

**EXTRACCIÓN DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS DE *Pleurotus ostreatus* (PLEUROTACEAE) POR MACERACIÓN DINÁMICA****Extraction of bioactive substances from *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) by dynamic maceration**Astrid Stefanía DUARTE-TRUJILLO^{1*}, Javier Alexander JIMÉNEZ-FORERO¹, Julio PINEDA-INSUASTI², Camila Alejandra GONZÁLEZ-TRUJILLO¹, Magdiel GARCÍA-JUÁREZ³¹Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (FCARN), Programa de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de los Llanos (UNILLANOS), Km 12 vía Puerto López, Villavicencio, Colombia.²Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA), Ibarra, Corredor Periférico Sur Fincas, San Agustín, Ecuador.³Productora de Hongos Comestibles Carbonero-Jacales, Huayacocotla, México.

*For correspondence: astrid.duarte@unillanos.edu.co

Received: 24th May 2018, Returned for revision: 07th March 2019, Accepted: 12th March 2019.

Associate Editor: Manuel Alfonso Patarroyo.

Citation/Citar este artículo como: Duarte-Trujillo AS, Jiménez-Forero JA, Pineda-Insuasti JA, González-Trujillo CA, García-Juárez M. Extracción de sustancias bioactivas de *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) por maceración dinámica. Acta biol. Colomb. 2020;25(1):61-74. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.72409>**RESUMEN**

La extracción de compuestos bioactivos de *Pleurotus ostreatus* por maceración dinámica, es un proceso sencillo y económico, que normalmente presenta baja eficiencia. El objetivo de este trabajo fue evaluar el proceso de extracción para determinar qué tratamiento permite la mayor eficiencia, analizando la influencia de los factores de estudio: concentración de etanol (50 %, 80 %, 95 %) y relación sólido/solvente (1:10, 1:20, 1:30). Se maceraron 5 g de polvo fúngico en etanol acuoso durante 90 minutos, a 150 rpm, 25 °C y tamaño de partícula de 0,5 a 1,0 mm. Se trataron los datos mediante estadística paramétrica con un nivel de confianza del 95 %. Los resultados revelaron que la mayor eficiencia de extracción total (40,9 %) en base seca se obtuvo con etanol al 50 % y una relación sólido/solvente de 1:30. Por componentes se encontró que, el etanol al 50 % con una relación de 1:20 permitió la máxima eficiencia para carbohidratos totales (17,9 %) y polisacáridos (17,2 %), mientras que con una relación de 1:30 se obtuvo la máxima eficiencia para azúcares reductores (0,91 %) y polifenoles (0,23 %). Por otro lado, el etanol al 95 % y la relación 1:30 permitió la máxima eficiencia para proteínas (29,4 %). La extracción de beta-glucanos no fue significativa. La eficiencia de la extracción está muy influenciada por los parámetros de operación, principalmente por la concentración de etanol; en particular, la de 50 % resultó más favorable para la obtención de la mayoría de sustancias bioactivas con potencial nutraceutico.

Palabras clave: Alimentos funcionales, extractos, hongos comestibles, optimización.**ABSTRACT**

The extraction by dynamic maceration of bioactive compounds from *Pleurotus ostreatus* is a simple and economical process which normally presents low efficiency. The objective of this work was to evaluate the extraction process to determine which treatment allows the highest efficiency, analyzing the influence of the study factors: ethanol concentration (50 %, 80 %, 95 %) and solid to solvent ratio (1:10, 1:20, 1:30). 5 g of fungal powder into aqueous ethanol were macerated during 90 minutes at 150 rpm, 25 °C and particle size from 0.5 to 1.0 mm. The data were treated by parametric statistics with a 95 % confidence level. The results reveal that the highest total extraction efficiency (40.9 %) on dry basis was obtained with 50 % ethanol and solid to solvent ratio of 1:30. As for components, it was found that 50 % ethanol with 1:20 ratio allowed maximum efficiency for total carbohydrates (17.99 %) and polysaccharides (17.23 %), while with the 1:30 ratio allowed maximum efficiency for reducing sugars (0.91 %) and polyphenols (0.23 %). On the other hand, 95 % ethanol with 1:30 ratio allowed maximum efficiency for proteins (29.4 %). The extraction of beta-glucans was not significant. The efficiency of extraction is very influenced by the operation parameters, mainly by the concentration of ethanol; in particular, the 50 % was more favorable for obtaining most bioactive substances with nutraceutical potential.

Keywords: Edible fungi, extracts, functional foods, optimization.

INTRODUCCION

El mercado mundial de ingredientes nutraceuticos se valoró en 27 mil millones de dólares en 2016 y se espera que aumente a una tasa compuesta anual del 7,5 % (Mordor Intelligence, 2017). Los hongos comestibles son considerados como alimentos nutraceuticos *per se*, ya que presentan propiedades tanto nutricionales como medicinales que permiten mejorar las funciones biológicas, y en efecto, la salud del consumidor (Valverde *et al.*, 2013).

Pleurotus ostreatus (Jacq: Fries) Kummer, también conocido como orellana o champiñón ostra, es el segundo hongo comestible más cultivado en el mundo (Suárez y Nieto, 2013). Su producción a nivel mundial durante el año 2013 fue de aproximadamente 6,5 millones de toneladas y se espera que siga en aumento debido a su importancia nutricional, medicinal y gastronómica (Royse y Sánchez, 2017). *P. ostreatus* sintetiza gran variedad de compuestos bioactivos, principalmente: polisacáridos (alfa y beta-glucanos) (Palacios *et al.*, 2012), proteínas (lectinas y lacasas) (El-fakharany *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2013), glicoproteínas (ubiquitina) (Wang y Ng, 2000), policétidos (lovastatina) (Chen *et al.*, 2012) y polifenoles (primordialmente flavonoides) (Unekwu *et al.*, 2014). Se reporta en la literatura que los extractos de *P. ostreatus* presentan actividad anticancerígena (Deepalakshmi y Mirunalini, 2016), antihipertensiva (Wang *et al.*, 2002), antiinflamatoria (Gunawardena *et al.*, 2014), antimicrobiana (Ramesh y Pattar, 2010), antioxidante (Khan *et al.*, 2017), anti-tirosinasa (Hapsari *et al.*, 2012), antitumoral (Devi *et al.*, 2015), cardioprotectora (Yan *et al.*, 2015), hepatoprotectora (Zhang *et al.*, 2016a), hipocolesterolémica, hipoglucémica (Zhang *et al.*, 2016b), inmunomoduladora (Llauradó *et al.*, 2016) y osteoprotectora (Zhang *et al.*, 2017), entre otras.

Existen diversos métodos de extracción de compuestos bioactivos, tanto convencionales como no convencionales que, a pesar de diferir en sus metodologías, tienen objetivos en común, tales como, presentar alta eficiencia de extracción, ser factibles tecnológicamente, ser reproducibles y conservar tanto la estabilidad como la bioactividad de los extractos (Smith, 2003; Bernal-Rodríguez, 2012). Sin embargo, todavía no existe un método estandarizado para la extracción de sustancias bioactivas a partir de hongos, ya que las farmacopeas existentes sólo recopilan procedimientos para la obtención de productos naturales de origen vegetal y animal (Farmacopea Francesa, 1847; Farmacopea argentina, 2003; Farmacopea Brasileña, 2010). La industria espera que el método de extracción empleado sea, además de económico, eficiente, para obtener el máximo aprovechamiento de los recursos empleados y mayores utilidades (Martínez-Sánchez y Pérez-Pérez, 2002). La eficiencia, constituye junto con la productividad, el nexo causal para el desarrollo de la empresa (Acevedo y Linares, 2012) y estimula los procesos de I+D+i (Martínez-Rincón, 2016). La optimización de la eficiencia es un reto en el

que se puede trabajar de forma conjunta con la academia (Palmer y Chaguturu, 2017).

La maceración es junto con la extracción Soxhlet y la hidrodestilación, uno de los métodos convencionales de extracción de sustancias bioactivas. Consiste en poner en contacto la matriz sólida con el solvente durante un tiempo determinado. La matriz sólida es el material biológico seco en polvo. El solvente, también conocido como menstruo, es un líquido de naturaleza general como el agua, alcoholes alifáticos de hasta tres carbonos (por lo general etanol) o la mezcla de ambos. La mezcla de la matriz sólida con el solvente se denomina tintura. La maceración es un método que pese a ser sencillo, inocuo y de bajo costo, presenta baja eficiencia (Farmacopea Argentina, 2003; Čujić *et al.*, 2016 Azmir *et al.*, 2013;). La eficiencia del método depende primordialmente de los parámetros de operación (tanto controlables como no controlables), la naturaleza de la matriz sólida, la química de los compuestos bioactivos de interés, los conocimientos científicos y la destreza del experimentador (Azmir *et al.*, 2013); los parámetros de operación son los factores más influyentes (Valverde y Dos Santos, 2000).

Las eficiencias reportadas en la literatura para la extracción de sustancias bioactivas de *Pleurotus* spp. por maceración dinámica son muy bajas, y oscilan entre 0,4 % y 22 % (Alam *et al.*, 2010; Maity *et al.*, 2011), aún con agitación, parámetro que notoriamente favorece la difusión de sustancias bioactivas en el solvente (Azmir *et al.*, 2013; Duarte-Trujillo y Pineda-Insuasti, 2018). Además, las eficiencias documentadas no hacen alusión al tipo de sustancia bioactiva extraída, ya que son valores generales. La patente estadounidense número US10092609B2, describe el proceso de elaboración de preparados medicinales con paletas mezcladoras, a partir de biomasa fúngica fresca, incluyendo a *Pleurotus ostreatus*. Proceso mediante el cual se logró una bioactividad mayor que la reportada en la literatura, aunque no se calculó la eficiencia de extracción, ni se detallaron los parámetros de operación (Wieser *et al.*, 2015). Tan sólo un estudio evaluó la influencia de algunos parámetros de operación en el proceso de extracción, pero no obtuvo eficiencias mayores al 3,6 % (Jiao *et al.*, 2017), lo que indica que probablemente la combinación de los parámetros de operación no fue la adecuada.

En un estudio preliminar, se evaluó la influencia del tamaño de partícula, el tiempo de maceración y la frecuencia de agitación, y se encontró que este último es el único factor que influye significativamente sobre la eficiencia de extracción, por lo que se optó por realizar los experimentos consecutivos en condiciones de agitación. La mayor eficiencia se obtuvo operando con frecuencia de agitación de 160 rpm (Duarte-Trujillo y Pineda-Insuasti, 2018). La temperatura es un parámetro que favorece la extracción, sin embargo, se comprobó que el calentamiento afecta la bioactividad de las sustancias, por lo que en este trabajo se

prefirió trabajar a temperatura ambiente (Gil-Ramírez *et al.*, 2013; Szwengiel y Stachowiak, 2016). La influencia del resto de parámetros es desconocida.

En este contexto, el objetivo de este trabajo es evaluar la influencia de la concentración de etanol ([etOH]) y la relación sólido/solvente (R/N) en el proceso de extracción de sustancias bioactivas totales y parciales de *P. ostreatus* (Orellana) por maceración dinámica, manteniendo constantes el resto de parámetros de operación, para demostrar que con lo realizado se puede mejorar ostensiblemente la eficiencia de extracción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y reactivos

Los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*, con contenido de humedad del 90 %, se adquirieron de la empresa colombiana CasOrellana, cultivo Mesitas del Colegio (Cundinamarca, Colombia), donde fueron cultivados en bagazo de caña a 23 °C, 990 msnm y 90 % de humedad relativa. Los reactivos de grado analítico se adquirieron de PanReac AppliChem (Barcelona, España), mientras que, el beta-glucano laminarina se adquirió de Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE.UU.).

Preparación del material biológico

Se deshidrataron los hongos frescos en un horno de secado Jelotech OF-11E a 60 °C hasta peso constante (balanza analítica Kern PCB 350-3), según metodología de Ma *et al.* (2014); posteriormente se molieron en molino eléctrico Victoria VH750-C monofásico a 1650 rpm y se tamizaron con tamices Fisher No. 18 (1 mm) y 35 (0,5 mm) según especificación A.S.T.M.E. El tamaño de partícula (TP) promedio de la matriz sólida (polvo fúngico) fue de 0,6786 mm de ancho por 1,3940 mm de largo, que se determinó con el procesador de imágenes digitales ImageJ.

Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental factorial 3², completamente aleatorizado. Se seleccionó como unidad experimental una muestra de 5 g de polvo fúngico y como variable de respuesta la eficiencia de extracción (Ef). Los factores de estudio fueron la concentración de etanol acuoso ([etOH]) y la relación sólido/solvente (R/N). Cada factor contó con tres niveles, los cuales se combinaron formando un total de nueve tratamientos, como relaciona la tabla 1. Los tratamientos se realizaron por triplicado, dando lugar a 27 experimentos. Los parámetros de operación fueron el tipo de solvente (etanol), el tamaño de partícula de la matriz sólida (0,5- 1,0 mm), la frecuencia de agitación (150 rpm) y el tiempo de maceración (90 min) (Albuquerque *et al.*, 2017; Duarte-Trujillo y Pineda-insuasti, 2018). La temperatura

(°T) de la tintura se consideró como factor de ruido y se midió en tres momentos: al inicio de la maceración (TM = 0 min), al intermedio (TM = 45 min) y al final (TM = 90 min).

Maceración dinámica

Se pesaron 5 g de polvo fúngico en balanza analítica Kern PCB 350-3 y se depositaron en cada Erlenmeyer junto con la cantidad correspondiente de etanol, conforme al diseño experimental (Tabla 1). Todos los Erlenmeyer se envolvieron en papel aluminio, se rotularon y se dejaron macerando en agitador IKA HS260 (b-s1) a 150 rpm durante 90 minutos. La temperatura (°T) de las tinturas se monitoreó introduciendo el termómetro LCD Digital BOE310 dentro de cada erlenmeyer en el TM indicado. Las tinturas se filtraron en bomba de vacío 5 CFM 1/3hp, con papel Whatman No. 4 previamente secado (horno de secado Jelotech OF-11E) y pesado (balanza analítica Kern PCB 350-3). Los residuos se reservaron para el cálculo de Ef (%) en base seca, y los filtrados (extractos líquidos) para la cuantificación de las sustancias bioactivas, también en base seca.

Cuantificación de eficiencia de extracción total

La ecuación 1 permitió calcular la Ef (%) como el cociente entre el Peso Seco del Extracto (PSE) y el Peso Seco de la Muestra (PSM), multiplicado por 100. PSM corresponde a 5 g de polvo fúngico, mientras que PSE se calcula restando el Peso Seco del Residuo al PSM. PSE se calculó con una resta, con el objetivo de evitar la evaporación de los filtrados, ya que en forma líquida es más fácil la cuantificación de sustancias bioactivas.

Tabla 1. Matriz del diseño experimental, para la evaluación de la extracción de sustancias bioactivas de *Pleurotus ostreatus* por maceración dinámica, empleando etanol acuoso como solvente.

TRATAMIENTO	[etOH] (%)	R/N
T1	50	1:10
T2	50	1:20
T3	50	1:30
T4	80	1:10
T5	80	1:20
T6	80	1:30
T7	90	1:10
T8	90	1:20
T9	90	1:30

Donde; [etOH] corresponde a la concentración del etanol acuoso en términos de porcentaje, y R/N representa la relación sólido/solvente.

$$Ef(\%) = \frac{PSE(g)}{PSM(g)} * 100 \quad (1)$$

Cuantificación de eficiencia por componentes

Se cuantificaron por espectroscopía en espectrofotómetro UV-VIS RIGOL Ultra-3660 por quintuplicado. Se aplicó el método del ácido sulfúrico y fenol para la estimación de carbohidratos (CH) totales usando glucosa ($C_6H_{12}O_6$) como patrón (DuBois *et al.*, 1956); el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) para la medición de azúcares reductores empleando glucosa ($C_6H_{12}O_6$) como patrón (Miller, 1959; Ávila *et al.*, 2012); el método del Folin-Ciocalteu para la cuantificación de polifenoles usando ácido gálico ($C_7H_6O_5$) como patrón (Singleton *et al.*, 1999); el método de rojo congo para medición de beta-glucanos empleando laminarina de *Laminaria digitata* como patrón (Nitschke *et al.*, 2011); y el método de Bradford para la determinación de proteínas empleando Albúmina de Suero Bovino (BSA) como patrón (Bradford, 1976; Tehrani *et al.*, 2012).

La ecuación 2 permitió calcular la eficiencia de extracción por Sustancia Bioactiva (ESB). Consta del producto de la Concentración de Sustancia Bioactiva en el extracto (CSB) y el Volumen de la Tintura (VOL), dividido entre el producto del Peso Seco de la Muestra y el factor de conversión de microgramos a gramos, multiplicado todo por 100.

$$ESB(\%) = \frac{CSB \left(\frac{\mu g}{ml} \right) * VOL(ml)}{PSM(g) * 10^6} * 100 \quad (2)$$

Análisis estadístico

Los datos fueron tratados en el Software estadístico R® - 3.4.2, con un nivel de confianza del 95 %. Se realizó un Análisis de Varianzas (ANOVA, por sus siglas en inglés), y en los casos en donde se encontró diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (HSD, por sus siglas en inglés) para identificar cuáles son los tratamientos diferentes entre sí. Previamente, se verificaron los supuestos de la estadística paramétrica más importantes: normalidad y homocedasticidad (homogeneidad de varianzas). La distribución normal se verificó con la prueba de Shapiro-Wilk, mientras que la homocedasticidad de los datos se verificó con la prueba de Levene. Los datos que no presentaron distribución normal se transformaron con la distribución de Johnson, empleando la función "SB" (Chou *et al.*, 1998), y se sometieron de nuevo a verificación de supuestos.

RESULTADOS

Control de temperatura

La Fig. 1 representa las temperaturas ($^{\circ}T$) de cada tintura, medidas en diferentes tiempos de maceración (TM). Se observa que, con el transcurso del TM, la $^{\circ}T$ permaneció inestable en T4; fluctuó con tendencia a aumentar en T2 y T5; aumentó en T1, T7 y T8; y disminuyó paulatinamente en T3, T6 y T9.

Eficiencia de extracción de sustancias bioactivas totales

T3 fue el tratamiento que presentó la mayor eficiencia, correspondiente al 40,9 %, seguido de T2 y T1, con eficiencias del 36,6 % y 32,4 %, respectivamente. Los resultados de la prueba de Tukey mostraron que T3 fue el único tratamiento estadísticamente diferente del resto. Por el contrario, T2 y T1 presentaron similitud estadísticamente significativa entre sí (Fig. 2). El ANOVA multifactorial arrojó un valor p de $5,254e^{-11}$ para [etOH], de $8,485e^{-05}$ para la R/N y de 0,3022 para la interacción entre ellos. Se dedujo que ambos factores tienen una influencia estadísticamente significativa sobre Ef (%), pero su interacción no. La influencia de [etOH] fue mayor, ya que los tres mejores tratamientos operaron con etanol al 50 %, pero difieren en la R/N.

Eficiencia de extracción por componentes

Carbohidratos totales

Los tratamientos que presentaron mayor eficiencia fueron T2, T3 y T6, con eficiencias de 17,9 %, 11,9 % y 12,4 %, respectivamente. Los resultados de la prueba de Tukey revelaron que T2 presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto a T3 y T6 (Fig. 3a). El ANOVA multifactorial arrojó un valor p de $1,79e^{-11}$ para [etOH], de $1,97e^{-05}$ para R/N y de 0,00243 para la interacción entre estos. Se comprobó que tanto los factores como su interacción tienen influencia estadísticamente significativa sobre la ESB (%) de carbohidratos totales.

Azúcares reductores

T3, T9 y T1 presentaron las mayores eficiencias (0,92 %, 0,89 % y 0,88 % respectivamente). Los resultados de la prueba de Tukey revelaron que T1, T3 y T9 no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre sí (Fig. 3b). El ANOVA multifactorial arrojó un valor p de 0,0339 para [etOH], de 0,0592 para la R/N y de 0,1344 para la interacción entre ellos; por lo que se dedujo que ambos factores tienen influencia estadísticamente significativa sobre la ESB (%) de azúcares reductores, pero su interacción no tiene efecto.

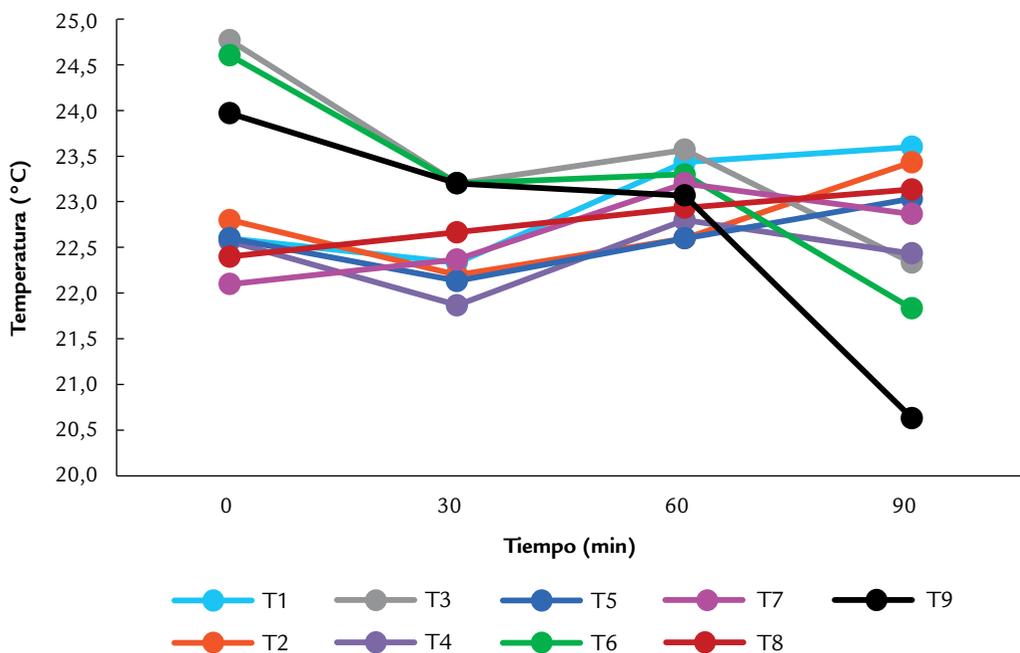


Figura 1. Control de temperatura de la tintura (solvente + polvo fúngico) durante la extracción de sustancias bioactivas de *Pleurotus ostreatus* por maceración dinámica, empleando etanol acuoso como solvente a diferentes concentraciones (50 %, 80 %, 95 %) y diferentes relaciones sólido/solvente (1:10, 1:20, 1:30). Los tratamientos (T) evaluados fueron: T1(50 %, 1:10); T2 (50 %, 1:20); T3 (50 %, 1:30); T3 (80 %, 1:10); T4 (80 %, 1:20); T5 (80 %, 1:30); T6 (95 %, 1:10); T7 (95 %, 1:20); T7 (95 %, 1:30). Los datos corresponden a la media de la temperatura a partir de tres experimentos independientes por tratamiento. Los datos se tomaron en cuatro momentos: TM= 0 min, TM= 30 min, T= 60 min, T= 90 min.

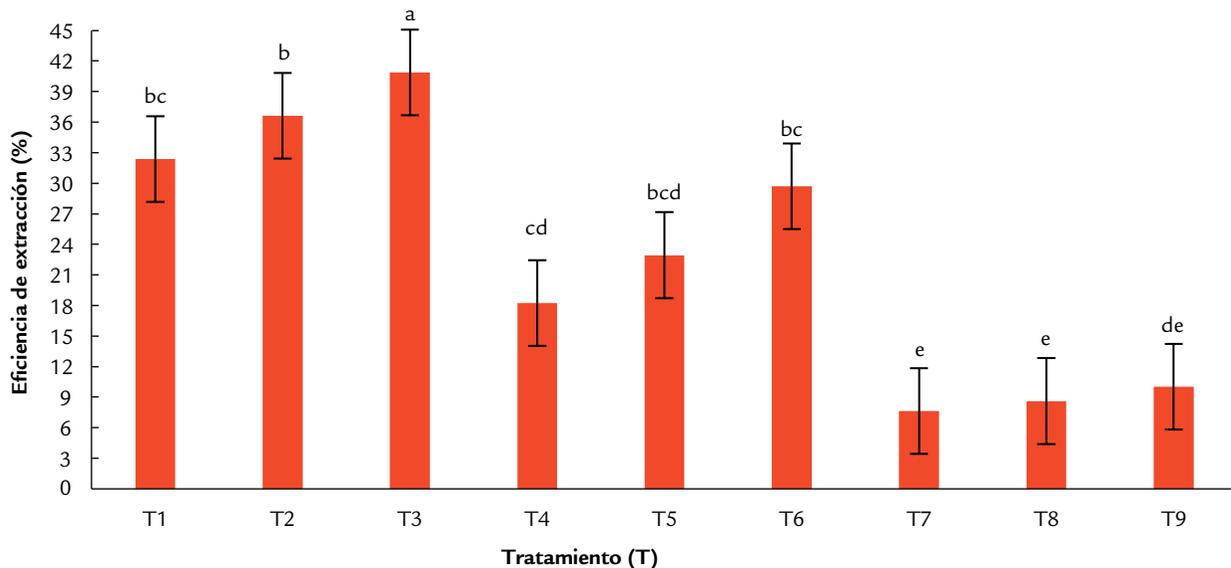


Figura 2. Efecto de los diferentes tratamientos en la eficiencia de extracción de sustancias bioactivas totales de *Pleurotus ostreatus* por maceración dinámica, empleando etanol acuoso como solvente a diferentes concentraciones (50 %, 80 %, 95 %) y diferentes relaciones sólido/solvente (1:10, 1:20, 1:30). Los tratamientos (T) evaluados fueron: T1(50 %, 1:10); T2 (50 %, 1:20); T3 (50 %, 1:30); T3 (80 %, 1:10); T4 (80 %, 1:20); T5 (80 %, 1:30); T6 (95 %, 1:10); T7 (95 %, 1:20); T7 (95 %, 1:30). Los datos corresponden a la media de la eficiencia a partir de tres experimentos independientes por tratamiento. Como análisis estadístico se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con un nivel de confianza del 95%. Las letras sobre las barras representan las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Polisacáridos totales

T2 presentó el valor de eficiencia más alto, correspondiente al 17,23 %, seguido de T3 y T6, con eficiencias del 10,99 % y 11,66 %. Los resultados de la prueba de Tukey revelaron

que los tres mejores tratamientos presentaron similitud estadística entre sí (Fig 3a). El ANOVA multifactorial arrojó un valor p de $1,17 \times 10^{-09}$ para [etOH], de 0,000166 para R/N y de 0,040940 para la interacción entre ellos; lo que

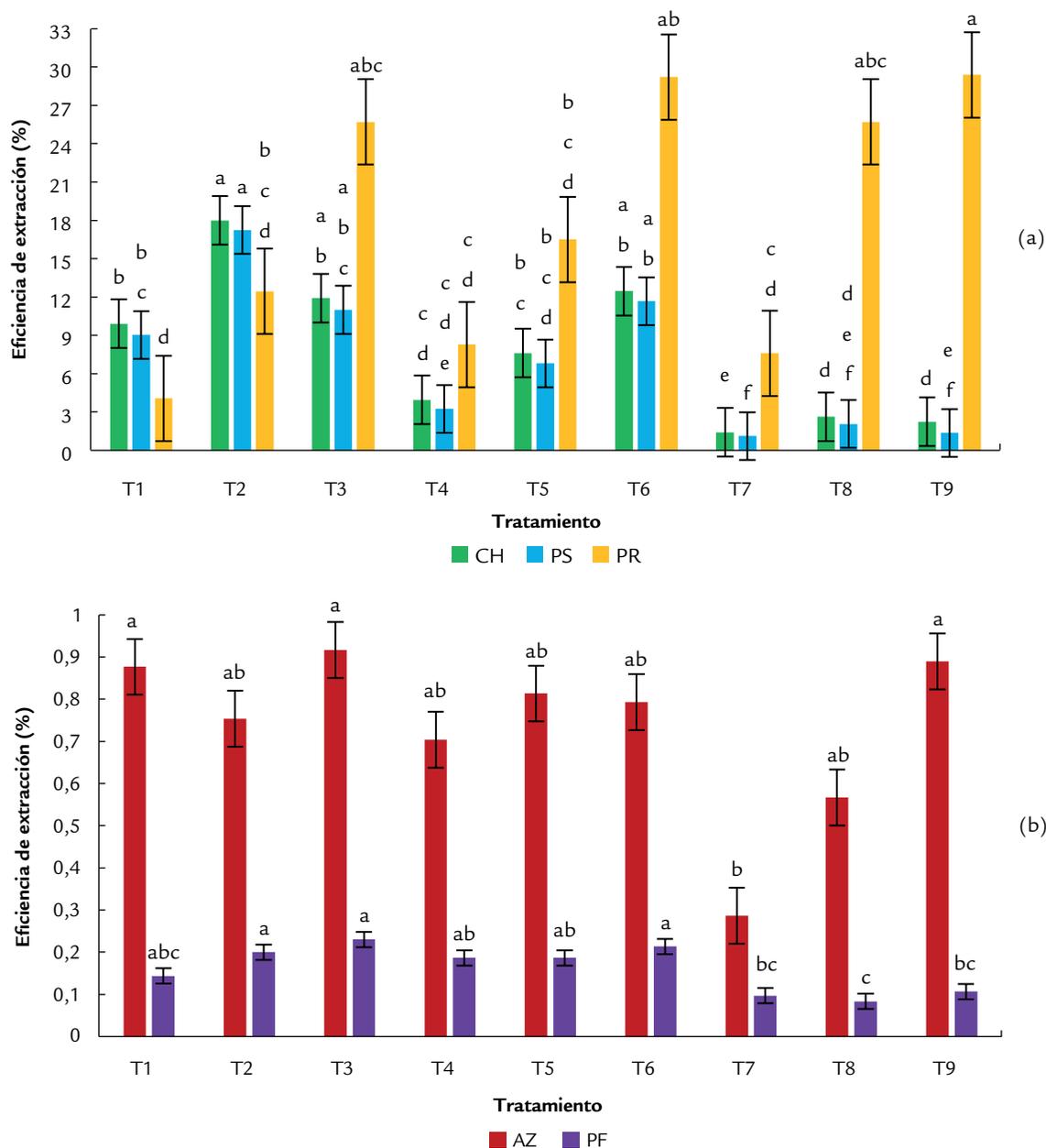


Figura 3. Efecto de los diferentes tratamientos en la eficiencia de extracción selectiva (por componentes) de sustancias bioactivas de *Pleurotus ostreatus* por maceración dinámica, empleando etanol acuoso como solvente a diferentes concentraciones (50 %, 80 %, 95 %) y diferentes relaciones sólido/solvente (1:10, 1:20, 1:30). Donde; CH = carbohidratos; PS = polisacáridos; PR = proteínas; AZ = azúcares reductores; PF = polifenoles. Los tratamientos (T) evaluados fueron: T1(50 %, 1:10); T2 (50 %, 1:20); T3 (50 %, 1:30); T3 (80 %, 1:10); T4 (80 %, 1:20); T5 (80 %, 1:30); T6 (95 %, 1:10); T7 (95 %, 1:20); T7 (95 %, 1:30). Los datos corresponden a la media de la eficiencia a partir de tres experimentos independientes por tratamiento. Como análisis estadístico se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con un nivel de confianza del 95%. Las letras sobre las barras representan las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

demonstró que ambos factores, al igual que su interacción, tienen una influencia estadísticamente significativa sobre ESB (%) de polisacáridos totales.

Polifenoles

Los tratamientos que presentaron las eficiencias más altas fueron T3, T6 y T2 (0,23 %, 0,21 % y 0,20 %,

respectivamente), los cuales no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí, según la prueba de Tukey (Fig. 3b). El ANOVA multifactorial arrojó un valor p de $1,27 \times 10^{-06}$ para [etOH], de 0,0351 para R/N y de 0,1107 para la interacción entre ellos, lo que indica que ambos factores tienen influencia significativa sobre la ESB(%) de polifenoles, pero su interacción no.

Proteínas

T9 y T6 tienen la ESB (%) más alta (29,39 % y 29,21 % respectivamente), seguidos de T3 y T8 (25,7 % cada uno). Según la prueba de Tukey, T9 presenta diferencias estadísticamente significativas con el resto de tratamientos, aunque es similar T6, T3 y T8 (Fig. 3a). Por otro lado, T3 y T8 no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí. El ANOVA multifactorial arrojó un valor p de 0,169 para [etOH], de $3,25 \times 10^{-05}$ para R/N y de 0,686 para la interacción entre ellos, lo que quiere decir que el único factor que tiene influencia estadísticamente significativa sobre la ESB(%) de proteínas es R/N.

Beta-glucanos

Al realizar las lecturas de los diferentes tratamientos, los beta-glucanos no fueron detectados por el espectrofotómetro. Es probable que los parámetros de operación no hayan favorecido la extracción o que el método de cuantificación no haya sido lo suficientemente sensible.

DISCUSIÓN

Control de temperatura

Algunos tratamientos como T3, T6 y T9 disminuyeron su temperatura en el transcurso de la maceración, lo que se debió principalmente a la alta concentración del etanol, una sustancia con alta presión de vapor que absorbe energía del medio para volatilizarse (Griffin, 2009; Thorpe y Thorpe, 2010). Otros tratamientos como T1, T4 y T7 aumentaron su temperatura en el transcurso de la maceración, ya que la baja R/N permitió la concentración de las saponinas fúngicas (Nikiforova *et al.*, 2009), cuya actividad surfactante promovió la formación de puentes de hidrógeno y, por lo tanto, la retención del alcohol en la matriz sólida porosa (hongo molido), evitando su volatilización (Nam y Lee, 1999).

Sin embargo, los cambios de °T no fueron lo suficientemente grandes como para evaluar la influencia de este parámetro en el proceso de extracción.

Gil-Ramírez *et al.* (2013) evaluaron la influencia de los parámetros de operación en el método de Extracción por Agua Presurizada y obtuvieron la máxima actividad hipocolesterolemica (76 %) a una °T de 25 °C. Cuando aumentaron la °T a 200 °C obtuvieron la mayor eficiencia (55 %), aunque la bioactividad fue casi nula. Lo anterior indica que la bioactividad es una variable influenciada por ciertos parámetros de operación. Se recomienda su evaluación para estudios posteriores.

Eficiencia de extracción de sustancias bioactivas totales

En la literatura no se encontraron estudios donde se haya usado etanol al 50 % en la extracción de sustancias

bioactivas totales de *Pleurotus* spp. por maceración dinámica, que permitiera contrastar las eficiencias de extracción con los tres mejores tratamientos de esta investigación (T3, T2 y T1), que operaron a esa concentración. Sólo la patente KR20160072674A describe el método de extracción de sustancias bioactivas de *P. ostreatus* por reflujo, empleando diferentes concentraciones de etanol (25, 50, 75, 95 %) sin revelar eficiencias de extracción (Akiko *et al.*, 2002; Kim, 2014). Si bien, un estudio realizado con la levadura *Kluyveromyces lactis* reveló que el etanol al 40-50 % es un agente eficaz de permeabilización a °T de 5 °C y °T de 30 °C, favoreciendo la difusión de las sustancias bioactivas (Flores *et al.*, 1994). La Farmacopea Brasileña (2010) aconseja extraer las sustancias bioactivas a partir de matrices sólidas vegetales con etanol al 60 %, ya que este es un solvente de naturaleza general y alta polaridad que permite extraer la mayor parte de constituyentes químicos del material biológico (Ćujić *et al.*, 2016).

En cuanto a la R/N, no se pudo hacer comparaciones, ya que sólo Alam *et al.*, (2010) y Lin *et al.*, (2014) informaron una R/N de 1:22 para la extracción, por maceración dinámica, de *P. ostreatus* y *P. eryngii*, respectivamente. Wang *et al.* (2002) patentaron un extracto medicinal de *P. ostreatus* por maceración estática, usando una R/N de 1:4. Tetsuro *et al.* (2004) patentaron un proceso de extracción de sustancias bioactivas de *P. ostreatus* por decocción o reflujo, usando una R/N entre 1:3 y 1:10, del mismo modo que Kim (2014), quien a diferencia usó una R/N de 1:40. Cheung y Wu (2013) extrajeron las sustancias bioactivas de *Cordyceps sinensis* por Extracción Asistida por Ultrasonido (UAE, por sus siglas en inglés) y encontraron que la R/N tiene influencia significativa sobre la Ef (%), ya que el rendimiento del extracto en base seca disminuyó cuando la relación aumentó de 1:30 a 1:70. El mayor rendimiento se obtuvo con la R/N de 1:30, al igual que en esta investigación.

La influencia de [etOH] y R/N en la eficiencia de extracción de sustancias bioactivas totales de *Pleurotus* spp. por maceración dinámica no había sido estudiada en ninguna investigación anterior. Aunque analizando la literatura se encontró una correlación negativa entre [etOH] y Ef (%), ya que al emplear etanol al 70 % la eficiencia fue del 15,7 % (Hapsari *et al.*, 2012), con etanol al 80 % la eficiencia disminuyó al 13,8 % (Alam *et al.*, 2010) y con etanol absoluto la eficiencia se redujo a tan sólo el 0,23 % (Choi *et al.*, 2013). Se evidenció que al igual que en esta investigación, un aumento en [etOH] se traduce en una disminución en Ef (%).

En el presente trabajo se obtuvo una Ef (%) de aproximadamente el 41 %, lo que representó un gran avance en materia de viabilidad, teniendo en cuenta que las mayores Ef (%) reportadas en la literatura para la extracción de sustancias bioactivas totales de *P. ostreatus* por maceración dinámica correspondieron al 15,7 % (Hapsari *et al.*, 2012) y 22,2 % (Alam *et al.*, 2010), usando como solvente etanol

70 % a 50 °C y agua a 70 °C, respectivamente. En cuanto a la maceración estática, la mayor Ef (%) reportada es del 10 %, empleando agua a ebullición para la obtención de extractos de *P. cornucopiae* con actividad antioxidante (Pahila *et al.*, 2017), y del 0,23 % para la obtención de extractos de *P. eryngii* con actividad anti-dermatitis, empleando etanol absoluto como solvente (Choi *et al.*, 2013). Lo anterior muestra que incorporar agitación durante la maceración incrementa notablemente la Ef (%) (Ćujić *et al.*, 2016).

Se logró aumentar la eficiencia en aproximadamente el doble de la reportada en la literatura, lo que aumenta la viabilidad del proceso. El extracto obtenido puede ser utilizado sólo o como ingrediente activo en composiciones farmacéuticas. En caso de utilizarse sólo, puede ser agregado a jugos y bebidas nutritivas (Mahajna *et al.*, 2006).

Eficiencia de extracción por componentes

Carbohidratos totales y azúcares reductores

Los carbohidratos de *Pleurotus* spp. son en su mayoría bioactivos, de los cuales, los beta-glucanos son los polisacáridos que presentan mayor actividad biológica (Gomes-Corrêa *et al.*, 2016). Los glucósidos cardiacos y los glucósidos esteroides son los únicos azúcares de *P. ostreatus* que presentan actividad biológica, aunque no existen estudios que evalúen su proceso de extracción (Iwalokun *et al.*, 2007; Unekwu *et al.*, 2014).

La extracción de carbohidratos totales de *Pleurotus* spp. no ha sido muy abordada porque este grupo de biomoléculas comprende gran variedad de sacáridos, que difieren en cuanto a secuencia, longitud, estructura molecular y grado de polimerización, entre otras propiedades que influyen en su actividad biológica y en su solubilidad en el solvente de extracción (Ramakrishnan y Angayarkanni, 2007; Villares, 2014).

Debido a la diversidad de carbohidratos que puede contener el extracto, una sola concentración de etanol no podría extraer todos los carbohidratos de *Pleurotus* spp., aunque en general, los azúcares son muy solubles en agua y algo solubles en etanol, mientras que los polisacáridos son por lo general insolubles a una [etOH] mayor al 80 % (Ramakrishnan y Angayarkanni, 2007; Villares, 2014), lo que explica que en este trabajo, el etanol al 50 % promovió la mayor extracción de carbohidratos totales.

Polisacáridos totales

Comúnmente, la extracción de polisacáridos fúngicos implica la maceración del hongo seco y molido en soluciones acuosas, que pueden ser alcalinas, etanólicas o solamente agua a ebullición; aunque algunos polisacáridos hidrofóbicos pueden no ser extraídos (Wang *et al.*, 2012).

La R/N de T2 (1:20), el tratamiento con la eficiencia más alta, estuvo comprendida dentro del intervalo (1:17 a 1:22) descrito en la patente CN107987180A para la extracción

de polisacáridos de *P. ostreatus* con agua caliente y etanol absoluto. Sun *et al.*, (2010), optimizaron la extracción de polisacáridos de *P. ostreatus* por maceración estática y obtuvieron su mayor pureza con una R/N de 1:22, muy similar a la de T2. No se midió la eficiencia de extracción.

Cheung y Wu (2013) optimizaron la extracción de polisacáridos de *Cordyceps sinensis* por UAE y alcanzaron la mayor eficiencia con una R/N de 1:30, como T3, el segundo mejor tratamiento. La patente CN104292348B describe la extracción de polisacáridos de *P. ostreatus* con agua caliente, seguido de etanol absoluto, con una R/N de 1:30 (Li, 2009). La patente CN104292348B describe la extracción de polisacáridos de *P. ostreatus* con agua caliente y R/N 1:30, y documenta una eficiencia de extracción del 8,3 % (Hu *et al.*, 2014). T2 duplicó la eficiencia reportada por la patente.

La influencia significativa de la R/N coincidió con el estudio de Sun *et al.*, (2010), quienes optimizaron mediante el Método de Superficie de Respuesta (RSM) el proceso de extracción acuosa de polisacáridos de *P. ostreatus* por maceración estática. Jiao *et al.* (2017) también optimizaron por RSM el proceso de Extracción Enzimática Asistida (EAE) de polisacáridos de *P. djamor*, y obtuvieron su mayor eficiencia (3,61 %) operando con una R/N de 1:57. La alta R/N pudo haber causado la baja eficiencia de extracción, ya que es un factor con influencia significativa, como indica el ANOVA multifactorial. Yuan *et al.* (2017) también hallaron influencia significativa de la R/N en la extracción de polisacáridos de *Russula griseocarnosa*; la eficiencia aumentó entre la R/N de 1:20 y la R/N de 1:50, y posteriormente disminuyó. El resto de autores no evaluaron la influencia de la R/N, pero usaron las siguientes proporciones de forma predeterminada: 1:10 (Mitra *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016), 1:15 (Liu *et al.*, 2015), 1:25 (Ma *et al.*, 2014), 1:30 (Li y Shah, 2016), 1:50 (Radzki *et al.*, 2016).

La influencia significativa del Factor [etOH] coincidió con el estudio de Liu *et al.* (2010), que optimizaron el proceso de extracción de polisacáridos de *Pleurotus* spp. por UAE. Para los autores, el etanol al 90 % permitió la máxima eficiencia de extracción, correspondiendo al 7,1 % para *P. nebrodensis*, 7,5 % para *P. eryngii* y 8,2 % para *P. cornucopiae*. Sin embargo, las eficiencias fueron muy bajas en contraste con otros estudios, debido a que las [etOH] mayores al 80 % sólo permiten la extracción selectiva de lípidos, azúcares reductores, proteínas y moléculas de bajo peso molecular (Tong *et al.*, 2009; Dalonso *et al.*, 2010; Maity *et al.*, 2011; Mitra *et al.*, 2013; Facchini *et al.*, 2014; Komura *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2015; Radzki *et al.*, 2016; Jiao *et al.*, 2017). El etanol a concentraciones altas es el alcohol más favorable para la precipitación de los polisacáridos fúngicos, por lo que resulta más útil en procesos de separación y purificación que en procesos de extracción (Villares, 2014).

Se logró superar en más del doble las eficiencias reportadas en la literatura. Mientras que en este trabajo se reportó una eficiencia máxima del 17,23 %, otros autores

sólo alcanzaron valores entre el 3,6 % y el 7,8 % (Tong *et al.*, 2009; Dalonso *et al.*, 2010; Maity *et al.*, 2011; Mitra *et al.*, 2013; Facchini *et al.*, 2014; Komura *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2015; Radzki *et al.*, 2016; Jiao *et al.*, 2017).

Polifenoles

Ćujić *et al.* (2016) obtuvieron la máxima extracción de polifenoles de *Aronia* spp. por maceración dinámica operando con una [etOH] de 50 % y una R/N de 1:20, las mismas condiciones que T2, el tratamiento más eficiente. Etanol al 50 % fue referido por algunos autores como un solvente apropiado para la solubilización de polifenoles extraíbles de plantas (Dominguez-Rodriguez *et al.*, 2017; Okiyama *et al.*, 2018).

Un modelo creado mediante RSM para evaluar la extracción de polifenoles de cáscara de granada evidenció que 1:30 fue la mejor R/N, ajustada por una [etOH] del 60 % (Sood y Gupta, 2015), coincidiendo con dos de los tratamientos más eficientes, T3 y T6, que operaron con la misma R/N y concentraciones del 50 % y 80 %, respectivamente. Tratamientos como T6, con etanol 80 % y R/N = 1:30, ya fueron reportados en la literatura como la mejor combinación en la extracción de polifenoles de *Thymus serpyllum* L. (Jovanović *et al.*, 2017). De igual modo, ya se reportó el etanol al 80 % como el mejor solvente para la extracción de polifenoles de cáscara de mandarina por UAE (Safdar *et al.*, 2017).

La influencia significativa del factor [etOH] coincidió con el estudio de Finimundy *et al.*, (2018), quienes optimizaron la extracción de polifenoles de *P. sajor-caju* mediante Extracción Asistida por Calentamiento (HAE, por sus siglas en inglés), obteniendo su mayor eficiencia a una [etOH] del 72 %, cercana T6.

Proteínas

La extracción de proteínas se realizó de acuerdo con Bravo *et al.* (2011), mezclando los extractos hidro-alcohólicos con buffer fosfato de sodio (FS) pH 7,3 en relación 1:1 y agitando durante 2-3 horas. Luego, se centrifugó en Centrifuga Thermo Scientific SL-40R a 4500 rpm durante 30 min y se mezcló el sobrenadante con acetona fría en relación 1:4. Para concentrar las proteínas, se centrifugó a 4000 x g durante 20 minutos a 4 °C (Tehrani *et al.*, 2012). El proceso de extracción de proteínas fue similar al de Karmali (2007) y Zhang *et al.* (2017), quienes también emplearon acetona fría y buffer fosfato salino a pH neutro, aunque con diferentes parámetros de operación.

Se encontraron dos patentes (KR100971874B1, CN102382181B), que describen procesos de extracción de proteínas fúngicas. El primero detalla la extracción acuosa a alta temperatura y alta presión con R/N de 1:20. El segundo detalla la extracción acuosa a baja presión y baja temperatura con una R/N de 1:10 a 1:20, seguida de una extracción en etanol (70-80 %) con los mismos parámetros

de operación (Young, 2008; Chen *et al.*, 2011). No se pudo hacer comparaciones con este trabajo, ya que los métodos de extracción eran diferentes y la eficiencia del proceso no fue relacionada en la invención.

Tao *et al.* (2009) emplearon buffer NaCl para la obtención de extractos proteicos de *P. tuber-regium*, con una ESB(%) de hasta el 42 %, superando en aproximadamente un 10 % la máxima ESB(%) obtenida en T9, el tratamiento con la eficiencia más alta. Por su parte, Xia *et al.* (2011) extrajeron proteoglicanos de *P. ostreatus* por maceración estática con agua a 80 °C y luego precipitaron las proteínas con etanol a 4 °C durante 12 h, obteniendo eficiencias de menos del 5 %. Según esto, este trabajo no representó un avance en términos de eficiencia de extracción de proteínas, ya que la eficiencia máxima fue inferior a la reportada en la literatura.

Betaglucanos

La extracción de los beta-glucanos fúngicos está en función de su estructura, de la cual depende su solubilidad en agua caliente o soluciones alcalinas (principalmente NaOH acuoso). El agua caliente extrae los beta-glucanos polares mientras que las soluciones alcalinas extraen los apolares (Zhu *et al.*, 2015). La mayoría de los betaglucanos polares presentan una o más actividades biológicas, mientras que los apolares raramente presentan actividad biológica, pero cuando lo hacen tienen mayor acción estimulante del sistema inmunológico (Bohn y BeMiller, 1995; Zeković *et al.*, 2005).

El agua de extracción tiene que estar caliente para alterar la estructura de los beta-glucanos y aumentar la solubilidad, lo que explica que en este trabajo la extracción haya sido casi nula, ya que se operó a temperatura ambiente para evitar la degradación de los compuestos fenólicos por las altas temperaturas (Valverde y Dos Santos, 2000; Zhu *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

La maceración dinámica con etanol acuoso es un método de extracción apropiado para la extracción de sustancias bioactivas totales de *Pleurotus ostreatus*. La concentración de etanol ([etOH]) y la relación sólido/solvente (R/N) son dos parámetros de operación que influyen significativamente en la eficiencia; por su parte, los cambios de temperatura, producto de la agitación de la tintura, no son lo suficientemente grandes como para evaluar su influencia en el proceso. Operar con etanol al 95 % y una R/N de 1:30 permite obtener extractos ricos en proteínas, con una eficiencia del 30 % en base seca mientras que, operar con etanol al 50 % y una R/N de 1:30, permite obtener extractos ricos en polisacáridos, azúcares reductores y polifenoles, alcanzando una eficiencia del 41 % en base seca. La eficiencia obtenida duplica la máxima reportada en la literatura, lo que representa un aporte científico y tecnológico para el proceso de maceración dinámica de matrices sólidas fúngicas con fines industriales, y en particular, para la obtención de novedosos productos nutracéuticos y cosmocéuticos.

Por otro lado, se recomienda evaluar la influencia de los diferentes parámetros de operación en la bioactividad de los extractos, ya que el potencial nutracéutico está en función de la bioactividad.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de química y a la dirección del Programa de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de Los Llanos por su apoyo logístico y económico; y al Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente por su asesoramiento.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Acevedo A, Linares M. El enfoque y rol del ingeniero industrial para la gestión y decisión en el mundo de las organizaciones. *Ind data*. 2012;15(1):9–24. Doi: <https://doi.org/10.15381/indata.v15i1.6236>.
- Alam N, Yoon KN, Lee KR, Shin PG, Cheong JC, Yoo YB, *et al*. Antioxidant activities and Tyrosinase inhibitory effects of different extracts from *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *Mycobiology*. 2010;38(4):295–301. Doi: <https://doi.org/10.4489/MYCO.2010.38.4.295>.
- Albuquerque BR, Prieto MA, Barreiro MF, Rodrigues A, Curran TP, Barros L, *et al*. Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo* L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. *Ind Crops Prod*. 2017;95:404–415. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.050>.
- Ávila R, Rivas B, Hernández R, Chirinos M. Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui*. *Multiciencias*. 2012;12(2):129–135.
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, *et al*. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng*. 2013;117(4):426–436. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>.
- Bernal Rodríguez CA. Contribución al estudio farmacotécnico del extracto estandarizado de frutos de *Physalis peruviana* L. con miras a la obtención de un producto fitoterapéutico (tesis de maestría). Bogotá D.C.: Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia; 2012. 193 p.
- Bohn JA, BeMiller JN. (1→3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr Polym*. 1995;28(1):3–14. Doi: [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00076-3](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00076-3).
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1–2):248–254. Doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Bravo KE, Muñoz K, Calderón J, Osorio EJ. Desarrollo de un método para la extracción de polifenol oxidasa de uchuva (*Physalis peruviana* L.) y aislamiento por sistemas bifásicos acuosos. *Vitae*. 2011;18(2):124–132.
- Chen H, Zhang Y, Zhang N, Ma L. Method for extracting active proteins with antioxidant and hypoglycemic functions from mushrooms. CN102382181B, 2011.
- Chen L, Zhang Y, Sha O, Xu W, Wang S. Hypolipidaemic and hypoglycaemic activities of polysaccharide from *Pleurotus eryngii* in Kunming mice. *Int J Biol Macromol*. 2016;93(Pt A):1206–1209. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.094>.
- Chen SY, Ho KJ, Hsieh YJ, Wang LT, Mau JL. Contents of lovastatin, γ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. *LWT - Food Sci Technol*. 2012;47(2):274–278. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.019>.
- Cheung YC, Wu JY. Kinetic models and process parameters for ultrasound-assisted extraction of water-soluble components and polysaccharides from a medicinal fungus. *Biochem Eng J*. 2013;79:214–220. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.08.009>.
- Choi JH, Kim HG, Jin SW, Han EH, Khanal T, Do MT, *et al*. Topical application of *Pleurotus eryngii* extracts inhibits 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice by the regulation of Th1/Th2 balance. *Food Chem Toxicol*. 2013;53:38–45. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.025>.
- Chou YM, Polansky AM, Mason RL. Transforming non-normal data to normality in statistical process control. *J Qual Technol*. 1998;30(2):133–141. Doi: <https://doi.org/10.1080/00224065.1998.11979832>.
- Čujić N, Šavikin K, Janković T, Pljevljakušić D, Zdunić G, Ibrić S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem*. 2016;194:135–142. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.008>.
- Dalonso N, Souza R, Silveira MLL, Ruzza AA, Wagner TM, Wisbeck E, *et al*. Characterization and antineoplastic effect of extracts obtained from *Pleurotus sajor-caju* fruiting bodies. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;160(8):2265–2274. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8678-9>.
- Deepalakshmi K, Mirunalini S. Efficacy of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) P.kumm. on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *New Horizons Transl Med*. 2016;3(2):73–82. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.nhtm.2016.06.002>.
- Devi KSP, Behera B, Mishra D, Maiti TK. Immune augmentation and Dalton's Lymphoma tumor inhibition by glucans/glycans isolated from the mycelia and fruit body of *Pleurotus ostreatus*. *Int Immunopharmacol*. 2015;25(1):207–217. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.01.026>.
- Dominguez-Rodriguez G, Marina ML, Plaza M. Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants. *J Chromatogr A*. 2017;1514:1–15. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.066>.

- Duarte-Trujillo AS, Pineda-insuasti JA. Influencia del tamaño de partícula, la agitación y el tiempo en la extracción de sustancias bioactivas de la seta ostra (*Pleurotus ostreatus*). Rev Biorrefinería. 2018;1(3):26–36.
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem. 1956;28(3):350–356. Doi: <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- El-fakharany EM, Haroun BM, Ng TB, Redwan EM. Oyster mushroom laccase inhibits hepatitis c virus entry into peripheral blood cells and hepatoma cells. Protein Pept Lett. 2010;17(8):1031–1039. Doi: <https://doi.org/10.2174/092986610791498948>.
- Facchini JM, Alves EP, Aguilera C, Gerna RMM, Lange-Silveira ML, Wisbeck E, *et al.* Antitumor activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma 180. Int J Biol Macromol. 2014;68:72–77. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.033>.
- Farmacopea Argentina. Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina. 7 ed. vol. 1. Buenos Aires: ANMAT; 2003. 114 p.
- Farmacopea Brasileña. Fundación Oswaldo Cruz [FIOCRUZ]. 5 ed. vol. 1. Brasília: Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria [ANVISA]; 2010. 546 p.
- Farmacopea Francesa. Traducido por Jiménez, Manuel. 2 ed. Madrid: Imprenta de D. N. Sanchíz; 1847. 483 p.
- Finimundy TC, Barros L, Calhella RC, Alves MJ, Prieto MA, Abreu RMV, *et al.* Multifunctions of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer: A highly nutritious food and a source for bioactive compounds. Food Chem. 2018;245:150–158. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.088>.
- Flores MV., Voget CE, Ertola JJ. Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. Enzyme Microb Technol. 1994;16(4):340–346. Doi: [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90177-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90177-5).
- Gao W, Sun Y, Chen S, Zhang J, Kang J, Wang Y, *et al.* Mushroom lectin enhanced immunogenicity of HBV DNA vaccine in C57BL/6 and HBsAg-transgenic mice. Vaccine. 2013;31(18):2273–2280. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.02.062>.
- Gil-Ramírez A, Clavijo C, Palanisamy M, Ruiz-Rodríguez A, Navarro-Rubio M, Pérez M, *et al.* Screening of edible mushrooms and extraction by pressurized water (PWE) of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl CoA reductase inhibitors. J Funct Foods. 2013;5(1):244–250. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.10.013>.
- Gomes-Corrêa RC, Brugnari T, Bracht A, Peralta RM, Ferreira ICFR. Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. Trends Food Sci Technol. 2016;50:103–117. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.012>.
- Griffin RD. Principles of hazardous materials management. 2a ed. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2009. 216 p.
- Gunawardena D, Bennett L, Shanmugam K, King K, Williams R, Zabarar D, *et al.* Anti-inflammatory effects of five commercially available mushroom species determined in lipopolysaccharide and interferon- γ activated murine macrophages. Food Chem. 2014;148:92–96. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.015>.
- Hapsari R, Elya B, Amin J. Formulation and evaluation of antioxidant and tyrosinase inhibitory effect from gel containing the 70% ethanolic *Pleurotus ostreatus* extract. Int J Med Arom Plants. 2012;2(1):135–140.
- Hu Q, Happy H, Yang W, Zhao L, Yan F, Anxinxin, *et al.* A method for synchronizing protein and polysaccharide extracted from *Pleurotus* processing byproducts. CN104292348B, 2014.
- Iwalokun BA, Usen UA, Otunba AA, Olukoya DK. Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. African J Biotechnol. 2007;6(15):1732–1739.
- Jiao F, Wang X, Song X, Jing H, Li S, Ren Z, *et al.* Processing optimization and anti-oxidative activity of enzymatic extractable polysaccharides from *Pleurotus djamor*. Int J Biol Macromol. 2017;98:469–478. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.126>.
- Jovanović AA, Đorđević VB, Zdunić GM, Pljevljakušić DS, Šavikin KP, Gođevac DM, *et al.* Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. Sep Purif Technol. 2017;179:369–380. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.055>.
- Karmali A. Process for simultaneous extraction and purification of fine chemicals from spent mushroom compost, mushroom stems and partially degraded mushroom fruiting bodies. EP2078755A1, 2007.
- Khan AA, Gani A, Masoodi FA, Mushtaq U, Naik AS. Structural, rheological, antioxidant, and functional properties of β -glucan extracted from edible mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Coprinus atramentarius*. Bioact Carbohydrates Diet Fibre. 2017;11:67–74. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.BCDF.2017.07.006>.
- Kim Y. Method for producing *Pleurotus ostreatus* extract with enhanced ergothioneine content and *Pleurotus ostreatus* extract produced by the same method. KR20160072674A, 2014.
- Komura DL, Ruthes AC, Carbonero ER, Gorin PAJ, Lacomini M. Water-soluble polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* var. florida mycelial biomass. Int J Biol Macromol. 2014;70:354–359. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.007>.
- Li S, Shah NP. Characterization, antioxidative and bifidogenic effects of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* after heat treatments. Food Chem. 2016;197(Pt A):240–249. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.113>.
- Li W. Process combination for extracting polysaccharide in oyster mushroom mycelium cells and determination method thereof. CN101560263A, 2009.

- Lin JT, Liu CW, Chen YC, Hu CC, Juang LD, Shiesh CC, *et al.* Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties for ethanolic extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting bodies harvested at different time. *LWT - Food Sci Technol.* 2014;55(1):374-382. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.08.023>.
- Liu X, Zhou B, Lin R, Jia L, Deng P, Fan K, *et al.* Extraction and antioxidant activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus sp.* mycelium. *Int J Biol Macromol.* 2010;47(2):116-119. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.05.012>.
- Liu X, Wang L, Zhang C, Wang H, Zhang X, Li Y. Structure characterization and antitumor activity of a polysaccharide from the alkaline extract of king oyster mushroom. *Carbohydr Polym.* 2015;118:101-106. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.058>.
- Llauradó G, Morris HJ, Lebeque Y, Venet G, Fong O, Marcos J, *et al.* Oral administration of an aqueous extract from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* enhances the immunonutritional recovery of malnourished mice. *Biomed Pharmacother.* 2016;83:1456-1463. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.08.067>.
- Ma G, Yang W, Mariga AM, Fang Y, Ma N, Pei F, *et al.* Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* residue. *Carbohydr Polym.* 2014;114:297-305. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.069>.
- Mahajna JA, Yassin M, Solomon PW. Mushroom extracts having anticancer activity. US20060045887A1, 2006.
- Maity K, Kar ME, Maity S, Gantait SK, Das D, Maiti S, *et al.* Structural characterization and study of immunoenhancing and antioxidant property of a novel polysaccharide isolated from the aqueous extract of a somatic hybrid mushroom of *Pleurotus florida* and *Calocybe indica* variety APK2. *Int J Biol Macromol.* 2011;48(2):304-310. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.12.003>.
- Martínez-Rincón LJ. Colombia y Brasil, complejidad logística: ¿verdad o mito? (Tesis de maestría). Medellín: Departamento de Organización y Gerencia, Universidad EAFIT; 2016. 48 p.
- Martínez-Sánchez A, Pérez-Pérez M. R&D project efficiency management in the Spanish industry. *Int J Proj Manag.* 2002;20(7):545-560. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0263-7863\(01\)00024-2](https://doi.org/10.1016/S0263-7863(01)00024-2).
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 1959;31(3):426-428. Doi: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Mitra P, Khatua S, Acharya K. Free radical scavenging and nos activation properties of water soluble crude polysaccharide from *Pleurotus ostreatus*. *Asian J Pharm Clin Res.* 2013;6(3):67-70.
- Mordor Intelligence. *Nutraceutical Ingredients Market - Growth, Trends and Forecasts (2017 - 2022)*. 2017. Disponible en: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/nutraceutical-ingredients-market>
- Nam SY, Lee YM. Pervaporation separation of methanol/methyl t-butyl ether through chitosan composite membrane modified with surfactants. *J Memb Sci.* 1999;157(1):63-71. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(98\)00368-8](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(98)00368-8).
- Nikiforova SV., Pozdnyakova NN, Turkovskaya OV. Emulsifying agent production during PAHs degradation by the white rot fungus *Pleurotus Ostreatus* D1. *Curr Microbiol.* 2009;58(6):554-558. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9367-1>.
- Nitschke J, Modick H, Busch E, von Rekowski RW, Altenbach H-J, Mölleken H. A new colorimetric method to quantify β -1,3-1,6-glucans in comparison with total β -1,3-glucans in edible mushrooms. *Food Chem.* 2011;127(2):791-796. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.149>.
- Okiyama DCG, Soares ID, Cuevas MS, Crevelin EJ, Moraes LAB, Melo MP, *et al.* Pressurized liquid extraction of flavanols and alkaloids from cocoa bean shell using ethanol as solvent. *Food Res Int.* 2018;114:20-29. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.055>.
- Pahila J, Kaneda H, Nagasaka R, Koyama T, Ohshima T. Effects of ergothioneine-rich mushroom extracts on lipid oxidation and discoloration in salmon muscle stored at low temperatures. *Food Chem.* 2017;233:273-281. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.130>.
- Palacios I, García-Lafuente A, Guillamón E, Villares A. Novel isolation of water-soluble polysaccharides from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Carbohydr Res.* 2012;358:72-77. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.06.016>.
- Palmer M, Chaguturu R. Academia-pharma partnerships for novel drug discovery: essential or nice to have? *Expert Opin Drug Discov.* 2017;12(6):537-540. Doi: <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1318124>.
- Radzki W, Ziaja-Sołtys M, Nowak J, Rzymowska J, Topolska J, Sławinska A, *et al.* Effect of processing on the content and biological activity of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* mushroom. *LWT - Food Sci Technol.* 2016;66:27-33. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.016>.
- Ramakrishnan S, Angayarkanni N. *Carbohydrates - organic aspects and metabolism*. Basic Biochem. professional Nurs., New Delhi: B.I. Publications Pvt. Ltda.; 2007, p. 12-19.
- Ramesh CH, Pattar MG. Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. *Pharmacognosy Res.* 2010;2(2):107-112. Doi: <https://doi.org/10.4103/0974-8490.62953>.
- Royse DJ, Sánchez JE. Producción mundial de setas *Pleurotus* spp. con énfasis en países iberoamericanos. En: Royse DJ, Sánchez JE, editores. *La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas Pleurotus spp.* San Cristóbal de Las Casas, Chiapas,

- México: El Colegio de la Frontera Sur; 2017; p. 17–25.
- Safdar MN, Kausar T, Jabbar S, Mumtaz A, Ahad K, Saddozai AA. Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *J Food Drug Anal.* 2017;25(3):488–500. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.010>.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999;299:152–178. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
- Smith RM. Before the injection - Modern methods of sample preparation for separation techniques. *J Chromatogr A.* 2003;1000(1):3–27. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00511-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00511-9).
- Sood A, Gupta M. Extraction process optimization for bioactive compounds in pomegranate peel. *Food Biosci.* 2015;12:100–106. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.09.004>.
- Suárez Arango C, Nieto IJ. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: Una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Rev Iberoam Micol.* 2013;30(1):1–8. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.03.011>.
- Sun Y, Li T, Yan J, Liu J. Technology optimization for polysaccharides (POP) extraction from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* by Box-Behnken statistical design. *Carbohydr Polym.* 2010;80(1):242–247. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.018>.
- Szwengiel A, Stachowiak B. Deproteinization of water-soluble β -glucan during acid extraction from fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Carbohydr Polym.* 2016;146:310–319. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.015>.
- Tao Y, Zhang Y, Zhang L. Chemical modification and antitumor activities of two polysaccharide-protein complexes from *Pleurotus tuber-regium*. *Int J Biol Macromol.* 2009;45(2):109–115. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.04.010>.
- Tehrani MHH, Fakhrehoseini E, Nejad MK, Mehregan H, Hakemi-Vala M. Search for proteins in the liquid extract of edible mushroom, *Agaricus bisporus*, and studying their antibacterial effects. *Iran J Pharm Res.* 2012;11(1):145–150.
- Tetsuro I, Akiko I, Fumitake S. Physiologically active substance EEM-S originating in mushrooms, process for producing the same and drugs. US6783771B2, 2004.
- Thorpe E, Thorpe S. The pearson general knowledge manual. Nueva Delhi: Pearson; 2010. 800 p.
- Tong H, Xia F, Feng K, Sun G, Gao X, Sun L, *et al.* Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresour Technol.* 2009;100(4):1682–1686. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.004>.
- Unekwu HR, Audu JA, Makun MH, Chidi EE. Phytochemical screening and antioxidant activity of methanolic extract of selected wild edible Nigerian mushrooms. *Asian Pacific J Trop Dis.* 2014;4(Supl 1):153–157. Doi: [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60431-X](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60431-X).
- Valverde E, Dos Santos M. Extracción de materias primas vegetales. En: Pinzón R, editor. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos.* Bogotá D.C.: Área de Ciencia y Tecnología del Convenio Andrés Bello & Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacéuticos (RIPROFITO) del subprograma X del CYTED; 2000. p. 27–60.
- Valverde ME, Hernández-Perez T, Paredes-López O. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *Int J Microbiol.* 2013;1–14. Doi: <https://doi.org/10.1155/2015/376387>.
- Villares A. Polysaccharides from mushrooms: a natural source of bioactive carbohydrates. En: Benkeblia N, editor. *Polysaccharides: natural fibers in food and nutrition.* Boca Raton, Florida: CRC Press; 2014. p. 150–64.
- Wang HX, Ng TB. Isolation of a novel ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostreatus* mushroom with anti-human immunodeficiency virus, translation-inhibitory, and ribonuclease activities. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276(2):587–593. Doi: <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3540>.
- Wang QB, Xu ZP, Liu NN. Research of fermentation, separation and purification in production of extracellular glucan from *Sclerotium rolfsii*. En: Sung W-P, Kao JC, Chen R, editores. *Frontiers of energy and environmental engineering.* Hong Kong: CRC Press; 2012. p. 711–715.
- Wang R, Huang Y, Zhao W. *Pleurotus* extract and use in treating hypertension. US20030161842A1, 2002.
- Wieser JA, Martin J, Sarnat BL. Process for preparing medicinal mycological preparations. US10092609B2, 2015.
- Xia F, Fan J, Zhu M, Tong H. Antioxidant effects of a water-soluble proteoglycan isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 2011;42(3):402–407. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2010.08.012>.
- Yan B, Jing L, Wang J. A polysaccharide (PNPA) from *Pleurotus nebrodensis* offers cardiac protection against ischemia-reperfusion injury in rats. *Carbohydr Polym.* 2015;133:1–7. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.076>.
- Young KK. Extraction method of protein polysaccharide using extraction process of high hydrostatic pressure and hydrothermal and mushroom processed foodstuffs manufacturing method of the same. KR100971874B1, 2008.
- Yuan Y, Liu Y, Liu M, Chen Q, Jiao Y, Liu Y, *et al.* Optimization extraction and bioactivities of polysaccharide from wild *Russula griseocarnosa*. *Saudi Pharm J.* 2017;25(4):523–530. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.04.018>.
- Zekovic DB, Kwiatkowski S, Vrvic MM, Jakovljevic D, Moran CA. Natural and Modified (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. *Crit Rev Biotechnol.* 2005;25(4):205–230. Doi: <https://doi.org/10.1080/07388550500376166>.
- Zhang C, Li S, Zhang J, Hu C, Che G, Zhou M, *et al.* Antioxidant and hepatoprotective activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus eryngii* SI-04. *Int J Biol Macromol.* 2016a;91:568–577. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.104>.

- Zhang J, Sun L, Zapata PA, Arias M, Atehortuac L, Webster TJ. Anti-Inflammatory Bone Protective Effects of Nano-Protein Extracts from Mushroom Species: *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus ostreatus*. J Nanosci Nanotechnol. 2017;17(8):5884–5889. Doi: <https://doi.org/10.1166/jnn.2017.13854>.
- Zhang Y, Hu T, Zhou H, Zhang Y, Jin G, Yang Y. Antidiabetic effect of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. Int J Biol Macromol. 2016b;83:126–132. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.045>.
- Zhu F, Du B, Bian Z, Xu B. Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities. J Food Compos Anal. 2015;41:165–173. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.01.019>.