidation of ergosterol. *Mycologia*, 94(4), 563–568. Obtenido de <http://www.mycologia.org/content/94/4/563.full.pdf+html>
- Trigos, Á., & Suárez, J. (2010). Los hongos como alimentos funcionales y complementos alimenticios. En D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales, & V. M. Mora (Eds.), *Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI* (pp. 59–76). Puebla, México: Red Latinoamericana de Hongos

- Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP.
- Trigos, Á., Zayas, T., Ortuño, L., Sobal, M., & Morales, P. (1994). Contenido de ergosterol en algunas especies cultivadas de *Pleurotus*. *Micología Neotropical Aplicada*, 7, 43–46.
- Tuor, U., Winterhalter, K., & Fiechter, A. (1995). Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology*, 41, 1–17. Obtenido de <http://ac.els-cdn.com/016816569500042O/1-s2.0-016816569500042O-main.pdf>
- Wasser, S. P. (2011). Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied microbiology and biotechnology*, 89,1323–1332.doi: 10.1007/s00253-010-3067-4
- Wiseman, H. (1993). Vitamin D is a membrane antioxidant: Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS Letters* 326, 285–288. Obtenido de <http://ac.els-cdn.com/001457939381809E/1-s2.0-001457939381809E-main.pdf>
- Yazawa, Y., Yokota, M., & Sugiyama, K. (2000). Antitumor promoting effect of an active component of *Polyporus*, ergosterol and related compounds on rat urinary bladder carcinogenesis in a short-term test with concanavalin A. *Biology & Pharmacology Bulletin*, 23, 1298–1302. doi: 10.1248/bpb.23.1298