

**COMPOSICIÓN MICOQUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA SETA *Pleurotus ostreatus* EN DIFERENTES ESTADOS DE CRECIMIENTO****Mycοchemical composition and antioxidant activity of *Pleurotus ostreatus* mushroom in different growth stages**Yaixa BELTRÁN DELGADO¹^{*}, Humberto MORRIS QUEVEDO¹^{*}, Oliva Daliannis DOMÍNGUEZ²^{*}, Pedro BATISTA CORBAL³^{*}, Gabriel LLAURADÓ MAURY¹^{*}¹Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente, Avenida Patricio Lumumba s/n, Santiago de Cuba, Cuba.²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Carretera de Manzanillo Km 17½. Peralejo, Bayamo, Granma, Cuba.³Centro de Toxicología y Biomedicina, Universidad de Ciencias Médicas, Autopista Nacional Km 1 ½ s/n, Santiago de Cuba, Santiago de Cuba, Cuba^{*}For correspondence: yaixa@uo.edu.cuReceived: 10th January 2019, Returned for revision: 4th June 2019, Accepted: 8th July 2020.

Associate Editor: Carolina Firacative.

Citation/Citar este artículo como: Beltrán Delgado Y, Morris Quevedo H, Oliva Domínguez D, Batista Corbal P, Llauradó Maury G. Composición micoquímica y actividad antioxidante de la seta *Pleurotus ostreatus* en diferentes estados de crecimiento. Acta Biol Colomb. 2021;26(1):89-98. Doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v26n1.84519>**RESUMEN**

Pleurotus sp. es un género de basidiomicetos ampliamente distribuido a nivel mundial, con especies que revisten importancia, no solo desde el punto de vista comercial por su valor nutricional, sino también por sus propiedades medicinales. Sin embargo, aún son insuficientes los estudios micoquímicos y se desconoce su relación con las propiedades antioxidantes de bioproductos obtenidos de estas setas durante diferentes estados de crecimiento. En el presente trabajo, se determinó el contenido de proteínas, carbohidratos, azúcares reductores, fenoles totales y flavonoides, así como la actividad antioxidante *in vitro* (ensayos de captación de radicales DPPH y estimación del poder reductor) de extractos acuosos de *Pleurotus ostreatus* en dos estados de crecimiento (primordios y cuerpos fructíferos maduros) durante la fermentación sólida. El contenido de proteínas, azúcares reductores y flavonoides fue superior en el extracto acuoso de cuerpos fructíferos maduros, mientras que los carbohidratos y fenoles totales fueron mayores en el extracto de primordios. Los valores de EC₅₀ en los ensayos de DPPH y los de poder reductor fueron de 1,72 mg/mL y 3,27 mg/mL para el extracto de primordios y de 0,44 mg/mL y 0,48 mg/mL para el de cuerpos fructíferos maduros, respectivamente. Los resultados sugieren que las propiedades antioxidantes de extractos acuosos de *Pleurotus ostreatus* (primordios y cuerpos fructíferos maduros) reflejan las variaciones en la concentración de moléculas bioactivas, teniendo en cuenta las particularidades fisiológicas de las fases de crecimiento. Ello podría resultar de utilidad para el diseño de protocolos de obtención de bioproductos de *Pleurotus ostreatus* con aplicaciones potenciales como antioxidantes en las industrias alimentaria y farmacéutica.

Palabras clave: antioxidante, fermentación, nutraceuticos, setas.**ABSTRACT**

Pleurotus sp. is a genus of Basidiomycetes widely distributed worldwide, with species that are important not only from the commercial point of view for its nutritional value, but also for their medicinal properties. However, mycochemical studies and the relationship with the antioxidant properties of bioproducts obtained from these mushrooms during different growth stages are still insufficient. In this work, the content of proteins, carbohydrates, reducing sugars, total phenols and flavonoids was determined, as well as the *in vitro* antioxidant activity (tests of scavenging DPPH and reducing power estimation) of aqueous extracts of *Pleurotus ostreatus* in different growth stages (primordia and mature fruiting bodies) during the solid fermentation. The content of proteins, reducing sugars and flavonoids was higher in the aqueous extract of mature fruiting bodies, while carbohydrates and total phenols were increased in the extract of primordia. The EC₅₀ values in the DPPH and reducing power assays were 1.72 mg/mL and 3.27 mg/mL for primordia extract and 0.44 mg/mL and 0.48 mg/mL in the case of mature fruiting bodies extract, respectively. The results suggest that the antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* aqueous extracts (primordia and mature fruiting bodies), reflected the variations in the concentration of bioactive molecules, taking into account the physiological characteristics of the growth phases. This could be useful in designing protocols for obtaining bioproducts from *Pleurotus ostreatus* with potential applications as antioxidant in food and pharmaceutical industries.

Keywords: antioxidant, fermentation, nutraceuticals, mushrooms.

INTRODUCCIÓN

Los hongos comestibles medicinales se han utilizado desde épocas remotas como parte integral de la dieta normal del hombre. Por ello pueden considerarse como alimentos funcionales con beneficios a la salud humana, además de sus propiedades nutricionales (Rathore *et al.*, 2017). Al respecto, se ha propuesto un modelo en pirámide para el uso de este tipo de hongos en cuanto a sus cualidades como alimento, suplementos dietéticos y atributos medicinales (Chang y Wasser, 2012).

De manera general, los hongos contienen una serie de componentes que contribuyen a su valor nutricional, tales como proteínas, vitaminas y minerales. Además, presentan fibra dietética y abundancia de aminoácidos esenciales (Suárez y Nieto, 2013). También contienen compuestos de interés terapéutico, que incluyen moléculas de alto peso molecular como polisacáridos (principalmente β -D- glucanos), heteroglucanos, quitina, peptidoglucanos, proteoglucanos, lectinas y ácido ribonucleico, así como moléculas de bajo peso molecular como lactonas, fenoles, terpenoides y alcaloides, antibióticos y agentes quelantes de metales (Gargano *et al.*, 2017).

La amplia gama de metabolitos secundarios identificados está relacionada con los procesos de biogénesis de los hongos comestibles, en los cuales influyen principalmente la naturaleza de los nutrientes que conforman el sustrato donde se desarrollan (Suárez y Nieto, 2013), además de las condiciones climáticas. Ello conlleva a que hongos presentes en regiones diferentes o que crezcan en sustratos que varíen en composición, puedan modificar su metabolismo (Sakamoto, 2018).

Los hongos comestibles se incluyen o clasifican dentro de los Basidiomicetos. Dentro de ellos, el género *Pleurotus* está ampliamente distribuido y se cultiva en muchos países (Carrasco-González *et al.*, 2017). Este género resulta interesante desde el punto de vista nutricional debido a su contenido de proteínas, lípidos, niveles tolerables de ácidos nucleicos y por la presencia de vitaminas, minerales, fibra dietética y beta-glucanos (Golak-Siwulska *et al.*, 2018), además, de su valor medicinal (Caz *et al.*, 2015; Morris *et al.*, 2017).

En la actualidad, el análisis comparativo de las propiedades funcionales y medicinales de los hongos es una problemática, y una de las causas reside en la heterogeneidad de la composición química y en los métodos de preparación de los productos, entre ellos los extractos y la purificación de los compuestos (Meneses *et al.*, 2016). De ahí la necesidad de explorar la composición micoquímica de los bioproductos de estas setas en sus diferentes estados de crecimiento, ya sea durante la fermentación sólida o en el cultivo sumergido, ya que pueden utilizarse en el diseño de nuevas formulaciones nutraceuticas para el mejoramiento de la salud humana. Se requieren nuevos productos de origen natural, que además de contener nutrientes, tengan un efecto preventivo y

terapéutico para diferentes desórdenes patológicos asociados al desbalance redox en el organismo, tales como cáncer, artritis reumatoide, aterosclerosis y procesos degenerativos asociados con la edad (Liguori *et al.*, 2018).

Tomando en cuenta estos elementos, en el presente trabajo se determinaron los componentes macromoleculares mayoritarios, así como el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de extractos acuosos obtenidos de la especie *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P.Kumm. (1871), en diferentes estados de crecimiento durante la fermentación sólida.

Los trabajos publicados en este tema evidencian una amplia variación de la composición bioquímica y de las actividades biológicas de *Pleurotus* spp., influenciadas por las condiciones de cultivo. En este sentido, y al menos hasta la revisión realizada, este es el primer trabajo que aborda este aspecto, utilizando como sustrato la pulpa de café residual que se genera en grandes volúmenes en países caficultores de América Latina. Los resultados sientan las bases para la aplicación de los bioproductos obtenidos de esta seta, en las fases de crecimiento estudiadas, en las industrias alimentaria y médico-farmacéutica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

La investigación se desarrolló en la Planta de Investigación-Producción de Setas Comestibles del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Universidad de Oriente, Cuba. Se utilizó la cepa de *P. ostreatus* CCEBI 3024, depositada en la Colección de Cultivos del CEBI. Los primordios y cuerpos fructíferos maduros se obtuvieron por fermentación en estado sólido, utilizando como único sustrato pulpa de café (*Coffea canephora*), bajo las condiciones de cultivo referidas por Bermúdez *et al.* (2001). El estudio fue realizado de enero a junio de 2017.

Obtención de los extractos a partir de primordios y cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*

Una vez colectados, los primordios y cuerpos fructíferos maduros se fragmentaron en trozos pequeños. Se utilizaron 500 g de material fresco, a los que se les adicionó 3 mL de agua destilada por cada gramo de biomasa. Los extractos se obtuvieron mediante tratamiento térmico de la biomasa durante diez horas a 90-95 °C.

Ambos extractos se centrifugaron a 3000 rpm durante diez min y se filtraron a través de una membrana de 0,22 μ m. Se determinó el contenido de materia seca en cada caso. Los extractos resultantes se conservaron a 4 °C durante el período experimental.

En la presente investigación se establecieron las condiciones de cultivo y la obtención de los extractos de

P. ostreatus referidas al tipo de solvente, la temperatura y el tiempo de extracción, las cuales se contemplan en la patente de invención, descrita por Morris *et al.* (2011). "Procedimiento para la obtención de un preparado inmunocéutico de *Pleurotus spp*". Certificado No. 23717 (Resolución 1754/2011) Ref: 2011/1337 de la República de Cuba.

Composición micoquímica de los extractos

Cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó según Lowry *et al.* (1951). Las absorbancias se midieron a 595 nm en espectrofotómetro (T60 UV-Visible Spectrophotometer). Se utilizó albúmina de suero bovino, BSA (BDH, Alemania) para la curva patrón ($y = 0,0018x + 0,0249$; $R^2 = 0,9927$). Los resultados se expresaron como μg en equivalentes de BSA por mL del extracto y como g en equivalente de BSA por 100 g del extracto (base seca).

Cuantificación de carbohidratos

Los carbohidratos totales se cuantificaron de acuerdo con el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Se determinó la absorbancia en espectrofotómetro (T60 UV-Visible Spectrophotometer) a una longitud de onda de 490 nm. Se utilizó glucosa (Sigma) para la curva de calibración ($y = 0,0033x - 0,0408$; $R^2 = 0,995$). Los resultados se expresaron como μg en equivalentes de glucosa por mL del extracto y como g en equivalente de glucosa por 100 g del extracto (base seca).

Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores se determinaron mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) (Miller, 1959). La absorbancia se determinó a 540 nm en espectrofotómetro (T60 UV-Visible Spectrophotometer). La glucosa (Sigma) se utilizó para la curva de calibración ($y = 0,0004x - 0,007$; $R^2 = 0,9942$). Los resultados se expresaron como g en equivalente de glucosa por 100 g del extracto en seco.

Cuantificación de fenoles totales

La determinación del contenido de fenoles totales se llevó a cabo según Slinkard y Singleton (1977) con el empleo del reactivo de Folin-Ciocalteu al 50 % (MERK). Se determinó la absorbancia a 765 nm en espectrofotómetro (T60 UV-Visible Spectrophotometer) y se comparó con una curva de calibración de ácido gálico (Sigma) ($y = 15,944x - 0,0475$; $R^2 = 0,9983$). Los resultados se expresaron como mg en equivalentes de ácido gálico por 100 g del extracto (base seca).

Determinación del contenido de flavonoides

La estimación del contenido de flavonoides se realizó por el método descrito por Zhishen *et al.* (1999). Se tomaron 250 μL de los extractos, los cuales se mezclaron con 1,25 mL de agua destilada y 75 μL de una solución al 5 % de NaNO_2

(Riedel-de Haën). Luego de cinco min se añadieron a la mezcla 150 μL de una solución acuosa de AlCl_3 (Reachim) al 10 %. Después de transcurridos seis min, se añadieron 500 μL de NaOH (Riedel-de Haën) 1 M y 275 μL de agua destilada. La solución se mezcló bien y se leyó a 510 nm en un espectrofotómetro (T60 UV-Visible Spectrophotometer). Se utilizó catequina (Sigma) para la curva de calibración ($y = 0,9629x - 0,0002$; $R^2 = 0,9999$). Los resultados se informaron como mg en equivalentes de catequina por 100 g del extracto (base seca).

Actividad antioxidante de los extractos

El efecto antioxidante *in vitro* de los extractos se evaluó mediante el ensayo de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) según Shimada *et al.* (1992). Se empleó el radical 2,2 difenil -1-picrilhidracilo (DPPH) (MERCK) a una concentración de 1 mM. A 0,25 mL de los extractos a diferentes concentraciones (0,06-1 mg/mL), se le adicionó 1,5 mL de la solución etanólica de DPPH. Se agitó con vórtex (Heidolph REAX2000) y se mantuvo en la oscuridad por 20 minutos. Posteriormente se procedió a leer las absorbancias en espectrofotómetro (T60 UV-Visible Spectrophotometer) a 517 nm. La capacidad de secuestro del radical se determinó por el cálculo del porcentaje de inhibición de dicho radical mediante la ecuación: $I_p \text{ DPPH} \% = (\text{AP} - \text{AM}) / \text{AP} * 100$, donde AP= Absorbancia del Blanco y AM= Absorbancia de la muestra. Se expresó además la capacidad de secuestro de este radical en función de las concentraciones de los extractos a las que se alcanza el 50 % de la inhibición (EC_{50}).

Por otra parte, se estimó el poder reductor según Huang y Mau (2006). A 2,5 mL de los extractos se le añadió 2,5 mL de ferricianuro de potasio (Reachim) (1 %). La mezcla se incubó durante 20 min a 50 °C y una vez frías se les adicionó 2,5 mL de ácido tricloroacético (10 %). Se centrifugó (Tehtnica ŽELEJNI) a 2000 rpm durante diez min. Posteriormente se tomaron 5 mL del sobrenadante y se añadió 5 mL de agua destilada y 1 mL de cloruro férrico (Sigma Aldrich) (1 g/L). Luego la absorbancia se midió en espectrofotómetro (T60 UV-Visible Spectrophotometer) a 700 nm. Se utilizó el ácido ascórbico como sustancia antioxidante de referencia para el ensayo de poder reductor. El poder reductor se expresó como la concentración de los extractos a los que se alcanza el 50 % de la absorbancia máxima (EC_{50}).

Análisis estadístico

Las muestras se procesaron por triplicado en experimentos independientes. Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm desviación estándar. Se utilizó la prueba t-Student para todos los ensayos con una $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó con el programa STATGRAPHICS Centurion XV (Statgraphics Technologies, Inc, E.U.A).

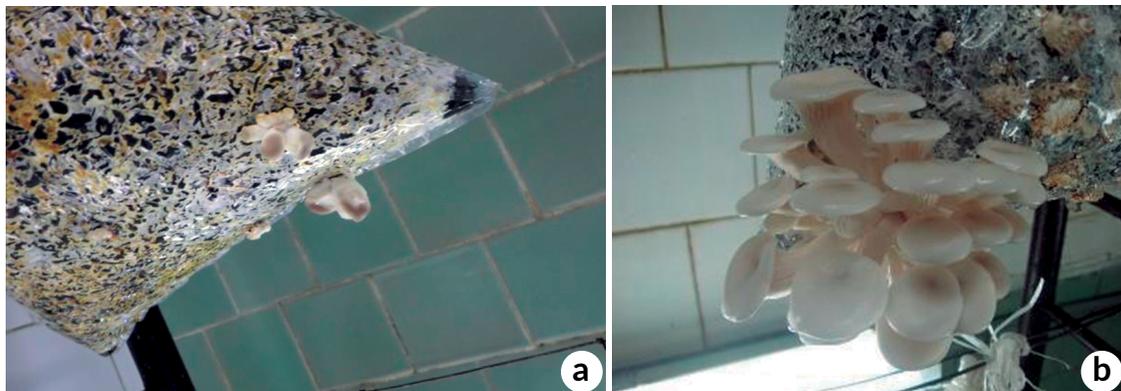


Figura 1. Fases de crecimiento correspondientes a primordios y cuerpos fructíferos maduros de *Pleurotus ostreatus*. **a)** primordios y **b)** cuerpos fructíferos maduros, creciendo sobre pulpa de café. Foto tomada por los autores en la Planta de Investigación- Producción de Setas Comestibles del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestran las características morfológicas de *P. ostreatus* en las fases de crecimiento de primordios y cuerpos fructíferos maduros cultivada sobre pulpa de café a los 17 y 20 días, respectivamente.

Composición micoquímica de los extractos

La composición macromolecular referida a proteínas presentes en los extractos mostró una concentración de $48,7 \pm 0,05$ g/100 g de materia seca en el extracto de cuerpos fructíferos maduros obtenido a altas temperaturas, mientras que el extracto de primordios tuvo un valor de $45,3 \pm 0,01$ g/100 g de materia seca (Tabla 1). Existen diferencias estadísticas significativas para $p < 0,05$.

Por otra parte, la concentración de carbohidratos totales en el extracto de primordios presentó un valor de $50,5 \pm 0,00$ g/100 g de materia seca. En el caso del extracto de cuerpos fructíferos maduros, el valor fue de $43,3 \pm 0,01$ g/100 g de materia seca (Tabla 1). Estos valores presentaron diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

En cuanto a los azúcares reductores, el extracto de cuerpos fructíferos maduros mostró una concentración de $37,5 \pm 0,01$ g/100 g de materia seca, mientras que la concentración en el extracto de primordios fue de $28,7 \pm 0,00$ g/100 g de materia seca. Estos valores presentaron diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

Los resultados correspondientes al contenido de fenoles totales en los extractos de *P. ostreatus* en diferentes etapas de crecimiento durante la fermentación sólida se presentan en la Tabla 1. Los resultados indicaron la existencia de una concentración de compuestos fenólicos en el extracto de primordios ($19 \pm 0,16$ mg/100 g), con valores más altos, en comparación con los obtenidos en el extracto de cuerpos fructíferos maduros ($9,1 \pm 0,62$ mg/100 g). Estos valores presentaron diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

El extracto de cuerpos fructíferos maduros a altas temperaturas mostró un valor de flavonoides de $5,46 \pm 0,04$ mg/100 g y el extracto de primordios de $3,58 \pm 0,03$ mg/100 g, existiendo diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ (Tabla 1).

Evaluación de la actividad antioxidante

En la figura 2 se muestran los porcentos de captación del radical DPPH y los valores de EC_{50} de ambos extractos acuosos de *P. ostreatus* en las diferentes etapas de crecimiento de la fermentación sólida. Los resultados mostraron que, en el extracto de primordios, los porcentos de captación del radical estuvieron en el rango de 15-35 %, superiores a los mostrados por el extracto caliente de cuerpos fructíferos maduros (16-26 %). Los valores de EC_{50} se estimaron en función de las concentraciones de los extractos a las que se alcanza el 50 % de la captación máxima. Se obtuvo un

Tabla 1. Composición micoquímica de los extractos acuosos de *Pleurotus ostreatus*

Extractos	Proteínas	Carbohidratos	Azúcares reductores	Fenoles totales	Flavonoides
	g/100 g	g/100 g	g/100 g	mg/100g	mg/100g
EC-CF	$48,7 \pm 0,05^*$	$43,3 \pm 0,01$	$37,5 \pm 0,01^*$	$9,10 \pm 0,62$	$5,46 \pm 0,04^*$
EC-P	$45,3 \pm 0,01$	$50,5 \pm 0,00^*$	$28,7 \pm 0,00$	$19,0 \pm 0,16^*$	$3,58 \pm 0,03$

*Indica diferencias estadísticamente significativas. t- Student ($p < 0,05$).
Cuerpos fructíferos: EC-CF; primordios: EC-P

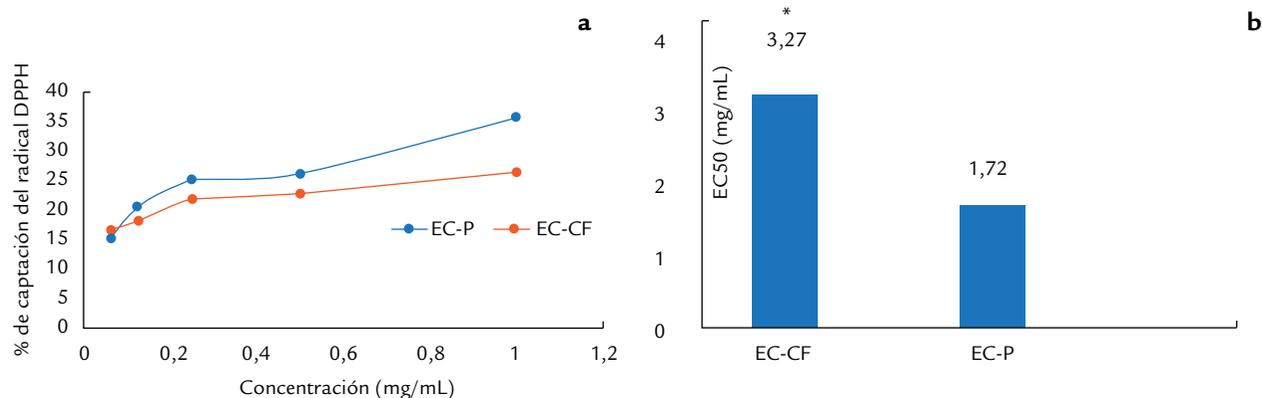


Figura 2. a. Captación del radical DPPH de extractos acuosos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* en diferentes etapas de crecimiento. **b.** Valores de EC_{50} de los extractos. *indica diferencias estadísticamente significativas (t-student, $p < 0,05$). Cuerpos fructíferos: EC-CF; primordios: EC-P

valor de 3,27 mg/mL en el extracto de cuerpos fructíferos maduros, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) frente al del extracto de primordios, que resultó de 1,72 mg/mL.

Las curvas representativas del poder reductor de los extractos acuosos en diferentes etapas de crecimiento durante la fermentación sólida de *P. ostreatus* se presentan en la figura 3. Los valores de EC_{50} obtenidos en nuestro estudio fueron de $0,48 \pm 0,02$ mg/mL para el extracto de cuerpos fructíferos maduros y de $0,44 \pm 0,03$ mg/mL en el extracto de primordios, sin diferencias significativas en el análisis estadístico realizado ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Dentro de los hongos basidiomicetos se distinguen dos fases de crecimiento, la fase reproductiva (cuerpos fructíferos) y la fase vegetativa (micelio o crecimiento micelial). Durante la colonización del sustrato, las hifas crecen y se ramifican hasta formar el micelio (Sánchez, 2017). Este último, bajo condiciones favorables de humedad y temperatura, se extiende sobre un sustrato adecuado y se transforma en pequeños conglomerados denominados primordios, que van aumentando de tamaño hasta formar los cuerpos fructíferos maduros (Pelkmans *et al.*, 2016).

Los estudios previos documentan que las esporas inmaduras y la fructificación madura de estos hongos poseen concentraciones variables de los metabolitos secundarios (Soares *et al.*, 2009). Al respecto, Barros *et al.* (2007a) refirieron que en la fase de primordios las esporas de las setas son fuentes potenciales de metabolitos. El comportamiento en términos del metabolismo secundario, en general, varía con los géneros, las especies, las cepas e incluso las diferentes fases fisiológicas de crecimiento.

En el presente trabajo se observó que la composición de proteínas, azúcares reductores y flavonoides de *P. ostreatus* fue superior en el extracto acuoso de los cuerpos fructíferos maduros.

La extracción con un solvente polar como el agua, ofrece una serie de ventajas referidas a seguridad, economía y flexibilidad. En general, su naturaleza polar permite su uso como solvente de extracción de muchos productos, como proteínas, alcoholes, azúcares, sustancias inorgánicas y ácidos orgánicos, ente otros (Chemat *et al.*, 2012).

El contenido de proteínas de los hongos depende de la composición del sustrato, el tamaño del píleo, el tiempo de cosecha y las especies de hongos (Salata *et al.*, 2018). Al respecto, se ha reportado que no solo el contenido y naturaleza de proteínas en el sustrato tienen influencias en el contenido de proteínas en los cuerpos fructíferos (Wang *et al.*, 2001).

El contenido de las proteínas de las setas comestibles resulta intermedio entre las de animales y vegetales, pero su calidad es superior por la presencia de todos los aminoácidos esenciales (Kinge *et al.*, 2016). De acuerdo con Khan y Tania (2012), las especies de *Pleurotus* son reconocidas como buena fuente de proteínas, con valores de 11 a 42 g/ 100 g peso seco. En este sentido, Rodrigues *et al.* (2015) refirieron que el contenido de proteínas en cinco especies de *Pleurotus* cultivadas de forma similar osciló entre 16,2 y 26,6 g/100 g de peso seco. Los valores obtenidos en el presente estudio resultan superiores a los reportados por esos autores.

En estudios realizados por Okwulehie *et al.* (2014) con la especie *Pleurotus pulmonarius* Quéil (1872) cultivada en diferentes sustratos (serrín de *Khaya invorensis* Chev y paja de *Andropogon gayanus* Kunth), se analizó la composición química y los valores nutricionales de dos estados de crecimiento de los cuerpos fructíferos (primordios y cuerpos fructíferos maduros). El contenido de proteínas mostró valores superiores ($7,06 \pm 0,10$ % y $8,51 \pm 0,10$ %) en los cuerpos fructíferos maduros para ambos sustratos, respectivamente.

Algunas investigaciones refieren que en los extractos obtenidos a altas temperaturas se produce la agregación y precipitación de estas biomoléculas, fundamentalmente

como resultado de las interacciones hidrofóbicas (Chávez *et al.*, 1990). Luego, ocurre una pérdida durante las etapas de filtración y de centrifugación. Ello favorecerá el aislamiento y posterior purificación de sustancias estables al calor, como los glucanos.

Las proteínas de las setas comestibles también contribuyen a potenciar determinadas actividades biológicas de interés para el tratamiento de diversas patologías. De ahí que algunos investigadores como Liu *et al.* (2013), informaron la capacidad de barrido de radicales superóxido e hidroxilo con relación a la cantidad de proteínas presentes en complejos polisacáridos-proteínas. Los autores demostraron que en las muestras polisacáridicas, donde las concentraciones de proteínas son casi nulas (trazas), la actividad antioxidante es muy baja, no así en aquellas muestras ricas en proteínas. Lo anterior correlaciona positivamente la presencia de proteínas junto a otros compuestos, con las propiedades antioxidantes de un preparado biológico.

Por otra parte, los carbohidratos constituyen los componentes prevaletentes de la materia seca de los hongos comestibles, alrededor de un 55-81 % (Valverde *et al.*, 2015). Se ha comprobado que la composición del sustrato utilizado para los cultivos de los hongos juega un papel primordial en su riqueza metabólica y dentro de ella se destacan los carbohidratos (García, 2008). El contenido total de carbohidratos de las setas, incluyendo los digeribles y los no digeribles, varía con la especie en un 35-70 % del peso seco (Díez y Álvarez, 2001). En las especies de *Pleurotus*, el contenido de carbohidratos con base en el peso seco se encuentra en un intervalo de 46,6 a 81,8 % (Rahi y Malik, 2016).

Según Kalac (2013), el contenido de carbohidratos constituye aproximadamente la mitad de la materia seca de los hongos y está presente principalmente como polisacáridos y glicoproteínas. Por ello, resultan adecuados para su incorporación a dietas bajas en calorías.

Los carbohidratos desempeñan un papel esencial durante el crecimiento y la fructificación de las setas comestibles (Zhou *et al.*, 2016). En estudios realizados por Barros *et al.* (2007b), se evaluaron los efectos de la maduración de los cuerpos fructíferos de *Lactarius deliciosus* L. ex Fr. Gray, 1821 y *Lactarius piperatus* (L.) Pers. 1797 en su composición química. Los resultados mostraron que el contenido de carbohidratos decreció en ambas especies a medida que se incrementaba la maduración de sus cuerpos fructíferos. Esto puede estar basado en el papel energético de los carbohidratos, que son catabolizados por la producción de energía a lo largo del crecimiento de la seta. Nuestros resultados apoyan este hallazgo, pues los mayores valores se detectaron en la fase de primordio.

En cuanto a los azúcares reductores, resulta de interés su determinación, pues al poseer un grupo OH hemiacetalico libre, pueden reaccionar como reductores con otras moléculas. Los extractos de polisacáridos contienen glucosa como el componente monosacárido mayoritario en la

cadena principal y en una proporción variable con respecto a otros azúcares (Klaus *et al.*, 2011). De igual forma, otras moléculas de azúcares pueden encontrarse unidas lateralmente a polisacáridos del tipo β -D-glucanos, tales como manosa, xilosa y galactosa (Wasser, 2002).

Los azúcares reductores son solo una pequeña parte del contenido de los carbohidratos, porque los polisacáridos como la quitina y el almidón son los más abundantes de los carbohidratos de los hongos (Manzi *et al.*, 2001). Al respecto, en un estudio realizado por Shukla y Jaitly (2011) con cinco especies de setas comestibles, el contenido de azúcares reductores varió entre 0,026 y 0,035 % con respecto al peso seco. El máximo contenido de azúcares reductores se encontró en las especies *P. citrinopilatus* (0,035 %) y *P. florida* (0,033 %), seguidas por *P. sajor-caju* (0,032 %), *P. djamor* (0,031 %) y *Hypsizygus ulmarius* Bull (0,026 %).

Otra de las determinaciones realizadas en la presente investigación fue la concentración de fenoles totales y flavonoides. Estas biomoléculas guardan relación con la actividad antioxidante de un producto. En particular, se considera que los polifenoles pueden ser los principales compuestos antioxidantes en hongos comestibles (Valverde *et al.*, 2015). Sin embargo, es importante evaluar el tipo particular de fenol presente en los hongos y su contribución individual a la capacidad antioxidante total.

El extracto acuoso de primordios mostró una mayor concentración de fenoles totales en comparación con el de cuerpos fructíferos maduros (Tabla 1). Este resultado concuerda con el reportado por Nattoh *et al.* (2016), quienes realizaron un estudio con cuatro fases de crecimiento de *P. djamor* R22; las fases primordiales de esta seta registraron los valores más altos para los extractos etanólico y acuoso (13,803±0,797 y 8,726±0,801 mg GAE/g peso seco, respectivamente), en cuanto a la concentración de polifenoles. Al respecto, reportaron que las setas comestibles poseen moléculas fenólicas, cuyas concentraciones variaban en las cuatro fases de crecimiento del hongo seleccionadas. Una explicación para esta observación se relaciona con la posible implicación de estos compuestos en el mecanismo de defensa, lo que reduce sus concentraciones con la maduración de los cuerpos fructíferos, como fue descrito por Radzki *et al.* (2014).

No obstante, otros trabajos refieren resultados contradictorios a los nuestros. Tal es el caso de González *et al.* (2016), quienes evaluaron de la actividad antioxidante de extractos acuosos y metanólicos de *P. ostreatus* en diferentes estados de crecimiento. Dichos autores encontraron valores de 4,21±0,01 mg GAE/g en el extracto de primordios a altas temperaturas, y 9,92±0,05 mg GAE/g en el extracto de cuerpos fructíferos. Estos valores reafirman la diferencia de concentración en dependencia de la etapa de crecimiento. Al respecto, Koutrotsios *et al.* (2017) realizaron un estudio en los basidiocarpos de dieciséis cepas de *P. ostreatus* y encontraron un contenido variable de fenoles

totales que fluctuaron entre 1,27 y 8,62 mg GAE/100 g de peso fresco. En estudios realizados en *L. piperatus* se demostró que en el estado de cuerpos fructíferos maduros con esporas inmaduras se presentan altos contenidos de fenoles y flavonoides, en comparación con aquellos donde la madurez está presente, tanto en los carpóforos como en las esporas (Barros *et al.*, 2007b).

Palacios *et al.* (2011) reportaron que la concentración de flavonoides depende de la especie en cuestión y no se correlaciona necesariamente con el contenido de compuestos fenólicos totales. En este sentido, los hongos podrían tener una aplicación comercial interesante como fuente de flavonoides, ya que en plantas están presentes en grandes concentraciones solo bajo condiciones fisiológicas específicas, como en las primeras etapas de desarrollo (Jourdan *et al.*, 1985). Al respecto, se conoce que la acumulación de metabolitos secundarios como flavonoides y fenoles, es una respuesta de hongos y plantas al estrés biótico y abiótico (Selvamani *et al.*, 2018). En particular, los ácidos fenólicos son producidos por hongos y plantas para la protección contra la luz ultravioleta, insectos e infecciones de patógenos y parásitos, entre otros. De ahí que el nivel de compuestos fenólicos depende de varios factores como técnicas de cultivo, condiciones de crecimiento, proceso de maduración, cosecha y condiciones de almacenamiento (Barros *et al.*, 2009).

Consideramos que en las preparaciones de los extractos de la presente investigación no solo se valorizan los compuestos de bajo peso molecular. Estudios previos muestran que el tiempo de extracción y los solventes polares pueden favorecer la presencia de compuestos de alto peso molecular como los polisacáridos, lo cuales se han reportado como estimuladores o supresores de componentes específicos del sistema inmune. Además, tienen la capacidad de secuestrar radicales libres y pueden tener actividades antioxidante y antienviejimiento.

La actividad antioxidante de los extractos evaluados mostró que los porcentos de captación del radical DPPH

en el extracto de primordios fueron superiores (35,6 %) a los mostrados por el extracto de cuerpos fructíferos maduros (26,25 %). El valor de EC_{50} resultó ser menor en el extracto de primordios, lo que sugiere una mejor captación del radical en este bioproducto. Alispahic *et al.* (2015), en un estudio sobre la actividad antioxidante de extractos de hongos del mercado de Bosnia, reportaron un 43,88 % de captación de este radical en un extracto metanólico de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*. Por su parte, Sudha *et al.* (2012) informaron para *P. eous* valores de 12,42-70,21 % de captación del radical DPPH en un extracto acuoso por decocción a concentraciones de 2-10 mg/mL.

El poder reductor de los hongos medicinales podría estar relacionado con la capacidad de actuar como donantes de hidrógeno (Shimada *et al.*, 1992). Dicho poder reductor es dependiente de la concentración, donde a medida que aumenta esta, si posee capacidad reductora, se incrementará la absorbancia. En nuestros resultados, a medida que aumentó la concentración de los extractos se incrementó la absorbancia a 700 nm. El incremento de la absorbancia a esta longitud de onda es proporcional a la cantidad de Fe^{3+} reducido a Fe^{2+} por la especie antioxidante evaluada.

Sudha *et al.* (2012), en un estudio sobre la actividad antioxidante de extractos de *P. eous*, obtuvieron para un extracto acuoso por decocción a 2 mg/mL, una absorbancia de 0,673. En nuestro trabajo, con 1 mg/mL, se obtuvo un valor de absorbancia de 0,538 para el extracto de cuerpos fructíferos maduros. Por otro lado, Boosong *et al.* (2016) obtuvieron una absorbancia de 0,37 a una concentración de 0,5 mg/mL en un estudio con extractos de cuerpos fructíferos de *P. sajor-caju*. Las propiedades del poder reductor, de este modo, pueden ser un indicador del potencial antioxidante de los compuestos que se evalúan (Meir *et al.*, 1995). En general, los valores de EC_{50} referidos al poder reductor de los extractos de la presente investigación (Fig. 3) no mostraron diferencias significativas entre sí, en el análisis estadístico realizado.

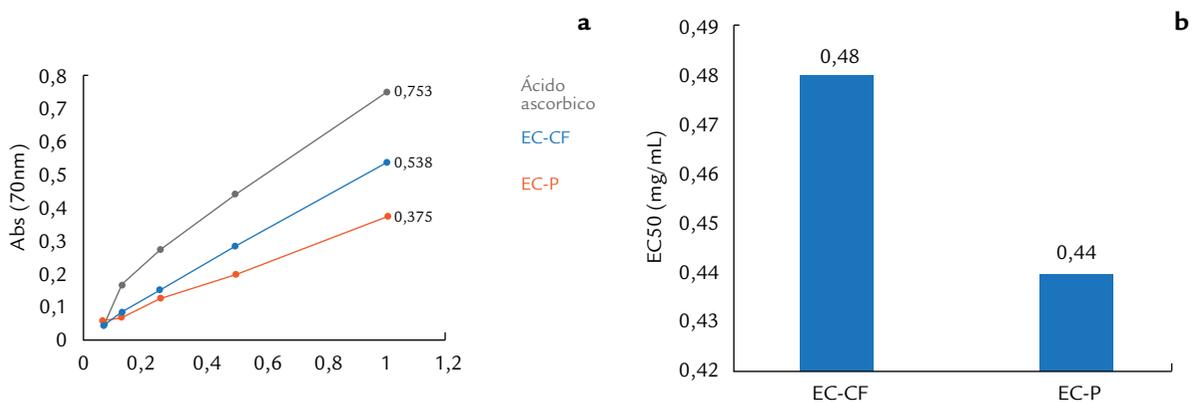


Figura 3. a. Poder reductor de extractos acuosos de *Pleurotus ostreatus* en diferentes etapas de crecimiento. **b.** Valores de EC_{50} de los extractos. **Cuerpos fructíferos:** EC-CF; primordios: EC-P

Los resultados obtenidos sugieren que la fase de primordio en la biogénesis de compuestos bioactivos en la seta comestible *P. ostreatus*, cultivada sobre pulpa de café, también podría considerarse para realizar otros estudios *in vitro* o *in vivo* que sustenten sus propiedades antioxidantes con las consiguientes aplicaciones prácticas. La investigación genera nuevos interrogantes para el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la formación y maduración de los cuerpos fructíferos de esta especie de seta.

CONCLUSIONES

La composición macromolecular de los extractos alcanzó valores superiores en la fase de crecimiento de cuerpos fructíferos maduros, con respecto al contenido de proteínas, azúcares reductores y flavonoides. Los resultados obtenidos a partir del estudio de las propiedades antioxidantes, particularmente los fenoles (2,1 veces superior en el extracto de primordios), sugieren variaciones en la concentración de moléculas bioactivas, atribuibles a la fisiología de las fases de crecimiento. Estos resultados revisten importancia para la identificación y cuantificación del perfil individual de estas moléculas con futuras aplicaciones en las industrias alimentaria y médico-farmacéutica y para el diseño y formulación de nuevos productos terapéuticos relacionados con el desbalance redox.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Proyecto Institucional de la Universidad de Oriente “Productos naturales y servicios farmacéuticos para el mejoramiento de la calidad de vida en Hospitales del Oriente de Cuba”. Este trabajo también fue soportado por la Cooperación de Desarrollo Belga, a través del Consejo de Universidades Flamencas- Programa de Cooperación Universitario para el Desarrollo mediante VLIR-UOS, en el contexto del Programa de Cooperación Institucional Universitaria con la Universidad de Oriente.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Alispahic A, Šapcanin A, Salihovic M, Ramic E, Dedic A, Pazalja M. Phenolic content and antioxidant activity of mushroom extracts from Bosnian market. *Glas hem tehnol Bosne Herceg*.2015;44:5-8
- Barros L, Ferreira MJ, Queirós B, Ferreira I, Baptista P. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem*.2007a;103:413-419. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.038>
- Barros L, Baptista P, Ferreira IC. Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food Chem Toxicol*. 2007b;45(9):1731-1737. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2007.03.006>
- Barros L, Dueñas M, Ferreira IC, Baptista P, Santos-Buelga C. Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food Chem Toxicol*.2009;47(6):1076-1079. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.039>
- Bermúdez RC, García N, Gross P, Serrano M. Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba. *Micol Aplicada Int*.2001;13(1):2529.
- Boonsong S, Klaypradit W, Wilaipun P. Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants. *AGNR*.2016;50:89-97. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.anres.2015.07.002>
- Carrasco JA, Serna SO, Gutiérrez, JA. Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies: Potential use as food ingredient. *J Food Compos Anal*.2017;58:69-81. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.016>
- Caz V, Gil A, Largo C, Tabernero M, Santamaría M, Martín-Hernández R, *et al*. Modulation of cholesterol-related gene expression by dietary fiber fractions from edible mushrooms. *J Agric Food Chem*.2015;63(33):7371-7380. Doi: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02942>
- Chang ST, Wasser SP. The Role of Culinary-Medicinal Mushrooms on Human Welfare with a Pyramid Model for Human Health. *Int J Med Mush*.2012;14(2):95-134.
- Chavéz M, Díaz J, Pérez U, Delfín J. *Temas de Enzimología (Tomo1)*. Santiago de Cuba: ENPES; 1990.
- Chemat F, Vian MA, Cravotto G. Green extraction of natural products: concept and principles. *Int J Mol Sci*.2012;13(7),8615-8627. Doi: <https://dx.doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Diez VA, Alvarez A. Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. *Food Chem*. 2001;75:417-422. Doi: [https://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00229-1](https://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00229-1)
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Robers PA, Smith F. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal Biochem*.1956;28:350-356.
- García N. Producción de setas comestibles y enzimas lacasas por fermentación en estado sólido de la pulpa de café con *Pleurotus* spp (tesis de doctorado). Santiago de Cuba: Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente; 2008. 150 p.
- Gargano ML, Van Griensven LJ, Isikhuemhen OS, Lindequist U, Venturella G, Wasser SP, *et al*. Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. *PI Biosystems*. 2017;151(3):548-565. Doi: <https://dx.doi.org/10.1080/11263504.2017.1301590>
- Golak I, Kałużewicz A, Spizewski T, Siwulski M, Sobieralski K. Bioactive compounds and medicinal properties of oyster mushrooms (*Pleurotus* sp.). *Folia Hortic*. 2018;30(2):191-201. Doi: <https://doi.org/10.2478/fhort-2018-0012>

- González I, Escalona HB, Ponce E, Téllez M, Gupta VK, Díaz G, *et al.* Evaluation of the antioxidant activity of aqueous and methanol extracts of *Pleurotus ostreatus* in different growth stages. *Front Microbiol.* 2016;7:1099. Doi: <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01099>
- Huang SJ, Mau JL. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of irradiation. *LWT- Food Sci Technol.* 2006;39:707-716. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2005.06.001>
- Jourdan PS, McIntosh CA, Mansell RL. Naringin levels in citrus tissues: II. Quantitative distribution of naringin in *Citrus paradise* MacFad. *Plant Physiol.* 1985;77:903-908. Doi: <https://dx.doi.org/10.1104/pp.77.4.903>
- Kalac P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *J Sci Food Agric.* 2013;93:209-218. Doi: <https://dx.doi.org/10.1002/jsfa.5960>
- Khan MA, Tania M. Nutritional and medicinal importance of *Pleurotus* mushrooms: an overview. *Food Rev Int.* 2012;28(3):313-329. Doi: <https://dx.doi.org/10.1080/87559129.2011.637267>
- Kinge TR, Adi EM, Mih AM, Ache NA, Nji TM. Effect of substrate on the growth, nutritional and bioactive components of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*. *Afr J Biotechnol.* 2016;15(27):1476-1486. Doi: <https://dx.doi.org/10.5897/AJB2015.15130>
- Klaus A, Kozarski M, Niksic M, Jakovljevic D, Todorovic N, Van Griensven L. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *LWT-Food Sci Technol.* 2011;44(10):2005-2011. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.010>
- Koutrotsios G, Kalogeropoulos N, Stathopoulos P, Kaliora AC, Zervakis GI. Bioactive compounds and antioxidant activity exhibit high intraspecific variability in *Pleurotus ostreatus* mushrooms and correlate well with cultivation performance parameters. *World J Microbiol Biotechnol.* 2017;33:98. Doi: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01532>
- Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.* 2018;13:757-772. Doi: <https://dx.doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- Liu J, Wu YC, Kan J, Wang Y, Jin CH. Changes in reactive oxygen species production and antioxidant enzyme activity of *Agaricus bisporus* harvested at different stages of maturity. *J Sci Food Agric.* 2013;93(9):2201-2206. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jfct.2012.10.014>
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr A, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
- Manzi P, Aguzzi A, Pizzoferrato L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chem.* 2001;73:321-325. Doi: [https://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00304-6](https://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00304-6)
- Meir S, Kanner J, Akiri B, Philosoph S. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J Agr Food Chem.* 1995;43:1813-1819. Doi: <https://dx.doi.org/10.1021/jf00055a012>
- Meneses ME, Martínez D, Torres N, Sánchez M, Aguilar M, Morales P, *et al.* Hypocholesterolemic properties and prebiotic effects of Mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 mice. *PLoS One.* 2016;11,e0159631. Doi: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0159631>
- Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 1959;31:426-428.
- Morris HJ, Beltrán Y, Llauradó G, Batista PL, Perraud-Gaime I, García N, *et al.* Mycelia from *Pleurotus* sp (oyster mushroom): a new wave of antimicrobials, anticancer and antioxidant bio-ingredients. *Int J Phytocosmetics Nat Ingredients.* 2017;2,14. Doi: <https://dx.doi.org/10.15171/ijpni.2017.03>
- Morris HJ, Llauradó G, Beltrán Y, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, *et al.* Procedimiento para la obtención de un preparado inmunocéutico de *Pleurotus* spp. Certificado No. 23717 (Resolución 1754/2011) Ref: 2011/1337.
- Nattoh G, Musieba F, Gatebe E, Mathara J. Towards profiling differential distribution of bioactive molecules across four phenologies in *Pleurotus djamor* R22. *Asian Pac J Trop Dis.* 2016;6(6):472-480. Doi: <https://dx.doi.org/10.5251/abjna.2016.7.1.9.18>
- Okwulehie IC, Urama J, Okorie DO. Chemical composition and nutritional value of mature and young fruiting bodies of *Pleurotus pulmonarius* produced on *Andropogon gayanus* straw and *Khaya ivorensis* sawdust. *IOSR J Pharm Biol Sci.* 2014;9(3):72-77.
- Palacios I, Lozano M, Moro C, Arrigo MD, Rostagno MA, Martínez JA, *et al.* Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chem.* 2011;128(3):674-678. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.085>
- Pelkmans J, Lugones LG, Wösten HA. Fruiting bodies formation in basidiomycetes. 15. In *Growth, differentiation and sexuality*. 3rd edition. Switzerland: Springer International Publishing. 2016. p. 387-405.
- Radzki W, Slawinska A, Jablonska-Rys E, Gustaw W. Antioxidant capacity and polyphenolic content of dried wild edible mushrooms from Poland. *Int J Med Mush.* 2014;16(1):65-75. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.016>
- Rahi DK, Malik D. Diversity of mushrooms and their metabolites of nutraceutical and therapeutic significance. *J Mycol.* 2016. Doi: <https://dx.doi.org/10.1155/2016/7654123>
- Rathore H, Prasad S, Sharma S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *PharmaNutrition.* 2017;5(2):35-46. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.phanu.2017.02.001>

- Rodrigues D, Vasconcelos M, Gomes A, Freitas A, Roriz M, Duarte AC. Chemical composition and nutritive value of *Pleurotus citrinopileatus* var *cornucopiae*, *P. eryngii*, *P. salmoneo stramineus*, *Pholiota nameko* and *Hericium erinaceus*. J Food Sci Technol. 2015;52(11):6927-6939. Doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s13197-015-1826-z>
- Sakamoto Y. Influences of environmental factors on fruiting body induction, development and maturation in mushroom-forming fungi. Fungal Biol Rev. 2018;32(4):236-248. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2018.02.003>
- Sałata A, Lemieszek M, Parzymies M. The nutritional and health properties of an oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr) P. Kumm). Acta Sci Pol Hortoru. 2018;17:185-197. Doi: <http://dx.doi.org/10.24326/asphc.2018.2.16>
- Sánchez C. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. Synth Syst Biotechnol. 2017;21(1):13-22. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.synbio.2016.12.001>
- Selvamani S, El-Enshasy HA, Dailin DJ, Malek R, Hanapi S, Ambehatabi K, et al. Antioxidant Compounds of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus*. Int J Biotechnol Wellness Ind. 2018;7(1):1-14.
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J Agr Food Chem. 1992;40:945-948. Doi: <https://dx.doi.org/10.1021/jf00018a005>
- Shukla S, Jaitly AK. Morphological and Biochemical Characterization of Different Oyster Mushroom (*Pleurotus* spp.) J Phytol. 2011;3(8):18-20.
- Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analyses: automation and comparison with manual method. Am J Enol Vitic. 1977;28:49-55.
- Soares AA, Souza CGM, Daniel FM, Ferrari GP, Costa SMG, Peralta RM. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. Food Chem. 2009;112:775-781. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.117>
- Suárez C, Nieto IJ. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. Rev Iberoam Micol. 2013;30(3):1-8. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2012.03.01>
- Sudha G, Vadivukkarasi S, Shree RBI, Lakshmanan P. Antioxidant activity of various extracts from an edible mushroom *Pleurotus eous*. Food Sci Biotechnol. 2012;21(3):661-668. Doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s10068-012-0086-1>
- Valverde ME, Hernández-Pérez T, Paredes-López O. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. Int J Microbiol. 2015.14pag. Doi: <https://dx.doi.org/10.1155/2015/376387>
- Wang D, Sakoda A, Suzuki M. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. Bioresour Technol. 2001; 78(3):293-300. Doi: [https://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00002-5](https://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00002-5)
- Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl Microbiol Biotechnol. 2002;60(3):258-274. Doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s00253-002-1076-7>
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 1999;64:555-559. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- Zhou S, Ma F, Zhang X, Zhang J. Carbohydrate changes during growth and fruiting in *Pleurotus ostreatus*. Fungal Biol. 2016; 120 (6-7): 852-861. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.03.007>