



**Tesis presentada en opción al Título
Académico de Máster en Biotecnología**

Mención Industrial

**Actividad antioxidante de extractos
acuosos de *Pleurotus ostreatus*
obtenidos por diferentes métodos de
extracción**

Autora: Lic. Lisandra Mirian Cutiño Viñals

Tutores: MSc. Yaixa Beltrán Delgado

Dr.C Humberto Joaquín Morris Quevedo

Consultante: Isabel Gaime Perraud, PhD

Dedicatoria

A mi madre, por impulsar cada uno de los logros de mi vida

Agradecimientos

Uno de los momentos más felices de terminar la tesis de maestría, es escribir los agradecimientos...

A mi madre, pues gracias a su educación y apoyo incommensurable he llevado a feliz término este capítulo de mi vida académica, y los que vendrán.

A mi padre, por estar presente desde la distancia.

A mis tutores, el profesor Humberto Morris, por permitirme encauzar este tema de investigación, y por su asesoría; y a la profesora Yaixa Beltrán por su ayuda práctica en la realización de los experimentos y atinada revisión del documento.

A mis tíos y primos, por haber sido _y porque sé que continuarán_ siendo incondicionales conmigo.

A mi mexicanita Gaby, por hacer aquellos días extensos de trabajo en el laboratorio jornadas alegres y provechosas, por aquellos viajes y salidas que nunca olvidaremos, y por supuesto a Itzel por ayudarnos, y por tantas risas y momentos simpáticos y a Juan Carlos, por habernos acompañado en el inicio de los experimentos.

Al claustro de la maestría en Biotecnología, por todo lo aprendido, y los consejos dados, y a todos los trabajadores del CEBI por poder contar con ellos siempre, especialmente a Migdalia, Yancisy y Leonor, por molestarlas tanto y recibir siempre un trato agradable de su parte.

A mis queridos profesores y amigos del departamento, por soportar mis malacrianzas y por sus valiosos consejos, especialmente Yanna, Bernardo y Abdíel.

A Sus, Andy y Mar por sus consejos y ayuda en la realización de los experimentos, la estadística y la presentación de los resultados, y por las fiestas vividas y las que nos faltan.

A Dani por su ayuda en el laboratorio, prestándome instrumental o criticando mi trabajo.

A Javier Ernesto, por ayudarme en aquellas curvas y en la estadística.

A la dirección del Departamento de Biología y Geografía por exhortar la realización de esta tesis, y a todos mis profesores de allí, los que están y los que estuvieron

A Anolandis, Carmen y Librada por su apoyo imprescindible con reactivos, cristalería y equipos de laboratorio.

A la profesora Bigán por sus consejos y apoyo, sobre todo en la docencia de Bioquímica, para la realización de este trabajo

A mis compañeros de la maestría, por hacer llevaderas y divertidas las clases, por las risas y los nervios, y por aquellos días en La Habana: Deylis, Imilsi, Jose, Angel, Yadira, Traida, Didi, Henry, Yanet, Radamés, Dagmara, Yancysi, Alieski... sin ustedes no hubiera sido lo mismo

A la familia de Javier, porque siempre puedo contar con ellos

A mis viejos y nuevos amigos por alentarme

Y por supuesto a Javier, porque no cabe en estas páginas todo lo que tendría que agradecerte...

A todo el que contribuyó de una manera u otra en la realización de esta tesis, todos tendrán mi gratitud por siempre.

Listado de siglas

ABTS: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AE: Extracto de acetona
APD: Agar-Papa-Dextrosa
ARN: Ácido ribonucleico
ANOVA: Análisis de varianza
BHA: Ácido β hidroxianisol
BHT: Butil hidroxitolueno
CCCC: Diseño experimental central compuesto cara centrado
DBO: 2, 3-diazabicyclo [2, 2, 2] oct-2-eno
DCC: Diseño central compuesto
DPPH: 2,2 difenil -1-picrilhidrazilo
EAG: Equivalente de ácido gálico
EAU: Extracción asistida por ultrasonido
EC₂₅: Concentración efectiva al 25%
EC₅₀: Concentración efectiva al 50%
EM: Extracción de maceración
EMA: Error medio absoluto
ESC: Extracción con solvente convencional
ER: Equivalente de resveratrol
ERN: Especies reactivas del nitrógeno
ERO: Especies reactivas de oxígeno
ES: Extracción mediante Soxhlet
FES: Fermentación en estado sólido
FRAP: Poder de reducción/antioxidante del ion férrico
GRAS: Generalmente reconocidos como seguros
IC₅₀: Concentración inhibitoria al 50%
LOO: Radical peroxilo
LOOH: Lípidos hidroperóxidos
LPO: Peroxidación lipídica
LSD: Prueba de Rangos Múltiples de la Diferencia Menos Significativa Protegida de Fisher
MSR: Metodología de superficie de respuesta
NADPH: Nicotina adenina dinucleótido fosfato
PE: Extracto de éter de petróleo
TE: Equivalente de trolox
TEAC: Capacidad antioxidante equivalente al trolox
VCEAC: Capacidad antioxidante equivalente a la vitamina C
YPG: Levadura Peptona Glucosa

Resumen

Micoquímicos, como los fenólicos, son de interés por sus propiedades antioxidantes, y posible protección contra enfermedades cardiovasculares y cáncer. Para obtenerlos es necesario liberarlos de su compleja matriz, sin grandes cantidades de solvente ni largos tiempos de extracción. En este trabajo se emplearon diferentes métodos para la obtención de extractos acuosos del micelio vegetativo de *Pleurotus ostreatus* producido por fermentación sumergida, para evaluar su actividad antioxidante *in vitro*. Se realizaron extracciones empleando agua caliente (100 °C), sonda ultrasónica y baño ultrasónico; en tiempos de 5 y 15 minutos. El mayor contenido de fenoles totales se obtuvo en la extracción con agua caliente (100 °C) tanto a 5 (183.70 mg EAG/100 g MS) como a 15 min (213.77 mg EAG/100 g MS). Las extracciones mediante ultrasonido durante 5 (EC₅₀ = 2.69 mg/mL: sonda) (EC₅₀ = 3.75 mg/mL: baño) y 15 min (EC₅₀ = 2.81 mg/mL: sonda) (EC₅₀ = 2.05 mg/mL: baño) tuvieron una mayor actividad de captación del radical DPPH, de manera similar fue el comportamiento en el ensayo de poder reductor. Asimismo, se utilizó un diseño de superficie de respuesta compuesto central cara centrado para evaluar el efecto del tiempo de extracción, potencia ultrasónica y gramos de micelio sobre la actividad antioxidante de extractos obtenidos empleando la sonda ultrasónica. La optimización múltiple de estas respuestas se alcanza con 5 minutos, 314 W de potencia y 1.26 gramos de micelio, prediciendo 367.48 mg EAG/100 g MS de fenoles totales, y a la concentración de 1.6 mg/mL, 40.77% de captación del DPPH y un poder reductor de 0.66. Los extractos obtenidos a 100 °C en los dos tiempos evaluados resultaron los de mayor contenido de fenoles totales. Los extractos obtenidos mediante sonda ultrasónica estuvieron entre los de mejores propiedades antioxidantes tanto en el ensayo de DPPH como en el de poder reductor. El diseño empleado permitió predecir los efectos de las variables sobre las respuestas estudiadas.

Palabras clave: extracción ultrasónica, fenoles, micelio vegetativo, superficie de respuesta

Abstract

Micochemicals, such as phenolic compounds, are of great interest due to their antioxidant properties, and possible protection against cardiovascular diseases and cancer. To obtaining them is necessary its release from their complex matrix, without using large amounts of solvent and long extraction times. In this work different methods were used for to obtain the aqueous extracts of vegetative mycelium of *Pleurotus ostreatus*, produced by submerged fermentation, to evaluate their *in vitro* antioxidant activity. The extractions were performed using hot water (100 °C), ultrasonic probe and ultrasonic bath; in times of 5 and 15 minutes. The highest total phenolic content was obtained in hot water extraction (100 °C) at both 5 (183.70 mg AGE/100 g MS) and 15 min (213.77 mg AGE/ 100 g MS). Ultrasound extractions for 5 (EC₅₀ = 2.69 mg/mL: probe) (EC₅₀ = 3.75 mg / mL: bath) and 15 min (EC₅₀ = 2.81 mg/mL: probe) (EC₅₀ = 2.05 mg/mL: bath) had higher DPPH inhibition activity; the behavior in the reducing power test was similar. Likewise, a face centered central composite response surface design was used to evaluate the effect of extraction time, ultrasonic power and grams of mycelium on total phenols and antioxidant activity of extracts obtained using the ultrasonic probe. Multiple optimization of these responses is achieved with 5 minutes, 314 W of power and 1.26 grams of mycelium, predicting 367.48 mg AGE/100 g MS of total phenols, and for an extract concentration of 1.6 mg/mL, 40.77% of DPPH inhibition and reducing power of 0.66. The extracts obtained at 100 °C in the two evaluated times were those with the gighest total phenolic content. The extracts obtained through an ultrasonic probe were among those with the best antioxidant properties in the DPPH and reducing power tests. The used design allowed to predict the effects of the variables on the studied responses.

Key words: phenols, response surface, ultrasonic extraction, vegetative mycelium

Índice

Introducción.....	1
Capítulo 1 Revisión bibliográfica.....	4
1.1 Características del estrés oxidativo	4
1.2 Propiedades medicinales de los hongos comestibles-medicinales	5
1.3 <i>Pleurotus ostreatus</i> : un hongo con propiedades nutricionales y medicinales.....	6
1.3.1 Clasificación taxonómica	6
1.3.2 Morfología.....	7
1.3.3 Valor nutricional	7
1.3.4 Cultivo sumergido.....	8
1.3.5 Propiedades antioxidantes	8
1.4 Extracción de compuestos bioactivos: de lo tradicional a lo moderno	10
1.4.1 Extracción de compuestos bioactivos mediante ultrasonido.....	10
1.5 Metodología de superficie de respuesta en el análisis del efecto de variables de la extracción asistida por ultrasonido.....	14
1.5.1 Diseño compuesto central	16
Capítulo 2 Materiales y métodos.....	17
2.1 Organismo utilizado y condiciones de cultivo	17
2.2 Obtención de biomasa micelial	17
2.3 Fenoles totales y actividad antioxidante de extractos obtenidos por diferentes métodos de extracción.....	17
2.3.1 Métodos de extracción	17
2.3.2 Determinación del contenido de fenoles totales.....	18
2.3.3 Evaluación de la actividad antioxidante.....	18
2.3.4 Análisis estadístico.....	19
2.4 Efecto de tres variables sobre la extracción con sonda ultrasónica utilizando la metodología de superficie de respuesta.....	19
2.4.1 Diseño experimental.....	19
2.4.2 Análisis estadístico.....	20
2.4.3 Determinación de los puntos de optimización de las variables estudiadas de la extracción asistida por ultrasonido	21
Capítulo 3 Resultados y discusión.....	22
3.1 Fenoles totales y actividad antioxidante de extractos acuosos de <i>P. ostreatus</i> obtenidos mediante agua (100 °C) y ultrasonido.....	23
3.1.1 Fenoles totales	23
3.1.2 Evaluación de la actividad antioxidante.....	27
3.2 Efecto del tiempo de extracción, potencia ultrasónica y gramos de micelio sobre los fenoles totales y la actividad antioxidante de extractos obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido	30

3.2.1 Fenoles totales	31
3.2.2 Captación del radical DPPH.....	34
3.2.3 Poder reductor	37
3.2.4 Determinación de los puntos de optimización de los variables estudiadas de la extracción asistida por ultrasonido	40
Conclusiones	41
Recomendaciones	42
Literatura citada	43

Introducción

El problema endógeno más importante que enfrentan los sistemas biológicos, es la producción incontrolada de especies reactivas de oxígeno (ERO), muy activas, productos que tienen uno o más electrones no apareados [Revisado por Wu y Hansen (2008)]. Estos radicales libres están involucrados en la aparición de muchas enfermedades como el cáncer, la artritis reumatoide y la aterosclerosis, así como en los procesos degenerativos asociados con el envejecimiento (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Los sistemas de defensa antioxidante solo pueden prevenir parcialmente el daño oxidativo (Simic, 1988). Por lo tanto, esta insuficiencia tiene que ser compensada mediante el uso de antioxidantes exógenos naturales (Doughari *et al.*, 2009).

Una fuente muy notable de estos antioxidantes son los hongos comestibles y medicinales. Por esta y otras 130 propiedades medicinales (Wasser, 2014), los proyectos de investigación en curso tienen como objetivo promover a los hongos como "bioterapéuticos" de nueva generación (Patel y Goyal, 2012). Los hongos se pueden usar principalmente como alimento para un estado saludable, los productos refinados puros se pueden usar como un medicamento para el estado enfermo, y los productos de extracto crudo se usan principalmente como suplementos dietéticos para un estado no saludable, así como para estados saludables y enfermos (Chang y Wasser, 2012).

Entre los hongos comestibles, las especies de *Pleurotus* (hongo ostra) se han utilizado en todo el mundo debido a su valor nutricional, propiedades medicinales y otros efectos beneficiosos (Zhang *et al.*, 2014). La mayoría de investigaciones han estado enfocadas al estudio de la composición química y propiedades medicinales del cuerpo fructífero. Sin embargo, el proceso de producir cuerpos fructíferos o basidiomas requiere mucho tiempo y esfuerzo, ya que exige grandes volúmenes de sustrato, espacio y mano de obra calificada, factores que dificultan la investigación en el laboratorio (Inácio *et al.*, 2015). El crecimiento de los cultivos de células de hongos en condiciones sumergidas en un medio de cultivo líquido acelera el proceso, lo que resulta en el rendimiento de biomasa en unos pocos días y la obtención de sustancias nutricionales estandarizadas (Lull *et al.*, 2005). Por esa razón, hoy en día se están haciendo muchos intentos para obtener metabolitos bioactivos a partir de micelios en fase vegetativa a través del cultivo en fermentación sumergida.

La actividad antioxidante de los hongos se ha correlacionado con la presencia de compuestos fenólicos y otros compuestos que pueden eliminar los radicales libres (Sulistiany *et al.*, 2016). Sin embargo, uno de los principales problemas para obtener compuestos nutricionalmente valiosos a partir de los hongos de una manera energéticamente eficiente y económicamente sostenible es la dificultad de liberarlos de su compleja matriz y su ubicación intracelular, evitando el uso de grandes cantidades de solvente y un largo tiempo de extracción (Roselló-Soto *et al.*, 2016).

Para afrontar estas limitaciones, se han desarrollado métodos no convencionales de extracción como el ultrasonido. Esta es una tecnología clave para lograr el objetivo de la química y la extracción sostenible y "verde" (Chemat *et al.*, 2017).

La eficiencia de la extracción de antioxidantes está influenciada por múltiples factores tales como: tasa líquido/sólido, pH (Rodrigues *et al.*, 2008) potencia de sonicación,

temperatura, ciclo de trabajo, tiempo de sonicación, tiempo de extracción (Chavan y Singhal, 2013), frecuencia (Chukwumah *et al.*, 2009), así como aspectos relacionados con el solvente (Wei, 2008). La detección individual de estos factores a la vez es laboriosa y requiere mucho tiempo de trabajo experimental (Belwal *et al.*, 2016).

La metodología de superficie de respuesta (MSR) puede superar estas dificultades, pues ofrece información acerca de los efectos de la posible interacción entre las variables (Khuri, 1996). De acuerdo a Baş y Boyacı (2007) la MSR consiste en un grupo de técnicas matemáticas y estadísticas que pueden usarse para definir las relaciones entre la respuesta y las variables independientes, solas o en combinación, en los procesos. Además de analizar los efectos de las variables independientes, esta metodología experimental también genera un modelo matemático.

Este modelo matemático permite predecir las condiciones a las que los parámetros de extracción deben fijarse con el propósito de optimizar el proceso de extracción. La optimización implica la dilucidación de las condiciones a las cuales aplicar un procedimiento de tal modo que produzca la mejor respuesta posible (Araujo y Brereton, 1996). La metodología de superficie de respuesta se ha empleado para optimizar la extracción asistida por ultrasonido de compuestos con actividad antioxidante, tales como fenoles en *Vitis vinifera*, (González-Centeno *et al.*, 2014) *Lycium ruthenicum* (Chen *et al.*, 2018) y en la melaza de azúcar de remolacha (Chen *et al.*, 2015) así como polisacáridos en *Pleurotus eryngii* (Zhang *et al.*, 2014).

En el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, se encuentran depositadas en la colección de cultivos, cepas del género *Pleurotus*. Las caracterizaciones micoquímicas y los estudios realizados *in silico*, *in vitro* e *in vivo* con la cepa CCEBI 3024 de la especie *P. ostreatus* (Jacq. ex Fr) P. Kumm (1871), sugieren la presencia de importantes compuestos bioactivos, con actividad inmunomoduladora, antioxidante y antitumoral.

Existen evidencias científicas de que la extracción de antioxidantes en plantas y hongos es potenciada por la extracción asistida por ultrasonido (EAU), en tanto en otros casos, se obtienen resultados comparables a los de las extracciones convencionales. Por ello, en el presente trabajo se formuló la siguiente **pregunta de investigación**:

- ¿Existen diferencias en la actividad antioxidante *in vitro* de extractos acuosos de micelio vegetativo de *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3024 obtenidos mediante ultrasonido y agua a 100°C?

A partir de este, se formuló el siguiente **objetivo general**:

- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de extractos acuosos de micelio de *Pleurotus ostreatus* obtenidos mediante ultrasonido y agua a 100 °C

Para su cumplimiento, se enunciaron los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el contenido de fenoles totales de extractos acuosos de micelio vegetativo de *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3024 obtenidos mediante agua a 100°C, baño ultrasónico y sonda ultrasónica en tiempos de extracción de 5 y 15 minutos.
- Evaluar la actividad antioxidante de estos extractos mediante los ensayos de captación del radical DPPH y poder reductor.

- Evaluar el efecto del tiempo de extracción, potencia ultrasónica y gramos de micelio en el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de extractos obtenidos mediante sonda ultrasónica empleando un diseño de superficie de respuesta compuesto central cara centrado.

Novedad: Hasta donde conocemos, no existen reportes en la literatura referidos a la evaluación del contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de extractos acuosos de micelio vegetativo de *Pleurotus ostreatus* obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido, que además incluyan la metodología de superficie de respuesta para dilucidar interacciones entre variables del proceso.

Capítulo 1 Revisión bibliográfica

1.1 Características del estrés oxidativo

La toxicidad del oxígeno fue explicada hace 65 años por Gerschman (1954) cuando publicó en la revista Science su teoría de radical libre para explicar este fenómeno. Estos radicales libres derivados del oxígeno son generalmente inestables y atacan rápidamente a las moléculas estables más cercanas para capturar el electrón que necesitan para ganar estabilidad.

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) incluyen no solo radicales libres como el radical superóxido, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo, sino también otras moléculas como oxígeno singlete y ozono (Blokhina *et al.*, 2003). La literatura también considera la existencia de las especies reactivas del nitrógeno (ERN) como el óxido nítrico ($NO\bullet$) y el anión peroxinitrito ($ONOO^-$); aunque químicamente resultan también ERO (Gill *et al.*, 2010).

Las ERO se forman como productos secundarios de la respiración mitocondrial o por ciertas oxidasas, como la oxidasa nicotina adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y están involucrados en muchos eventos celulares, lo que incluye su actuación como segundos mensajeros en la activación de varias rutas de señalización conducentes a la activación de factores de transcripción, mitogénesis, expresión genética e inducción de la apoptosis o muerte celular programada [Revisado en Babich *et al.* (2011)]. Contra estos radicales, las células de mamíferos poseen defensas intracelulares como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, que protegen a las células contra el exceso de radicales libres (Ostrovidov *et al.*, 2000). Cuando la generación de estas especies excede la capacidad del sistema para neutralizarlas y eliminarlas, se produce estrés (Khatua *et al.*, 2013). La superproducción de ERO resulta en el estrés oxidativo.

Estas especies altamente reactivas producidas en procesos metabólicos normales pueden dañar proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN. La producción de ERO y ERN puede incrementarse por factores externos como: contaminación ambiental, rayos X, radiación ultravioleta, cigarrillos, alcohol, estrés, consumo de grasas saturadas y algunas sustancias presentes en alimentos y bebidas (por ejemplo, residuos de pesticidas, aditivos químicos, conservantes, hormonas) (Badarinath *et al.*, 2010).

La oxidación se produce en lípidos con ácidos grasos poliinsaturados, generando ERO tales como los radicales hidroxilo (Halliwell y Gutteridge, 1984). La membrana lipídica mitocondrial es fácilmente atacada por ERO ya que las mitocondrias son la fuente más importante de ERO (Khatua *et al.*, 2013). Este ataque resulta en la peroxidación lipídica. Según Ferreira *et al.* (2009) la peroxidación lipídica da como resultado un radical lipídico altamente reactivo y finalmente forma un radical peroxilo (LOO). El radical peroxilo reacciona con otros lípidos adyacentes que producen lípidos hidroperóxidos (LOOH) que se descomponen fácilmente para formar un nuevo radical lipídico (Ferreira *et al.*, 2009).

El daño al ADN inducido por ERO implica roturas de ADN simples o dobles, modificaciones de purina, pirimidina o desoxirribosa y enlaces cruzados de ADN. El radical hidroxilo puede causar lesiones en el ADN mediante la formación de 8-OH-G, un biomarcador potencial de carcinogénesis (Valko *et al.*, 2006).

La fisiopatología de muchas enfermedades refleja una relación entre estas y el estrés oxidativo. Muchas enfermedades como aterosclerosis, hipertensión, isquemias, Alzheimer, Parkinson, cáncer, diabetes mellitus y otras condiciones inflamatorias se considera que se deben principalmente a un desbalance entre la homeostasis prooxidante y antioxidante (Shirwaikar y Somashekar, 2003). Asimismo, el envejecimiento, se caracteriza por una progresiva decadencia entre las funciones bioquímicas y fisiológicas de varios tejidos y órganos en un individuo, cuyas causas aún no han sido esclarecidas, pero se había propuesto como causa el aumento del estrés oxidativo y los trastornos del metabolismo energético (Pawelec, 2006). Por tanto, incrementar la ingesta de antioxidantes ayuda a proteger al organismo de los radicales libres y retrasa el progreso de muchas enfermedades crónicas (Liu *et al.*, 2013) y del envejecimiento.

1.2 Propiedades medicinales de los hongos comestibles-medicinales

Durante milenios, los hongos comestibles han sido valorados como un tesoro nutricional y medicinal. Culturas como la china y la egipcia conocían de manera empírica los beneficios a la salud que estos alimentos proporcionaban a las personas (Cheung *et al.*, 2003). De ellos se han aislado e identificado importantes compuestos con actividad funcional (con beneficios a la salud) y medicinal (terapia y prevención de enfermedades). Les han sido descritas alrededor de 130 propiedades medicinales, entre las que figuran: antitumorales, inmunomoduladoras, antioxidantes, cardioprotectoras, antihipercolesterolémicas, antivirales, antibacterianas, antiparasíticas, detoxificantes, hepatoprotectoras y antidiabéticas (Wasser, 2014).

Entre los géneros de hongos comestibles que demuestran actividades biológicas útiles se incluyen *Agaricus*, *Ganoderma*, *Pleurotus*, *Phellinus*, *Trametes*, *Lentinus*, *Auricularia*, *Hericium*, *Grifola*, *Flammulina*, *Tremella* y *Pholiota* (Paterson y Lima, 2014). Estos hongos contienen varias sustancias fisiológicamente activas, incluidos polisacáridos de alto peso molecular (principalmente β -D-glucanos), heteroglucanos, sustancias quitinosas, peptidoglucanos, proteoglucanos, lectinas, componentes de ARN, fibra dietética; y sustancias orgánicas de bajo peso molecular, como terpenoides, esteroides, fenoles, vitaminas, antraquinonas, derivados del ácido benzoico, sesquiterpenos, alcaloides, lactonas, esteroides, agentes quelantes de metales y análogos de nucleótidos (Chang y Wasser, 2012; Valverde *et al.*, 2015).

Los polisacáridos son las sustancias más conocidas y más potentes derivadas de hongos con propiedades antitumorales e inmunomoduladoras. El polisacárido β -glucano es el metabolito más versátil debido a su actividad biológica de amplio espectro. Estos β -glucanos consisten en una cadena lineal de residuos de glucosa unidos por enlaces glicosídicos β - (1 \rightarrow 3), a menudo con residuos de glucosa de cadena lateral unidos por enlaces β - (1 \rightarrow 6) (Chen y Seviour, 2007).

Un ejemplo del uso de los productos medicinales derivados de hongos es el medicamento contra el cáncer obtenido de *Ganoderma lucidum* y producido en Japón con el nombre de Krestin, que representa el 25% del total de la comercialización mundial de medicamentos contra el cáncer (Mizuno, 1999). Por otro lado, el hongo shiitake, *Lentinula edodes* produce lentinano, un β -glucano conocido por suprimir la proliferación celular de la leucemia. El extracto etanólico de este hongo disminuyó significativamente la proliferación celular de las células CH72, en tanto no pudo cambiar la respuesta

proliferativa de la línea celular de queratinocitos no tumorigénicos (C50). El análisis del ciclo celular demostró que el extracto de *L. edodes* indujo una detención transitoria de G1, sin que se observaran cambios en las células C50 (Gu y Belury, 2005). El extracto de agua caliente del hongo comestible *Tricholoma crassum* proporcionó un glucano, cuyo estudio de actividad inhibidora de la peroxidación de lípidos mostró que podría usarse como aditivo antioxidante para alimentos debido a su valor de IC₅₀ que es 94.32 ± 7.43 µg/mL (Samanta *et al.*, 2013).

Devi *et al.* (2013) aisló del hongo *P. ostreatus*, un glucano soluble en agua que mostró mejora de activación de células inmunes y un potencial efecto antitumoral en un modelo de ratones portadores de tumor. Los glucanos intracelulares aislados de micelios de *P. ostreatus* consistieron generalmente en fucosa, manosa y glucosa con enlaces α , y se plegaron en un grupo helicoidal triple. Los autores también están de acuerdo en que la propiedad funcional del heteroglucano puede estar estrechamente vinculada a sus entidades estructurales. El glucano no demostró actividad citotóxica contra las células de Sarcoma 180. Por lo tanto, el efecto antitumoral estaba mediado por el sistema inmune. Dado que mejora el mecanismo de vigilancia para contribuir a la inhibición del tumor, la biomacromolécula glucano, un inmunomodulador, cuya fuente es un hongo, puede usarse como agente terapéutico en tales casos (Devi *et al.*, 2013).

En trabajos previos con la cepa de *Pleurotus* que se utilizó en este estudio, se investigaron la actividad antimicrobiana y efectos estimulantes sobre el sistema complemento/macrófago de las fracciones de polisacáridos de *Pleurotus* sp. El extracto activó el sistema autolítico microbiano de ocho cepas: siete cepas autolizantes con valores de intensidad que van desde 2.7% en *Candida* sp. a 36.1% en *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que la autólisis fue de 1.8% en una cepa no autolizante (*Bacillus cereus*). El extracto (5-100 mg/pocillo) mejoró la actividad de la fosfatasa ácida en macrófagos peritoneales murinos en un 133-184% en comparación con los controles. Los hallazgos introducen un nuevo enfoque "bifuncional" (antimicrobiano/inmunomodulador) al potencial nutracéutico del extracto de agua caliente de micelio vegetativo de *P. ostreatus* (Llauradó *et al.*, 2015).

Entre los metabolitos secundarios con propiedades medicinales destacan los compuestos fenólicos. El ácido protocatecuico y compuestos relacionados detectados como compuestos principales en el extracto etanólico del hongo *Clitocybe alexandri* indujeron la inhibición significativa del crecimiento celular de la línea celular de cáncer de pulmón (NCIH460). Estos compuestos, al menos en parte, han contribuido a la detención del ciclo celular en la fase S y a la apoptosis inducidas por el extracto de *C. alexandri* en la línea celular del cáncer de pulmón (Popovic *et al.*, 2013).

1.3 *Pleurotus ostreatus*: un hongo con propiedades nutricionales y medicinales

1.3.1 Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

División: Basidiomycota

Clase: Homobasidiomycetes

Orden: Agaricales

Familia: Pleurotaceae

Género: *Pleurotus*

Especie: *Pleurotus ostreatus*

1.3.2 Morfología

Tanto el nombre científico como el común se refieren a la forma del cuerpo fructífero. El latín *Pleurotus* (de lado) se refiere al crecimiento lateral del tallo con respecto al píleo, mientras que el *ostreatus* en latín y el nombre común en inglés (o español), *oyster* (ostra) se refiere a la forma del píleo que se asemeja al bivalvo del mismo nombre. *P. ostreatus* tiene un píleo ancho, en forma de abanico u ostras, que abarca de 5 a 25 cm; los especímenes naturales varían de blanco a gris o de tostado a marrón oscuro; el margen se enrolla cuando es joven y suave, a menudo algo lobulado y ondulado.

Laminillas: de color blanco a crema y descienden sobre el tallo si está presente.

Estípite: descentrado con un accesorio lateral a la madera.

Impresión de esporas: color blanco a gris lila y se ven mejor en una superficie oscura (Sher *et al.*, 2011).

1.3.3 Valor nutricional

Los hongos comestibles del género *Pleurotus* se encuentran entre los más populares, debido a su alto valor nutricional, sus propiedades organolépticas y medicinales, rápido crecimiento y condiciones de cultivo poco exigentes (Gregori *et al.*, 2007). Es el segundo género más cultivado a nivel mundial, representando el 19% de la producción de hongos (Royse *et al.*, 2017).

P. ostreatus, la especie más popular del género, se usa comúnmente en la preparación de sopas, en recetas de salteados con salsa de soja o en rellenos (Corrêa *et al.*, 2016). Su supremacía nutricional en relación con la dieta vegetariana está en virtud de su pared celular rica en quitina que actúa como fuente de fibra dietética, junto con su contenido de vitaminas (incluyendo tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, ergosterina y niacina), contenidos considerables de microelementos y macroelementos como fósforo y hierro, carbohidratos y un muy bajo nivel de grasas (Maftoun *et al.*, 2015).

El compost de crecimiento puede influir en la composición química y, como consecuencia, en el valor nutricional de los hongos cultivados (Manzi *et al.*, 2004). La calidad del hongo también está influenciada por otros parámetros, como la etapa de desarrollo y las condiciones previas y posteriores a la cosecha. Todos estos factores interferentes justifican la variabilidad en los datos de composición publicados por diferentes autores que trabajan incluso con la misma especie de hongo (Manzi *et al.*, 2004) además de la variabilidad genética intraespecífica de muestras de diferentes orígenes geográficos y productores (Reis *et al.*, 2012).

1.3.4 Cultivo sumergido

Debido a la gran capacidad que tienen los basidiomicetos de crecer en diferentes sustratos y condiciones medioambientales, se ha explorado el empleo de la fermentación en estado líquido como una herramienta para obtener el mayor provecho de su cultivo. Los cultivos que se realizan en la fase vegetativa son mucho más interesantes y funcionales para la investigación, ya que se pueden mantener en el laboratorio, a pequeña y mediana escala, y se pueden controlar fácilmente parámetros importantes como la temperatura, la humedad, el pH y la aireación (Inácio *et al.*, 2015).

Se han desarrollado técnicas para una variedad de hongos y se utilizan en la propagación del micelio para diferentes aplicaciones, como el inóculo líquido para la producción de cuerpos fructíferos en sustratos sólidos; producción de biomasa para alimentos, suplementos dietéticos y aplicaciones farmacéuticas; y conversión de residuos de biomasa y producción de enzimas (Gregori *et al.*, 2007). Dentro de las variables a considerar en cultivos sumergidos de basidiomicetos se encuentran la temperatura, el pH, la agitación y el medio de cultivo, entre otras. Diversas investigaciones ponen de manifiesto la capacidad de los basidiomicetos de crecer en un amplio rango de pH, sin embargo, recomiendan usar un pH de 5 o inferior para evitar la contaminación bacteriana; un rango de temperaturas de entre 25 y 30 °C, en el caso de los hongos del género *Pleurotus*; una agitación de 100 a 160 rpm, así como el uso de caldo de papa-dextrosa, aminoácidos, licor de maíz, azúcares reductores (principalmente glucosa y xilosa), hidrolizado de caseína, extracto de levadura y peptona como las principales fuentes de carbono y nitrógeno (Suárez Arango y Nieto, 2013).

De acuerdo a Smith *et al.* (2002) si bien la fermentación en estado sólido (FES) seguirá siendo el método elegido para la producción de hongos, habrá un aumento continuo en el desarrollo de la tecnología fermentación en estado líquido (Capelo *et al.*, 2005) para producir biomasa de hongos medicinales de una manera más uniforme y reproducible. Las empresas de biotecnología occidentales aún no han reconocido el potencial en esta área de la biociencia médica (Smith *et al.*, 2002). Sin embargo, para utilizar las biomásas miceliales, es necesario demostrar que son similares a los cuerpos fructíferos (Soares *et al.*, 2013).

1.3.5 Propiedades antioxidantes

P. ostreatus es una especie que muestra claramente propiedades antioxidantes, la cual parece concentrar un completo "arsenal" contra el estrés oxidativo, incluyendo compuestos básicos antioxidantes (ácido ascórbico/vitamina C, α -tocoferol/vitamina E, β -caroteno) y un alto contenido de compuestos fenólicos con propiedades extensas de reducción y barrido de radicales (Borchers *et al.*, 2008), así como β -glucanos como el pleurano, el que ha mostrado un efecto positivo sobre el colon de ratas con lesiones precancerosas (Bobek y Galbavy, 2001).

Los extractos de hongos *P. ostreatus* tuvieron propiedades antioxidantes en ratas con daño hepático inducido por CCl₄, como se indica por aumentos significativos en las concentraciones de antioxidantes y enzimas antioxidantes (Jayakumar *et al.*, 2006; Jayakumar *et al.*, 2007). La capacidad de captación del radical 2,2 difenil -1-picrilhidrazilo (DPPH) de extractos metanólicos de *P. ostreatus* demostró ser superior a la de varias especies de hongos, como *A. bisporus*, *Verpa conica* y *Boletus edulis*, de acuerdo al valor de EC₅₀ (0.01-0.02). Asimismo, su capacidad fue inferior a la de BHA y

del α -tocoferol, así como de los extractos metanólicos de *Lepista nuda*, *Russula delica*, *Polyporus squamosus* (Elmastas *et al.*, 2007).

En tanto, Yim *et al.* (2010) evaluó el potencial antioxidante y el contenido fenólico total del extracto acuoso de *P. ostreatus* y descubrió que el poder reductor férrico era significativamente mayor que el de BHA y que el del ácido ascórbico. El ensayo de poder de reducción/antioxidante del ion férrico (FRAP, por sus siglas en inglés) de cepas comerciales de *A. bisporus* y *P. ostreatus* y hongos silvestres como *Amanita caesarea*, *Fistulina hepatica*, y *Meripilus giganteus* arrojó valores de 1.528 a 9.340 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ g/L, correspondiendo el menor valor a *Pleurotus*. Las diferencias significativas evidenciadas en estos valores pueden deberse a tipos de compost, condiciones de crecimiento, tipos de químicos y cantidades utilizadas para la higiene durante el proceso de cultivo (Yıldız *et al.*, 2017). A estas mismas causas pueden deberse las diferencias entre los resultados de los diferentes ensayos de actividad antioxidante entre un trabajo y otro. Chirinang y Intarapichet (2009) encontraron que los extractos de acuosos de *P. ostreatus* con mayor contenido fenólico poseían mejores actividades antioxidantes que el extracto etanólico.

El poder reductor de una concentración de 10 mg/mL del extracto de hongo fue de 1.367, relativamente más pronunciado que el de butil hidroxitolueno (BHT) (1.192). Hubo una correlación estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre extracto y BHT.

Un estudio de Iwalokun *et al.* (2007) mostró la actividad antioxidante de los extractos de éter de petróleo (PE) y acetona (AE) de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*. La actividad antioxidante de los extractos usando los métodos de DPPH y ABTS reveló una capacidad antioxidante equivalente a la vitamina C (VCEAC) de 3.6–3.8 mM para PE y 4.1–4.4 mM para AE, que son comparables a los de la infusión de té verde (6.2–6.4 mM). Akata *et al.* (2012) estudiaron esta misma especie, encontrando una potente actividad de eliminación de radicales libres (96.16%) a 2.72 mg/mL de concentración de extracto.

La peroxidación lipídica (LPO) es de gran importancia para la industria alimentaria y los consumidores, porque conduce al desarrollo de sabores indeseables y productos de reacción potencialmente tóxicos (Maillard *et al.*, 1996). A una concentración de 10 mg/mL, el extracto de *P. ostreatus* realizó una inhibición del 56.20% de la actividad de LPO y el estándar de ácido ascórbico lo inhibió al 67.15%. La concentración del extracto y ácido ascórbico necesaria para la inhibición del 50% de LPO fue de 8 y 6 mg/mL, respectivamente (Jayakumar *et al.*, 2009).

Sustancias fenólicas, como los flavonoides y ácidos fenólicos, son conocidas por poseer actividad antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1996). Compuestos fenólicos dietéticos han sido descritos no solo como aquellos que ejercen una variedad de acciones biológicas, tales como el barrido de radicales libres, la quelación de metales y la modulación de la actividad enzimática, sino que también han sido encontrados aquellos que son capaces de afectar la transducción de señales, la activación de factores de transcripción y la expresión génica (Srinivasan *et al.*, 2005). Los hongos también contienen muchos fenoles, que son muy eficientes en la eliminación de radicales peróxidos (Murcia *et al.*, 2002). La actividad antioxidante declarada del extracto de *P. ostreatus*, que se manifestó en la inhibición de la peroxidación lipídica (LPO), el barrido de los radicales hidroxilo y superóxido, la extinción de DBO, el poder reductor y la actividad quelante de iones hierro, fue posiblemente debido a su alto contenido de compuestos fenólicos (Jayakumar *et al.*, 2011).

1.4 Extracción de compuestos bioactivos: de lo tradicional a lo moderno

Tradicionalmente, la extracción asistida por solventes se ha utilizado para recuperar compuestos valiosos de hongos (Wei, 2008). Por ejemplo, la extracción acuosa es una técnica ampliamente empleada, ya que es un método económico y que no requiere ningún equipo especial (Roselló-Soto *et al.*, 2016). Sin embargo, la extracción mediante agua caliente requiere altas temperaturas (50–100 °C) (Abdullah *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2009) y tiempos de extracción que pueden ser largos (0.5–10 h) (Abdullah *et al.*, 2012; Morris *et al.*, 2007). Estos tiempos pueden propiciar la degradación de valiosos compuestos termolábiles que se encuentran en los hongos (Roselló-Soto *et al.*, 2016).

Por otro lado, las extracciones hidroalcohólicas también se han utilizado ampliamente para la recuperación de compuestos de alto valor agregado de los hongos. Esta técnica requiere una temperatura moderada ($T = 25\text{--}80\text{ °C}$). Sin embargo, necesita largos tiempos de tratamiento (1–72 h) y altas concentraciones de solventes (30–98.6%) (Shamtsyan *et al.*, 2004; Shnyreva *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2011). Además, la extracción hidroalcohólica implica el uso de solventes de alto costo (*i.e.*, etanol o metanol) y es difícil reciclar el remanente.

Las técnicas tradicionales en las plantas implican la aplicación de extracción sólido-líquido (Yıldız *et al.*, 2017) simplemente mediante la aplicación de solventes y lixiviación. Una aplicación doméstica de extracción con solvente convencional (ESC) es bastante familiar para todos en la vida diaria desde la preparación de café o té en casa. El ESC abarca métodos convencionales: extracción mediante Soxhlet (ES), percolación y extracción de maceración (EM). Estas técnicas se han utilizado durante más de un siglo para el aislamiento de fenoles (Ameer *et al.*, 2017). Sin embargo, ciertas desventajas relacionadas con ESC hacen que su aplicación sea poco rentable debido al consumo excesivo de tiempo, energía y solventes contaminantes (Cravotto *et al.*, 2011). Además, las técnicas de extracción convencionales generalmente implican el uso de grandes cantidades de solventes, y el riesgo de degradación térmica (más de 100 °C) o transformación de moléculas de interés (Wang y Weller, 2006).

En esta etapa de desarrollo, existe un mayor interés de la industria alimentaria por encontrar diferentes tecnologías que puedan mejorar la extracción de compuestos valiosos de los hongos de una manera sostenible (Roselló-Soto *et al.*, 2016). En este sentido, se han desarrollado y empleado varias tecnologías modernas para la extracción de bioactivos en hongos; en la obra citada se enuncian: extracción mediante ultrasonido, enzimas, microondas, campo eléctrico pulsado, agua subcrítica y fluidos supercríticos y subcríticos. En comparación con algunas otras técnicas de extracción, como la extracción asistida por microondas y la extracción de fluido supercrítico, los dispositivos ultrasónicos son menos costosos y mucho más fáciles en la práctica [Revisado por Yolmeh *et al.* (2014)].

1.4.1 Extracción de compuestos bioactivos mediante ultrasonido

1.4.1.1 Mecanismo de extracción

Los ultrasonidos son ondas mecánicas que requieren un medio elástico para extenderse (Chemat y Khan, 2011) facilitando la extracción de compuestos bioactivos de la muestra.

La extracción asistida por ultrasonido implica el uso de ultrasonidos que van desde 20 kHz a 2000 kHz (Handa *et al.*, 2008) y consiste en transmitir radiación de ultrasonido en diferentes tipos de dispositivos, como baños de agua, sondas y sonorreactores (Tadeo *et al.*, 2010).

Después de la propagación de las ondas ultrasónicas, ocurren dos ciclos alternativamente, un ciclo de alta presión (llamado compresión) y un segundo de baja presión (llamado expansión); luego la serie de esos ciclos crea una presión acústica (Wu *et al.*, 2012). Durante el ciclo de expansión, aparecen burbujas en el líquido, y cuando estas burbujas aumentan drásticamente y alcanzan un volumen para el cual ya no pueden absorber energía, sufren, durante un ciclo de alta presión, un colapso implosivo llamado cavitación (Kim y Zayas, 1989; Vardanega *et al.*, 2014).

Cada burbuja de cavitación es un "punto caliente" cuya vida útil es de aproximadamente 0.1 s (Luo *et al.*, 2018). La implosión de las burbujas de cavitación causa el principal efecto físico y mecánico del ultrasonido: la producción de microchorros dirigidos a alta velocidad a una superficie sólida (Chemat y Khan, 2011) (aproximadamente 110 m/s), que producen una región de alta temperatura (aproximadamente 5000 K) y una región de alta presión (aproximadamente 2000 atm) (Li *et al.*, 2001). Todos estos parámetros (alta temperatura, alta presión y turbulencia) mejoran la transferencia de masa a través de las membranas celulares (Wang *et al.*, 2008). Este microchorro genera además varios efectos, tales como desprendimiento de la superficie, erosión y descomposición de partículas y conduce a macroturbulencias y a una micromezcla (Maroun *et al.*, 2018). En la figura 1 se presenta un diagrama de la EAU.

Sorprendentemente, en la mayoría de las publicaciones sobre la EAU de productos naturales, los autores justifican la mejora de los rendimientos por los efectos de cavitación que ocurren durante la irradiación ultrasónica sin más investigaciones (Chemat *et al.*, 2017). Para conseguir la comprensión e ilustrar el efecto del ultrasonido en una matriz vegetal durante la EAU, Chemat *et al.* (2017) examinaron de cerca diferentes estudios y notaron que la extracción por ultrasonido no actúa con un mecanismo sino a través de diferentes mecanismos independientes o combinados entre fragmentación, erosión, capilaridad, detexturación y sonoporación.

La aplicación de la EAU se caracteriza por un aumento de los rendimientos de extracción, reducción del tiempo de extracción y una disminución en el consumo de solvente al mejorar el área de contacto superficial entre la matriz y el solvente de extracción (Samaram *et al.*, 2014). Además, la recuperación de compuestos valiosos de materiales alimenticios vegetales asistidos por ultrasonido es un método económico y simple (Barba *et al.*, 2014). De acuerdo con Barba *et al.* (2014), esta técnica se puede combinar con solventes y permite disminuir el tiempo y la temperatura de extracción, lo que puede ser una herramienta potencial para la preservación de compuestos termolábiles. Varias clases de componentes alimenticios como aromas, pigmentos, antioxidantes, y otros compuestos orgánicos y minerales han sido extraídos y analizados eficientemente a partir de una variedad de matrices (principalmente tejidos animales, alimentos y materiales vegetales) (Chemat y Khan, 2011).

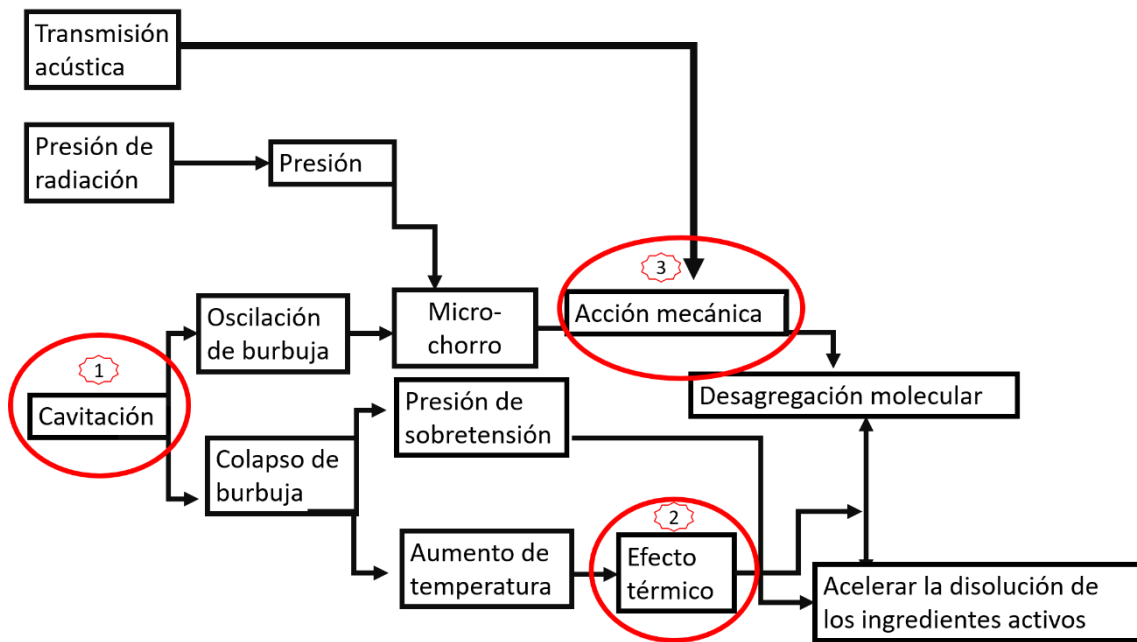


Figura 1. Diagrama de la EAU, señalando los tres efectos principales de la sonicación, modificado de Wen *et al.* (2018)

1.4.1.2 Parámetros de influencia

El contenido de humedad de la muestra, el grado de molienda, el tamaño de las partículas y el solvente son factores muy importantes para obtener una extracción eficiente y efectiva (Azmir *et al.*, 2013). Además, temperatura, presión, frecuencia y tiempo de sonicación, son los factores que gobiernan la acción del ultrasonido (Azmir *et al.*, 2013). El estudio de esos parámetros es de gran importancia para obtener una alta eficacia de extracción que a menudo resulta en obtener el mayor rendimiento de extracción. Sin embargo, es necesario considerar que el rendimiento no siempre es el único objetivo del proceso de extracción; además, los factores de influencia que hacen de esta una tecnología limpia, verde y sostenible también deben tenerse en cuenta (Wen *et al.*, 2018).

Los parámetros del proceso de las EAU incluyen también potencia o intensidad ultrasónica y amplitud. La influencia de la entrada de energía, así como el diseño del reactor y la forma de la sonda, pueden influir en el proceso (Pingret *et al.*, 2013). En general, la mayor eficiencia de las EAU, en términos de rendimiento y composición de los extractos, se puede lograr aumentando la potencia ultrasónica, reduciendo la humedad de las matrices para mejorar el contacto sólido-solvente, y optimizando la temperatura para permitir un tiempo de extracción más corto (Chemat *et al.*, 2017). Sin embargo, algunos estudios mostraron que la variación de potencia puede dar como resultado una cierta selectividad de las moléculas objetivo, donde la proporción de algunas moléculas es una función de la potencia aplicada [Chemat, 2004; Wei, 2010 en Chemat *et al.* (2017)]. Este parámetro está directamente relacionado con la amplitud del transductor y, en consecuencia, con la amplitud de presión de la onda de sonido (Santos *et al.*, 2009).

Se ha informado que una frecuencia más baja se correlaciona con un aumento de la cavitación durante las EAU (Ameer *et al.*, 2017). A medida que aumenta la frecuencia o intensidad del ultrasonido, las burbujas de cavitación líquida disminuyen gradualmente (Mason y Lorimer, 2002). La frecuencia puede ser selectiva con respecto a la extracción de fenoles: a 25 kHz (mayor extracción de daidzeína y genisteína) y 80 kHz (biocanina A y trans-resveratrol) en maní (Chukwumah *et al.*, 2009).

La elección del solvente más apropiado para extraer los analitos de la matriz de la muestra es un paso fundamental de la extracción por ultrasonido. Los factores que afectan la eficiencia de la extracción por ultrasonido incluyen el tipo de solvente, la cantidad y la concentración, así como la proporción de solvente y soluto (Wen *et al.*, 2018). La elección del solvente en las EAU depende de la solubilidad de los metabolitos objetivo, pero también de parámetros físicos como la viscosidad, la tensión superficial y la presión de vapor del solvente (Chemat *et al.*, 2017). La presión de vapor y la tensión superficial son dos factores clave que afectan la intensidad de la cavitación, y la intensidad de la cavitación disminuye al aumentar la presión de vapor y la tensión superficial (Jadhav *et al.*, 2009).

La cavitación es potenciada a una temperatura de extracción, pero altas temperaturas podría provocar la interrupción de la interacción del solvente y la matriz (Wen *et al.*, 2018). Sin embargo, altas temperaturas también mejoran las tasas de difusión del disolvente (Richter *et al.*, 1996). No obstante, los efectos sonoquímicos se ven favorecidos por bajas temperaturas y generalmente se aplica un control de temperatura para limitar su aumento (Sališová *et al.*, 1997). El rendimiento de la extracción también puede verse afectado por el tamaño de las partículas de la matriz, debido al hecho de que

la extracción está relacionada con la superficie expuesta y la longitud de la ruta de migración molecular (Sun *et al.*, 2011).

1.4.1.3 Dispositivos empleados

La mayor parte del trabajo relacionado con la EAU se ha llevado a cabo utilizando una un baño de ultrasonido y una sonda ultrasónica. El ultrasonido puede producir dos efectos diferentes en las muestras de acuerdo con diferentes modos de acción: efectos directos e indirectos (Kek *et al.*, 2013).

El baño de limpieza ultrasónico puede lograr buenos rendimientos de extracción por extracción indirecta (Mason, 1999). Este dispositivo se usa comúnmente para la dispersión sólida en el solvente (el ultrasonido reducirá drásticamente el tamaño de las partículas sólidas, lo que mejorará su solubilidad) (Shirsath *et al.*, 2012). Los principales factores que afectan la extracción en baños ultrasónicos son: tamaño de partícula, ácido y/u oxidante utilizado en el tratamiento, volumen de lixiviación, tiempo de sonicación, temperatura del agua dentro del baño, frecuencia ultrasónica, la posición de las muestras en el recipiente (posición vertical u horizontal) y el uso de detergente en el agua. Los factores anteriores son beneficiosos para lograr mejores resultados para la transmisión ultrasónica (Santos y Capelo, 2007). La selección del envase también es importante en las extracciones. La mejor opción sería un recipiente de fondo plano como un matraz cónico para lograr un mínimo reflejo de las ondas (Lorimer y Mason, 1987). El grosor del recipiente también debe mantenerse al mínimo para reducir la atenuación (Santos *et al.*, 2009).

Los baños ultrasónicos tienen la ventaja de ser fáciles de operar, económicos, pero no son adecuados para una reacción química debido a la baja reproducibilidad de la reacción, en la que la intensidad ultrasónica es grandemente atenuada por el solvente y la cristalería experimental (Gogate, 2010). Por sonicación indirecta, solo pequeñas cantidades de material vegetal pueden ser extraídas, mientras que, usando la aplicación directa del ultrasonido, grandes cantidades del material vegetal pueden ser extraídas (Vinatoru, 2001).

La aplicación directa del ultrasonido se evidencia en el sistema de la sonda, el cual es ampliamente usado para la sonicación de pequeños volúmenes de muestra pero se debe tener especial cuidado por el rápido incremento de la temperatura de la muestra (Shirsath *et al.*, 2012) y la pérdida de compuestos volátiles por utilizarse en un sistema abierto (Capelo *et al.*, 2005). Además, en las sondas el transductor piezoeléctrico podría invadir directamente dentro del solvente ultrasónico (Wen *et al.*, 2018) aunque este dispositivo promueve la transferencia de masa, incrementa el grado de destrucción de la muestra debido principalmente a la degradación de la sonda ultrasónica (Yao, 2016).

De acuerdo a Wen *et al.* (2018) los siguientes parámetros pueden afectar la sonda ultrasónica: amplitud, temperatura, la forma del recipiente de reacción, diámetro, tipo de sonda y propiedades químicas del material. El efecto de la forma del recipiente de la reacción es significativo también, este recipiente debe tener una forma cónica (Capelo *et al.*, 2005) con su diámetro siendo tan pequeño como sea posible, en aras de incrementar el nivel y que la sonda pueda ser insertada más profundamente en la muestra (Wen *et al.*, 2018), puesto que la intensidad ultrasónica decrece más abruptamente según se incrementa la distancia de superficie irradiante (Wang y Weller, 2006).

1.4.1.4 Extracción de antioxidantes

La extracción de compuestos antioxidantes se ha llevado a cabo utilizando el método de ultrasonido fundamentalmente en plantas, pero también en hongos. Se observó un incremento de hasta un 85% en el rendimiento de extracción de los fenoles de *Aronia melanocarpa*, utilizando el ultrasonido, en el caso de las frutas que no habían sido pretratadas (solo fueron cortadas por la mitad y no sometidas a un proceso de secado) se observó en el estudio de d'Alessandro *et al.* (2012). Asimismo, encontraron una muy buena correlación entre las concentraciones de fenoles en los extractos y las actividades antioxidantes correspondientes.

Se evaluó experimentalmente y se modeló la cinética de la extracción acuosa del contenido fenólico y la actividad antioxidante de productos secundarios de la uva (*Vitis vinifera* L.) tanto de manera convencional (agitación mecánica, 200 rpm) como acústica (55 ± 5 kHz, 435 ± 5 W/L, sistema sonda) a diferentes temperaturas de extracción (20, 35 y 50 °C) (González-Centeno *et al.*, 2015). La extracción convencional de los fenoles totales a 35 y 50 °C no difirió significativamente de las extracciones asistidas con potencia ultrasónica a 20 y 35 °C, respectivamente; y el proceso acústico requirió aproximadamente 3, 4 y 8 veces menos tiempo, a las temperaturas de 20, 35 y 50 °C, que la extracción convencional para obtener los extractos con similares características. En tanto, los mayores atributos de calidad fueron obtenidos después de 1 hora de extracción acústica a 50 °C. Específicamente, el contenido de fenoles totales, de los extractos estuvo alrededor de 3.3 veces mayor (770.9 ± 77.5 mg EAG/100 g biomasa seca) que la extracción convencional a 20 °C. Con respecto a la actividad antioxidante, estuvo cercana a 2.5 (705.9 ± 41.7 mg ET/100 g base seca) y 4.0-veces superior (722.4 ± 41.0 mg ET/100 g base seca), para las mediciones de ABTS y FRAP, respectivamente.

En hongos también se ha realizado extracción de antioxidantes utilizando el ultrasonido, se ha determinado la composición aproximada, el contenido de fenoles totales, la capacidad antioxidante y las actividades antimicrobianas de diferentes extractos de *Laetiporus sulphureus* (Petrović *et al.*, 2014). Las metodologías de extracción óptimas (clásica y asistida por ultrasonido) proveyeron una fracción que contiene los lípidos neutrales y polares y otra fracción con los carotenoides y pigmentos. Tanto el extracto acuoso como el metanólico tuvieron mayor contenido de fenoles totales y mostraron mayor actividad antioxidante que el extracto etanólico.

Los estudios reportados anteriormente demuestran que la extracción de antioxidantes mediante ultrasonido, en plantas y hongos, es un método que arroja rendimientos de extracción similares a los obtenidos en las extracciones convencionales, pero que pueden ser obtenidos en un tiempo considerablemente menor, y a una menor temperatura, lo que abarata los costos de extracción por concepto de ahorro de energía eléctrica. En otros casos, estos rendimientos de extracción y, por ende, las actividades antioxidantes, son superiores a los de los métodos tradicionales lo que se relaciona con las características intrínsecas del método, que fueron referidas con anterioridad en este capítulo.

1.5 Metodología de superficie de respuesta en el análisis del efecto de variables de la extracción asistida por ultrasonido

La metodología de superficie de respuesta (MSR) consiste en un grupo de técnicas matemáticas y estadísticas usadas en el desarrollo de una relación funcional adecuada entre una respuesta de interés, y , y un número de n variables asociadas de control (o

entrada) denotadas por x_1, x_2, \dots, x_k (Khuri y Mukhopadhyay, 2010). Este término se originó desde la perspectiva gráfica generada después del ajuste del modelo matemático (Bezerra *et al.*, 2008). Las superficies de respuesta se representan matemáticamente mediante ecuaciones llamadas modelos que son similares a las bien conocidas ecuaciones de regresión. Los modelos de regresión de primer o segundo orden podrían usarse para el análisis de respuestas y como funciones de variables independientes (Nwabueze, 2010). Si y puede ser modelado linealmente por las variables, entonces el modelo de primer orden sería lo suficientemente bueno. En general, dicha relación es desconocida, pero se puede aproximar mediante un modelo polinómico de bajo grado de la forma:

$$y = f(x)\beta + \varepsilon$$

donde $x = (x_1, x_2, \dots, x_k)$ $f(x)$ es una función vectorial de elementos p que consiste en potencias y productos cruzados de potencias de x_1, x_2, \dots, x_k en cierto grado denotado por d (≥ 1), β es un vector de p coeficientes constantes desconocidos denominados parámetros, y ε es un error experimental aleatorio que se supone que tiene una media de cero (Khuri y Mukhopadhyay, 2010).

Si hay una curvatura en la superficie de respuesta, entonces se debe utilizar un polinomio de mayor grado (Morshedi y Akbarian, 2014). El modelo utilizado en MSR es generalmente una ecuación cuadrática completa o la forma disminuida de esta ecuación. El modelo de segundo orden se puede escribir de la siguiente manera:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

donde $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}$ y β_{ij} son los coeficientes de regresión para los interceptos, los coeficientes lineal, cuadrático y de interacción respectivamente y X_i y X_j son variables independientes codificadas (Baş y Boyacı, 2007).

La MSR ha sido muy popular para los estudios de optimización en los últimos años. El término optimización se ha utilizado comúnmente en análisis químicos como medio para descubrir condiciones en las cuales aplicar un procedimiento que produzca la mejor respuesta posible (Araujo y Brereton, 1996). Algunas etapas en la aplicación de la MSR como una técnica de optimización son las siguientes:

1. la selección de variables independientes de efectos importantes sobre el sistema a través de estudios de cribado y la delimitación de la región experimental, de acuerdo con el objetivo del estudio y la experiencia del investigador;
2. la elección del diseño experimental y la realización de los experimentos de acuerdo con la matriz experimental seleccionada;
3. el tratamiento matemático-estadístico de los datos experimentales obtenidos a través del ajuste de una función polinómica;
4. la evaluación de la aptitud del modelo;
5. la verificación de la necesidad y posibilidad de realizar un desplazamiento en dirección a la región óptima;
6. obtener los valores óptimos para cada variable estudiada (Bezerra *et al.*, 2008).

Esta metodología actualmente es aplicada en la industria química y en varios campos tales como la electrónica, la biotecnología, ciencias de la vida, industria automotriz, agricultura, entre otros (Myers *et al.*, 2016). La MSR ha sido empleada para encontrar las condiciones óptimas de extracción de polisacáridos del hongo *P. eryngii* utilizando ultrasonido, las cuales fueron: tiempo de extracción 39 min, potencia ultrasónica 517 W, tasa agua-material 19 mL/g, y el rendimiento de los polisacáridos extraídos de *P. eryngii* fue de 34.3% bajo estas condiciones, resultado experimental que se encuentra en buena correspondencia con el predicho por el modelo (34.6%) (Zhang *et al.*, 2014).

La MSR se ha utilizado para optimizar las condiciones de extracción de antioxidantes de naturaleza fenólica con un contenido relativamente bajo de cafeína del té verde mediante la extracción asistida por ultrasonido (Lee *et al.*, 2013). Las condiciones óptimas predichas para la actividad antioxidante más alta y el nivel mínimo de cafeína se encontraron en etanol al 19.7%, tiempo de extracción de 26.4 min y temperatura de extracción de 24.0 °C. En las condiciones óptimas predichas, los valores experimentales fueron muy cercanos a los valores predichos: el rendimiento de la actividad antioxidante y la cafeína fueron del 82.1% y 15.4 mg/g, respectivamente. Por tanto, la metodología de superficie de respuesta ha demostrado ser útil en la predicción de las condiciones óptimas de extracción de antioxidantes mediante ultrasonido.

1.5.1 Diseño compuesto central

Los diseños de segundo orden más utilizados en la metodología de superficie de respuesta son los diseños factorial 3k, el de compuesto central y el Box-Behnken. El diseño compuesto central es probablemente el más popular de todos los diseños de segundo orden. Fue presentado por Box y Wilson en 1951. Este diseño consta de las siguientes partes: 1) un diseño factorial completo o factorial fraccional; 2) un diseño adicional, a menudo un diseño de estrella en el que los puntos experimentales están a una distancia del centro; y 3) un punto central (Bezerra *et al.*, 2008). El diseño compuesto central basado en la metodología de superficie de respuesta ha sido empleado exitosamente para optimizar tres variables de extracción, incluida la concentración de etanol (X_1), el tiempo de extracción (X_2) y la relación etanol acuoso- materia prima (X_3), para el logro de alto rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos de *Epimedium brevicornum* Maxim mediante extracción ultrasónica (Zhao *et al.*, 2014).

Para optimizar y estudiar los efectos de la temperatura de extracción (30–50 °C), la potencia de ultrasonido (20–40 W), el tiempo de extracción (10–30 min) y la relación líquido sólido (1:10 1:20 g/mL) en EAU sobre el rendimiento máximo de antocianina total, el contenido fenólico y de flavonoides de la cáscara de rambután se utilizaron cuatro factores con un diseño compuesto central cara centrado de tres niveles. Las condiciones óptimas fueron temperatura de extracción de 50 °C, potencia de ultrasonido de 20 W, tiempo de extracción de 20 min y relación sólido-líquido de 1: 18.6. Bajo las condiciones optimizadas, los valores experimentales [antocianina total (10.26 ± 0.39 mg/100 g), fenoles (552.64 ± 1.57 mg EAG/100 g)] y contenido de flavonoides (104 ± 1.13 mg ER/100 g) coincidieron estrechamente con los valores pronosticados e indicaron la idoneidad de los modelos desarrollados (Maran *et al.*, 2017).

Capítulo 2 Materiales y métodos

2.1 Organismo utilizado y condiciones de cultivo

Los experimentos se realizaron en la Planta de Investigación-Producción de Setas Comestibles, en el Laboratorio de Inmunología y Microbiología del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) y en el Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Biología y Geografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Oriente.

En el trabajo se utilizó la cepa de *P. ostreatus* CCEBI 3024, perteneciente a la colección de cultivos del CEBI. Las cepas se conservan en un medio de APD (Agar Papa Dextrosa) a 6 °C. Para su propagación, la siembra se realizó en placas Petri, las cuales fueron incubadas en oscuridad y a temperatura ambiente 27-30 °C hasta lograr un crecimiento micelial total a los 8-10 días.

2.2 Obtención de biomasa micelial

El cultivo sumergido se desarrolló de 10 a 15 días, en Erlenmeyers de 250 mL de capacidad conteniendo 200 mL de medio YPG (Levadura Peptona Glucosa), con la siguiente composición: glucosa (2%); peptona (0.5%); extracto de levadura (0.5%); KH_2PO_4 (0.1%); $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1%), propuesto por Horitsu *et al.* (1992) a un pH 5. Se utilizó una zaranda (HDL, China) a 120 rpm.

Tras el crecimiento de la biomasa micelial, esta se filtró, y se lavó exhaustivamente con agua destilada. Posteriormente se filtró al vacío y se pesó en una balanza analítica Sartorius.

2. 3 Fenoles totales y actividad antioxidante de extractos obtenidos por diferentes métodos de extracción

2.3.1 Métodos de extracción

Se pesaron 3 gramos de micelio vegetativo a los que se le añadieron 10 mL de agua destilada (tasa líquido sólido 10:3 mL/g) en diferentes recipientes de acuerdo al tipo de extracción con el que se procedería. En todos los casos las extracciones se realizaron por triplicado, en tiempos de 5 y 15 minutos.

2.3.1.1. Extracción mediante baño ultrasónico

Un baño ultrasónico (*Ultrasonic Bath Cleaner SB-3200DT*) de 55 ± 5 KHz de frecuencia y 180 W de potencia, dimensiones de 300*155*150 (mm) y 6 litros de volumen, se llenó con agua hasta 2/3 de su capacidad. Se situó en una gradilla un tubo de vidrio de 15 mL de volumen, conteniendo la biomasa micelial y el agua destilada. La temperatura de las extracciones fue de 25 ± 5 °C.

2.3.1.2 Extracción mediante sonda ultrasónica

Una sonda ultrasónica (*SCIENTZ-II D Ultrasonic Cell Crusher*) de frecuencia 20-25 kHz, cuya potencia se fijó en 50 % (425 W) se introdujo ~10mm (aproximadamente hasta la mitad) en el líquido. La amplitud se fijó en 6 μm , la recomendada para los 10 mL de

volumen de la muestra. La temperatura de las extracciones fue de 25 ± 3 °C. El tiempo de sonicación fue de 2 s y el tiempo de espera 4 s.

2.3.1.3 Extracción mediante agua caliente 100 °C

Estos extractos se obtuvieron colocando las muestras a una temperatura de 100 °C en baño de María. Luego de realizadas las extracciones, se centrifugaron (Heal Force Neofuge 15 R) los extractos a $150 \times g$ durante 10 min, y posteriormente se filtraron a través de una membrana de tamaño de poros ~ 0.22 μm , y se conservaron a 4-6 °C para su posterior análisis.

2.3.2 Determinación del contenido de fenoles totales

La concentración de compuestos fenólicos en los extractos acuosos de hongos se estimó mediante un ensayo colorimétrico, basado en los procedimientos descritos por Slinkard y Singleton (1977). 0.5 mL de los extractos se transfirieron a un tubo de ensayo, donde se le añadieron 1 mL de reactivo Folin-Ciocalteu al 50%, dejándose reaccionar durante 5 min a 30 °C en un cuarto oscuro. Luego, se adicionaron 2 mL de solución de Na_2CO_3 al 7.5%. Después de 1 h de reposo se determinó la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV2100 Rayleigh.

Se usó ácido gálico para calcular la curva de calibración (0.01-0.5 mg/mL; $y = 0.0163x + 0.049$ $R^2 = 0.9965$). La estimación de los compuestos fenólicos se realizó por triplicado. Los resultados fueron expresados como promedios \pm desviaciones estándar y expresados como mg en equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de biomasa seca.

2.3.3 Evaluación de la actividad antioxidante

2.3.3.1 Captación del radical DPPH

El método DPPH es un procedimiento establecido para medir la capacidad de eliminación de radicales de un compuesto basado en los procedimientos relacionados por Shimada *et al.* (1992) con algunas modificaciones. 1.25 mL de los extractos a diferentes concentraciones (0.5-2 mg/mL) se mezclaron con 1.25 mL de solución metanólica de DPPH al 0.6mM y fueron agitados vigorosamente en un vórtex. Luego fueron incubados durante 30 min en la oscuridad y posteriormente se leyó la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro, contra un blanco de metanol/agua en iguales proporciones. Los resultados se expresaron como porcentaje de captación del radical DPPH. El porcentaje de captación del radical DPPH se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ captación del DPPH} = (\text{AC} - \text{AM}) / \text{AC} * 100 \quad (2)$$

donde AC es la absorbancia de la solución DPPH sin extractos (en cambio, agua), y AM

y AM absorbancia de las muestras. Asimismo, se estimó la concentración a la que se alcanza el 50% de la captación de este radical (EC_{50}). Esta se calculó mediante el gráfico de porcentaje de captación del DPPH contra la concentración correspondiente del extracto.

2.3.3.2 Poder reductor

El poder reductor se determinó por la técnica referida por Oyaizu (1986), con ligeras modificaciones. A 680 μL de diferentes concentraciones de los extractos se les añadieron

680 μL de buffer fosfato de sodio pH 6.6 y ferrocianuro de potasio (10 g/L). Se incubó durante 20 min a 50 °C y una vez frescas las muestras, se les añadió 680 μL de ácido tricloroacético (100 g/L). A continuación, se procedió a centrifugar a 200 x g durante 10 min. Posteriormente se tomaron 1365 μL del sobrenadante, a los que se les añadió 1365 μL de agua destilada y 270 μL de cloruro férrico (1 g/L). Posteriormente se leyó la absorbancia a 700 nm. El poder reductor se expresó como EC₂₅ (mg/mL), que es la concentración efectiva de los extractos en la cual la absorbancia es 0.25. Este valor fue obtenido a partir del gráfico de la absorbancia registrada a 700 nm contra la concentración correspondiente del extracto.

2.3.4 Análisis estadístico

En el procesamiento de los datos se utilizó el software profesional Statgraphics Centurion XV (Statistical Graphics Corporation, 2005). La normalidad de la distribución de los residuos de la concentración de fenoles totales, así como de EC₅₀ y EC₂₅ de los ensayos de captación del DPPH y poder reductor de extractos de *P. ostreatus*, fue probada utilizando el test de Shapiro a un 5% de nivel de significancia. La prueba de Shapiro-Wilk está basada en la comparación de los cuartiles de la distribución normal ajustada a los datos. Si el valor de P fuese menor que 0.05 entonces se podría rechazar la idea de que los residuos provendrían de una distribución normal, lo que estaría violando uno de los supuestos del ANOVA. Se comprobó la homocedasticidad para cada factor (método y tiempo de extracción) por medio de una prueba de Levene a un 5% de nivel de significancia, por lo que un valor de P por debajo de 0.05 representaría diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones estándar.

Se realizó un ANOVA multifactorial, a un 5% de nivel de significancia considerando la interacción entre los factores. En los casos en que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, para determinar qué medias son significativamente diferentes de las otras se realizó una Prueba de Rangos Múltiples de la Diferencia Menos Significativa Protegida de Fisher (LSD) por factor. Se realizaron análisis de correlación y regresión lineal simple para evaluar la asociación y la dependencia, respectivamente, existente entre la actividad antioxidante estimada mediante los ensayos del DPPH y poder reductor con relación a la concentración de fenoles totales en los extractos.

2.4 Efecto de tres variables sobre la extracción con sonda ultrasónica utilizando la metodología de superficie de respuesta

2.4.1 Diseño experimental

La MSR contiene un diseño estadístico experimental. De acuerdo a Baş y Boyacı (2007), dependiendo de los criterios especiales y la selección de puntos y números experimentales, diferentes diseños experimentales podrían ser realizados trabajando con un estadístico experimental. El diseño no solo aleatoriza el error experimental a cada punto experimental, sino que también es igual a la distribución de puntos experimentales en el rango investigado de variables independientes. Estos aumentan la precisión del modelo (Baş y Boyacı, 2007).

El diseño de Box-Wilson, también llamado diseño central compuesto (DCC), es un diseño experimental utilizado para lograr la máxima información sobre un proceso a partir de un

número mínimo de experimentos (Yang *et al.*, 2009). En DCC, se utilizó el diseño experimental central compuesto cara centrado (CCCC) en este estudio para determinar las condiciones óptimas y estudiar el efecto de tres parámetros o variables: tiempo de extracción (min), potencia de ultrasonido (W) y gramos de micelio (g) en tres respuestas contenido fenólico total (mg/100 g MS) captación de DPPH (%) y poder reductor de los extractos acuosos de micelio vegetativo de *P. ostreatus* obtenidos mediante sonda ultrasónica. A partir de resultados experimentales preliminares (no reportados), y de la revisión bibliográfica, se determinaron los rangos de los parámetros o variables del proceso: tiempo de extracción (5–35 min), potencia ultrasónica, la que fue determinada por el máximo recomendado para el volumen de muestra utilizado, de 5 mL, (29–314 W) en el equipo empleado para la extracción, y gramos de micelio (1-2 g), los experimentos se establecieron en base a un diseño CCCC con tres factores en tres niveles y cada variable independiente se codificó en tres niveles entre -1, 0 y + 1. La codificación de las variables se realizó mediante la siguiente ecuación: (Maran *et al.*, 2013)

$$x_i = (X_i - X_z) / \Delta X_i \quad i=1,2,3 \dots k \quad 3)$$

donde x_i , es el valor adimensional de una variable independiente; X_i , el valor real de una variable independiente; X_z , el valor real de una variable independiente en el punto central; y ΔX_i cambio gradual del valor real de la variable i correspondiente a una variación de una unidad para el valor adimensional de la variable i . En este diseño, los puntos de estrella están en el centro de cada cara del espacio factorial, por lo tanto $\pm \alpha = \pm 1$. Las variables independientes codificadas y no codificadas utilizadas en este estudio se presentan en la tabla 1.

Se realizaron un número total de 16 experimentos, que consta de 8 puntos factoriales, 6 puntos de estrella y 2 réplicas en los puntos centrales (para permitir la estimación del error puro). Cada experimento se realizó por triplicado. La secuencia experimental se aleatorizó para minimizar los efectos de variabilidad inesperada en las respuestas debido a factores extraños. Se usó una ecuación polinómica de segundo orden para desarrollar un modelo empírico que correlacionara las respuestas con las variables independientes.

Los experimentos se realizaron de manera similar a los descritos para la extracción mediante sonda ultrasónica, variando las variables consideradas, y la amplitud, que en este caso fue de 3 μm , recomendada para el volumen de 5 mL. La determinación de los fenoles totales, poder reductor y el porcentaje de captación del DPPH se realizó de acuerdo a las metodologías descritas previamente. La actividad antioxidante se determinó a la concentración de 1.6 mg/mL, expresándose los resultados como porcentaje de captación del DPPH y poder reductor como absorbancia. Los valores observados se expresaron como el promedio \pm desviación estándar ($n = 3$).

2.4.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando Statgraphics Centurion XV (Statistical Graphics Corporation, 2005). Los datos experimentales se analizaron mediante análisis de regresión múltiple a través del método de mínimos cuadrados.

Los coeficientes de regresión de todos los términos (lineal, cuadrático e interacción) involucrados en el modelo y su efecto fueron analizados por diagrama estandarizado de Pareto y se generaron tablas ANOVA. Todos los términos del modelo fueron probados y verificados estadísticamente por la prueba F en niveles de probabilidad ($P < 0.05$).

Específicamente, los valores de "probabilidad (P) > F" menores que 0.05, 0.01 y 0.001 indican que los términos del modelo son significativos, altamente significativos y notablemente significativos, respectivamente, y los valores mayores que 0.05 indican que los términos del modelo no son significativos (Dahmoune *et al.*, 2015).

La autocorrelación o correlación entre los errores en el modelo y la asociación lineal entre los residuos adyacentes se evaluó mediante el método estadístico Durbin-Watson. La adecuación de los modelos desarrollados se probó encontrando los coeficientes de determinación (R^2), coeficientes de determinación ajustados (R^2 adj) y el valor F de la falta de ajuste. De las ecuaciones polinómicas de segundo orden fueron removidos los términos no relacionados. Después de ajustar los modelos, se construyeron gráficos de superficies para predecir la relación entre las variables independientes. También se obtuvieron los resultados estimados y los resultados de optimización de cada una de las respuestas.

2.4.3 Determinación de los puntos de optimización de las variables estudiadas de la extracción asistida por ultrasonido

Se aplicó el método de función Derringer o de deseabilidad para generar condiciones óptimas que tengan algún valor de deseabilidad específico. La escala de la función de deseabilidad individual varía entre $d = 0$, para una respuesta completamente indeseable, y $d = 1$, para una respuesta totalmente deseada, por encima de la cual las mejoras adicionales no tendrían importancia.

Esta técnica de optimización depende de si una respuesta particular debe ser maximizada o minimizada o dirigida en función de los requisitos del proceso, mientras que las variables independientes se mantienen dentro del rango (Maran *et al.*, 2017). En el presente estudio, se desarrolló la función deseabilidad para las siguientes respuestas: máximo de fenoles totales, captación de DPPH (%) y poder reductor. Luego se asignó un factor de peso, que define la forma de la función de deseabilidad para cada respuesta. Los pesos deben estar entre 1 y 10, con pesos más grandes correspondientes a respuestas más importantes. Se eligió un factor de peso de 1 para todas las deseabilidades individuales en este trabajo. El impacto de un objetivo se puede cambiar en relación con los otros objetivos. Puede variar de 1 (menos importante) a 5 (más importante). El valor predeterminado y escogido fue 3, que representa que todos los objetivos son igualmente importantes.

Tabla 1. Diseño experimental de superficie de respuesta compuesto central cara centrado, valores reales de las variables

Exp.	Tiempo (min)	Potencia (W)	Gramos de micelio (g)
1	5	162 (17%)	1.5
2	35	29 (3%)	1
3	5	314 (33%)	1
4	20	29 (3%)	1.5
5	35	29 (3%)	2
6	20	162 (17%)	1.5
7	5	314 (33%)	2
8	35	162 (17%)	1.5
9	5	29 (3%)	1
10	35	314 (33%)	1
11	20	162 (17%)	2
12	20	314 (33%)	1.5
13	5	29 (3%)	2
14	20	162 (17%)	1
15	20	162 (17%)	1.5
16	35	314 (33%)	2

Los valores codificados de X_{te} fueron -1 , 0 y $+1$ para los tiempos de extracción de 5 min, 20 min y 35 min, respectivamente.

Los valores codificados de X_{pu} fueron -1 , 0 y $+1$ para potencia ultrasónica de 3%, 17% y 33%, respectivamente.

Los valores codificados de X_{gm} fueron -1 , 0 y $+1$ para gramos de micelio de 1 g, 1.5 g y 2 g, respectivamente.

Capítulo 3 Resultados y discusión

Hoy en día, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares son las principales causas de muerte en todo el mundo y en la población cubana. Los estudios basados en la evidencia sugieren que existe una relación entre la fisiopatología de varias enfermedades crónicas (entre las que se incluyen estas) y el estrés oxidativo.

Por eso la ingesta de antioxidantes exógenos es crucial para mantener un nivel adecuado de antioxidantes para equilibrar las ERO, especialmente cuando los sistemas humanos de defensa y reparación de antioxidantes *in vivo* se consideran insuficientes para prevenir totalmente el daño (Abdullah *et al.*, 2012). Los productos naturales con actividad antioxidante se utilizan para ayudar al sistema endógeno de protección, aumentando el interés en el papel antioxidante de los productos nutraceuticos (Kanter, 1998).

Múltiples productos naturales de plantas y hongos, incluidos los polisacáridos, fenoles, flavonoides, vitaminas y terpenoides, pueden actuar como antioxidantes (Zheng *et al.*, 2011). Los hongos, valorados durante mucho tiempo como alimentos deliciosos y nutricionales en muchos países, ahora se estudian cada vez más por sus características químicas y nutricionales (Manzi *et al.*, 1999). Varios estudios declaran que los fenoles son componentes mayoritarios de los extractos de los hongos con actividad antioxidante. Los fenoles pueden clasificarse como inhibidores de radicales libres (rompe cadenas), descomponedores de peróxido, inactivadores de metales o eliminadores de oxígeno (Dziezak, 1986; Yagi, 1970).

Hace más de diez años, alrededor del 80%-85% de todos los productos de hongos medicinales comestibles se derivaban de los cuerpos fructíferos y solo el 15% procedía de extractos de micelios (Lindequist *et al.*, 2005). Por lo tanto, el cultivo sumergido es prometedor y es todavía una alternativa poco explorada para la extracción de moléculas bioactivas en poco tiempo, que también permite el almacenamiento de micelios durante un largo período sin alteraciones genéticas, beneficiando la conservación de la biodiversidad (Zilly *et al.*, 2011).

En general, las tecnologías de disrupción celular no convencionales (como el ultrasonido) pueden permitir la extracción de compuestos nutricionalmente valiosos de los hongos desde un punto de vista económico y ambientalmente sostenible. Existe la necesidad de desarrollar una base de datos para establecer las condiciones óptimas para extraer compuestos específicos con la tecnología apropiada (Roselló-Soto *et al.*, 2016).

Sin embargo, la investigación de componentes bioactivos provenientes del micelio vegetativo extraídos mediante diferentes procedimientos en hongos comestibles silvestres y cultivados es aún deficiente. A partir de las experiencias de nuestro grupo de trabajo acerca de las propiedades inmunomoduladoras de extractos hidrosolubles crudos de *Pleurotus* sp., obtenidos tanto del micelio como de los cuerpos fructíferos (Llauradó *et al.*, 2015; Morris *et al.*, 2011), esta tesis profundiza en el estudio del contenido total de fenoles de extractos acuosos miceliales obtenidos mediante diferentes métodos, (agua caliente 100 °C y el ultrasonido) así como en la evaluación de sus potencialidades como fuentes de antioxidantes naturales para las industrias alimentaria y médico-farmacéutica.

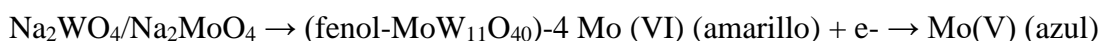
3.1 Fenoles totales y actividad antioxidante de extractos acuosos de *P. ostreatus* obtenidos mediante agua (100 °C) y ultrasonido

3.1.1 Fenoles totales

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, y sus estructuras pueden ser una molécula fenólica simple o un polímero complejo. Exhiben una amplia gama de propiedades fisiológicas, como los efectos antialérgicos, antiaterogénicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antitrombóticos, cardioprotectores y vasodilatadores (Valverde *et al.*, 2015).

Actúan como antioxidantes ya que pueden donar hidrógeno o electrones, estabilizar la reacción de ruptura de la cadena y terminar la reacción de Fenton (Rice-Evans *et al.*, 1996) por la presencia de grupos hidroxilo en su estructura (Hatano *et al.*, 1989). Pueden donar átomos de hidrógeno a los radicales lipídicos y producir derivados lipídicos y radicales antioxidantes, que son más estables y menos disponibles para promover la autooxidación (Kiokias *et al.*, 2008). Son capaces de participar en la cascada de eliminación de H₂O₂. Como resultado, la difusión de radicales libres está estéricamente impedida y las reacciones de peroxidación están restringidas (Takahama y Oniki, 1997). Diversos estudios demuestran que la presencia de compuestos de naturaleza fenólica es significativa para la actividad antioxidante *in vitro* de hongos del género *Pleurotus* (Pal *et al.*, 2010) y específicamente de la especie *P. ostreatus* (Yim *et al.*, 2010) aunque otros componentes como los polisacáridos y las vitaminas C y E presentes en *P. ostreatus* también pueden contribuir a su capacidad antioxidante.

En este trabajo, para la determinación del contenido de fenoles totales se empleó el ensayo de Folin Ciocalteu. El ensayo se basa en la transferencia de electrones en medio alcalino de compuestos fenólicos y otras especies reductoras al molibdeno, formando complejos azules que pueden monitorizarse espectrofotométricamente a 750–765 nm (Magalhães *et al.*, 2008), de acuerdo con la siguiente ecuación:



El centro de molibdeno en los complejos generalmente se acepta como el sitio de reducción, donde el ion Mo⁶⁺ se reduce a Mo⁵⁺ al aceptar un electrón donado por el antioxidante fenólico. En esta reacción, los compuestos fenólicos actuarían como agentes reductores, por lo que el ensayo es utilizado para medir lo que se conoce como Actividad Antioxidante Total. El ensayo Folin-Ciocalteu es altamente sensible a fenoles monohidroxilados, polifenoles, flavonoides y taninos; sin embargo, de acuerdo a Palacios *et al.* (2011) el método podría sobrestimar el contenido fenólico total, ya que otras sustancias fácilmente oxidables, como azúcares, ácido ascórbico, aminoácidos (tirosina, triptófano), etc. podrían interferir al reaccionar con el reactivo colorimétrico (una mezcla de ácidos fosfotungstáctico y fosfomolibódico).

Para la determinación del contenido de fenoles totales en nuestro trabajo, se utilizó una curva de calibración de ácido gálico. Ello obedece a que según Ferreira *et al.* (2009) los ácidos fenólicos han sido reportados como los compuestos polifenoles mayoritarios en los hongos. En *P. ostreatus* se han encontrado los siguientes fenoles: ácido p-cumárico,

ácido ferúlico, ácido gálico, ácido gentísico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido homogentísico, ácido protocatecuico, miricetina y pirogalol (Moro *et al.*, 2012).

En la figura 2 se presentan los resultados correspondientes al contenido de fenoles totales de los extractos acuosos de *P. ostreatus* obtenidos mediante diferentes métodos y en dos tiempos, evaluados mediante el ensayo de Folin Ciocalteu. Para probar los supuestos del ANOVA, se aplicó el estadístico de Shapiro -Wilks ($W = 0.974367$, $P = 0.854363$) y la prueba de Levene (0.941241 , $P = 0.412014$ para el factor métodos y 0.435859 , $P = 0.837261$ para el factor tiempo).

Se realizó un ANOVA multifactorial, calculándose la razón F (una relación entre la estimación entre grupos y la estimación dentro del grupo). Como el valor P de la prueba F es inferior a 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media concentración de fenoles totales de cada uno de los métodos a otro a un nivel de confianza de 95.0%. El ANOVA multifactorial reflejó que existen diferencias estadísticamente significativas al considerar efectos de segundo orden, entre los métodos ($F = 123.64$ $P < 0.001$) pero no entre los tiempos ($F = 2.71$, $P = 0.1259$), ni en la interacción entre estos factores ($F = 3.17$, $P = 0.0785$).

El método de extracción que resultó en mayor cantidad de fenoles totales fue el de agua caliente 100 °C, seguido del método de ultrasonido utilizando una sonda y por último el del baño ultrasónico, con diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Múltiples Rangos (LSD). Estos tiempos utilizados en la extracción con agua a 100 °C a 5 y 15 minutos, constituyen tiempos inferiores a los convencionales (0.5-10 h).

El uso de agua caliente para extraer el componente soluble del micelio fue para simular la preparación de la infusión de té herbal. Por lo tanto, en comparación con otros extractos solventes, la información obtenida mediante el uso de extractos de agua caliente sería más valiosa para estos productos que pueden usarse en las dietas humanas (Mau *et al.*, 2005).

A medida que aumenta la frecuencia del ultrasonido, disminuye la producción y la intensidad de la cavitación en el líquido (Mason y Lorimer, 2002). A una mayor frecuencia, como la del baño ultrasónico, la cavitación acústica sería más difícil de inducir ya que las burbujas de cavitación necesitan un retraso para iniciarse durante el ciclo de rarefacción o expansión y los ciclos de compresión-rarefacción pueden ser demasiado cortos para permitir el crecimiento progresivo de las burbujas de cavitación (Chemat *et al.*, 2017).

La duración de la fase de rarefacción (durante la cual crecen las burbujas de cavitación) es inversamente proporcional a la frecuencia ultrasónica; por lo tanto, a altas frecuencias, se requieren amplitudes e intensidades mayores para generar cavitación (Mason y Lorimer, 2002). No obstante, es posible que deba considerarse la formación de radicales libres a una irradiación superior a 20 kHz (Azwanida, 2015). Las moléculas de agua pueden romperse generando radicales libres altamente reactivos que pueden reaccionar y modificar otras moléculas (Arzeni *et al.*, 2012; Riesz y Kondo, 1992).

A bajas frecuencias, como la de la sonda, las burbujas de cavitación transitorias son relativamente menos numerosas, aunque de gran diámetro, lo que privilegia los efectos físicos en lugar de los químicos (Leong *et al.*, 2011; Mason *et al.*, 2011). El efecto de la frecuencia puede estar relacionado no solo con el tamaño de la burbuja de cavitación, sino

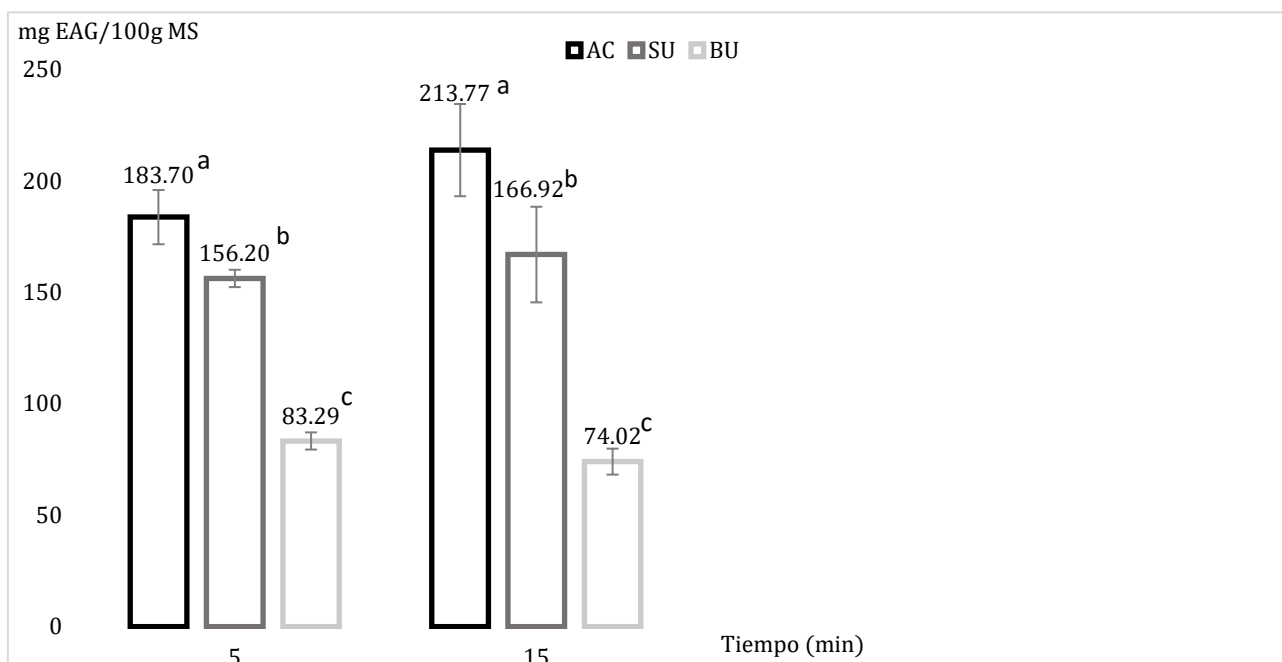


Figura 2. Contenido de fenoles totales de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos por diferentes métodos. Cada valor está expresado como el promedio \pm la desviación estándar ($n = 3$) SU: sonda ultrasónica, AC: agua 100 °C; BU: baño ultrasónico. Letras minúsculas diferentes indican promedios estadísticamente diferentes en cuanto a los métodos empleados.

también con su influencia en la resistencia a la transferencia de masa (Esclapez *et al.*, 2011).

En los baños ultrasónicos la intensidad ultrasónica es grandemente atenuada por el solvente y la cristalería experimental (Gogate, 2010). Por su parte, la sonda ultrasónica es mucho más poderosa porque la intensidad ultrasónica es liberada en una pequeña superficie (solo la punta de la sonda) comparada con el baño ultrasónico (Shirsath *et al.*, 2012). Algunos estudios han mostrado que el proceso de extracción por ultrasonido utilizando una sonda ultrasónica se caracterizó por un incremento en la transferencia de masa (Capelo-Martínez, 2009) debido a que la sonda está directamente inmersa en el matraz de reacción, por tanto, puede ocurrir menos atenuación (Chemat y Khan, 2011), y aumenta el área de contacto con el material para reducir la resistencia de transferencia de masa. En el baño ultrasónico, las ondas de ultrasonido primero deben pasar a través del líquido en el dispositivo ultrasónico y luego a través de la pared del recipiente, lo que resulta en una intensidad de ultrasonido inferior a la esperada en el recipiente de muestra (Collins *et al.*, 1999).

Los mejores resultados de la sonda con respecto al baño también pueden deberse a que la potencia de la sonda (425 W) es superior a la del baño (180 W). La potencia del ultrasonido es muy importante para mejorar el rendimiento de extracción de compuestos objetivo del material (Hossain *et al.*, 2012). El rendimiento de extracción aumentó con el incremento de la potencia ultrasónica, que se debe a que una potencia ultrasónica mayor resulta en un procedimiento de transferencia de masa mejorado (Wang *et al.*, 2013).

Da Porto *et al.* (2013), empleando una sonda ultrasónica, encontraron que los rendimientos máximos de polifenoles totales y sus fracciones de extracción de *Vitis vinifera* se lograron después de la aplicación de 15 min de ultrasonido y luego disminuyeron los rendimientos. Estos autores argumentan que esto podría deberse al hecho de que los polifenoles ubicados en la región externa de la partícula eran más fácilmente accesibles al solvente que aquellos en la parte interna en la que los tejidos de las semillas estaban más inaccesibles. Durante los primeros 15 minutos, la transferencia de masa ocurre principalmente por convección y corresponde a la solubilidad del soluto extraído, luego aparecen los fenómenos de difusión que involucran la parte interna de las partículas de semillas. En nuestro estudio, no existieron diferencias entre el contenido de fenoles totales de los extractos obtenidos a 5 y 15 minutos de extracción, pero en el estudio de Da Porto *et al.* (2013) emplearon una potencia ultrasónica de 150 W, en cambio en el nuestro fue de 425 W. Otros estudios han encontrado también una mayor eficacia en la extracción de fenólicos en *Cratoxylum formosum* empleando ultrasonido a 45 kHz, etanol al 50.3% v/v, a 65 °C durante 15 minutos (Yingngam *et al.*, 2014).

Se ha estimado el contenido de fenoles totales y flavonoides en ocho especies de hongos comestibles: seis silvestres (*Boletus edulis*, *Calocybe gambosa*, *Canthabellus cibarius*, *Craterellus cornucopioides*, *Hygrophorus marzuolus*, *Lactarius deliciosus*) y dos cultivados (*A. bisporus* y *P. ostreatus*) (Palacios *et al.*, 2011). Los niveles de compuestos fenólicos y flavonoides, en términos de materia seca, estuvieron en el intervalo de 1-6 mg/g. Dentro de este intervalo (1.56-2.14 EAG mg/g), se encontraron los valores de contenido de fenoles totales de los extractos obtenidos con el uso de la sonda ultrasónica y agua caliente 100 °C en el presente trabajo. El contenido de fenoles de *P. ostreatus* en la obra citada estuvo aproximadamente en este rango, siendo de los más bajos entre los hongos considerados en el estudio, solo superando a *H. marzuolus* y *C. cornucopioides*. Los extractos de estos hongos fueron obtenidos con agitación durante 24 horas con el uso

de metanol, en tanto en nuestro trabajo se utilizó agua como solvente de extracción y tiempos de extracción considerablemente menores (5-15 min), lo que podría sugerir probable utilidad de los métodos empleados en nuestro estudio.

Es preciso señalar que en el caso de los resultados de Palacios *et al.* (2011), se expresaron como equivalentes de catequina, la cual el propio estudio no detecta en *P. ostreatus*. El hecho de que los resultados deben expresarse en equivalentes de un compuesto estándar particular (como catequina, ácido gálico o ácido tánico) hacen que los resultados obtenidos para diferentes autores sean difíciles de comparar (Ferreira *et al.*, 2009). Los resultados de concentración de fenoles totales también se expresan ocasionalmente como ácido cafeico, ácido clorogénico o equivalentes de ácido ferúlico, lo que requiere la estandarización de los resultados informados (Karadag *et al.*, 2009). Además, como Folin-Ciocalteu es un ensayo basado en transferencia de electrones y mide la capacidad reductora del extracto, que normalmente se ha expresado como "contenido fenólico", sería más adecuado llamarlo ensayo de capacidad reductora hidrofílica teniendo en cuenta las interferencias químicas, que actúan como reductores, presentes en casi todos los alimentos, bebidas y preparaciones a base de hierbas, como tioles, aminoácidos, proteínas, algunas vitaminas e iones inorgánicos (Margraf *et al.*, 2015).

El contenido de compuestos fenólicos en los extractos acuosos de *Pleurotus* sp. obtenidos por diferentes métodos fue superior al informado por Beltrán Delgado *et al.* (2013) en cinco extractos obtenidos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp., obtenidos con solventes de diferente polaridad; quienes encontraron que los niveles más altos se encontraron en extractos polares (agua y etanol) con valores de 138.4 y 86.37 mg/100 g de base seca, respectivamente. En cambio, Yim *et al.* (2010) encontraron 798.55 mg EAG/100 g de biomasa seca de contenido de fenoles totales en el extracto acuoso de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* (de acuerdo al ensayo de Folin Ciocalteu) obtenido luego del tratamiento de la muestra en un baño de agua a 50 °C por 330 minutos, resultados que triplican los más altos obtenidos en este trabajo mediante agua caliente a 100 °C.

Las diferencias en estos estudios pueden deberse a que, en el caso de los compuestos fenólicos con más de un grupo hidroxilo, se espera que dupliquen el rendimiento molar de color; sin embargo, los efectos estéricos o sustituciones en el anillo aromático podrían modificar la respuesta esperada, dado que los grupos hidroxilo no son accesibles para el agente cromóforo (Palacios *et al.*, 2011). Además, estas discrepancias pueden ser atribuibles a la variabilidad genética intraespecífica. Por otro lado, estas comparaciones se realizan con estudios de cuerpos fructíferos, la escasez de estudios de fenoles de micelio vegetativo dificulta la comparación.

Los ácidos fenólicos se comportan como antioxidantes, debido a la reactividad de su residuo fenol (sustituyente hidroxilo en el anillo aromático). Aunque existen varios mecanismos, se cree que el modo predominante de actividad antioxidante es la eliminación de radicales a través de la donación de átomos de hidrógeno. Otros mecanismos antioxidantes establecidos, como la mitigación de radical, son a través de la donación de electrones y la extinción de oxígeno singlete (Shahidi *et al.*, 1992).

Los ensayos de extracción con ultrasonido han demostrado mejoras en el rendimiento de extracción que van del 6 al 35%, como resume Vilku *et al.* (2008). Los procesos de EAU son de gran interés desde un punto de vista industrial, ya que la tecnología es un paso adicional al proceso existente con una mínima alteración, la aplicación en la extracción

acuosa, donde los solventes orgánicos pueden reemplazarse con solventes generalmente reconocidos como seguros (GRAS), reducción en el uso de solventes y menor tiempo de extracción (García-Salas *et al.*, 2010).

3.1.2 Evaluación de la actividad antioxidante

La necesidad de medir la actividad antioxidante está bien documentada; estos ensayos se llevan a cabo para una comparación significativa de alimentos o productos comerciales y para la provisión de estándares de calidad para asuntos regulatorios y declaraciones de propiedades saludables (Shahidi, 2008). Hasta la fecha, se emplean varios ensayos químicos junto con tecnologías de detección altamente sensibles y automatizadas para la evaluación de la actividad antioxidante a través de mecanismos particulares, por ejemplo, actividad de barrido contra ciertos tipos de radicales libres o ERO, poder reductor y quelación de metales, entre otros (Shahidi y Zhong, 2015). Las propiedades antioxidantes de los hongos más frecuentemente consumidos (silvestres y cultivados) han sido evaluadas utilizando la mayoría de los tests *in vitro* más estandarizados como TEAC, el método del ácido β -linoleico, el método de dieno conjugado, la habilidad de barrido en radicales hidroxilos o DPPH, la habilidad quelante contra iones ferrosos, poder reductor, inhibición de la peroxidación, etc. y muestran valores intermedios comparados con frutas y vegetales (Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2009).

3.1.2.1 Actividad frente al radical DPPH

DPPH es el ensayo antioxidante más común que se utiliza y *Pleurotus sp* es uno de los hongos más estudiados (Khatua *et al.*, 2013). Es un método basado en la transferencia de electrones con un mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno que es solo una vía de reacción marginal en el ensayo (Prior *et al.*, 2005).

El DPPH es un radical cromógeno estable con un color morado intenso. Este color púrpura generalmente se decolora / desaparece cuando hay un antioxidante presente en el medio. Por lo tanto, las moléculas antioxidantes pueden extinguir los radicales libres DPPH (es decir, al proporcionar átomos de hidrógeno o por donación de electrones, posiblemente mediante un ataque de radicales libres sobre la molécula DPPH) y convertirlos en un producto incoloro / blanqueado (es decir, 2,2-difenilo -1-hidrazina, o una hidrazina análoga sustituida), lo que resulta en una disminución de la absorbancia a 517 nm (Ferreira *et al.*, 2007).

En el método realizado, el radical cromógeno púrpura se reduce mediante compuestos antioxidantes/reductores a la correspondiente hidrazina de color amarillo pálido: los resultados a menudo se expresan utilizando el parámetro EC_{50} más apropiado, definido como la concentración de sustrato que produce una pérdida del 50% de la captación del DPPH (Locatelli *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha argumentado que la eliminación de DPPH no imita el mecanismo de eliminación de radicales de antioxidantes en alimentos reales o sistemas biológicos debido a la falta de radicales de oxígeno en el ensayo (Benzie y Strain, 1999). Aun así, el análisis de eliminación de radicales DPPH se encuentra entre los métodos más utilizados y ofrece el primer enfoque para evaluar la actividad antioxidante (Shahidi y Zhong, 2015).

Las curvas de la captación del radical DPPH por los extractos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos por los métodos estudiados se presentan en la figura 3. Al investigar el hongo, este mostró actividad de eliminación de radicales libres DPPH, actuando posiblemente

como antioxidantes primarios según lo sugerido por Tsai *et al.* (2009). Los efectos de barrido de extractos acuosos obtenidos por diferentes métodos sobre radicales DPPH aumentaron con el incremento de las concentraciones y fueron de bajos a moderados (27.03-46.49%) a la concentración de 2 mg/mL. Otros autores han encontrado porcentajes de captación mayores ($63.20 \pm 0.24\%$) a la concentración de 1000 μM (Yim *et al.*, 2010). Los valores de EC_{50} fueron estimados en función de las concentraciones de los extractos a las que se alcanza el 50% de la captación, y se presentan en la figura 4.

Para probar los supuestos del ANOVA de los valores de EC_{50} se aplicó el estadístico de Shapiro-Wilk ($W = 0.920568$, $P = 0.135365$) y el test de Levene (0.669871 , $P = 0.526436$) para el factor métodos y para el factor tiempos (0.0002 , $P = 0.986647$). El factor métodos ($F = 134.98$) y tiempo de extracción ($F = 26.61$) así como su interacción ($F = 51.05$), resultaron significativos de manera destacable, según los resultados del ANOVA multifactorial ($P < 0.001$) al considerar efectos de segundo orden.

Un menor valor de EC_{50} indica una habilidad más fuerte de los extractos de actuar como inhibidores del radical DPPH. Los valores más bajos de EC_{50} fueron los de los extractos obtenidos mediante sonda ultrasónica y baño (así como los obtenidos a los 15 minutos de extracción) con diferencias estadísticamente significativas con respecto a los de agua caliente según la prueba de múltiples rangos LSD. Los tejidos sonicados absorben un volumen extra de solvente. Durante la sonicación, el proceso de cavitación provoca una inflamación de las células, la absorción de solventes y un agrandamiento de los poros de las paredes celulares, lo que permite una mayor difusividad a través de las paredes celulares. Los rendimientos mejorados obtenidos en la extracción asistida por ultrasonido también podrían atribuirse al hecho de que la sonicación podría incitar a la descomposición de las paredes celulares y facilitar el lavado del contenido celular (Diouf *et al.*, 2009).

Se han realizado estudios comparativos entre la actividad de captación del radical DPPH de extractos metanólicos de cuerpos fructíferos y de micelio vegetativo. Esta capacidad de los extractos de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* f. florida en un rango de concentraciones de 0.3125 a 5 mg/mL, resultó superior a la de extractos miceliales con rangos desde 49.31% y 77.82% pero inferior a la vitamina C. Los resultados mostraron que el EC_{50} de los cuerpos fructíferos y los extractos de micelio fue de 0.45 ± 0.04 y 2.76 ± 0.36 mg/mL, respectivamente (Sulistiany *et al.*, 2016). Este valor referido al EC_{50} de micelios es similar al que se obtuvo en nuestro estudio, para las extracciones asistidas por ultrasonido, de igual modo es superior a los obtenidos para cuerpos fructíferos.

El extracto metanólico, en cuya obtención se utilizó la sonicación por 15 minutos, seguida por sucesivas reextracciones, del micelio de *P. ostreatus* dio la menor actividad en la captación del radical DPPH ($\text{EC}_{50} = 58.13$ mg/mL) en un estudio comparativo de varias especies de hongos comerciales, que involucró tanto cuerpos fructíferos como micelio, para el caso de los cuerpos fructíferos fue de 6.54 ± 0.16 mg/mL (Reis *et al.*, 2012). El EC_{50} de ese extracto micelial es casi 15 veces superior a la mayor obtenida en nuestro estudio. En su estudio, Chirinang y Intarapichet (2009) notaron que la actividad de eliminación de radicales del extracto acuoso de *P. ostreatus* ($\text{EC}_{50} = 11.56$ mg/mL) fue mejor que la de *P. sajorcaju* ($\text{EC}_{50} = 13.38$ mg/mL) probablemente debido a un mayor contenido de compuestos fenólicos y fibras dietéticas.

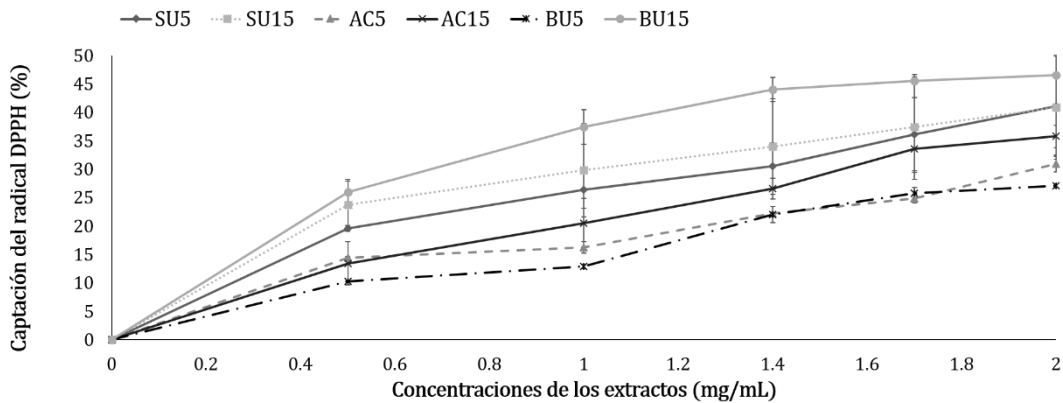


Figura 3. Captación del radical DPPH (%) de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos por diferentes métodos. Cada valor está expresado como el promedio \pm la desviación estándar ($n = 3$) (SU: sonda ultrasónica, AC: agua 100 °C, BU: baño ultrasónico)

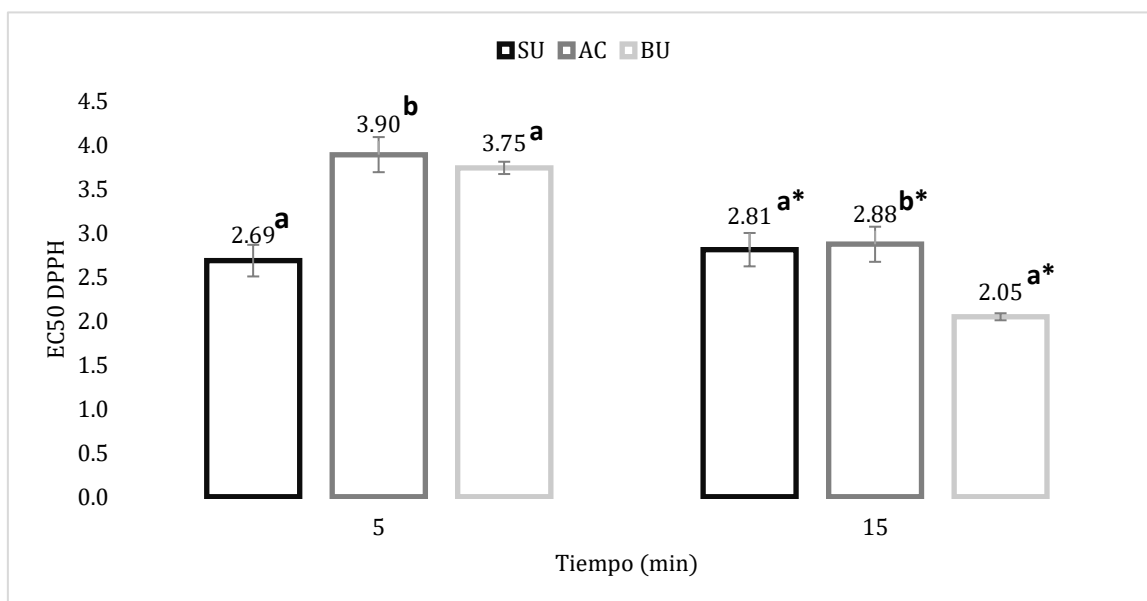


Figura 4. EC₅₀ para la captación del DPPH de los extractos acuosos de micelio vegetativo de *P. ostreatus* obtenidos por diferentes métodos. Cada valor está expresado como el promedio \pm la desviación estándar ($n = 3$) (SU: sonda ultrasónica, AC: agua 100 °C, BU: baño ultrasónico). Letras minúsculas diferentes indican promedios estadísticamente diferentes en cuanto a los métodos empleados, asteriscos en cuanto a los tiempos.

La extracción con agua a 100 °C, similar a la de nuestro estudio, resultó en un valor de 14.8 mg/mL de EC₅₀, casi cuatro veces superior al mayor valor de nuestro estudio, correspondiente a la extracción de 5 minutos con agua caliente (Tsai *et al.*, 2009). En cambio, en otro estudio, los extractos acuosos de cuerpos fructíferos silvestres de hongos turcos de esta especie, dieron valores de EC₅₀ casi cuatro veces menores a los nuestros (EC₅₀ = 0.545 mg/mL) (Oke y Aslim, 2011).

Los resultados varían de autor en autor probablemente por las condiciones ambientales diferentes, las metodologías de cultivo, etapa de desarrollo cuando son cosechados y la variación genética entre cepas (Ruiz-Rodriguez *et al.*, 2009). No obstante, se puede concluir que los métodos utilizados, desde el de agua caliente, a tiempos varias veces menores que los empleados frecuentemente en estas extracciones, como el de sonda y baño ultrasónico, son factibles de utilizar para la extracción de antioxidantes de micelio vegetativo de *P. ostreatus* en las condiciones probadas.

Múltiples autores han intentado establecer una correlación entre la concentración de especies antioxidantes cuantificadas en forma de fenoles totales y la actividad antioxidante frente al radical DPPH. Los resultados son divergentes. Algunos autores describen la existencia de correlación positiva entre la actividad antioxidante de extractos de hongos comestibles-medicinales con el contenido de compuestos fenólicos (Spigno *et al.*, 2007). De igual modo, Lim *et al.* (2007) refirió una elevada correlación entre la actividad secuestradora de radicales libres, la inhibición de la producción de óxido nítrico por células inflamatorias y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en extractos de *Tricholoma matsutake*. En cambio, otros estudios refieren poca correlación entre estas dos variables (Capecka *et al.*, 2005). En el caso de nuestro estudio, no se evidenció una asociación estadísticamente significativa entre EC₅₀ DPPH y fenoles totales (F = 0.75, P = 0.3998), el coeficiente de correlación (r = 0.211795) mostró una relación positiva relativamente débil entre los fenoles totales y el EC₅₀ de DPPH.

Aunque los compuestos fenólicos son conocidos por su fuerte actividad antioxidante (Buer *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2008), dos criterios clave a menudo influyen en su efectividad. En primer lugar, la estructura de cada compuesto fenólico es un elemento clave para determinar la efectividad de su actividad (Falleh *et al.*, 2012). Aunque estas moléculas comparten una estructura común en el anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo, a menudo son sustituidas por diferentes tipos de grupos químicos como hidroxilo, metoxilo, sulfato y otros (Buer *et al.*, 2010). La posición y la naturaleza de estos sustituyentes afectan en gran medida la efectividad de la actividad de los compuestos fenólicos. En segundo lugar, se reconoce que estas moléculas interactúan entre sí a través de sinergia y/o procesos antagonísticos (Falleh *et al.*, 2012). Con respecto al mecanismo de antagonismo, la mezcla de compuestos fenólicos tiene una actividad antioxidante relativamente baja (Attia, 2007). Por lo tanto, la combinación de diferentes estructuras, así como sus proporciones e interacciones relativas (sinergia o antagonismo) son la fuente de la variabilidad de su actividad antioxidante (Attia, 2007).

3.1.2.2 Determinación del poder reductor

El método del poder reductor se basa en la capacidad de la sustancia que será evaluada de reducir las especies férricas (Fe³⁺) a ferrosas (Fe²⁺) por una transferencia electrónica directa. Este ensayo suele realizarse de dos variantes: la conocida como FRAP y la conocida como poder reductor que es la empleada en nuestro trabajo, diferenciándose una de otra principalmente en la fuente de Fe³⁺ que se adiciona al sistema. En este

experimento, se realizó una medición espectrofotométrica a 700 nm, longitud de onda donde absorbe el complejo de Fe^{2+} formado. 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. Se refirió el poder reductor como la concentración del extracto a la que se alcanza el 25% de la absorbancia máxima (EC_{25}). El poder reductor de los hongos medicinales podría estar relacionado con la capacidad de actuar como donantes de hidrógeno (Shimada *et al.*, 1992).

En la figura 5 se reflejan las curvas del poder reductor de los extractos de *P. ostreatus* obtenidos por diferentes métodos. Se encontró que el poder reductor de los extractos de *P. ostreatus* aumenta constantemente en proporción directa a la concentración creciente del extracto. Estos resultados también han sido obtenidos en extractos etanólicos de hongos de esta misma especie (Jayakumar *et al.*, 2009). El poder reductor de los extractos acuosos de micelio vegetativo de *P. ostreatus* obtenidos por diferentes métodos se incrementó al aumentar la concentración, y fueron de bajos a moderados (0.22-0.32%) a la concentración de 2 mg/mL. Dados estos resultados se procedió a calcular el EC_{25} . Los valores de EC_{25} fueron estimados en función de las concentraciones de los extractos a las que se alcanza 0.25 de absorbancia y se presentan en la figura 6.

Para probar los supuestos del ANOVA de los valores de EC_{25} se realizaron el Estadístico W de Shapiro-Wilk ($W = 0.965408$, $P = 0.694703$) y el test de Levene (1.6388, $P = 0.227138$) para el factor métodos y para el factor tiempos (0.662474, $P = 0.427636$). El factor métodos resultó notablemente significativo ($F = 78.51$, $P < 0.0001$) y la interacción de este con el tiempo de extracción, también fue estadísticamente significativa ($F = 14.73$, $P = 0.0006$), según los resultados del ANOVA multifactorial al considerar efectos de segundo orden.

Un menor valor de EC_{25} indica una habilidad más fuerte de los extractos de actuar como agentes reductores. Los valores más bajos de EC_{25} fueron los de los extractos obtenidos mediante agua 100 °C y sonda ultrasónica, con diferencias estadísticamente significativas con respecto a los de baño ultrasónico según la prueba de múltiples rangos LSD. El poder reductor sí se relacionó con los fenoles totales, ($F = 48.48$, $P = 0.0000$) según el análisis de regresión lineal. El estadístico F indica que el modelo ajustado explica 75.1872% de la variabilidad en EC_{25} de poder reductor, *i.e* que los fenoles totales determinan este porcentaje de la variabilidad en el poder reductor. El R^2 adj es de 73.6364 %. El coeficiente de correlación es igual a -0.867106, indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables, y que al aumentar los fenoles totales decreció el EC_{25} , por eso la correlación es negativa, pero el efecto es de incrementar la actividad antioxidante. Dado que la mayoría de resultados en otros trabajos se expresan como EC_{50} , no fue posible realizar comparaciones.

3.2 Efecto del tiempo de extracción, potencia ultrasónica y gramos de micelio sobre los fenoles totales y la actividad antioxidante de extractos obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido

La MSR es una herramienta estadística multivariada capaz de derivar una ecuación polinómica que describe el comportamiento del conjunto de datos (González-Centeno *et al.*, 2014). Basados en experimentos preliminares (no reportados) y en la revisión

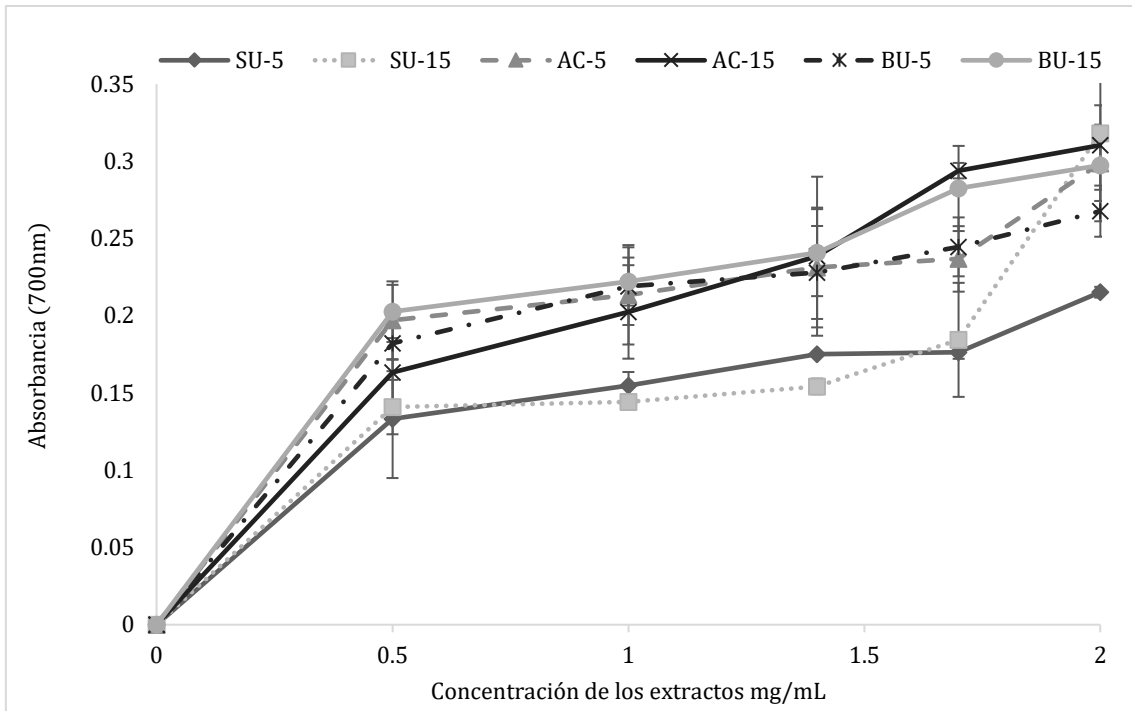


Figura 5. Poder reductor de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos por diferentes métodos (SU: sonda ultrasónica, AC: agua 100 °C, BU: baño ultrasónico). Cada valor está expresado como el promedio \pm la desviación estándar (n = 3)

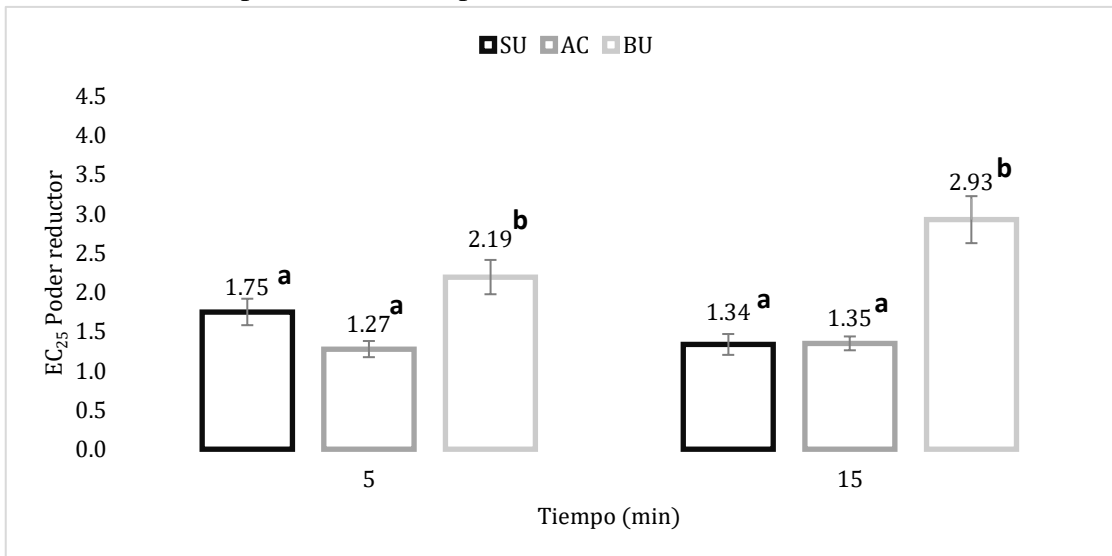


Figura 6. EC₂₅ para el poder reductor de los extractos acuosos de micelio vegetativo de *P. ostreatus* obtenidos por diferentes métodos. Cada valor está expresado como el promedio \pm la desviación estándar (n = 3) SU: sonda ultrasónica, AC: agua 100 °C; BU: baño ultrasónico. Letras minúsculas diferentes indican promedios estadísticamente diferentes en cuanto a los métodos empleados.

bibliográfica llevada a cabo, se escogieron como rangos para las variables a evaluar los siguientes: tiempo de extracción (5-35 min), gramos de micelio (1-2 g) y potencia ultrasónica (3-33%~ 29-314 W), cuyo rango estuvo determinado por el recomendado para el volumen de muestra utilizado, que fue de 5 mL, en el equipo empleado para la extracción.

Los valores observados estuvieron en el contenido de fenoles totales 172.79 y 419.03 mg EAG/100 g MS, y a la concentración de 1.6 mg/mL el porcentaje de captación del radical DPPH de estos extractos estuvo entre 1.57 y 37.26% y el poder reductor entre 0.13 y 0.66. Para ilustrar las correlaciones entre las variables independientes y dependientes consideradas, los gráficos de superficie de respuesta se construyeron sobre la base de las ecuaciones del modelo mencionadas posteriormente. Estos tipos de gráficos mostraron los efectos de dos de las tres variables independientes sobre el factor de respuesta, manteniendo la tercera en un nivel codificado que se encontró como óptimo.

3.2.1 Fenoles totales

Los valores óptimos para la extracción de fenoles totales fueron: tiempo de extracción = 5 min, potencia ultrasónica = 33% y gramos de micelio = 1g. Por eso, al estudiar el efecto de la interacción de los factores por medio de los gráficos de superficie de respuesta, el tercer factor fue fijado en estos valores.

Entre los experimentos realizados, los mayores valores de fenoles totales fueron observadas con el extracto obtenido en el experimento #3, con 419.03 ± 39.68 mg EAG/100 g (potencia ultrasónica = 33%, tiempo de extracción = 5 min, gramos de micelio = 1), y en los experimentos #7, 11, 13, 8, 16, 14 y 9, en ese orden, se obtuvieron los menores valores, siendo el menor 172.79 ± 16.83 mg EAG/100 g MS. Estos valores fueron superiores a los del extracto metanólico de una cepa comercial de *P. ostreatus*, 1.276 ± 0.065 mg EAG/g.

Se aplicó el test de Shapiro-Wilk ($W = 0.958582$, $P = 0.149072$) para probar la normalidad de los datos. Se realizó el test de Levene (0.271158 , $P = 0.763733$ por tiempo de extracción; 0.888254 , $P = 0.418462$ por potencia ultrasónica; 2.83822 $P = 0.069047$ por gramos de micelio) para la homogeneidad de varianza.

El coeficiente de determinación de los fenoles totales fue de $R^2 = 0.6800$ de datos experimentales. El valor más alto de R^2 muestra la conveniencia del modelo para dilucidar las relaciones entre las variables (Koocheki *et al.*, 2009). Sin embargo, un gran valor de R^2 no siempre implica que el modelo de regresión sea bueno. Agregar una variable al modelo siempre aumentará R^2 , independientemente de si la variable adicional es estadísticamente significativa o no. Por lo tanto, es mejor usar un R^2 adj para evaluar la adecuación del modelo. El estadístico R^2 adj, ajustado por grados de libertad (g.l), que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 62.40%. Este valor indica una alta representación de la variabilidad de los parámetros por el modelo. La comparación de los valores R^2 y R^2 adj para los modelos no mostró una diferencia dramática. Esta armonía indica que los términos no significativos no se han incluido en el modelo. Si hay muchos términos en los modelos, y el tamaño de muestra no es lo suficientemente grande, el R^2 adj puede ser notablemente más pequeño que R^2 (Yetilmezsoy *et al.*, 2009). En nuestro estudio, se encontró que el valor R^2 adj a estaba cerca del R^2 .

Una falta significativa de ajuste muestra que los modelos no pudieron representar los datos en el dominio experimental en los que los puntos no se incluyeron en la regresión. La prueba de falta de ajuste está diseñada para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados o si se debería usar un modelo más complicado. Se realiza comparando la variabilidad de los residuos del modelo actual con la variabilidad entre observaciones obtenidas en condiciones repetidas de los factores. Dado que el valor de P para la falta de ajuste F, relativa al error puro en la tabla ANOVA es mayor que 0.05, el modelo parece ser adecuado para los datos observados al nivel de confianza del 95.0%, no siendo significativa ($F = 0.90$, $P = 0.6147$), con lo que se verifica la validez del modelo, y podría ser utilizado para predecir los fenoles totales de extractos obtenidos por ultrasonido en el rango de parámetros estudiados y bajo las mismas condiciones, a partir del micelio vegetativo de *P. ostreatus*.

El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 6.63714. El error medio absoluto (EMA) de 33.5806 es el valor promedio de los residuos. Puesto que el valor de P del estadístico de Durbin-Watson es mayor que 5.0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5.0% ($P = 0.1770$). El rango del estadístico DW varía entre 0 y 4. El valor DW por debajo de 2 indica correlación positiva y por encima de 2 indica correlación negativa (Khajeh, 2011). Nuestro estudio muestra que, el valor DW de 1.79 está cerca de 2, lo que indica el buen ajuste del modelo.

El modelo polinómico de segundo orden, que correlaciona los fenoles totales y las tres variables codificadas, excluyendo los términos no significativos, se obtuvo en la ecuación 4 a continuación:

$$\text{Fenoles totales} = 236.681 - 49.7348 * X_{gm} - 35.6443 * X_{te} * X_{pu} + 6.4279 * X_{te} * X_{gm} + 47.7538 * X_{pu}^2 - 37.9496 * X_{pu} * X_{gm} - 35.8346 * X_{gm}^2$$

Aunque los coeficientes del modelo obtenidos son empíricos y no pueden relacionarse con significación física o química, son útiles para predecir los resultados de condiciones de operación no probadas [Ramirez, 2000 en Heleno *et al.* (2015)]. Cuanto mayor es el valor absoluto de un coeficiente, más importante es el peso de la variable correspondiente. Para cada término en los modelos, un valor F grande y un valor P pequeño implicarían un efecto más significativo en la variable de respuesta respectiva (Quanhong y Caili, 2005).

Los resultados del ANOVA derivados del análisis del experimento para la respuesta fenoles totales, se observan en la tabla 2. De los 9 efectos, 5 tienen valores de P menores que 0.05 de acuerdo a la razón F, indicando que son significativamente diferentes de cero en el nivel de confianza del 95.0%. En términos lineales, los gramos de micelio ($P < 0.0000$) tuvieron un efecto negativo significativo notablemente significativo, a diferencia del resto de factores, que no resultaron significativos. El signo del efecto marca el desempeño de la respuesta. De esta manera, cuando un factor tiene un efecto positivo, la respuesta es mayor en el nivel alto y cuando un factor tiene un efecto negativo, la respuesta es menor en el nivel alto (Heleno *et al.*, 2015). El valor del efecto cuantitativo representa la magnitud de la influencia del término en la respuesta (Maran *et al.*, 2013).

El coeficiente de regresión grande y negativo (-49) de los gramos de micelio significa que a un alto nivel de gramos de micelio el contenido de fenoles decrece. Su significación también se evidencia por su alto valor de F, y por su efecto estimado también grande y

negativo, como se muestra en el diagrama estandarizado de Pareto (Figura 7), que presenta los efectos estimados en orden decreciente de importancia.

En términos cuadráticos, los gramos de micelio tuvieron un efecto negativo también significativo ($P = 0.0320$), aunque inferior al efecto altamente positivo de la potencia ultrasónica ($P = 0.0080$). Esto significa que los fenoles totales aumentan con el incremento de la potencia, teóricamente hasta el 33%.

En tanto, la interacción negativa entre la potencia y los gramos de micelio ($P = 0.0003$) tuvo la mayor significancia en el contenido de fenoles totales entre los efectos interactivos, como también se aprecia en su alto valor de suma de cuadrados (Tabla 3). La significancia de esta interacción fue superior a la interacción negativa altamente significativa entre el tiempo y la potencia ultrasónica (0.0006). La interacción entre el tiempo y los gramos de micelio no fue significativa.

La extracción de fenoles totales reales obtenidos en experimentos y los fenoles totales pronosticados producidos por el modelo se muestra en la tabla 4. El coeficiente de correlación entre ambos grupos de valores fue alto ($r = 0.844162$).

3.2.1.1 Análisis de las superficies de respuesta para fenoles totales

Con respecto a la influencia combinada exhibida tanto por el tiempo de extracción como por la potencia del ultrasonido (Figura 8) el contenido de fenoles totales se incrementó alcanzando el máximo cuando la potencia ultrasónica ascendió de 3 a 33%, en el menor tiempo de extracción. El efecto cuadrático de la potencia cambió significativamente cuando el tiempo se incrementa de 5 a 35 minutos; a la más baja potencia el contenido de fenoles totales prácticamente se mantuvo constante, con un ligero ascenso; a la más alta, descendió. A grandes tiempos de extracción y altos valores de potencia aumentó el contenido de fenoles totales.

Aparentemente, esta actividad se favorece en cortos tiempos de extracción según se incrementa la potencia ultrasónica, evidenciando la negatividad de esta interacción. No obstante, es de considerar que la concavidad de la superficie de respuesta puede sugerir que el rango de estas variables quizás no es el más apropiado, por lo que sería recomendable realizar estudios en rangos de tiempo y potencia ultrasónica superiores.

Con respecto a la variable potencia ultrasónica, diversos estudios de EAU de fenoles a partir de la uva, (González-Centeno *et al.*, 2014) hojas de aceituna, (Ahmad-Qasem *et al.*, 2013) y cáscaras de rambután (Maran *et al.*, 2017) mostraron una mayor recuperación fenólica con el aumento de la potencia acústica. Esta mejora en la extracción con ultrasonido podría atribuirse a los efectos ultrasónicos como la formación de microchorros y la transmisión acústica (Sivakumar *et al.*, 2009). Es importante señalar que Ma *et al.* (2008) tampoco informaron diferencias significativas ($P > 0.05$) para el contenido fenólico total de los extractos de cáscara de mandarina obtenidos a una potencia de ultrasonido de hasta 200 W/L, al aumentar esta variable de 80 a 1400 W/L.

En cuanto al tiempo, dado que este no fue significativo, es de esperar que la mínima duración de la extracción sea suficiente para la extracción de los fenoles totales. Además, largos tiempos de extracción pueden traer como consecuencia que la estructura de los polifenoles se destruya y su estabilidad disminuya debido al colapso continuo de las microburbujas (Maran *et al.*, 2017).

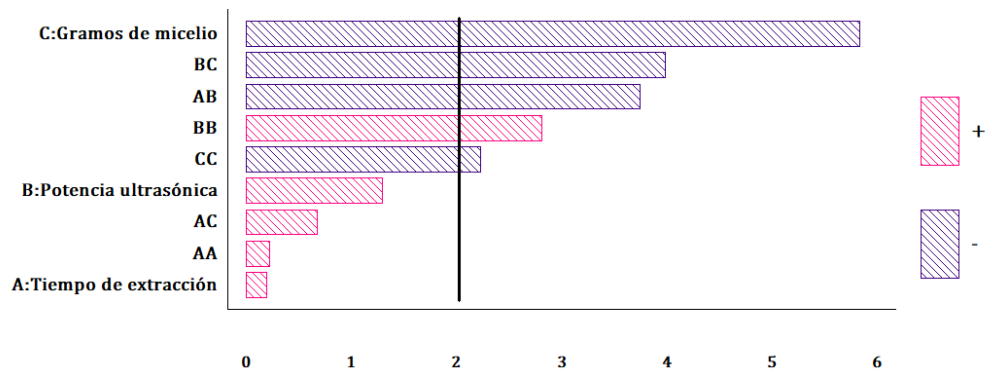


Figura 7. Diagrama estandarizado de Pareto para fenoles totales mostrando los efectos y las interacciones estimadas en orden decreciente.

Tabla 2. Análisis de varianza para fenoles totales

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
A:Tiempo de extracción	79.7195	1	79.7195	0.04	0.8493
B:Potencia ultrasónica	3612.85	1	3612.85	1.66	0.2057
C:Gramos de micelio	74206.4	1	74206.4	34.11	0.0000
AA	107.505	1	107.505	0.05	0.8253
AB	30492.4	1	30492.4	14.02	0.0006
AC	991.629	1	991.629	0.46	0.5039
BB	17160.8	1	17160.8	7.89	0.0080
BC	34564.1	1	34564.1	15.89	0.0003
CC	10832.0	1	10832.0	4.98	0.0320
bloques	839.941	2	419.971	0.19	0.8253
Falta de ajuste	78185.2	33	2369.25	53.78	0.0035

Tabla 3 Valores observados y predichos de la respuesta fenoles totales

No. de experimento	Observados	Predichos
1	264.83 ± 11.81	236.68
2	317.17 ± 30.34	289.60
3	419.70 ± 39.68	378.36
4	288.55 ± 7.02	284.44
5	247.77 ± 24.40	278.89
6	270.99 ± 14.01	236.68
7	172.79 ± 16.83	190.13
8	177.36 ± 7.57	236.68
9	194.93 ± 19.24	231.17
10	323.97 ± 32.09	294.21
11	172.98 ± 13.54	151.11
12	239.42 ± 23.56	284.44
13	175.21 ± 1.66	194.74
14	187.82 ± 4.10	250.58
15	274.45 ± 6.87	236.68
16	177.83 ± 12.21	131.70

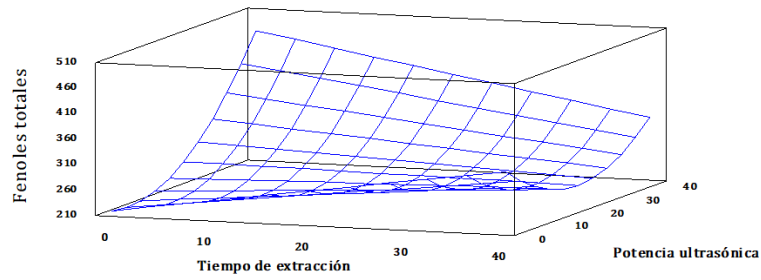


Figura 8. Superficie de respuesta estimada para fenoles totales (mg EAG/100 g MS) como una función de la potencia ultrasónica y el tiempo de extracción (gramos de micelio = 1 g).

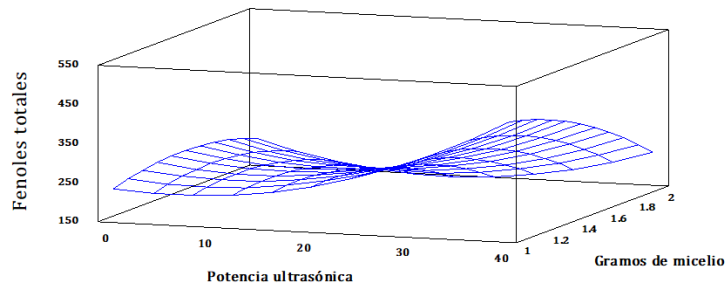


Figura 9. Superficie de respuesta estimada para fenoles totales como una función de la potencia ultrasónica y los gramos de micelio (tiempo de extracción = 5 min).

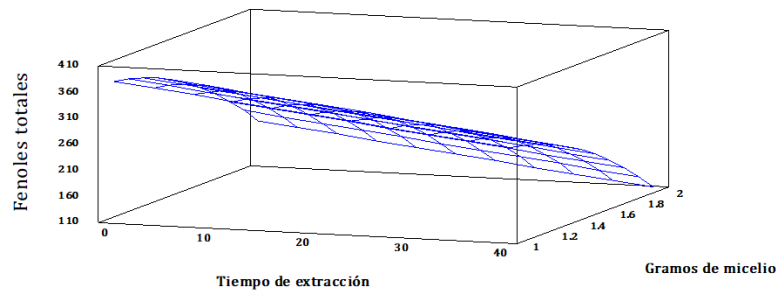


Figura 10. Superficie de respuesta estimada para fenoles totales como una función del tiempo de extracción y los gramos de micelio (potencia ultrasónica = 33%).

La aplicación de energía de ultrasonido durante más tiempo o más ciclos de trabajo aumenta la temperatura del medio de extracción debido a la generación de calor y disminuye el rendimiento de extracción de los fenólicos, probablemente debido a la descomposición química (Chavan y Singhal, 2013). Aunque otros autores refieren que largos tiempos son mejores para la extracción asistida por ultrasonido de fenoles (utilizando un baño) como Ghafoor *et al.* (2009) quien evaluó tiempos desde 20 a 34 minutos.

La tendencia observada para fenoles totales de micelio vegetativo de *P. ostreatus* tras la variación simultánea de gramos de micelio y potencia (tiempo = 5 min) se representa en la figura 9. Al menor valor de gramos de micelio, valores de medios a altos de potencia incrementaron sostenidamente la extracción de fenoles totales de los extractos, observándose los valores más altos. Al incrementarse la potencia desde 3 a 33% se incrementaron los fenoles totales según se aumentaron los gramos de micelio hasta un valor intermedio, encontrándose los mayores valores de esta actividad. Al incrementarse los gramos de micelio de 1 a 2 g a altos valores de potencia el contenido de fenoles descendió. A bajos valores de potencia, al incrementarse los gramos de micelio, los fenoles totales prácticamente permanecieron constantes.

En nuestro estudio el volumen del solvente (agua) se mantuvo constante, menores valores de gramos de micelio se corresponden con mayores tasas sólido líquido, por lo que se explica el efecto negativo de este factor sobre los fenoles totales. La diferencia de concentración entre el interior celular y el solvente exterior fue causada por la mayor relación sólido-líquido, lo que podría disolver los constituyentes de manera más efectiva y conducir a una mayor tasa de transferencia de masa (Ying *et al.*, 2011) y aumentar el rendimiento de extracción.

Estos resultados coinciden con lo observado en polifenoles de *Aronia melanocarpa* (d'Alessandro *et al.*, 2012) *Berberis asiatica*, (Belwal *et al.*, 2016) *Lycium ruthenicum*, (Jiang *et al.*, 2017) y *Vitis vinifera* (Vural *et al.*, 2018). Al parecer, los fenoles totales alcanzaron un máximo al aumentar la potencia y con valores bajos de gramos de micelio, demostrándose la alta significación negativa de esta interacción.

Finalmente, al plotear el tiempo combinado con los gramos de micelio (Figura 10) se puede observar que el máximo se encontró en valores bajos de tiempo y gramos de micelio. Al incrementarse el tiempo y los gramos de micelio el contenido de fenoles descendió de manera lineal, aunque no muy pronunciada. Esta interacción no fue significativa a un 95% de nivel de confianza. No obstante, esto solo indica su insignificancia en el rango de estudio.

3.2.2 Captación del radical DPPH

3.2.2.1 Análisis estadístico y ajuste del modelo utilizando MSR

Entre los experimentos realizados, las mejores respuestas para el porcentaje de captación de DPPH de los extractos a la concentración de 1.6 mg/mL, fueron observadas con el extracto obtenido en el experimento #13, con un porcentaje de captación de 37.26% (potencia ultrasónica = 3%, tiempo de extracción = 5 minutos, gramos de micelio = 2 g), y el # 8 con un porcentaje de captación de 37.13% (potencia ultrasónica = 17% , tiempo de extracción = 35 min, gramos de micelio = 1.5 g) y el del #16 (tiempo de extracción =

35 min, potencia ultrasónica = 33% gramos de micelio = 2 g) el de menor respuesta (1.57%).

Se aplicó el test de Shapiro-Wilk ($W = 0.973594$, $P = 0.509217$) para probar la normalidad de los datos. Se realizó el test de Levene (2.4624, $P = 0.0966352$ por tiempo de extracción; 2.3662 $P = 0.105413$ por potencia ultrasónica; 2.14831, $P = 0.128498$; por gramos de micelio) para la homogeneidad de varianza.

El coeficiente de determinación ($R^2 = 0.7872$) indica que el modelo explica el 78.72% de la variabilidad en el porcentaje de captación de DPPH. Dado que los valores de R^2 para esta variable de respuesta estuvo cerca de 0.80, el modelo de regresión fue adecuado para explicar su comportamiento. El estadístico R^2 ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 73.6743%. Este valor indica una alta representación de la variabilidad de los parámetros por el modelo. La comparación de los valores R^2 y R^2_{adj} para los modelos no mostró una diferencia dramática. La falta de ajuste no fue significativa ($F = 1.47$, $P = 0.3336$), por lo que el modelo parece ser adecuado para los datos observados al nivel de confianza del 95.0% y podría ser utilizado para predecir la actividad de captación del radical DPPH de extractos obtenidos por ultrasonido a partir del micelio de *P. ostreatus*.

El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 4.25408. El error medio absoluto (EMA) de 3.97901 es el valor promedio de los residuos. Se calculó el estadístico de Durbin-Watson ($DW = 2.28169$, $P = 0.8062$); puesto que el valor de P es mayor que 5.0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5.0%.

El modelo polinómico de segundo orden que correlaciona la captación del radical DPPH y las tres variables codificadas en este estudio se obtuvo en la ecuación 5 a continuación:

$$\% \text{ de captación del radical DPPH} = 26.9681 - 2.39316 * X_{te} - 2.55654 * X_{pu} + 7.90242 * X_{te}^2 - 8.08366 * X_{te} * X_{pu} - 5.47775 * X_{te} * X_{gm} - 5.53914 * X_{pu} * X_{gm} - 11.8876 * X_{gm}^2$$

En este caso, 7 de los 9 efectos tienen un valor de P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. En términos lineales, la potencia ultrasónica ($P = 0.0272$) tuvo un efecto significativo negativo en captación del DPPH, al igual que el tiempo, ($P = 0.0378$) a diferencia de los gramos de micelio, factor que no resultó significativo. El tiempo de extracción es uno de los factores cruciales para la extracción de compuestos antioxidantes, ya que estos compuestos son potencialmente propensos a la degradación si se exponen a condiciones ambientales durante un período prolongado (Ng *et al.*, 2012). El número de microburbujas de cavitación creadas por ultrasonido aumentó con la duración extendida. El colapso asimétrico de las microburbujas cerca de las superficies también se asoció con microchorros que podrían lavar las superficies y dañar la sustancia en solución (Vilkhu *et al.*, 2008).

En términos cuadráticos, los gramos de micelio tuvieron un efecto negativo destacable significativo ($P < 0.0000$), lo que significa que la actividad antioxidante determinada por el ensayo de DPPH tuvo un máximo a un determinado nivel de gramos de micelio, luego del cual comenzó a decrecer. A su vez este efecto fue superior al efecto positivo del tiempo ($P = 0.0037$) mientras que el término interactivo del tiempo de extracción y la potencia ultrasónica ($P < 0.0000$) tuvieron la mayor significancia en la captación del

DPPH, superior a la interacción de la potencia y los gramos de micelio y del tiempo y gramos de micelio. Todos estos efectos fueron significativos en este orden, basándose en la suma de cuadrados y el valor de P, lo que puede ser visualizado en el diagrama de Pareto (Figura 11). Los efectos interactivos afectaron negativamente el porcentaje de captación de DPPH de los extractos, lo cual significa que cuando ambos factores incrementaban sus valores, el valor de la respuesta decreció.

Los valores reales de la captación del DPPH obtenidos en los experimentos y los predichos por el modelo se presentan en la tabla 4. El coeficiente de correlación entre estos grupos de valores fue de 0.887217, considerándose bueno.

3.2.2.2 Análisis de las superficies de respuesta

Los valores óptimos para la extracción del DPPH fueron: tiempo de extracción = 5 min, potencia ultrasónica = 33%, gramos de micelio = 1.5226 g. Por eso, al estudiar el efecto de la interacción de los factores por medio de los gráficos de superficie de respuesta, el tercer factor fue fijado en estos valores.

En lo referente a la influencia combinada mostrada tanto por el tiempo de extracción como por la potencia del ultrasonido (Figura 12), la actividad de captación del radical DPPH se incrementó cuando la potencia ultrasónica ascendió de 3 a 33%, en el menor tiempo de extracción. El efecto de la potencia cambió significativamente cuando el tiempo se incrementa de 5 a 35 minutos; a la más baja potencia decreció ligeramente y luego se incrementó esta actividad. A grandes tiempos de extracción y altos valores de potencia decreció considerablemente la actividad antioxidante. Aparentemente, esta actividad se favorece en cortos tiempos de extracción según se incrementa la potencia ultrasónica.

El aumento del proceso de extracción con ultrasonido se atribuye parcialmente a los fenómenos de cavitación, pero también a los efectos de la descomposición molecular. Sin embargo, prolongar el tratamiento ultrasónico contribuye a la degradación de los compuestos bioactivos, como se informó en investigaciones anteriores (Sang *et al.*, 2017).

La tendencia observada por la actividad de captación del radical DPPH del micelio vegetativo de *P. ostreatus* bajo la variación simultánea de los gramos de micelio y la potencia (tiempo de extracción = 5 min) se representa en la figura 13. Al menor valor de gramos de micelio, valores de medios a altos de potencia incrementaron sostenidamente la actividad antioxidante de los extractos. Al incrementarse la potencia desde 3 a 33% se incrementó la captación del DPPH según se incrementan los gramos de micelio hasta un valor intermedio, encontrándose los mayores valores de esta actividad. Al incrementarse la potencia y los gramos de micelio, la actividad descendió. A valores altos de gramos de micelio, al incrementarse la potencia la actividad prácticamente permaneció constante.

Al parecer, esta actividad alcanzó un máximo al aumentar la potencia y con valores intermedios de gramos de micelio. En nuestro estudio, el término lineal de la tasa líquido-sólido, expresada en gramos de micelio, influyó en los fenoles totales, no así en la actividad antioxidante. No obstante, algunos estudios tampoco encontraron influencia de esta variable tanto en el contenido de fenoles totales como en la actividad antioxidante (Ilaiyaraja *et al.*, 2015). De manera similar, la tasa solvente: sólido fue encontrada inefectiva en el proceso de extracción por Vu *et al.* (2017).

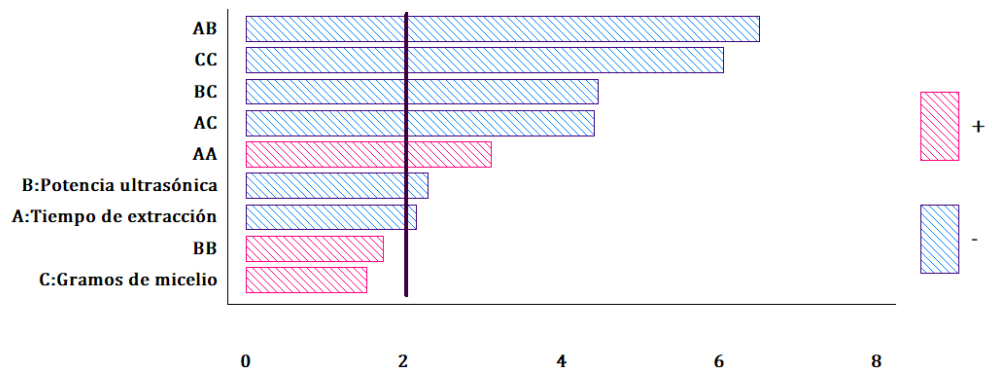


Figura 11. Diagrama estandarizado de Pareto para captación del DPPH (%) mostrando los efectos y las interacciones estimadas en orden decreciente.

Tabla 4. Análisis de varianza para la respuesta captación del DPPH (%)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
A:Tiempo de extracción	171.817	1	171.817	4.65	0.0378
B:Potencia ultrasónica	196.077	1	196.077	5.30	0.0272
C:Gramos de micelio	86.7007	1	86.7007	2.35	0.1344
AA	356.187	1	356.187	9.64	0.0037
AB	1568.29	1	1568.29	42.43	0.0000
AC	720.137	1	720.137	19.48	0.0001
BB	110.926	1	110.926	3.00	0.0918
BC	736.371	1	736.371	19.92	0.0001
CC	1352.97	1	1352.97	36.61	0.0000
bloques	24.6063	2	12.3032	0.33	0.7190
Falta de ajuste	1240.7	30	41.3568	0.81	0.6879

Tabla 5. Valores observados y predichos de la captación del DPPH (%) de los extractos acuosos de *P. ostreatus*

No. de experimento	Observados	Predichos
1	23.35 ± 0.75	35.22
2	28.66 ± 2.37	29.98
3	36.21 ± 3.25	29.78
4	31.60 ± 2.45	32.42
5	28.36 ± 2.31	33.50
6	28.91 ± 2.98	26.12
7	33.44 ± 3.36	33.05
8	37.13 ± 0.55	30.43
9	8.51 ± 0.25	7.64
10	16.89 ± 0.36	19.78
11	14.89 ± 0.76	14.74
12	22.95 ± 1.91	27.31
13	37.26 ± 3.55	33.08
14	6.01 ± 0.47	11.34
15	33.67 ± 3.09	26.12
16	1.57 ± 0.11	1.14

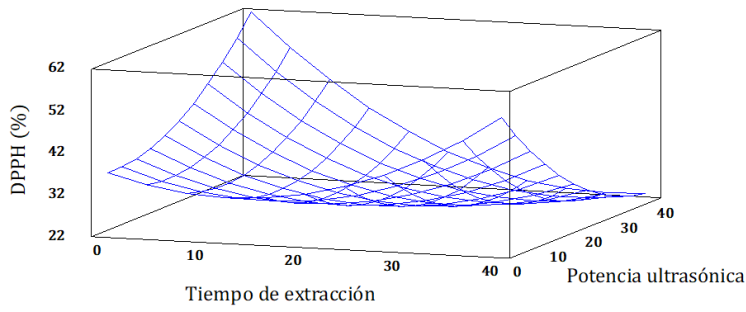


Figura 12. Superficie de respuesta estimada para captación del DPPH (%) como una función de la potencia ultrasónica y el tiempo de extracción (gramos de micelio = 1.5 g).

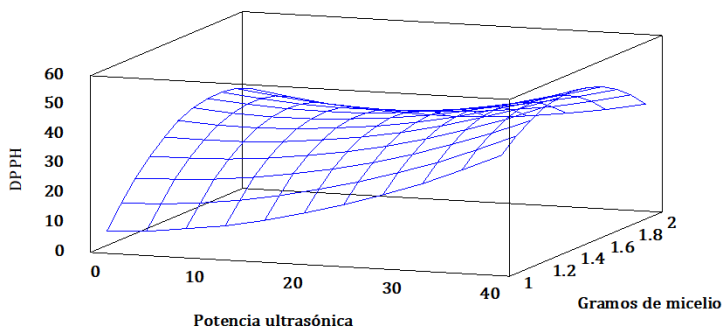


Figura 13. Superficie de respuesta estimada para captación del DPPH (%) como una función de la potencia ultrasónica y los gramos de micelio (tiempo de extracción = 5 min)

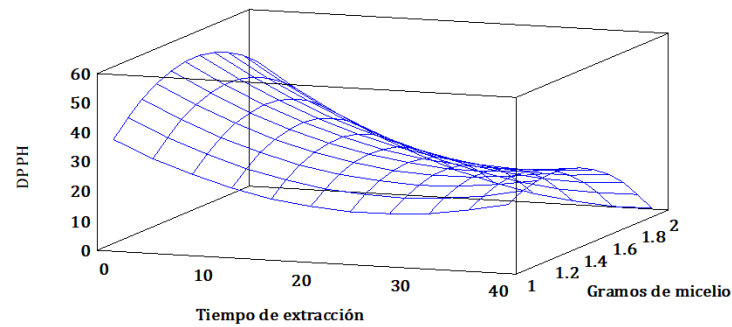


Figura 14. Superficie de respuesta estimada para captación del DPPH (%) como una función de los gramos de micelio y el tiempo de extracción (potencia ultrasónica = 33%)

Finalmente, al plotear el tiempo combinado con los gramos de micelio, se puede observar en la figura 14 que el máximo se encontró en valores cortos de tiempo y valores intermedios de gramos de micelio. A valores bajos de gramos de micelio, según se incrementa el tiempo la actividad antioxidante disminuyó generalmente. A valores altos de gramos de micelio, esta disminución al incrementarse el tiempo fue mucho más pronunciada y constante. De esta manera, se corrobora el efecto negativo de esta interacción sobre la actividad antioxidante de los extractos de *P. ostreatus*. Según Bezerra *et al.* (2008) la forma de este gráfico indicaría que el punto óptimo se encuentra fuera del área de estudio, no obstante, no sería posible desde el punto de vista físico.

Estos valores intermedios de gramos de micelio encontrados como óptimos para la actividad antioxidante, se corresponden con valores intermedios de tasas líquido-sólido, evidenciando la influencia cuadrática de este término en la actividad de captación del radical DPPH. Similarmente a nuestro estudio, la actividad antioxidante de la goma de la semilla de membrillo se incrementó cuando la tasa agua: semilla aumentó hasta 30:1 pero decreció a mayores tasas agua: semilla (Jouki *et al.*, 2014). Wong *et al.* (2013) reportó una tendencia similar para Dukung Anak (*Phyllanthus niruri*). Estos autores ilustraron que la capacidad de captación del DPPH se incrementó cuando la tasa líquido: sólido aumentó de 1:6 a 1:18. Sin embargo, a mayores tasas la capacidad de captación del radical DPPH decreció. Esto puede deberse al hecho de que una mayor tasa agua: sólido resultó en un mayor gradiente de concentración para extraer los compuestos antioxidantes polares y no polares, dependiendo de la proporción de estos en la muestra seleccionada (Ng *et al.*, 2012), lo cual también parece aplicar para el caso del micelio de *P. ostreatus*. Entonces, se puede concluir que la actividad antioxidante se incrementa al aumentar los gramos de micelio hasta que alcanza un nivel óptimo.

Los antioxidantes fenólicos interfieren con el proceso de oxidación como eliminadores de radicales libres y algunas veces como quelantes de metales (Shahidi y Zhong, 2015). No obstante, en este trabajo se encontró una relación estadísticamente significativa ($F = 5.53$, $P = 0.0230$) y moderadamente débil entre los fenoles totales y el porcentaje de captación del DPPH, con un coeficiente de correlación de 0.3278, y una R^2 de 10.7358, con lo que el contenido de fenoles totales en los extractos explicaría solo este porcentaje de variabilidad en la actividad antioxidante medida por el ensayo de DPPH. La efectividad de los antioxidantes es generalmente influida por un número de factores, incluyendo sus características estructurales, concentración, temperatura, tipo de oxidación, sustrato, estado físico del sistema, así como la presencia de prooxidantes y sinérgicos (Pokorny *et al.*, 2001). Alternativamente, los extractos de plantas y animales conteniendo un cóctel de sustancias antioxidantes con potenciales efectos sinérgicos son usados directamente para inhibir la oxidación *in vitro* e *in vivo* (Shahidi y Zhong, 2015), lo que también puede aplicar para el caso de los hongos.

3.2.3 Poder reductor

3.2.3.1 Análisis estadístico y ajuste del modelo utilizando MSR

Entre los experimentos realizados, las mayores respuestas para poder reductor (0.66), observada de los extractos a la concentración de 1.6 mg/mL, con el extracto obtenido en el experimento #3 (potencia ultrasónica de 33%, 5 minutos de extracción y con 1 gramo

de micelio) y el del #14 (tiempo de extracción = 20 min, potencia ultrasónica = 18% gramos de micelio = 1g) el de menor respuesta (0.13).

Se aplicó el estadístico de Shapiro-Wilk para determinar la distribución normal de los residuos ($W = 0.961288$, $P = 0.190593$). Se realizó la prueba de Levene (1.58236 , $P = 0.216709$ por tiempos de extracción; 0.0288341 , $P = 0.971596$ por potencia ultrasónica; 0.254062 , $P = 0.776748$ por gramos de micelio)

El modelo polinómico de segundo orden correlacionando al poder reductor y a las tres variables en este estudio fue obtenido con la ecuación 6:

$$\text{Poder reductor} = 0.395088 - 0.0328733 * X_{te} + 0.0852697 * X_{te}^2 - 0.137942 * X_{te} * X_{pu} - 0.04985 * X_{te} * X_{gm} - 0.0435833 * X_{pu} * X_{gm} - 0.134964 * X_{gm}^2$$

La falta de ajuste no fue significativa ($F = 5.42$, $P = 0.0937$), lo que significa que el modelo ajustado representa adecuadamente a los datos (tabla 6) En este caso, 6 efectos tuvieron valores de P menores que 0.05 , indicando que son significativamente diferentes de cero a un 95% de nivel de confianza, con comportamientos muy similares a los observados para el caso del DPPH, ya que ambos ensayos están basados en la transferencia de electrones, capacidades inherentes a determinados compuestos a los que se atribuye esta actividad, que están presentes en los hongos, como los fenoles y polisacáridos. El coeficiente de determinación ($R^2 = 0.7832$) indica que el modelo así ajustado explica el 78.32% de la variabilidad en el poder reductor. Mientras el valor de R^2 sea más cercano a la unidad, de una mejor manera el modelo empírico se ajusta a los valores reales (Han *et al.*, 2011).

El R^2 adj, que es más apropiado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 73.18%. Al comparar los valores de R^2 y R^2 adj del modelo estos no mostraron grandes diferencias. Esta armonía indica que los términos no significativos han sido eliminados del modelo. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 0.0774233. El error medio absoluto (EMA) de 0.051710 es el valor promedio de los residuos. Dado que el valor de P del estadístico de Durbin Watson es mayor que 0.05 , ($DW = 1.91198$, $P = 0.3632$) no hay indicación de autocorrelación serial entre los residuos.

El mayor coeficiente de regresión con un valor menor de P indica un efecto más significativo en su respectiva variable de respuesta (Yim *et al.*, 2012). En términos lineales, el tiempo de extracción, ($P = 0.0258$) tuvo un efecto significativo negativo sobre el poder reductor, en tanto los otros parámetros no resultaron significativos.

En términos cuadráticos, los gramos de micelio tuvieron un efecto negativo significativo destacable ($P < 0.0000$), superior al efecto positivo del tiempo ($P = 0.0095$) mientras que los efectos interactivos del tiempo de extracción y la potencia ultrasónica ($P < 0.0000$) tuvo un destacable efecto significativo, superior al resto de efectos e interacciones, aunque las interacciones del tiempo y los gramos de micelio, y de la potencia y gramos de micelio fueron altamente significativos en este orden, basándose en la suma de cuadrados y el valor de P , lo que se refleja en el diagrama de Pareto (Figura 15). La única interacción positiva fue la del tiempo y los gramos de micelio, resultando diferente a lo observado en la captación del DPPH, en el que todas las interacciones fueron negativas. Esto significa que el impacto del factor gramos de micelio dependerá del nivel del tiempo de extracción, y viceversa.

Los valores reales de poder reductor obtenidos en los experimentos y los predichos por el modelo producido se muestran en la tabla 7. El coeficiente de correlación entre ambos grupos de valores fue de 0.884997.

3.2.3.2 Análisis de las superficies de respuesta

Los valores óptimos para la extracción del poder reductor fueron: tiempo de extracción = 5 min, potencia ultrasónica = 33% y gramos de micelio = 1.3446 g. Por eso, al estudiar el efecto de la interacción de los factores por medio de los gráficos de superficie de respuesta, el tercer factor fue fijado en estos valores.

En lo relativo a la influencia combinada del tiempo de extracción y la potencia ultrasónica (Figura 16) el poder reductor se incrementó de manera constante cuando la potencia ultrasónica ascendió de 3 a 33%, en el menor tiempo de extracción, alcanzando un valor máximo. A bajos valores de potencia, el incremento del tiempo provocó un aumento en la respuesta, aunque no muy pronunciado. A altos valores de potencia, el incremento del tiempo hizo que el poder reductor disminuyera discretamente. A altos valores de potencia, según se incrementaba el tiempo decreció considerablemente la actividad antioxidante determinada por este ensayo, mostrando el efecto negativo de la interacción de estas dos variables. Aparentemente, esta actividad se favorece en cortos tiempos de extracción y altos valores de potencia ultrasónica, de manera similar a la actividad de captación del radical DPPH.

La tendencia observada para el poder reductor del micelio vegetativo de *P. ostreatus* bajo la variación simultánea de los gramos de micelio y la potencia (tiempo de extracción = 5 min) se observa en la figura 17. Al menor valor de gramos de micelio, según se aumenta la potencia se incrementan sostenidamente la actividad antioxidante medida por el poder reductor de los extractos. Al menor valor de potencia, también se incrementa la actividad hasta un punto en el que comienza a decrecer, manteniéndose en valores muy bajos. Al incrementarse la potencia hasta 33% se incrementó el poder reductor según se incrementan los gramos de micelio hasta un valor aproximadamente intermedio, encontrándose los mayores valores de esta actividad, luego de lo cual comienzan a decrecer. Con esto, se corrobora el efecto positivo de esta interacción. A valores altos de gramos de micelio, al incrementarse la potencia el poder reductor se incrementó. Al parecer, esta actividad alcanzó un máximo al aumentar la potencia y con valores de medios a bajos de gramos de micelio.

Al plotear el tiempo combinado con los gramos de micelio (Figura 18) se puede observar que el máximo se encontró en valores cortos de tiempo y valores intermedios a bajos de gramos de micelio. A valores bajos de gramos de micelio, según se incrementó el tiempo la actividad antioxidante disminuyó. A valores altos de gramos de micelio, también ocurrió esta disminución. A los mayores valores de tiempo de extracción, según se incrementaban los gramos de micelio también se incrementó el poder reductor de los extractos, hasta valores intermedios a altos donde experimentó un ligero descenso. De esta manera, se corrobora el efecto negativo de esta interacción sobre la actividad antioxidante de los extractos de *P. ostreatus*.

Se encontró una relación estadísticamente significativa ($F = 18.05$; $P = 0.0001$) moderadamente fuerte entre el contenido de fenoles totales de los extractos y su poder reductor, con un coeficiente de correlación de 0.5308, y un R^2 de 28.1781, lo que significa que ese porcentaje de variabilidad en el poder reductor puede ser explicado por el

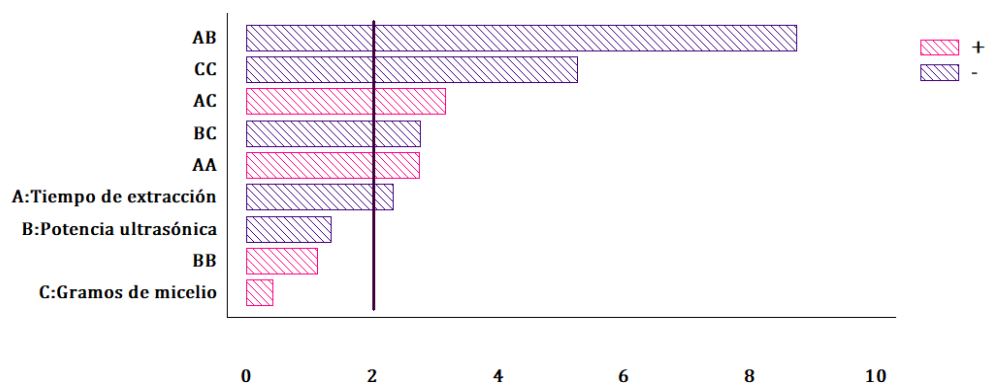


Figura 15. Gráfico estandarizado de Pareto para el poder reductor mostrando los efectos estimados y las interacciones en orden decreciente.

Tabla 6. Análisis de varianza de la respuesta poder reductor

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
A:Tiempo de extracción	0.0324197	1	0.0324197	5.41	0.0258
B:Potencia ultrasónica	0.0107276	1	0.0107276	1.79	0.1894
C:Gramos de micelio	0.00106565	1	0.00106565	0.18	0.6758
AA	0.0449459	1	0.0449459	7.50	0.0095
AB	0.45667	1	0.45667	76.18	0.0000
AC	0.0596405	1	0.0596405	9.95	0.0032
BB	0.00763393	1	0.00763393	1.27	0.2666
BC	0.0455882	1	0.0455882	7.61	0.0091
CC	0.165942	1	0.165942	27.68	0.0000
bloques	0.0000463804	2	0.0000231902	0.00	0.9961
Falta de ajuste	0.0483772	27	0.00179175	0.12	1.0000

Tabla 7. Valores observados y predichos del poder reductor

No. de experimento	Observados	Predichos
1	0.50 ± 0.03	0.50
2	0.40 ± 0.03	0.37
3	0.66 ± 0.06	0.59
4	0.54 ± 0.04	0.44
5	0.50 ± 0.04	0.57
6	0.39 ± 0.04	0.39
7	0.39 ± 0.04	0.41
8	0.44 ± 0.04	0.43
9	0.25 ± 0.02	0.26
10	0.18 ± 0.01	0.15
11	0.37 ± 0.03	0.25
12	0.31 ± 0.03	0.40
13	0.23 ± 0.02	0.26
14	0.13 ± 0.01	0.24
15	0.36 ± 0.02	0.39
16	0.18 ± 0.00	0.17

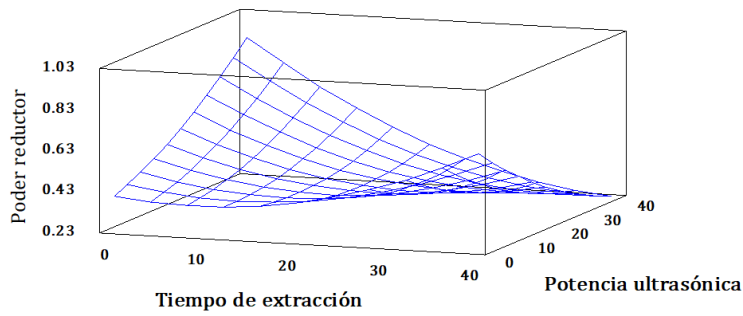


Figura 16. Superficie de respuesta estimada para el poder reductor como una función de la potencia ultrasónica y el tiempo de extracción (gramos de micelio = 1.3 g).

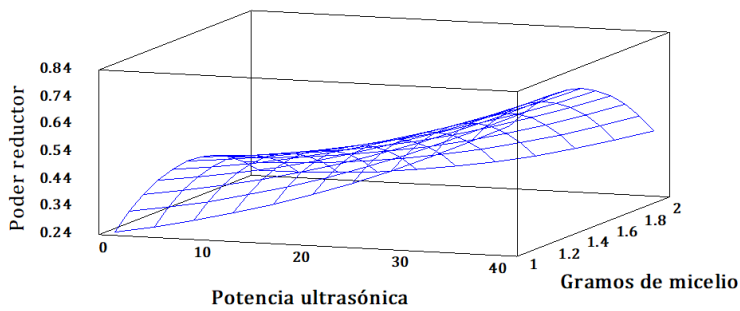


Figura 17. Superficie de respuesta estimada para poder reductor como una función de la potencia ultrasónica y los gramos de micelio (tiempo de extracción = 5 min)

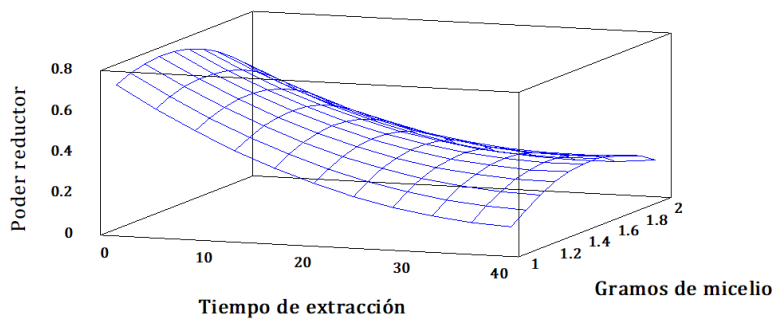


Figura 18. Superficie de respuesta estimada para poder reductor como una función de los gramos de micelio y el tiempo de extracción (potencia ultrasónica = 33%)

contenido fenólico observado. La relación de estas variables fue mayor a la encontrada para fenoles totales y porcentaje de captación del DPPH.

3.2.4 Determinación de los puntos de optimización de las variables estudiadas de la extracción asistida por ultrasonido

Cuando varias respuestas han de ser consideradas al mismo tiempo, es necesario encontrar un óptimo en el que el número total de respuestas haya sido tenido en cuenta. Un estudio de optimización global fue llevado a cabo dependiendo de los resultados experimentales de las tres respuestas (fenoles totales, captación del DPPH y poder reductor). Entre los puntos del diseño, la deseabilidad máxima se alcanza en el experimento #3 (0.75). La predicción de un grupo de condiciones óptimas para las tres variables de respuesta fue realizada utilizando la función deseabilidad. Un valor de deseabilidad total de 0.84 fue encontrado, en una escala de 0 a 1, donde 0 representa la respuesta completamente indeseable, y 1 la más deseable. Las condiciones óptimas fueron obtenidas sobre la base de un modelo de predicción para el mayor valor de deseabilidad global maximizando las respuestas.

La combinación de los niveles de cada factor que maximiza la deseabilidad se muestra en la tabla 8. En referencia al tiempo de extracción, los valores de 15 a 25 min están dentro del rango recomendado para EAU, porque son considerablemente menores que los requeridos usualmente en las extracciones convencionales (Shirsath *et al.*, 2012), los cuales son tiempos mayores al encontrado como óptimo en nuestro estudio. En cuanto a la potencia, los valores referenciados como óptimos en la literatura son variados, y el hecho de utilizar diferentes volúmenes y sistemas dificulta la comparación. De este modo, el valor óptimo de las respuestas predicho para esas condiciones, sería de 367.44 mg EAG/100 g MS de fenoles totales, 40.77% para el caso de la respuesta captación del DPPH y de 0.66 para el poder reductor. Por tanto, esto demuestra que, en las condiciones experimentales estudiadas, se pueden obtener extractos acuosos de micelio vegetativo de *P. ostreatus* utilizando sonda ultrasónica y sin pretratamiento, con un elevado contenido de fenoles totales, y buenas actividades de captación del radical DPPH y de poder reductor. Los modelos obtenidos tuvieron unos coeficientes de determinación de 0.6800-0.7872, asegurando relativamente buenos ajustes de los modelos cuadráticos a los datos experimentales.

Tabla 8. Valores óptimos codificados y reales de cada variable

Variable	Óptimo codificado	Óptimo real
Tiempo de extracción	-1.0	5 min
Potencia ultrasónica	1.0	33% (~314 W)
Gramos de micelio	-0.47472	1.263 g

Conclusiones

- ✓ Los tres métodos de extracción acuosa: agua a 100 °C, y la extracción asistida por ultrasonido empleando baño o sonda, con tiempos de extracción de 5 y 15 minutos, favorecieron la liberación de compuestos fenólicos de micelio vegetativo de *P. ostreatus*. Los extractos obtenidos a 100 °C en los dos tiempos evaluados resultaron los de mayor contenido de fenoles totales.
- ✓ Los extractos acuosos del micelio vegetativo de *P. ostreatus* poseen propiedades antioxidantes demostradas *in vitro*. Los extractos obtenidos mediante sonda ultrasónica estuvieron entre en los de mejores propiedades antioxidantes tanto en el ensayo de DPPH como en el de poder reductor.
- ✓ El diseño de superficie de respuesta compuesto central cara centrado permitió modelar y predecir los efectos e interacciones del tiempo de extracción, potencia ultrasónica y gramos de micelio, en un determinado rango, sobre los fenoles totales y la actividad antioxidante de extractos acuosos de micelio vegetativo de *P. ostreatus* obtenidos mediante sonda ultrasónica.

Recomendaciones

- ✓ Validar los modelos matemáticos obtenidos para las respuestas fenoles totales, captación del DPPH y poder reductor.
- ✓ Optimizar, empleando redes neuronales artificiales, el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de extractos acuosos de micelio vegetativo de *Pleurotus ostreatus* obtenidos mediante sonda ultrasónica, con muestras pretratadas.

Literatura citada

1. Abdullah N., Ismail S. M., Aminudin N., Shuib A. S. y Lau B. F. Evaluation of selected culinary-medicinal mushrooms for antioxidant and ACE inhibitory activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;2012.
2. Ahmad-Qasem M. H., Cánovas J., Barrajon-Catalan E., Micol V., Cárcel J. A. y García-Pérez J. V. Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innovative food science & emerging technologies*. 2013;17:120-9.
3. Akata I., Ergönül B. y Kalyoncu F. Chemical compositions and antioxidant activities of 16 wild edible mushroom species grown in Anatolia. *International Journal of Pharmacology*. 2012;8(2):134-8.
4. Ameer K., Shahbaz H. M. y Kwon J. H. Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2017;16(2):295-315.
5. Araujo P. W. y Brereton R. G. Experimental design III. Quantification. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1996;15(3):156-63.
6. Arzeni C., Martínez K., Zema P., Arias A., Pérez O. y Pilosof A. Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*. 2012;108(3):463-72.
7. Attia F. Effet du stress hydrique sur le comportement écophysiolgique et la maturité phénolique de la vigne *Vitis vinifera* L.: étude de cinq cépages autochtones de Midi-Pyrénées 2007.
8. Azmir J., Zaidul I., Rahman M., Sharif K., Mohamed A., Sahena F., *et al.* Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 2013;117(4):426-36.
9. Azwanida N. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*. 2015;4(196):2167-0412.1000196.
10. Babich H., Schuck A. G., Weisburg J. H. y Zuckerbraun H. L. Research Strategies in the Study of the Pro-Oxidant Nature of Polyphenol Nutraceuticals. *Journal of Toxicology*. 2011;2011.
11. Badarinath A., Rao K. M., Chetty C. M. S., Ramkanth S., Rajan T. y Gnanaprakash K. A review on *in-vitro* antioxidant methods: comparisions, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*. 2010;2(2):1276-85.
12. Barba F. J., Esteve M. J. y Frígola A. Bioactive components from leaf vegetable products. *Studies in natural products chemistry*. 41: Elsevier; 2014. p. 321-46.
13. Baş D. y Boyacı İ. H. Modeling and optimization II: Comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a biochemical reaction. *Journal of Food Engineering*. 2007;78(3):846-54.
14. Beltrán Delgado Y., Morris Quevedo H. J., de la Cruz E. R., Quevedo Morales Y. y Bermúdez Savón R. C. Contenido de fenoles totales en extractos de *Pleurotus* obtenidos con solventes de diferente polaridad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2013;32(2):121-9.
15. Belwal T., Dhyan P., Bhatt I. D., Rawal R. S. y Pande V. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). *Food chemistry*. 2016;207:115-24.
16. Benzie I. F. y Strain J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous

measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in enzymology*. 299: Elsevier; 1999. p. 15-27.

17. Bezerra M. A., Santelli R. E., Oliveira E. P., Villar L. S. y Escaleira L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 2008;76(5):965-77.

18. Blokhina O., Virolainen E. y Fagerstedt K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*. 2003;91(2):179-94.

19. Bobek P. y Galbavy S. Effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon. *British journal of biomedical science*. 2001;58(3):164.

20. Borchers A. T., Krishnamurthy A., Keen C. L., Meyers F. J. y Gershwin M. E. The immunobiology of mushrooms. *Experimental biology and medicine*. 2008;233(3):259-76.

21. Buer C. S., Imin N. y Djordjevic M. A. Flavonoids: new roles for old molecules. *Journal of integrative plant biology*. 2010;52(1):98-111.

22. Capecka E., Mareczek A. y Leja M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food chemistry*. 2005;93(2):223-6.

23. Capelo-Martínez J.-L. *Ultrasound in chemistry: analytical applications*: John Wiley & Sons; 2009.

24. Capelo J., Galesio M., Felisberto G., Vaz C. y Pessoa J. C. Micro-focused ultrasonic solid-liquid extraction (μ FUSLE) combined with HPLC and fluorescence detection for PAHs determination in sediments: optimization and linking with the analytical minimalism concept. *Talanta*. 2005;66(5):1272-80.

25. Chang S.-T. y Wasser S. P. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2012;14(2).

26. Chavan Y. y Singhal R. S. Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu* L.) and optimization study using response surface methodology. *Innovative food science & emerging technologies*. 2013;17:106-13.

27. Chemat F. y Khan M. K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*. 2011;18(4):813-35.

28. Chemat F., Rombaut N., Sicaire A.-G., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A.-S. y Abert-Vian M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics sonochemistry*. 2017;34:540-60.

29. Chen J. y Seviour R. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-glucans. *Mycological research*. 2007;111(6):635-52.

30. Chen M., Zhao Y. y Yu S. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food chemistry*. 2015;172:543-50.

31. Chen S., Zeng Z., Hu N., Bai B., Wang H. y Suo Y. Simultaneous optimization of the ultrasound-assisted extraction for phenolic compounds content and antioxidant activity of *Lycium ruthenicum* Murr. fruit using response surface methodology. *Food chemistry*. 2018;242:1-8.

32. Cheung L., Cheung P. C. y Ooi V. E. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*. 2003;81(2):249-55.

33. Chirinang P. y Intarapichet K.-O. Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *Science Asia*. 2009;35(2009):326-31.

34. Chukwumah Y. C., Walker L. T., Verghese M. y Ogutu S. Effect of frequency and duration of ultrasonication on the extraction efficiency of selected isoflavones and trans-resveratrol from peanuts (*Arachis hypogaea*). *Ultrasonics sonochemistry*. 2009;16(2):293-9.
35. Collins A. P., Dixon S. M., Edwards C. y Palmer S. B. Non-mechanical contact ultrasound system for monitoring contents of a moving container. Google Patents; 1999.
36. Corrêa R. C. G., Brugnari T., Bracht A., Peralta R. M. y Ferreira I. C. Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp.(Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;50:103-17.
37. Cravotto G., Binello A. y Orio L. Green extraction techniques. *AgroFOOD Industry hi-tech*. 2011;22:57-9.
38. d'Alessandro L. G., Kriaa K., Nikov I. y Dimitrov K. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*. 2012;93:42-7.
39. Da Porto C., Porretto E. y Decorti D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics sonochemistry*. 2013;20(4):1076-80.
40. Dahmoune F., Remini H., Dairi S., Aoun O., Moussi K., Bouaoudia-Madi N., *et al.* Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *P. lentiscus* L. leaves: Comparative study of artificial neural network (ANN) versus degree of experiment for prediction ability of phenolic compounds recovery. *Industrial Crops and Products*. 2015;77:251-61.
41. Devi K. S. P., Roy B., Patra P., Sahoo B., Islam S. S. y Maiti T. K. Characterization and lectin microarray of an immunomodulatory heteroglucan from *Pleurotus ostreatus* mycelia. *Carbohydrate polymers*. 2013;94(2):857-65.
42. Diouf P. N., Stevanovic T. y Boutin Y. The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts. *Industrial Crops and Products*. 2009;30(2):297-303.
43. Doughari J. H., Human I., Benadé A. y Ndakidemi P. Phytochemicals as chemotherapeutic agents and antioxidants: Possible solution to the control of antibiotic resistant verocytotoxin producing bacteria. 2009.
44. Dziezak J. Antioxidants-The ultimate answer to oxidation. *Food Technology*. 1986;40(9):94-&.
45. Elmastas M., Isildak O., Turkecul I. y Temur N. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007;20(3-4):337-45.
46. Esclapez M., García-Pérez J. V., Mulet A. y Cárcel J. Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews*. 2011;3(2):108.
47. Falleh H., Ksouri R., Lucchessi M.-E., Abdelly C. y Magné C. Ultrasound-assisted extraction: Effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2012;11(2):243-9.
48. Ferreira I. C., Baptista P., Vilas-Boas M. y Barros L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food chemistry*. 2007;100(4):1511-6.
49. Ferreira I. C., Barros L. y Abreu R. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*. 2009;16(12):1543-60.

50. Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A. y Fernández-Gutiérrez A. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*. 2010;15(12):8813-26.
51. Gerschman R. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Glutathione*: Elsevier; 1954. p. 288-91.
52. Ghafoor K., Choi Y. H., Jeon J. Y. y Jo I. H. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(11):4988-94.
53. Gill R., Tsung A. y Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010;48(9):1121-32.
54. Gogate P. R. Theory of cavitation and design aspects of cavitation reactors. *Theoretical and Experimental Sonochemistry Involving Inorganic Systems*: Springer; 2010. p. 31-67.
55. González-Centeno M., Comas-Serra F., Femenia A., Rosselló C. y Simal S. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics sonochemistry*. 2015;22:506-14.
56. González-Centeno M. R., Knoerzer K., Sabarez H., Simal S., Rosselló C. y Femenia A. Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.)—a response surface approach. *Ultrasonics sonochemistry*. 2014;21(6):2176-84.
57. Gregori A., Švagelj M. y Pohleven J. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology & Biotechnology*. 2007;45(3).
58. Gu Y.-H. y Belury M. A. Selective induction of apoptosis in murine skin carcinoma cells (CH72) by an ethanol extract of *Lentinula edodes*. *Cancer letters*. 2005;220(1):21-8.
59. Halliwell B. y Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine 2007* [Disponible en: <http://www.oup.com/us/catalog/general/subject/LifeSciences/Biochemistry/?view=usa&ci=9780198568698>].
60. Halliwell B. y Gutteridge J. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical journal*. 1984;219(1):1.
61. Han J., Jiang X. y Zhang L. Optimisation of extraction conditions for polysaccharides from the roots of *Isatis tinctoria* L. by response surface methodology and their *in vitro* free radicals scavenging activities and effects on IL-4 and IFN- γ mRNA expression in chicken lymphocytes. *Carbohydrate polymers*. 2011;86(3):1320-6.
62. Handa S., Khanuja S., Longo G. y Rakesh D. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, (1stedn), no. 66. Italy: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology. 2008.
63. Hatano T., Edamatsu R., Hiramatsu M., Mori A., Fujita Y., Yasuhara T., *et al.* Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI.: effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1989;37(8):2016-21.
64. Heleno S. A., Martins A., Queiroz M. J. R. y Ferreira I. C. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food chemistry*. 2015;173:501-13.
65. Horitsu H., Yahashi Y., Takamizawa K., Kawai K., Suzuki T. y Watanabe N. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: Optimization of production rate. *Biotechnology and bioengineering*. 1992;40(9):1085-91.

66. Hossain M. B., Brunton N. P., Patras A., Tiwari B., O'donnell C., Martin-Diana A. B., *et al.* Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry*. 2012;19(3):582-90.
67. Hu H., Zhang Z., Lei Z., Yang Y. y Sugiura N. Comparative study of antioxidant activity and antiproliferative effect of hot water and ethanol extracts from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2009;107(1):42-8.
68. Ilaiyaraja N., Likhith K., Babu G. S. y Khanum F. Optimisation of extraction of bioactive compounds from *Feronia limonia* (wood apple) fruit using response surface methodology (RSM). *Food chemistry*. 2015;173:348-54.
69. Inácio F. D., Ferreira R. O., Araujo C. A. V. d., Brugnari T., Castoldi R., Peralta R. M., *et al.* Proteases of wood rot fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. *BioMed research international*. 2015;2015.
70. Iwalokun B., Usen U., Otunba A. y Olukoya D. Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. *African Journal of Biotechnology*. 2007;6(15).
71. Jadhav D., Rekha B., Gogate P. R. y Rathod V. K. Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of food engineering*. 2009;93(4):421-6.
72. Jayakumar T., Ramesh E. y Geraldine P. Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl₄-induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2006;44(12):1989-96.
73. Jayakumar T., Thomas P. y Geraldine P. *In-vitro* antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2009;10(2):228-34.
74. Jayakumar T., Thomas P., Sheu J.-R. y Geraldine P. *In-vitro* and *in-vivo* antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Food research international*. 2011;44(4):851-61.
75. Jayakumar T., Thomas P. A. y Geraldine P. Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Experimental gerontology*. 2007;42(3):183-91.
76. Jiang Y., Qian F., Yang J., Liu Y., Dong F., Xu C., *et al.* CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nature communications*. 2017;8:15179.
77. Jouki M., Mortazavi S. A., Yazdi F. T. y Koocheiki A. Optimization of extraction, antioxidant activity and functional properties of quince seed mucilage by RSM. *International journal of biological macromolecules*. 2014;66:113-24.
78. Kanter M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Proceedings of the Nutrition Society*. 1998;57(1):9-13.
79. Karadag A., Ozcelik B. y Saner S. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food analytical methods*. 2009;2(1):41-60.
80. Kek S., Chin N. y Yusof Y. Direct and indirect power ultrasound assisted pre-osmotic treatments in convective drying of guava slices. *Food and Bioproducts Processing*. 2013;91(4):495-506.
81. Khajeh M. Response surface modelling of lead pre-concentration from food samples by miniaturised homogenous liquid-liquid solvent extraction: Box-Behnken design. *Food chemistry*. 2011;129(4):1832-8.
82. Khatua S., Paul S. y Acharya K. Mushroom as the potential source of new generation of antioxidant: a review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2013;6(5):3.

83. Khuri A. I. 12 Multiresponse surface methodology. Handbook of Statistics. 1996;13:377-406.
84. Khuri A. I. y Mukhopadhyay S. Response surface methodology. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics. 2010;2(2):128-49.
85. Kim S. y Zayas J. Processing parameters of chymosin extraction by ultrasound. Journal of Food Science. 1989;54(3):700-3.
86. Kiokias S., Varzakas T. y Oreopoulou V. *In vitro* activity of vitamins, flavonoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems. Critical reviews in food science and nutrition. 2008;48(1):78-93.
87. Koocheki A., Taherian A. R., Razavi S. M. y Bostan A. Response surface methodology for optimization of extraction yield, viscosity, hue and emulsion stability of mucilage extracted from *Lepidium perfoliatum* seeds. Food Hydrocolloids. 2009;23(8):2369-79.
88. Lee L.-S., Lee N., Kim Y., Lee C.-H., Hong S., Jeon Y.-W., *et al.* Optimization of ultrasonic extraction of phenolic antioxidants from green tea using response surface methodology. Molecules. 2013;18(11):13530-45.
89. Leong T., Ashokkumar M. y Kentish S. The fundamentals of power ultrasound-A review. 2011.
90. Li C.-X., Song H.-Y. Y Wang Z.-H. Recent advances of research and applications of ultrasound in chemical engineering. Acta petrolei sinica petroleum processing section. 2001;17(3):86-94.
91. Lim H.-W., Yoon J.-H., Kim Y.-S., Lee M.-W., Park S.-Y. y Choi H.-K. Free radical-scavenging and inhibition of nitric oxide production by four grades of pine mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.). Food chemistry. 2007;103(4):1337-42.
92. Lindequist U., Niedermeyer T. H. y Jülich W.-D. The pharmacological potential of mushrooms. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2005;2(3):285-99.
93. Liu J., Jia L., Kan J. y Jin C.-h. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). Food and Chemical Toxicology. 2013;51:310-6.
94. Liu X., Zhao M., Wang J., Yang B. y Jiang Y. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China. Journal of food composition and Analysis. 2008;21(3):219-28.
95. Llauradó G., Morris H. J., Ferrera L., Camacho M., Castán L., Lebeque Y., *et al.* *In-vitro* antimicrobial activity and complement/macrophage stimulating effects of a hot-water extract from mycelium of the oyster mushroom *Pleurotus sp.* Innovative food science & emerging technologies. 2015;30:177-83.
96. Locatelli M., Gindro R., Travaglia F., Coïsson J.-D., Rinaldi M. y Arlorio M. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. Food chemistry. 2009;114(3):889-97.
97. Lorimer J. P. y Mason T. J. Sonochemistry. Part 1—the physical aspects. Chemical Society Reviews. 1987;16:239-74.
98. Lull C., Wichers H. J. y Savelkoul H. F. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. Mediators of inflammation. 2005;2005(2):63-80.
99. Luo X., Cao J., Gong H., Yan H. y He L. Phase separation technology based on ultrasonic standing waves: A review. Ultrasonics sonochemistry. 2018;48:287-98.
100. Ma Y. Q., Chen J. C., Liu D. H. y Ye X. Q. Effect of ultrasonic treatment on the total phenolic and antioxidant activity of extracts from citrus peel. Journal of food science. 2008;73(8):T115-T20.

101. Maftoun P., Johari H., Soltani M., Malik R., Othman N. Z. y El Enshasy H. A. The edible mushroom *Pleurotus* spp.: I. Biodiversity and nutritional values. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*. 2015;4(2):67-83.
102. Magalhães L. M., Segundo M. A., Reis S. y Lima J. L. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta*. 2008;613(1):1-19.
103. Maillard M.-N., Soum M.-H., Boivin P. y Berset C. Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content. *LWT-Food science and Technology*. 1996;29(3):238-44.
104. Manzi P., Gambelli L., Marconi S., Vivanti V. y Pizzoferrato L. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food chemistry*. 1999;65(4):477-82.
105. Manzi P., Marconi S., Aguzzi A. y Pizzoferrato L. Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food chemistry*. 2004;84(2):201-6.
106. Maran J. P., Manikandan S., Nivetha C. V. y Dinesh R. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017;10:S1145-S57.
107. Maran J. P., Manikandan S., Thirugnanasambandham K., Nivetha C. V. y Dinesh R. Box-Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*. 2013;92(1):604-11.
108. Margraf T., Karnopp A. R., Rosso N. D. y Granato D. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. *Journal of food science*. 2015;80(11):C2397-C403.
109. Maroun R. G., Rajha H. N., El Darra N., El Kantar S., Chacar S., Debs E., *et al.* Emerging technologies for the extraction of polyphenols from natural sources. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications: Elsevier*; 2018. p. 265-93.
110. Mason T. J. Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents. *Advances in sonochemistry*. 1999;5:209-48.
111. Mason T. J., Cobley A., Graves J. y Morgan D. New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*. 2011;18(1):226-30.
112. Mason T. J. y Lorimer J. P. Applied sonochemistry: the uses of power ultrasound in chemistry and processing. *Synthesis*. 2002;61(3).
113. Mau J.-L., Tsai S.-Y., Tseng Y.-H. y Huang S.-J. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill. *LWT-Food science and Technology*. 2005;38(6):589-97.
114. Mizuno T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of medicinal mushrooms*. 1999;1(1).
115. Moro C., Palacios I., Lozano M., D'Arrigo M., Guillamón E., Villares A., *et al.* Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. *Food Chemistry*. 2012;130(2):350-5.
116. Morris H. J., Lebeque Y., Fontaine R., Bermúdez R. C., Llauradó G. y Marcos J. A note on the *in vitro* macrophage-stimulating activity of water-soluble extracts from mycelium of *Pleurotus* spp. *Food and agricultural immunology*. 2007;18(1):31-7.
117. Morris H. J., Llauradó G., Gutiérrez A., Lebeque Y., Fontaine R., Beltrán Y., *et al.*, editors. Immunomodulating properties of *Pleurotus* sp. fruiting bodies powder on cyclophosphamide treated mice. *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7)*; 2011.

118. Morshedi A. y Akbarian M. Application of response surface methodology: design of experiments and optimization: a mini review. *Indian Journal of Fundamental and Applied Science*. 2014;54:2434-9.
119. Murcia M. A., Martínez-Tomé M., Jiménez A. M., Vera A. M., Honrubia M. y Parras P. Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing. *Journal of Food Protection®*. 2002;65(10):1614-22.
120. Myers R. H., Montgomery D. C. y Anderson-Cook C. M. *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*: John Wiley & Sons; 2016.
121. Ng L., Ang Y., Khoo H. y Yim H. Influence of different extraction parameters on antioxidant properties of *Carica papaya* peel and seed. *Research Journal of Phytochemistry*. 2012;6(3):61-74.
122. Nwabueze T. U. Basic steps in adapting response surface methodology as mathematical modelling for bioprocess optimisation in the food systems. *International journal of food science & technology*. 2010;45(9):1768-76.
123. Oke F. y Aslim B. Protective effect of two edible mushrooms against oxidative cell damage and their phenolic composition. *Food chemistry*. 2011;128(3):613-9.
124. Ostrovidov S., Franck P., Joseph D., Martarello L., Kirsch G., Belleville F., *et al.* Screening of new antioxidant molecules using flow cytometry. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2000;43(9):1762-9.
125. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*. 1986;44(6):307-15.
126. Pal J., Ganguly S., Tahsin K. S. y Acharya K. *In vitro* free radical scavenging activity of wild edible mushroom, *Pleurotus squarrosulus* (Mont.) Singer. 2010.
127. Palacios I., Lozano M., Moro C., D'arrigo M., Rostagno M., Martínez J., *et al.* Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*. 2011;128(3):674-8.
128. Patel S. y Goyal A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotechnology*. 2012;2(1):1-15.
129. Paterson R. R. M. y Lima N. Biomedical effects of mushrooms with emphasis on pure compounds. *Biomedical journal*. 2014;37(6):357-68.
130. Pawelec G. Immunity and ageing in man. *Experimental gerontology*. 2006;41(12):1239-42.
131. Petrović J., Papandreou M., Glamočlija J., Ćirić A., Baskakis C., Proestos C., *et al.* Different extraction methodologies and their influence on the bioactivity of the wild edible mushroom *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food & function*. 2014;5(11):2948-60.
132. Pingret D., Fabiano-Tixier A.-S. y Chemat F. Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food control*. 2013;31(2):593-606.
133. Pokorny J., Yanishlieva N. y Gordon M. H. *Antioxidants in food: practical applications*: CRC press; 2001.
134. Popovic V., Zivkovic J., Davidovic S., Stevanovic M. y Stojkovic D. Mycotherapy of cancer: an update on cytotoxic and antitumor activities of mushrooms, bioactive principles and molecular mechanisms of their action. *Current topics in medicinal chemistry*. 2013;13(21):2791-806.
135. Prior R., Wu X. y Schaichs K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(10):4290 - 302.

136. Quanhong L. y Caili F. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food chemistry*. 2005;92(4):701-6.
137. Reis F. S., Martins A., Barros L. y Ferreira I. C. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(5):1201-7.
138. Rice-Evans C. A., Miller N. J. y Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*. 1996;20(7):933-56.
139. Richter B. E., Jones B. A., Ezzell J. L., Porter N. L., Avdalovic N. y Pohl C. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*. 1996;68(6):1033-9.
140. Riesz P. y Kondo T. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Radical Biology and Medicine*. 1992;13(3):247-70.
141. Rodrigues S., Pinto G. A. y Fernandes F. A. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2008;15(1):95-100.
142. Roselló-Soto E., Parniakov O., Deng Q., Patras A., Koubaa M., Grimi N., *et al.* Application of non-conventional extraction methods: Toward a sustainable and green production of valuable compounds from mushrooms. *Food Engineering Reviews*. 2016;8(2):214-34.
143. Royse D. J., Baars J. y Tan Q. Current overview of mushroom production in the world. *Edible and medicinal mushrooms: technology and applications*. 2017:5-13.
144. Ruiz-Rodríguez A., Santoyo S. y Soler-Rivas C. Antioxidant properties of edible mushrooms. *Funct Plant Sci Biotechnol*. 2009;3(1):92-102.
145. Sališová M., Toma Š. y Mason T. Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*. *Ultrasonics sonochemistry*. 1997;4(2):131-4.
146. Samanta S., Maity K., Nandi A. K., Sen I. K., Devi K. S. P., Mukherjee S., *et al.* A glucan from an ectomycorrhizal edible mushroom *Tricholoma crassum* (Berk.) Sacc.: Isolation, characterization, and biological studies. *Carbohydrate research*. 2013;367:33-40.
147. Samaram S., Mirhosseini H., Tan C. P. y Ghazali H. M. Ultrasound-assisted extraction and solvent extraction of papaya seed oil: Crystallization and thermal behavior, saturation degree, color and oxidative stability. *Industrial Crops and Products*. 2014;52:702-8.
148. Sang J., Sang J., Ma Q., Hou X.-f. y Li C.-q. Extraction optimization and identification of anthocyanins from *Nitraria tangutorun* Bobr. seed meal and establishment of a green analytical method of anthocyanins. *Food chemistry*. 2017;218:386-95.
149. Santos H. y Capelo J. Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta*. 2007;73(5):795-802.
150. Santos H. M., Lodeiro C. y Capelo-Martinez J.-L. The power of ultrasound in Ultrasound in chemistry: analytical applications. Wiley-VCH, Weinheim; 2009.
151. Shahidi F. Antioxidants: extraction, identification, application and efficacy measurement. *Electronic journal of environmental, agricultural and food chemistry*. 2008;8:3325-30.
152. Shahidi F., Janitha P. y Wanasundara P. Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science & nutrition*. 1992;32(1):67-103.

153. Shahidi F. y Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*. 2015;18:757-81.
154. Shamtsyan M., Konusova V., Maksimova Y., Goloshchev A., Panchenko A., Simbirtsev A., *et al.* Immunomodulating and anti-tumor action of extracts of several mushrooms. *Journal of Biotechnology*. 2004;113(1-3):77-83.
155. Sher H., Al-Yemeni M. y Khan K. Cultivation of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) in two different agroecological zones of Pakistan. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(2):183-8.
156. Shimada K., Fujikawa K., Yahara K. y Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1992;40(6):945-8.
157. Shirsath S., Sonawane S. y Gogate P. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2012;53:10-23.
158. Shirwaikar A. y Somashekar A. Antiinflammatory activity and free radical scavenging studies of *Aristolochia bracteolata* Lam. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 2003;65(1):67.
159. Shnyreva A., Song W. y Van Griensven L. J. L. D. Extracts of medicinal mushrooms *Agaricus bisporus* and *Phellinus linteus* induce proapoptotic effects in the human leukemia cell line K562. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2010;12(2).
160. Simic M. G. Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1988;202(2):377-86.
161. Sivakumar V., Anna J. L., Vijayeeswarri J. y Swaminathan G. Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2009;16(6):782-9.
162. Slinkard K. y Singleton V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*. 1977;28(1):49-55.
163. Smith J., Rowan N. y Sullivan R. Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments: *Cancer Research UK London*; 2002.
164. Soares A., de Sá-Nakanishi A., Bracht A., da Costa S., Koehnlein E., de Souza C., *et al.* Hepatoprotective effects of mushrooms. *Molecules*. 2013;18(7):7609-30.
165. Spigno G., Tramelli L. y De Faveri D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of food engineering*. 2007;81(1):200-8.
166. Srinivasan M., Rukkumani R., Ram Sudheer A. y Menon V. P. Ferulic acid, a natural protector against carbon tetrachloride-induced toxicity. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2005;19(4):491-6.
167. Suárez Arango C. y Nieto I. J. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2013;30(1):1-8.
168. Sulistiany H., Sudirman L. I. y Dharmaputra O. S. Production of fruiting body and antioxidant activity of wild *Pleurotus*. *Hayati Journal of Biosciences*. 2016;23(4):191-5.
169. Sun Y., Liu D., Chen J., Ye X. y Yu D. Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans- β -carotene from citrus peels. *Ultrasonics sonochemistry*. 2011;18(1):243-9.

170. Tadeo J. L., Sánchez-Brunete C., Albero B. y García-Valcárcel A. I. Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of chromatography A*. 2010;1217(16):2415-40.
171. Takahama U. y Oniki T. A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum*. 1997;101(4):845-52.
172. Tsai S.-Y., Huang S.-J., Lo S.-H., Wu T.-P., Lian P.-Y. y Mau J.-L. Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. *Food Chemistry*. 2009;113(2):578-84.
173. Valko M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M. y Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 2006;160(1):1-40.
174. Valverde M. E., Hernández-Pérez T. y Paredes-López O. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *International journal of microbiology*. 2015;2015.
175. Vardanega R., Santos D. T. y Meireles M. A. A. Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation. *Pharmacognosy reviews*. 2014;8(16):88.
176. Vilku K., Mawson R., Simons L. y Bates D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2008;9(2):161-9.
177. Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics sonochemistry*. 2001;8(3):303-13.
178. Vu H. T., Scarlett C. J. y Vuong Q. V. Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity from banana (*Musa cavendish*) peel. *Journal of food processing and preservation*. 2017;41(5):e13148.
179. Vural N., Algan Cavuldak Ö. y Anlı R. Multi response optimisation of polyphenol extraction conditions from grape seeds by using ultrasound assisted extraction (UAE). *Separation Science and Technology*. 2018;53(10):1540-51.
180. Wang J., Sun B., Cao Y., Tian Y. y Li X. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*. 2008;106(2):804-10.
181. Wang L. y Weller C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*. 2006;17(6):300-12.
182. Wang X., Wu Y., Chen G., Yue W., Liang Q. y Wu Q. Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from sparganii rhizoma with response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry*. 2013;20(3):846-54.
183. Wasser S. P. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomed J*. 2014;37(6):345-56.
184. Wei S. Pro-and antioxidative properties of medicinal mushroom extracts. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2008;10(4).
185. Wen C., Zhang J., Zhang H., Dzah C. S., Zandile M., Duan Y., *et al.* Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops—A review. *Ultrasonics sonochemistry*. 2018;48:538-49.
186. Wong B., Tan C. y Ho C. Effect of solid-to-solvent ratio on phenolic content and antioxidant capacities of "Dukung Anak" (*Phyllanthus niruri*). *International Food Research Journal*. 2013;20(1).
187. Wu T. Y., Guo N., Teh C. Y. y Hay J. X. W. *Advances in ultrasound technology for environmental remediation: Springer Science & Business Media; 2012.*

188. Wu X. J. y Hansen C. Antioxidant capacity, phenolic content, and polysaccharide content of *Lentinus edodes* grown in whey permeate-based submerged culture. *Journal of food science*. 2008;73(1):M1-M8.
189. Yagi K. A rapid method for evaluation of autoxidation and antioxidants. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1970;34(1):142-5.
190. Yang B., Liu X. y Gao Y. Extraction optimization of bioactive compounds (crocin, geniposide and total phenolic compounds) from *Gardenia* (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruits with response surface methodology. *Innovative food science & emerging technologies*. 2009;10(4):610-5.
191. Yao Y. Enhancement of mass transfer by ultrasound: Application to adsorbent regeneration and food drying/dehydration. *Ultrasonics sonochemistry*. 2016;31:512-31.
192. Yetilmesoy K., Demirel S. y Vanderbei R. J. Response surface modeling of Pb (II) removal from aqueous solution by *Pistacia vera* L.: Box–Behnken experimental design. *Journal of Hazardous Materials*. 2009;171(1-3):551-62.
193. Yıldız S., Yılmaz A., Can Z., Tabbouche S. A., Kılıç A. O. y Sesli E. Some bioactive properties of wild and commercial mushroom species. *Food and health*. 2017;3(4):161-9.
194. Yim H., Chye F., Tan C., Ng Y. y Ho C. Antioxidant activities and total phenolic content of aqueous extract of *Pleurotus ostreatus* (cultivated oyster mushroom). *Malaysian journal of nutrition*. 2010;16(2):281-91.
195. Yim H. S., Chye F. Y., Koo S. M., Matanjun P., How S. E. y Ho C. W. Optimization of extraction time and temperature for antioxidant activity of edible wild mushroom, *Pleurotus porrigens*. *Food and Bioproducts Processing*. 2012;90(2):235-42.
196. Ying W., Xiaohua L., Yumin L., Zhengfu T., Wen Y. y Jianbing J. Mass transfer model and experiment for rotating jet high-gravity bed. *Petrochemical Technology*. 2011;4.
197. Yingngam B., Monschein M. y Brantner A. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Cratogeomys formosum ssp. formosum* leaves using central composite design and evaluation of its protective ability against H₂O₂-induced cell death. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2014;7:S497-S505.
198. Yolmeh M., Najafi M. B. H. y Farhoosh R. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). *Food chemistry*. 2014;155:319-24.
199. Zhang A., Li X., Xing C., Yang J. y Sun P. Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus eryngii* using response surface methodology. *International journal of biological macromolecules*. 2014;65:28-32.
200. Zhao Y., Hou Y., Tang G., Cai E., Liu S., Yang H., *et al.* Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Epimedium brevicornum* Maxim using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activities *in vitro*. *Journal of analytical methods in chemistry*. 2014;2014.
201. Zheng W., Zhang M., Zhao Y., Miao K., Pan S., Cao F., *et al.* Analysis of antioxidant metabolites by solvent extraction from sclerotia of *Inonotus obliquus* (Chaga). *Phytochemical analysis*. 2011;22(2):95-102.
202. Zilly A., Bracht A., Coelho-Moreira J., Maciel G., Soares A., Bazanella G., *et al.* Enzymes from *Ganoderma lucidum*: Production and applications. *Current Topics in Biochemical Research*. 2011;13:1-11.

Anexo 1 Curva de calibración

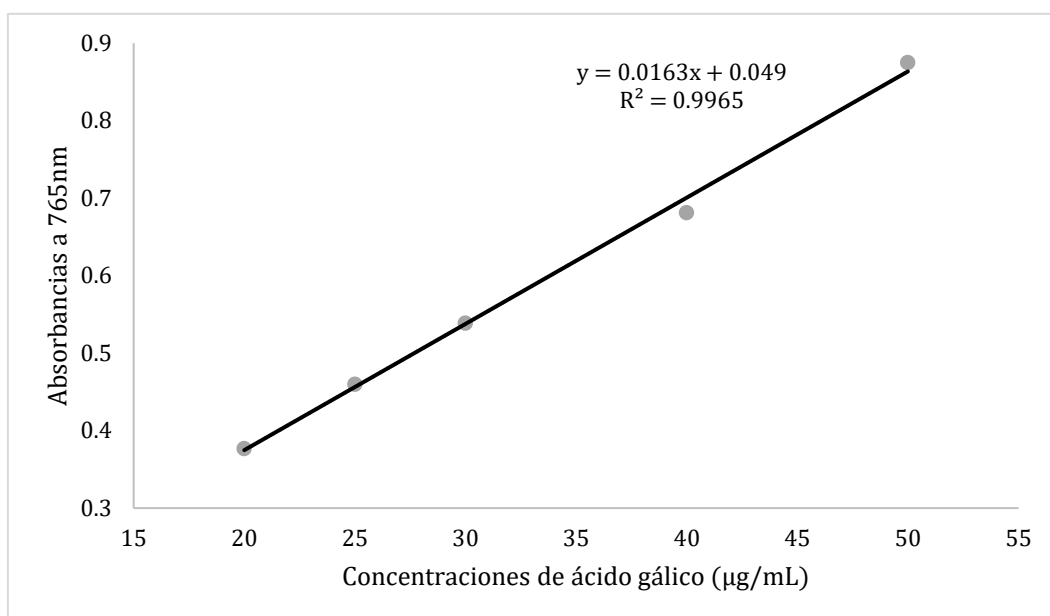


Figura 1. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de fenoles totales

Anexo 2 Gráficos del ANOVA multifactorial, de homogeneidad de varianzas y de la normalidad de los residuos de los extractos acuosos asistidos por ultrasonido y agua a 100°C de micelio de *P. ostreatus*.

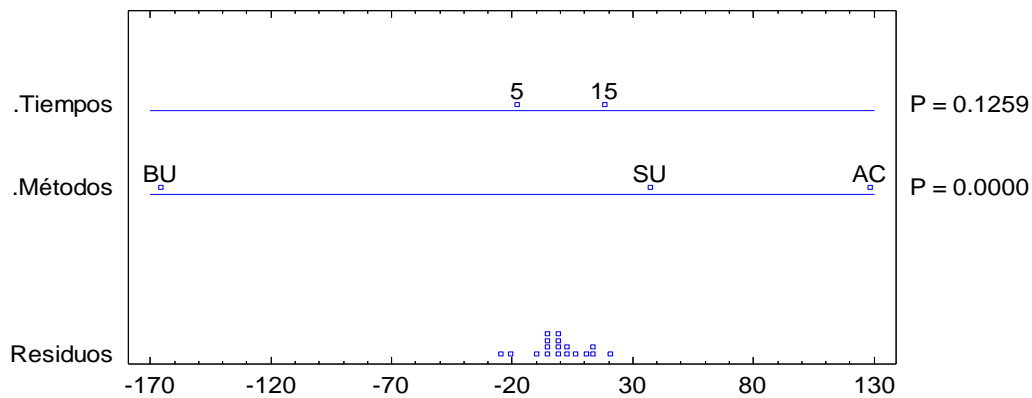


Figura 2. Gráfico del ANOVA multifactorial para fenoles totales de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante los métodos de sonda ultrasónica (SU), agua 100 °C (AC) y baño ultrasónico (BU) en tiempos de 5 y 15 min

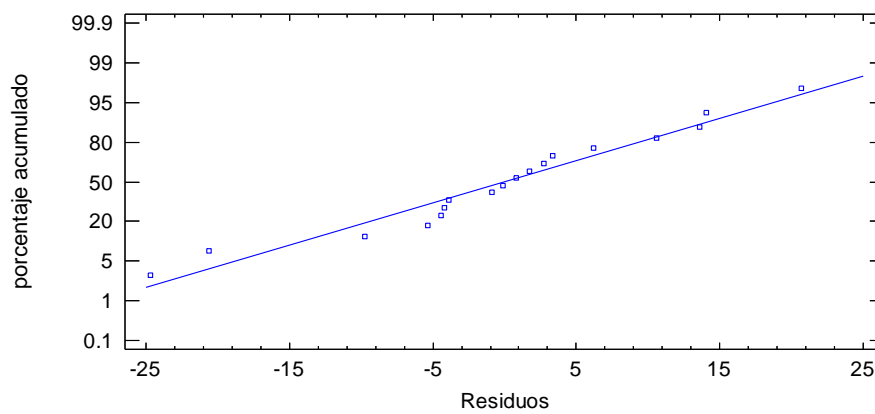


Figura 3. Gráfico de probabilidad normal para fenoles totales de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante los métodos de sonda ultrasónica (SU), agua 100 °C (AC) y baño ultrasónico (BU) en tiempos de 5 y 15 min

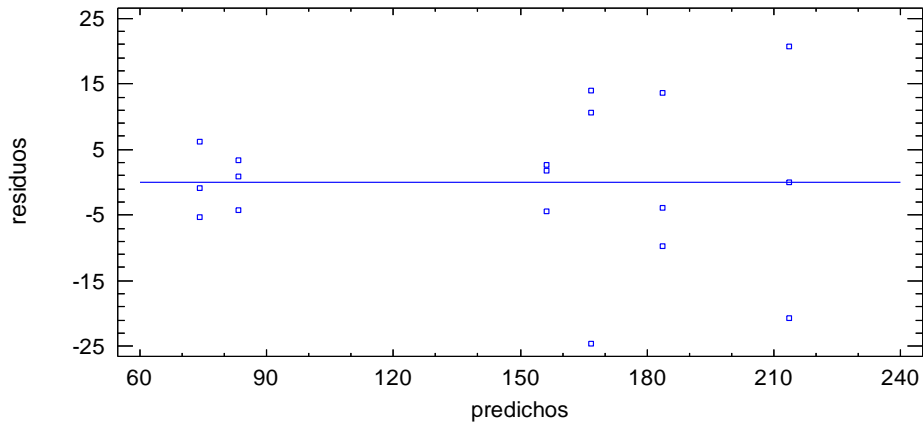


Figura 4. Gráfico de residuos contra predichos para fenoles totales de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante los métodos de sonda ultrasónica (SU), agua 100 °C (AC) y baño ultrasónico (BU) en tiempos de 5 y 15 min

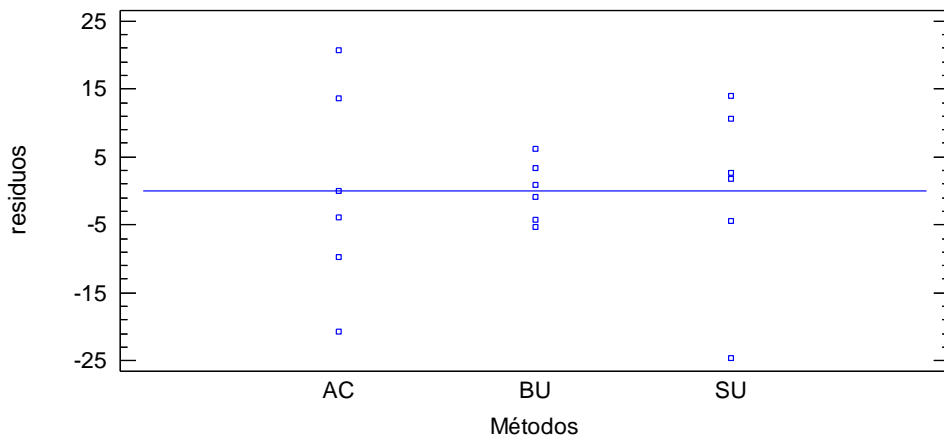


Figura 5. Gráfico de residuos contra niveles del factor métodos de los fenoles totales de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante los métodos de sonda ultrasónica (SU), agua 100 °C (AC) y baño ultrasónico (BU) en tiempos de 5 y 15 min

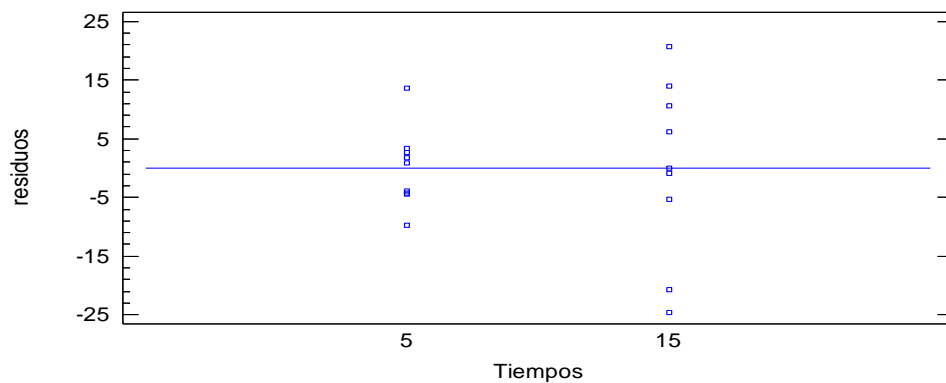


Figura 6. Gráfico de residuos contra niveles del factor tiempos de los fenoles totales de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante los métodos de sonda ultrasónica (SU), agua 100 °C (AC) y baño ultrasónico (BU) en tiempos de 5 y 15 min

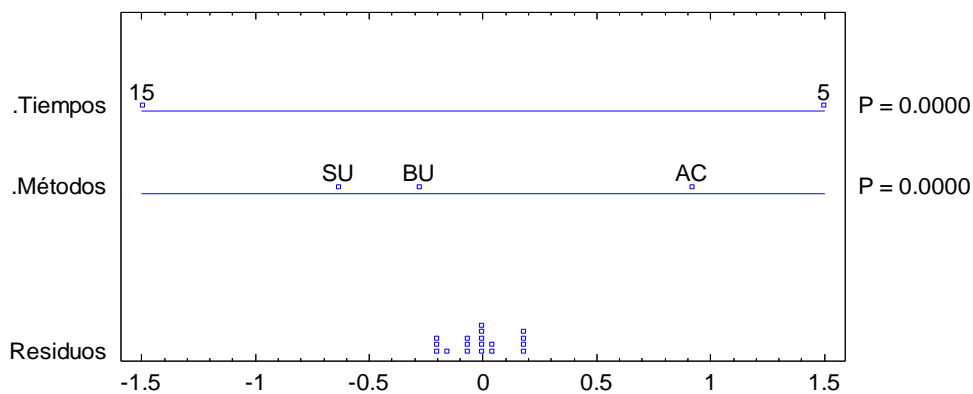


Figura 7. Gráfico ANOVA para EC₅₀ DPPH de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante los métodos de sonda ultrasónica (SU), agua 100 °C (AC) y baño ultrasónico (BU) en tiempos de 5 y 15 min

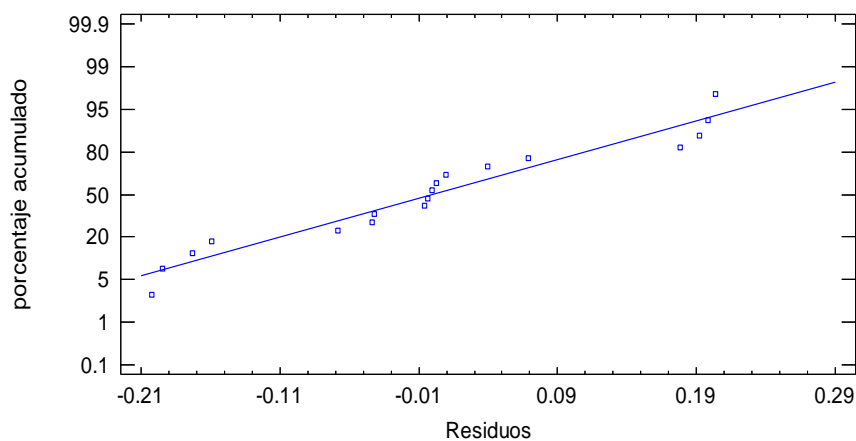


Figura 8. Gráfico de probabilidad normal para EC₅₀ DPPH de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante los métodos de sonda ultrasónica (SU), agua 100 °C (AC) y baño ultrasónico (BU) en tiempos de 5 y 15 min

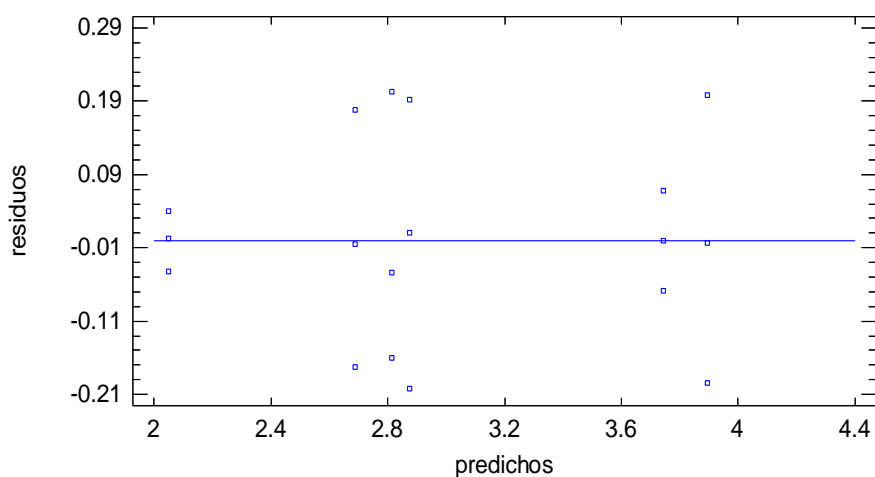


Figura 9. Gráfico de residuos contra predichos para EC₅₀ DPPH de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante los métodos de sonda ultrasónica (SU), agua 100 °C (AC) y baño ultrasónico (BU) en tiempos de 5 y 15 min

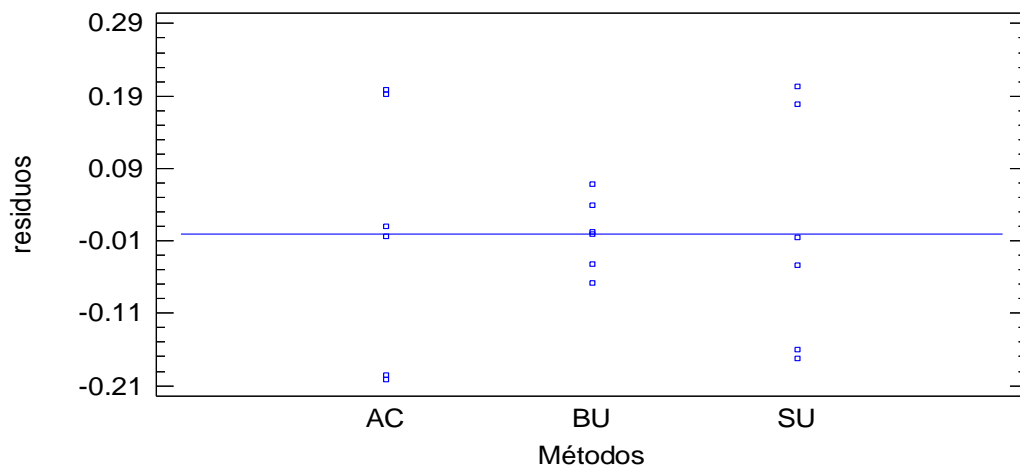


Figura 10. Gráfico de residuos contra niveles del factor métodos de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante los métodos de sonda ultrasónica (SU), agua 100 °C (AC) y baño ultrasónico (BU) en tiempos de 5 y 15 min

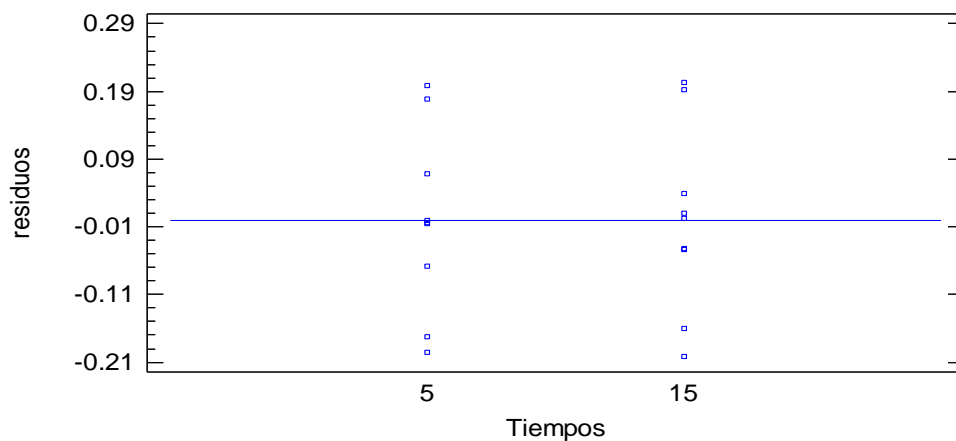


Figura 11. Gráfico de residuos contra niveles para EC50 DPPH del factor tiempos de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante los métodos de sonda ultrasónica (SU), agua 100 °C (AC) y baño ultrasónico (BU) en tiempos de 5 y 15 min

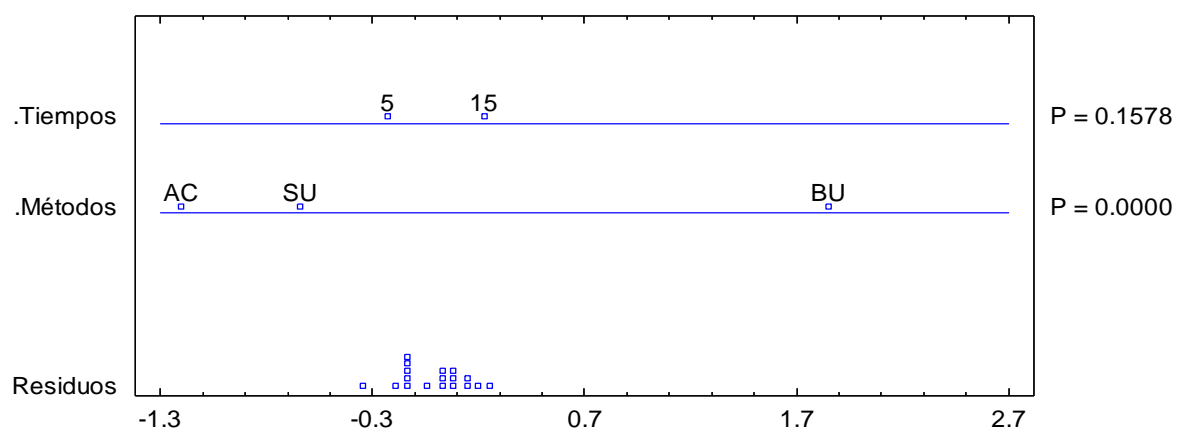


Figura 12. Gráfico ANOVA para EC₂₅ poder reductor de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante los métodos de sonda ultrasónica (SU), agua 100 °C (AC) y baño ultrasónico (BU) en tiempos de 5 y 15 min

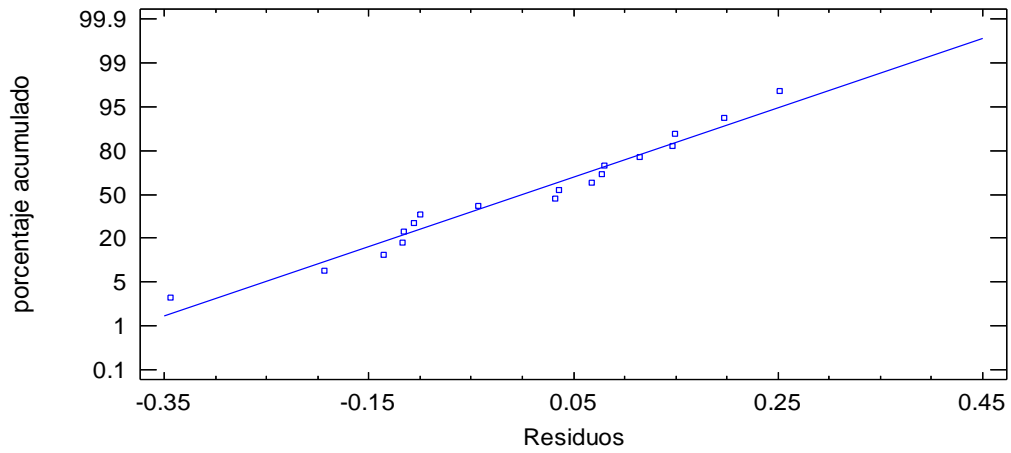
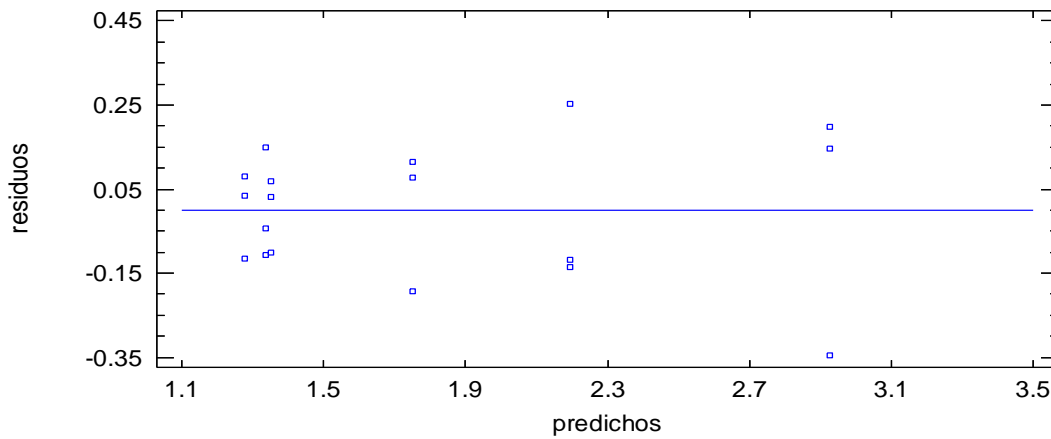


Figura 13. Gráfico de probabilidad normal para EC₂₅ poder reductor de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante los métodos de sonda ultrasónica (SU), agua 100 °C (AC) y baño ultrasónico (BU) en tiempos de 5 y 15 min



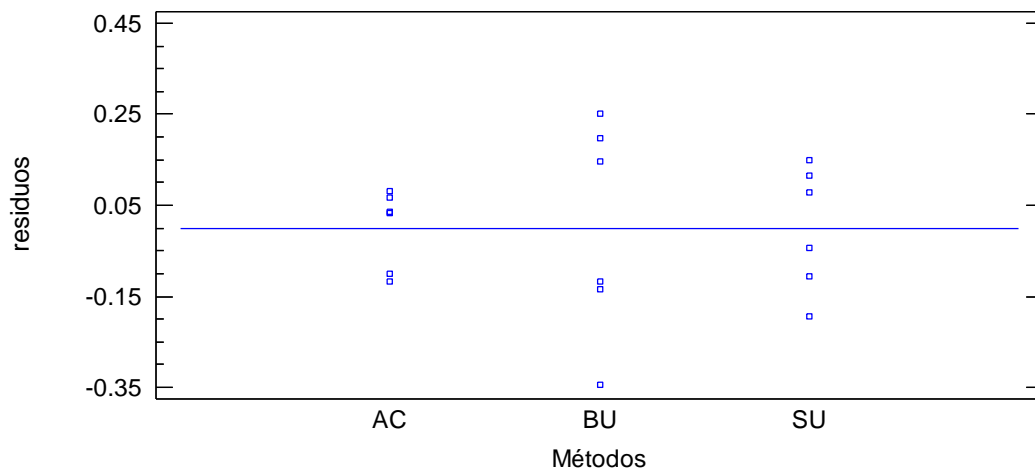


Figura 15. Gráfico de residuos contra niveles para EC₂₅ poder reductor del factor métodos de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante los métodos de sonda ultrasónica (SU), agua 100 °C (AC) y baño ultrasónico (BU) en tiempos de 5 y 15 min

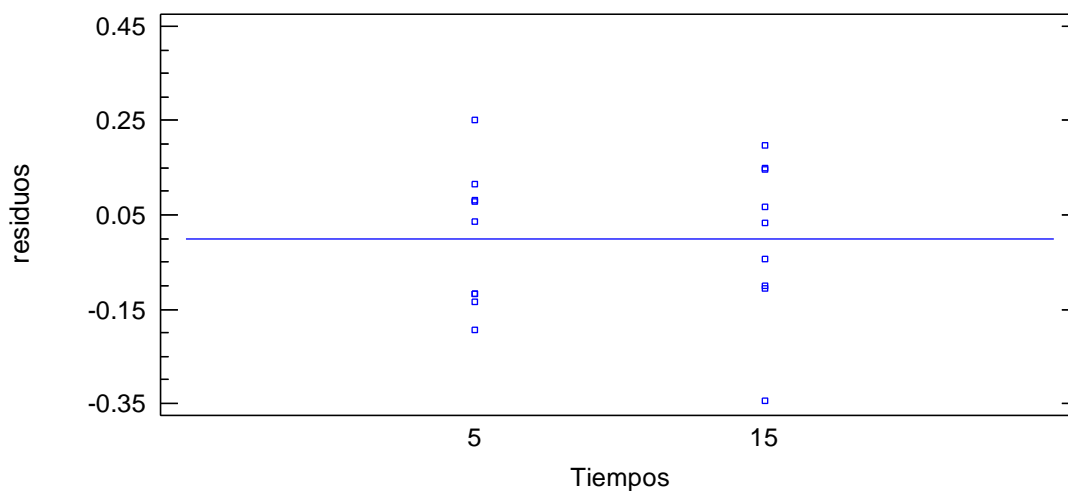


Figura 16. Gráfico de residuos contra niveles para EC₂₅ poder reductor del factor tiempos de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante los métodos de sonda ultrasónica (SU), agua 100 °C (AC) y baño ultrasónico (BU) en tiempos de 5 y 15 min

Anexo 3 Gráficos de regresión lineal simple

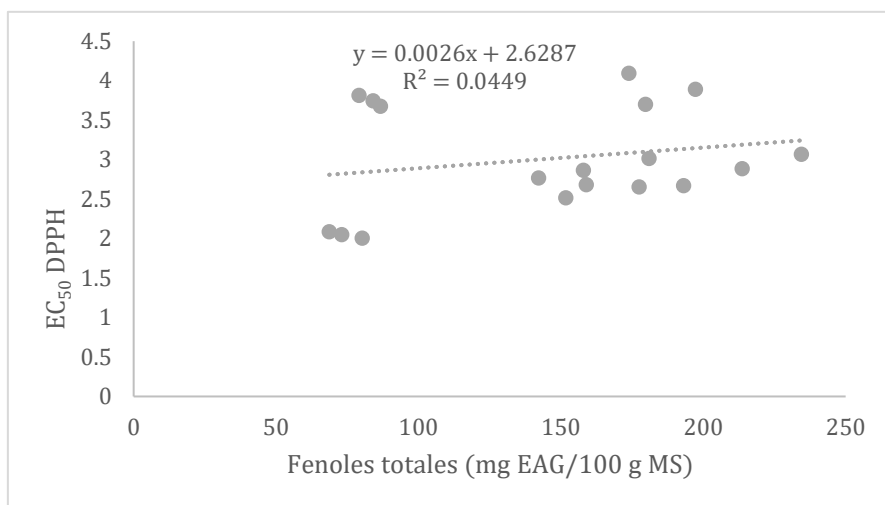


Figura 16. Gráfico de regresión lineal simple de fenoles totales contra EC₅₀ DPPH de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante los métodos de sonda ultrasónica (SU), agua 100 °C (AC) y baño ultrasónico (BU) en tiempos de 5 y 15 min

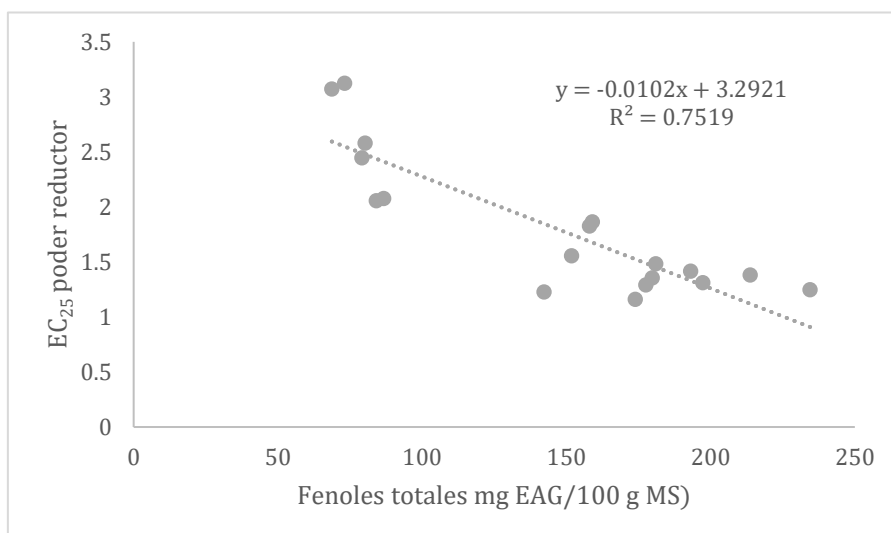


Figura 17. Gráfico de regresión simple de fenoles totales contra EC₂₅ poder reductor de los extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante los métodos de sonda ultrasónica (SU), agua 100 °C (AC) y baño ultrasónico (BU) en tiempos de 5 y 15 min

Anexo 4 Gráficos de normalidad de los residuos y de residuos contra predichos de las respuestas del diseño de superficie compuesto central cara centrada

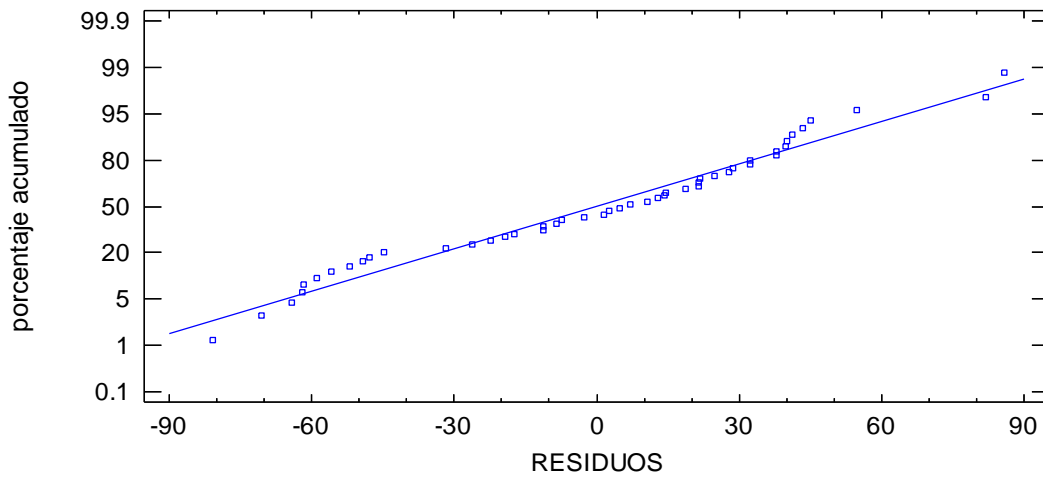


Figura 18. Gráfico de probabilidad normal de los residuos para fenoles totales de extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante sonda ultrasónica.

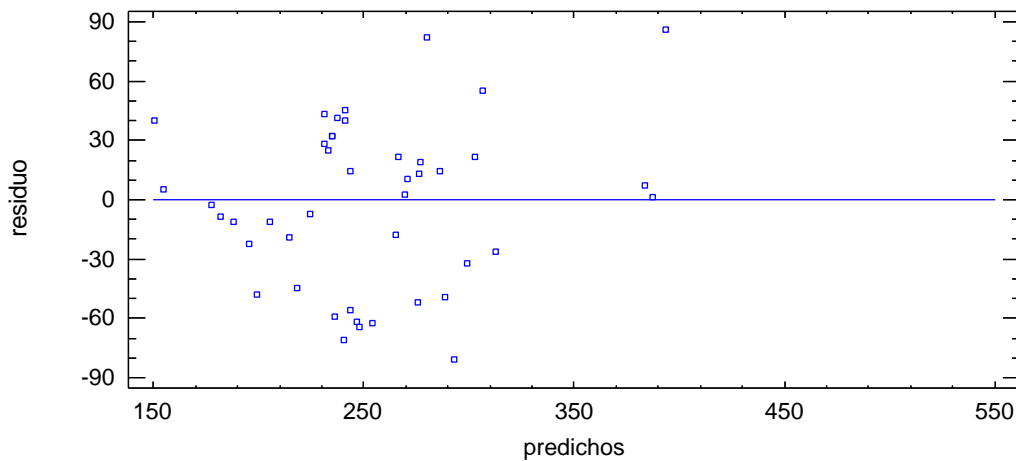


Figura 19. Gráfico de residuos contra predichos para fenoles totales de extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante sonda ultrasónica

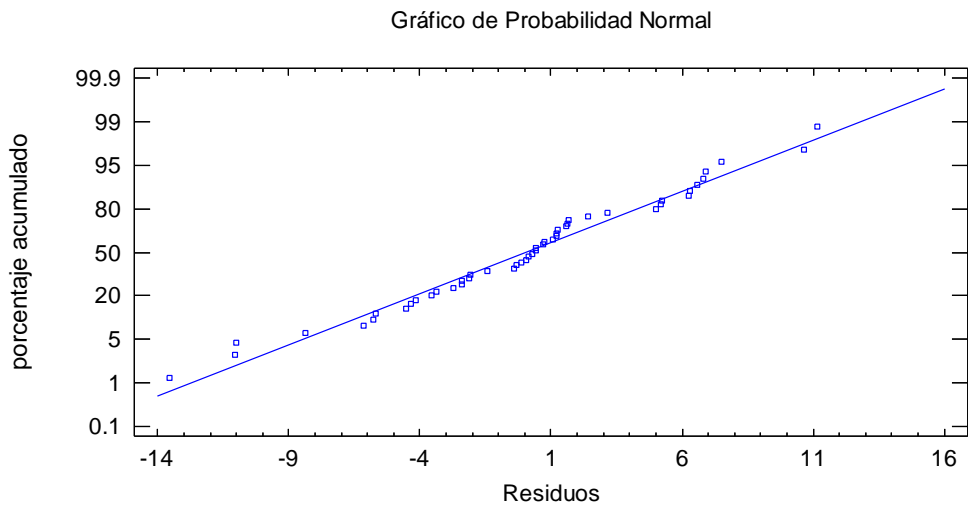


Figura 20. Gráfico de probabilidad normal para captación del DPPH (%) de extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante sonda ultrasónica

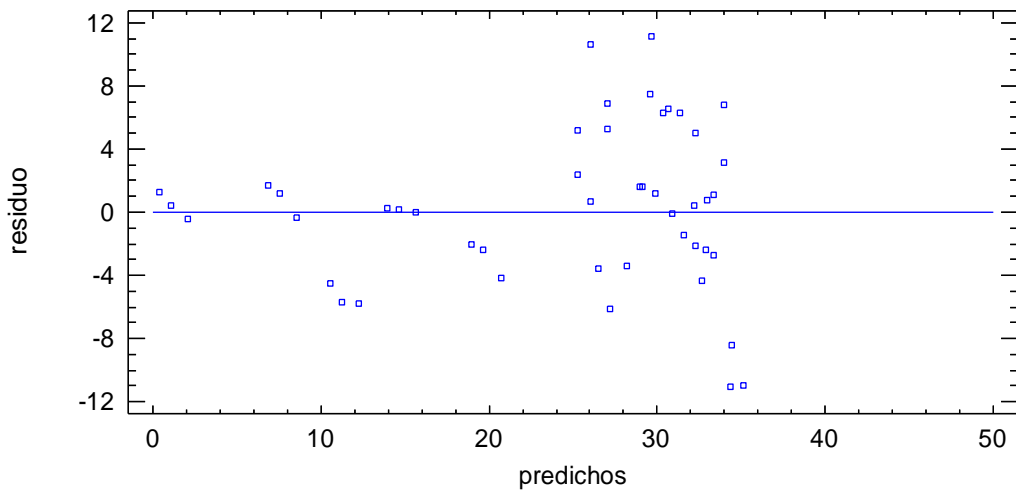


Figura 21. Gráfico de residuos contra predichos para captación del DPPH (%) de extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante sonda ultrasónica

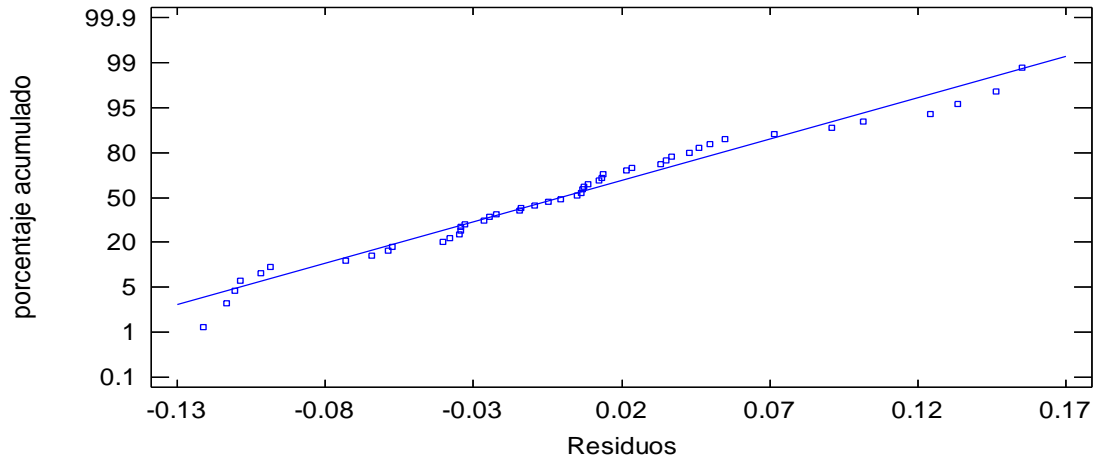


Figura 22. Gráfico de probabilidad normal para captación del DPPH (%) de extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante sonda ultrasónica

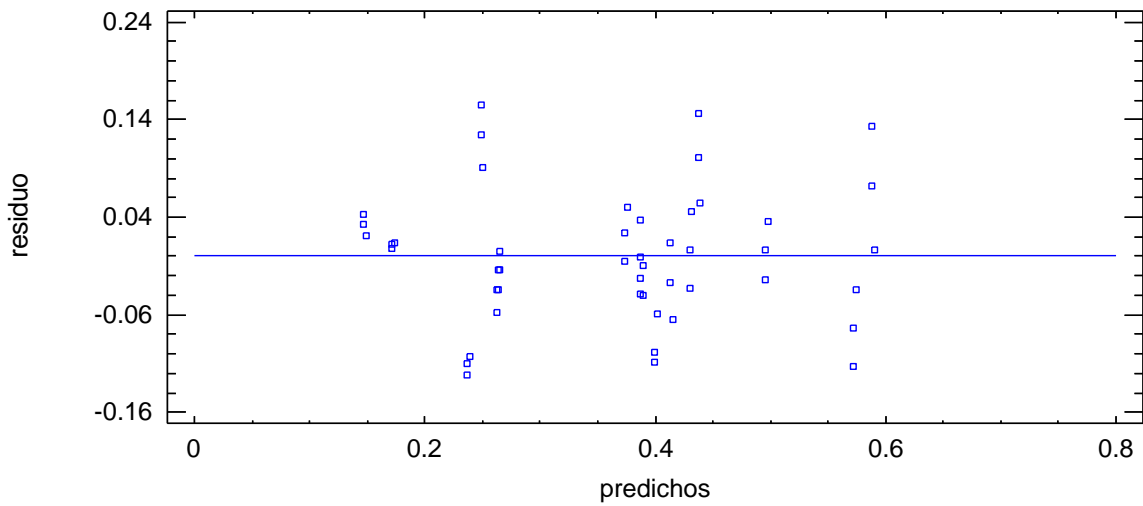


Figura 23. Gráfico de residuos contra predichos para poder reductor de extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante sonda ultrasónica

Anexo 5. Gráficos de regresión de fenoles totales contra captación del DPPH (%) y poder reductor de extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante sonda ultrasónica

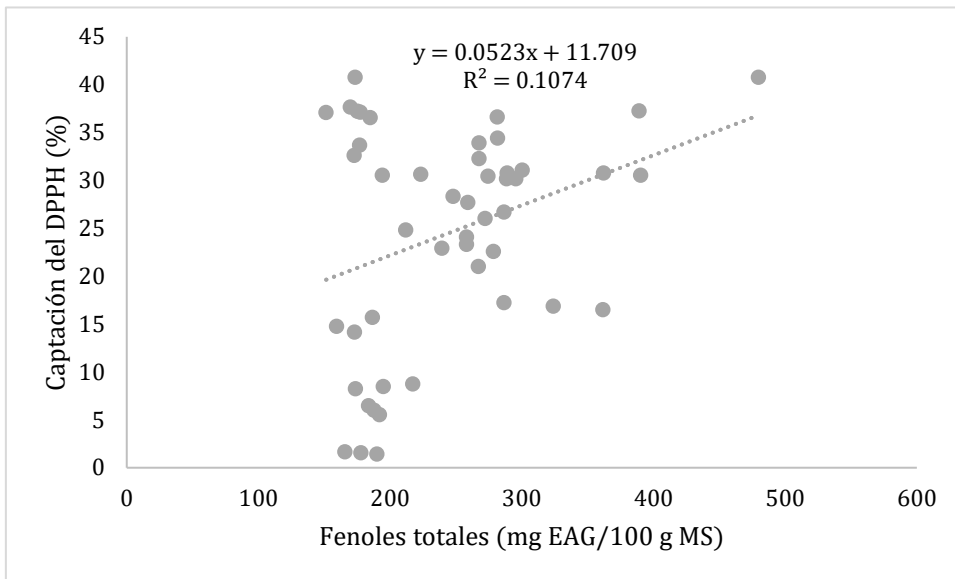


Figura 24. Gráfico de regresión simple de fenoles totales contra captación del DPPH (%) de extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante sonda ultrasónica

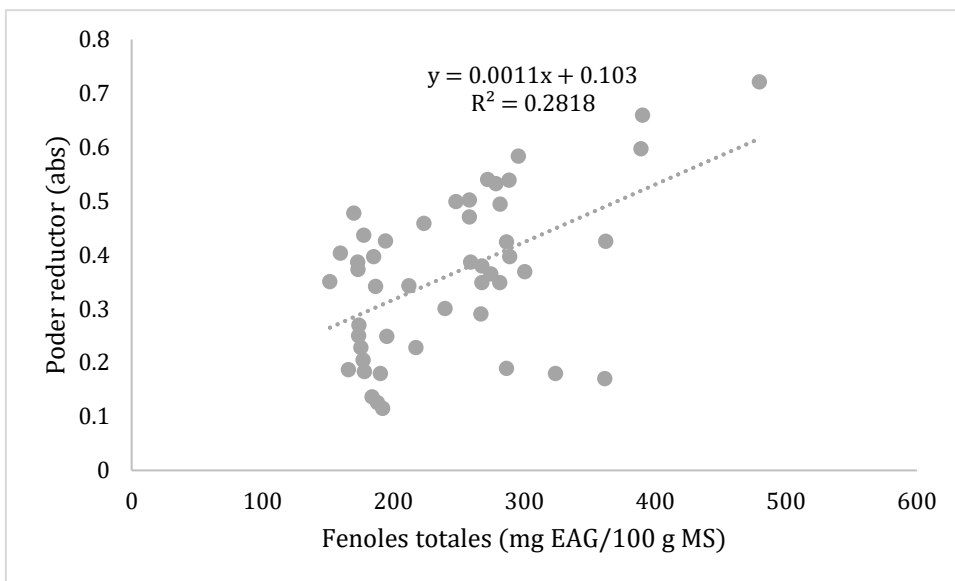


Figura 25. Gráfico de regresión simple de fenoles totales contra poder reductor de extractos acuosos de micelio de *P. ostreatus* obtenidos mediante sonda ultrasónica