



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

---

## INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Extracción de compuestos bioactivos de un  
sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* por  
ultrasonido

### T E S I S

Que para obtener el grado de Maestra en Ciencia de los  
Alimentos

### P R E S E N T A

Merari Osiel Estefes Duarte

Bajo la Dirección de:

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Co-Dirección:

Dr. Antonio de Jesús Cenobio Galindo

Asesores:

Dr. Rubén Jiménez Alvarado

Dra. Elizabeth Pérez Soto



Tulancingo de Bravo Hidalgo, México, agosto 2023





COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos  
Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "Extracción de compuestos bioactivos de un sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* por ultrasonido", que desarrolla la estudiante Merari Osiel Estefes Duarte

Asistentes:

Dr. Rafael Germán Campos Montiel  
Dr. Antonio de Jesús Cenobio Galindo  
Dr. Rubén Jiménez Alvarado  
Dra. Elizabeth Pérez Soto

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a la estudiante, Merari Osiel Estefes Duarte, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE  
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"  
Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 15 de agosto de 2023

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Dr. Antonio de Jesús Cenobio Galindo

Dr. Rubén Jiménez Alvarado

Dra. Elizabeth Pérez Soto



*[Handwritten signatures of the committee members]*



## **Reconocimientos**

**Un sincero reconocimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada a la alumna Merari Osiel Estefes Duarte (No. De CVU: 1149376) para la realización del proyecto “Extracción de compuestos bioactivos de un sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* por ultrasonido”**

## **Agradecimientos**

**Al Dr. Rafael Campos por permitirme ser su alumna y por el respaldo que me otorgó durante este camino.**

**Al Dr. Rubén Jiménez por orientarme siempre que me sentía perdida.**

**A la Dra. Elizabeth Pérez por creer en mí y en mis conocimientos.**

**Al Dr. Antonio Cenobio por nunca presionarme y siempre tomar en cuenta mi opinión.**

**Al Dr. Espino por compartir conmigo un poquito de todo su conocimiento y por ser un ejemplo para mí.**

**A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por permitirme ser parte de la familia.**

## Dedicatorias

A mi compañero y amigo de laboratorio, Javier, por acompañarme en el camino y hacerlo más interesante. *Eres un gran ser humano.*

A mis compañeros Carlos, Mirna y Soledad, por reírse conmigo aún en las tragedias. *Los quiero.*

A mis tíos, Luis y Vero, por escucharme. *Muchas gracias.*

A mis primos, Oscar y Luis, por acompañarme cuando estaba sola. *Fue de mucha ayuda.*

A mis mejores amigas Brenda, Citla y Arely, por apoyarme, alentarme y llenar mi vida de risas. *Las quiero mucho.*

A mis sobrinitas Tete y Sofí y a mi sobrinito Alex por enseñarme que se puede querer a alguien solo por existir. *Son hermosos.*

A mi amigo Uriel Lemus, por apoyarme, escucharme y por ser incondicional. *Te quiero mucho.*

A Darinka, por ser esa nueva amiga que me dio la vida y que me enseñó lo que una amistad recíproca significa. *Gracias por quererme y por amar a mi hermano.*

A mi hermano Toño, por ser mi ejemplo a seguir todos los días y por siempre permitirme ver más lejos. *A hombros de gigantes.*

A mi hermana Lucy, por darme motivos para levantarme todos los días y por enseñarme que el amor incondicional existe. *Eres el regalo más grande que me dio la vida, el que nunca pedí, eres vida para mí.*

Y a mi mamá Lucía, porque me enseñó con su ejemplo que yo podía hacer lo que sea que me propusiera. *Espero que estés orgullosa de mí.*  
*Hasta donde te encuentres mamá...*

## ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN.....	3
2.	MARCO TEÓRICO .....	5
2.1	CRECIMIENTO POBLACIONAL ACTUAL .....	5
2.2	DEMANDA GLOBAL DE ALIMENTOS .....	5
2.3	NUEVAS ALTERNATIVAS DE ALIMENTOS .....	6
2.4	HONGOS COMESTIBLES.....	6
2.5	CULTIVO DE HONGOS COMESTIBLES.....	8
2.6	ELABORACIÓN DEL SUSTRATO DE CULTIVO .....	9
2.7	PRODUCCIÓN DE <i>PLEUROTUS</i> EN LOCALES DE CULTIVO .....	9
2.8	SUSTRATO AGOTADO DE <i>PLEUROTUS</i> (SAP) .....	10
2.8.1	<i>Definición</i> .....	10
2.8.2	<i>Destino del SAP</i> .....	11
2.8.3	<i>Aplicaciones más comunes del SAP</i> .....	11
2.9	SUSTRATO AGOTADO DE <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> .....	14
2.9.1	<i>Propiedades físico-químicas del SAPO</i> .....	15
2.9.2	<i>Compuestos bioactivos de interés</i> .....	15
2.10	ULTRASONIDO .....	16
2.11	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS .....	17
2.11.1	<i>Metodología de superficie de respuesta</i> .....	17
2.11.2	<i>Diseño box. BehnkenE</i> .....	18
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	18
4.	JUSTIFICACIÓN .....	19
5.	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	21
5.1	OBJETIVO GENERAL .....	21
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
6.	HIPOTESIS.....	22
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
7.1	MATERIAL VEGETAL .....	23
7.1.1	<i>Humedad</i> .....	23
7.1.2	<i>Cenizas</i> .....	23
7.1.3	<i>Proteína</i> .....	24
7.1.4	<i>Grasa</i> .....	24
7.1.5	<i>Fibra</i> .....	24
7.1.6	<i>Carbohidratos</i> .....	25
7.2	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO POR ULTRASONIDO .....	25
7.3	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (CFT).....	26
7.4	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES (CF).....	27
7.5	DETERMINACIÓN DE TANINOS (TN).....	28
7.6	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT).....	29
7.6.1	<i>Inhibición del radical DPPH</i> .....	29
7.6.2	<i>Inhibición del radical ABTS</i> .....	30
7.7	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	31
8.	RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	34

8.1	COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL SUSTRATO AGOTADO .....	34
8.2	MODELO.....	34
8.3	INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN SOBRE EL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES DEL ESAPO .....	35
8.4	INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN SOBRE EL CONTENIDO DE FLAVONOIDES ...	36
8.5	INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN SOBRE EL CONTENIDO DE TANINOS .....	38
8.6	INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL 42	
8.7	OPTIMIZACIÓN.....	44
9.	CONCLUSIONES .....	46
10.	REFERENCIAS.....	47

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**FIGURA 1 ..... 7**

**FIGURA 2 ..... 8**

**FIGURA 3 ..... 9**

**FIGURA 4 ..... 10**

**FIGURA 5 ..... 18**

**FIGURA 6 ..... 27**

**FIGURA 7 ..... 28**

**FIGURA 8 ..... 29**

**FIGURA 9 ..... 30**

**FIGURA 10..... 31**

**FIGURA 11..... 36**

**FIGURA 12..... 38**

**FIGURA 13..... 39**

**FIGURA 14..... 45**

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 .....	15
Tabla 2 .....	32
Tabla 3 .....	33
Tabla 4 .....	40
Tabla 5 .....	41
Tabla 6 .....	45

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AA: Actividad Antioxidante

ABTS: 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzo-tiazolina-6-acido sulfónico.

AOAC: Asociación Científica Dedicada a la Excelencia Analítica

AOU: Amplitud de Onda de Ultrasonido

CAT: Capacidad Antioxidante Total

CB: Compuestos Bioactivos

CF: Compuestos Fenólicos

CF: Contenido de Flavonoides

CFT: Contenido de Fenoles Totales

cMeOH: Concentración de Metanol

DBB: Diseño Box- Behnken

DPPH: 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo

ESAPO: Extracto de Sustrato Agotado de *Pleurotus ostreatus*

FT: Fenoles Totales

MeOH: Metanol

MRS: Metodología de Superficie de Respuesta

SAH: Sustrato Agotado de Hongos

SAP: Sustrato Agotado de *Pleurotus spp.*

SAPE: Sustrato Agotado de *Pleurotus eryngii*

SAPO: Sustrato Agotado de *Pleurotus ostreatus*

SAPOs: Sustratos Agotados de *Pleurotus ostreatus*

SAPP: Sustrato Agotado de *Pleurotus pulmonarius*

SAPS: Sustrato Agotado de *Pleurotus sajor-caju*

TN: Taninos

TU: Tiempo de Ultrasonido

US: Ultrasonido

## I. Resumen

El consumo de hongos ha aumentado en los últimos días gracias a su alto valor nutricional, además de que su cultivo requiere de poca inversión, es de rápido crecimiento y su producción es simple. Sin embargo, a medida que aumenta el consumo de hongos, también aumenta la cantidad de subproductos resultantes de su cosecha, dentro de los que se encuentra principalmente el sustrato agotado de hongos (SAH). El *Pleurotus ostreatus* es uno de los hongos mayormente producidos de manera comercial en México y como consecuencia, uno de los mayores generadores de sustrato agotado. A pesar de que se le ha dado uso al sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* (SAPO), no existe información que hable acerca de la extracción de sus compuestos bioactivos (CB), por lo que el objetivo de este trabajo es realizar una extracción de sus CB haciendo uso de una tecnología verde (Ultrasonido) para posteriormente analizar las actividades biológicas que pudiera tener el SAPO y así buscar nuevos usos agroalimentarios para este material. Se prepararon extractos hidro-metanólicos del SAPO (15 tratamientos) de acuerdo con un diseño de Box-Behnken utilizando 3 variables independientes (amplitud de ultrasonido, tiempo y concentración de metanol) y 5 variables dependientes (contenido de fenoles totales, flavonoides, taninos y la inhibición del radical ABTS y DPPH), con el propósito de obtener la máxima extracción de CB. El contenido de fenoles totales en todos los experimentos fue cercano a los ~200 mgEAG/100g SAPO; el contenido de flavonoides osciló entre los 55 y los 97 mgEQ/100g. Los taninos mostraron valores de ~400-500 mgEC/100g. La capacidad antioxidante total medida como inhibición de los radicales DPPH y ABTS arrojó valores de ~300-500  $\mu\text{mol EAA}/100\text{g}$  y 1800-2200  $\mu\text{mol EAA}/100\text{g}$  de SAPO, respectivamente. Posteriormente, según las condiciones arrojadas por el modelo matemático, se realizó un experimento comprobatorio obteniendo una relación de exactitud superior al 96% entre lo predicho y los datos experimentales demostrando los parámetros más influyentes sobre la extracción óptima de biocompuestos del SAPO, y que el ultrasonido representa una alternativa viable para la optimización de la extracción de compuestos antioxidantes.

## II. Abstract

Mushroom consumption has increased in recent days thanks to its high nutritional value, in addition to the fact that its cultivation requires little investment, it is fast growing and its production is simple. However, as the consumption of mushrooms increases, the number of by-products resulting from their harvest also increases, among which is mainly the spent substrate of mushrooms (SAH). *Pleurotus ostreatus* is one of the most widely produced mushrooms. commercial way in Mexico and as a consequence, one of the largest generators of spent substrate. Despite the fact that the spent substrate of *Pleurotus ostreatus* (SAPO) has been used, there is no information that speaks about the extraction of its bioactive compounds (CB), so the objective of this work is to perform an extraction of its CB making use of a green technology (Ultrasound) to later analyse the biological activities that the SAPO could have and thus seek new agri-food uses for this material. Hydro-methanolic extracts of SAPO (15 treatments) were prepared according to a Box-Behnken design using 3 independent variables (ultrasound amplitude, time and methanol concentration) and 5 dependent variables (total phenols, flavonoids, tannins and inhibition of the radical ABTS and DPPH). With the purpose of obtaining the maximum extraction of CB. In general, the total phenol content in all the experiments was close to ~200 mg EAG/100g SAPO; the flavonoid content ranged between 55 and 97 mg EQ/100g. Tannins showed values of ~400-500 mg EC/100g. Total antioxidant capacity measured as inhibition of DPPH and ABTS radicals yielded values of ~300-500  $\mu\text{mol}$  EAA/100g and 1800-2200  $\mu\text{mol}$  EAA/100g SAPO, respectively. Subsequently, according to the conditions provided by the mathematical model, a verification experiment was carried out, obtaining an accuracy ratio greater than 96% between what was predicted and the experimental data, demonstrating the most influential parameters on the optimal extraction of bio composites from SAPO, and that ultrasound represents a viable alternative for optimizing the extraction of antioxidant compounds.

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la población aumenta de una manera acelerada y con ello la necesidad de más alimentos de riqueza proteica, bajos en grasa y precios accesibles (Phan y Sabaratnam, 2012). Ante esta necesidad, los hongos han resultado como una alternativa de interés, debido a su gran valor nutrimental (Pineda *et al.*, 2014), además, gracias a que su cultivo requiere de una menor inversión, es de rápido crecimiento, su proceso de producción es simple y requiere menor gasto de energía, su consumo aumenta y como consecuencia su volumen de producción. (Nidadavolu *et al.*, 2012; Pineda *et al.*, 2014). Sin embargo, la producción de los hongos genera una gran cantidad de subproductos agrícolas, siendo el más abundante el sustrato agotado de hongos (SAH) (Nakajima *et al.*, 2018), el cual está compuesto principalmente por micelio fúngico, enzimas extracelulares excretadas por el hongo y de sustratos lignocelulósicos no utilizados. El SAH no solamente genera un impacto ambiental negativo, sino que también eleva los costos de gestión de residuos de las industrias dedicadas a su cultivo (Antunes *et al.*, 2020a), esto debido a que cada kilogramo de hongo cosechado da como resultado de 5 a 6 kilogramos de subproductos (Cunha y Pardo, 2017). Uno de los hongos mayormente producidos en México es el *Pleurotus spp.* El cual es cultivado sobre diversos desechos agrícolas como aserrín de madera y varias fibras de origen vegetal, las cuales son modificadas con fuentes de carbono y de nitrógeno para optimizar los requerimientos del hongo para crecer (Cunha y Pardo, 2017). El *Pleurotus spp.* Al igual que cualquier otro hongo genera subproductos que cuentan con un alto valor nutritivo y pueden servir como materia prima para nuevas aplicaciones y la elaboración de nuevos productos (Antunes *et al.*, 2020b).

El sustrato agotado de *Pleurotus spp.* (SAP) ha sido ampliamente investigado, y se le ha dado uso como biorremediador, para la producción de cultivos, reutilizado en el cultivo de hongos, como alimento para animales, manejo de plagas, generación de energía, decolorante, entre otros (Cunha y Pardo, 2017). Una correcta gestión de SAP consiste en retirar el sustrato postcultivo de la cama de siembra, se parando el plástico del sustrato para una adecuada valorización y un óptimo reusó de este

material orgánico (Sánchez y Mata, 2012). Sin embargo, a pesar de que existe información sobre el sustrato agotado de varias especies de *Pleurotus* , se le ha puesto poca atención al sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* (SAPO) , a pesar de que es la especie de *Pleurotus* más producida de manera comercial en México (Ernesto *et al.*, 2017) tal es así, que no existe información que hable acerca de la extracción de sus compuestos bioactivos (CB), por lo que el propósito de este trabajo es realizar una extracción de sus CB haciendo uso de una tecnología verde (Ultrasonido) para posteriormente analizar las actividades biológicas que pudiera tener el SAPO y así buscar nuevos usos agroalimentarios para este material.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Crecimiento poblacional actual**

El crecimiento acelerado de la población mundial es un fenómeno de gran importancia para el desarrollo de la sociedad. Las Naciones Unidas prevén que la población mundial crezca de aproximadamente 7,000 millones de habitantes que había en 2011 a 9,300 millones para el año 2050 y 10,100 millones en 2100 (Lee, 2011). Ahora bien, las proyecciones más recientes de la ONU indican que actualmente la población se encuentra entre los 7500 y 8000 millones de habitantes, lo cual involucra grandes cambios, no solo en la economía mundial, sino también en las necesidades básicas per cápita como lo es la alimentación (Byrnes y Bumb, 2017).

### **2.2 Demanda global de alimentos**

La producción de alimentos aumenta conforme crece la población mundial. Aunque las estimaciones pueden variar dependiendo del nivel de consumo, un cálculo razonable indica que de 1995 a 2020 la producción de alimentos tuvo que aumentar en un 50% para poder satisfacer tal requerimiento (Byrnes y Bumb, 2017). La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación) estima que para el año 2050 la producción agrícola deberá incrementarse en un 70% para poder satisfacer las demandas (González *et al.*, 2020). Si bien, hasta el día de hoy se ha logrado cubrir esta necesidad, la población de bajos recursos es la que se ve más afectada en cuanto a las fuentes de alimentos de donde obtiene los nutrientes, esto debido a que su ingreso per cápita es menor que el del resto de la población (Gouel y Guimbard, 2019). Por lo tanto, es necesario encontrar fuentes alternativas de alimentos ricos en proteínas que permitan el consumo de alimentos de alta calidad, bajo costo, menos tiempo de producción y espacio (González *et al.*, 2020).

### **2.3 Nuevas alternativas de alimentos**

La búsqueda de nuevas alternativas alimenticias surge a partir de las desigualdades económicas entre los miembros de una población y la creciente demanda de alimentos de calidad. Actualmente es común encontrar en supermercados, la oferta de alimentos que además de ofrecer la nutrición básica, aportan beneficios adicionales a la salud, también llamados alimentos funcionales (Rubiano, 2006).

### **2.4 Hongos comestibles**

El cultivo de hongos tiene una larga tradición principalmente en los países asiáticos, especialmente en China, donde comenzó alrededor del año 600 D.C. con *Auricularia auricular* o también conocida como “Wood Ear” (oreja de madera). En Europa, el cultivo de *Agaricus bisporus*, el hongo botón se logró por primera vez en Francia durante el siglo XVII. Existen al menos 12,000 especies de hongos que poseen cuerpos fructíferos carnosos, y al menos 2,000 especies son comestibles. Se cree que hasta la fecha más de 200 especies naturales de hongos han sido recolectadas y utilizadas para diversos fines médicos tradicionales. Aproximadamente 35 especies se han cultivado comercialmente y 20 se cultivan a escala industrial. El hongo más cultivado en todo el mundo es *Lentinus edodes* (shiitake), seguido de *Pleurotus* spp (hongos ostra), *Auricula* (hongo de orejas de madera), *A. bisporus* (hongo botón), *Flamulina velutipes* (hongo de invierno) y *Volvariella volvacea* (hongo de paja) (Sánchez, 2010).

Los hongos comestibles son una opción importante cuando se habla de alimentos funcionales, puesto que tienen un bajo contenido calórico, gran cantidad de fibra dietética, alto contenido proteico (perfil completo de aminoácidos esenciales), enzimas y compuestos bioactivos que le permiten tener valiosas propiedades medicinales como antihipertensivo, antiinflamatorio, antimicrobiano, antioxidante, etc.(González *et al.*, 2020). Además de esto, su producción suele ser más rápida, económica y con un valor nutricional equiparable al de proteínas animales, por lo que la producción de hongos parece

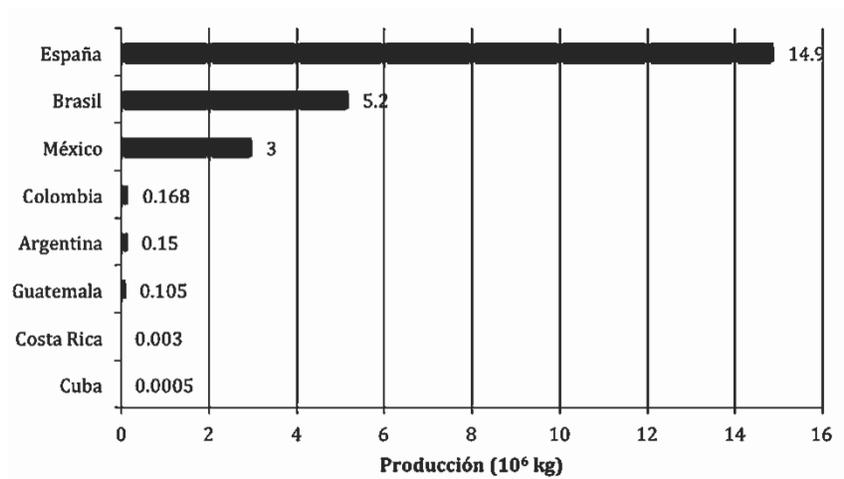
aumentar continuamente con el tiempo alrededor del mundo. Otra gran ventaja es su riqueza en vitaminas y minerales, además de su facilidad de cultivo sobre diversos sustratos, generalmente residuos de la industria maderera, papelera y agrícola, por lo que su cultivo es ecológico (Sánchez, 2010).

La producción mundial de *Pleurotus spp.* ha incrementado notablemente en los últimos años, siendo España, Brasil y México los países en Iberoamérica más sobresalientes (Figura 1)(Ernesto *et al.*, 2017).

Las especies de *Pleurotus* más cultivadas comercialmente entre los géneros de hongos comestibles son: *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. cornucopiae*, *P. djamor* y *P. eryngii* (Figura 2) (Ernesto *et al.*, 2017).

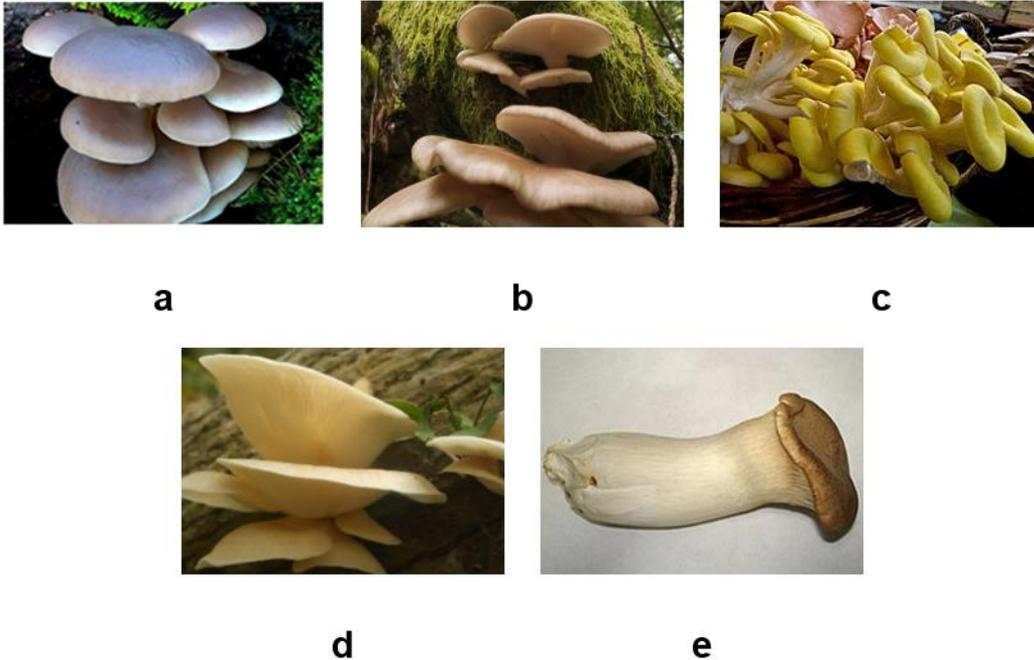
**Figura 1**

PRINCIPALES PAÍSES IBEROAMERICANOS PRODUCTORES DE PLEUROTUS SPP.  
(ERNESTO ET AL., 2017).



**Figura 2**

LAS CINCO ESPECIES DE *PLEUROTUS* MÁS CULTIVADAS: A) *P. OSTREATUS* B) *P. PULMONARIUS*, C) *P. CORNUCOPIAE*, D) *P. DJAMOR*, E) *P. ERYNGII* (ERNESTO ET AL., 2017; PINZÓN ET AL., 2021).



## 2.5 Cultivo de hongos comestibles

El cultivo de *Pleurotus spp.* puede realizarse utilizando una amplia variedad de residuos o subproductos agrícolas o agroindustriales, por ejemplo, subproductos como paja de trigo, paja de maíz, paja de cebada, bagazo de caña, aserrín de madera, etc. Algunos otros cultivadores utilizan desechos industriales o subproductos del procesado de alimentos como los residuos de aceite de algodón, piña, betabel, papas, algunos destilados y vinagres de granos (Pineda *et al.*, 2014).

Los ingredientes de cada formulación dependerán del cultivador, las especies o las cepas. En el caso de algunos productores deciden usar mezclas de rastrojos en diferentes proporciones, esto debido a que no se tiene disponibilidad de estos todo el año, por lo tanto, ajustan la formulación según sea necesario y en el caso de otros productores, utilizan los rastrojos de menor costo (Ernesto *et al.*, 2017).

## 2.6 Elaboración del sustrato de cultivo

Existen algunas consideraciones que deben tenerse en cuenta a la hora de preparar un sustrato de cultivo, como la disponibilidad de la materia prima, la regularidad en su composición fisicoquímica, el costo de adquisición, fácil localización facilidad de transporte y manejo (Sánchez, 2010). El proceso de elaboración del sustrato tiene por finalidad preparar las materias primas para el cultivo de *Pleurotus spp.* Tal como se muestra en la Figura 3.

**Figura 3**

*PROCESO GENERAL DE ELABORACIÓN DEL SUSTRATO PARA EL CULTIVO DE PLEUROTUS SPP. (GEA Y LAÍNEZ, 2011)*



En algunas ocasiones, es necesario enriquecer el sustrato de cultivo durante la inoculación con alguna fuente proteica. Algunos de estos suplementos son elaborados a base de harina de soya desnaturalizada, harina de gluten de maíz, proteína de patata y harina de plumas; además pueden añadirse algunos otros aditivos como carbohidratos simples, minerales, etc. (Gea y Laínez, 2011).

## 2.7 Producción de *Pleurotus* en locales de cultivo

Una vez inoculado el sustrato, es necesario el acondicionamiento de los locales de cultivo para la llegada de los paquetes de sustrato. Estos locales deben estar limpios y desinfectados, para posteriormente realizar una serie de actividades como se muestra en la Figura 4.

**Figura 4**

**ACTIVIDADES POSTERIORES A LA INOCULACIÓN DEL SUSTRATO EN LOCALES DE CULTIVO DE PLEUROTUS SPP. (GEA Y LAÍNEZ, 2011).**



La primera florada se recoge entre los 25 y 35 días después del inicio del ciclo de cultivo, la segunda 15 o 20 días después de recoger la primera, dando un total de entre 44 y 55 días un ciclo de cultivo completo (Figura 5), dependiendo las condiciones de cada cultivo. La producción media anual por paquete de sustrato oscila entre 2.2-2.5 kg lo que representa un 12-15% de rendimiento sobre el peso fresco del sustrato lo que significa que el 85-88% restante queda como materia orgánica residual por ciclo de cultivo (Gea y Laínez, 2011).

## **2.8 Sustrato agotado de Pleurotus (SAP)**

### **2.8.1 Definición**

El sustrato agotado de *Pleurotus* es aquel material orgánico que fue utilizado para el cultivo del hongo, pero que después de varios ciclos de cultivo ya no es rentable

para futuras producciones, esto debido que a que los nutrientes se agotaron y ahora se considera gastado (Cabrales *et al.*, 2017). También es conocido como SAP a los residuos agrícolas (bagazo de caña de azúcar, paja de trigo, etc.) y el micelio fúngico que queda después de la cosecha del hongo (Phan y Sabaratnam, 2012).

## **2.8.2 Destino del SAP**

Después de un ciclo de cultivo de hongos, el destino la materia orgánica residual (Sustrato agotado) depende de la industria, sin embargo, la estrategia actual de la mayoría consiste en incinerar, esparcir en la tierra, enterrar, compostar con estiércol animal o depositar en vertederos (Phan y Sabaratnam, 2012). Por otro lado, aunque a menor escala, existen otras aplicaciones que se le ha dado al SAP como la biorremediación, la producción de cultivos, etc.

## **2.8.3 Aplicaciones más comunes del SAP**

### **2.8.3.1 Biorremediación**

La biorremediación es una técnica ecológica utilizada para regresar a su estado original un ecosistema que ha sido contaminado y dañado. Para esta técnica se han utilizado microorganismos, hongos, plantas, enzimas, etc. (Kensa, 2011), que pueden eliminar o neutralizar contaminantes no deseados en aire, suelo o agua), transformando compuestos de peligro biológico en productos no peligrosos, todo esto con la intención de mitigar en la medida de lo posible, el daño hecho al ambiente (Hernández, 2021). El SAP ha sido evaluado como una solución parcial ante algunos contaminantes ambientales (Cunha y Pardo, 2017).

#### **2.8.3.1.1 Agua**

El sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* (SAPO) ha sido empleado como un biorremediador del agua contaminada con cobre (II) (Chia *et al.*, 2010) y níquel (II) (Tay *et al.*, 2011) por el poder biosorbente que caracteriza a los residuos agrícolas con los que los sustratos se elaboran. El SAPO también es empleado en la disipación de pesticidas como el tiabendazol, imazalil, orto- fenilfenol, difenilamina y algunos otros presentes en las aguas residuales del envasado de frutas mediante biocamas que permiten una depuración del agua más efectiva (Karas *et al.*, 2015).

El sustrato agotado de *Pleurotus eryngii* (SAPE) se ha ocupado para la biodegradación de antibióticos utilizados en la cría de animales llamados tetraciclinas, mediante la elaboración de un extracto adicionado con microcápsulas de alginato, el cual aumentó la tasa de eliminación de estos antibióticos en las aguas residuales porcinas (Chang *et al.*, 2014). El sustrato agotado de *Pleurotus sajor-caju* (SAPS) ha servido en la decoloración de colorantes textiles como el negro reactivo 5 y el naranja reactivo 16, gracias a su potencial enzimático (Singh *et al.*, 2011).

#### **2.8.3.1.2 Suelo**

El SAPO también es utilizado en la biorremediación del suelo contaminado con creosota envejecida degradando los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes, en donde la adición de aceite de pescado a la mezcla del SAPO proporcionó una mejor degradación de los hidrocarburos (Eggen, 1999). El sustrato agotado de *Pleurotus pulmonarius* (SAPP) ha sido utilizado en la eliminación de clorofenoles (desinfectantes y conservantes) que son los principales contaminantes de los cultivos (Chiu *et al.*, 1998) y en la eliminación de petróleo que ha sido derramado en suelos industriales (Chiu *et al.*, 2009). Además de su apoyo en la disminución de la contaminación por metales pesados que, aunque no reparan el daño por completo, si mejoran las propiedades físicas del suelo, aumentan los nutrientes disponibles, incluso ayuda a inmovilizar algunos metales pesados que podrían ser tóxicos (Frutos *et al.*, 2008).

#### **2.8.3.1.3 Plaguicidas**

El SAP ha sido estudiado en la adsorción de plaguicidas como el linuron, diazinón y miclobutanil evitando la lixiviación de estos en aguas subterráneas (Marín *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2012), así como también en la disipación del tebuconazol en el suelo de viñedos (Herrero *et al.*, 2011).

#### **2.8.3.2 Producción de cultivos**

El cultivo de los hongos se lleva a cabo sobre residuos agrícolas que le permitan un mejor crecimiento y una mayor productividad a corto plazo. Por otro lado, no solo

los hongos requieren de sustratos de cultivo que mejoren su calidad, si no también otros alimentos, los cuales han empleado el SAH como materia prima.

#### **2.8.3.2.1 Cultivos extensivos**

El SAPE ha sido utilizado y comparado con otros sustratos agotados en el trasplante de semillas de lechuga aumentando su nivel de germinación y la rapidez de su crecimiento (Kwack *et al.*, 2012). En el caso del SAPO se ha empleado para mejorar la producción de plantas hortícolas, como tomate, calabacín, pimiento (Medina *et al.*, 2009) y maíz (Adamovic *et al.*, 2007). De igual manera, el SAPO fue empleado en el cultivo de berenjena, el cual aumentó el número de cuerpos frutales y el peso de los mismos (Abdallah *et al.*, 2000).

#### **2.8.3.2.2 Fertilizante**

El SAP se ha empleado para reducir la producción de azúcar con un tratamiento previo de hidróxido de potasio, cal y amoníaco dando como resultado una mejora en la sacarificación enzimática, al igual que apoyó en la producción de biofertilizantes, lo que lo convierte en una materia prima potencial en la industria agroalimentaria (Zhu *et al.*, 2013).

#### **2.8.3.3 Reutilización en el cultivo de hongos**

El SAP se ha usado como material de cobertura para el cultivo de otros hongos como el *Agaricus spp.* y otros *Pleurotus*, adicionando suplementos nutricionales, mezclas de paja y carbonato de calcio ocasionando un aumento en la producción de hongos en comparación con otros sustratos (Pardo *et al.*, 2012). También, ha servido como sustrato de cultivo del hongo *Agrocybe cylindracea* en conjunto con aserrín de caucho dando como resultado un alto rendimiento del hongo en comparación a los que fueron cultivados solo con aserrín de caucho (Noonsong *et al.*, 2016).

#### **2.8.3.4 Alimento para animales**

El SAP ha servido en la suplementación de alimento para novillos Hanwoo steers, con la intención de obtener mayores pesos en la canal y mejorar la calidad de la

carne en general. Como resultado se obtuvo un mayor rendimiento y mejores características de la canal, dando lugar al uso del SAP como remplazo de los forrajes convencionales (Kim *et al.*, 2012). Por otro lado, el SAPE y el SAPO fueron utilizados para aumentar la degradabilidad del bagazo en rumiantes mediante el aumento de la biodisponibilidad de los nutrientes (Alborés *et al.*, 2006; Zadrazil y Puniya, 1995).

#### **2.8.3.5 Manejo de plagas**

El SAPE es considerado un eficiente plaguicida contra enfermedades fúngicas y bacterianas en plantas, puesto que, al rosear un extracto acuoso elaborado a base de este sustrato, se observó una disminución significativa de algunas enfermedades como la antracosis (Parada *et al.*, 2012). De igual manera, fue estudiado el efecto de la adición del SAP en el manejo de nematodos agalladores y logró reducir la eclosión de huevos y la muerte de los huevos jóvenes gracias a los compuestos fenólicos presentes (Aslam, 2013).

#### **2.8.3.6 Generación de energía**

Uno de los principales usos dados al SAP es la generación de combustible (biogás), esto mediante un pretratamiento enzimático y una combinación con estiércoles o lodos de plantas depuradoras que permite una mejor digestión bacteriana (Pérez *et al.*, 2017). Gracias a esto el SAP es considerado como una materia prima muy rentable para la generación de biocombustibles (Phan y Sabaratnam, 2012).

#### **2.8.3.7 Decolorante**

El SAP es utilizado para degradar colorantes como el azul brillante, negro de amido, verde de metilo, rojo congo, azul de metileno y otros gracias a las enzimas presentes como la lignina peroxidasa, lacasa beta- glucosidasa, carboximetilcelulosa y xilasa (Phan y Sabaratnam, 2012).

### **2.9 Sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus***

El sustrato de cultivo para el *Pleurotus ostreatus* es bastante homogéneo debido a que es elaborado a base de paja de cereales en casi su totalidad. La composición

de cada sustrato dependerá del material que este elaborado (Sánchez y Mata, 2012).

### 2.9.1 Propiedades físico-químicas del SAPO

El SAPO es un material de humedad alta y baja densidad, contiene un alto nivel de carbono orgánico oxidable y un contenido medio de nitrógeno. La tabla 1 muestra las propiedades fisicoquímicas y contenido de elementos totales del SAPO.

**Tabla 1**

*Propiedades físico-químicas y contenido de elementos totales del sustrato agotado de Pleurotus ostreatus*

Parámetros	Valor medio
Humedad (%)	70
Densidad aparente práctica (kg(m.f.) m <sup>3</sup> )	200
Espacio poroso total (%)	96
Cenizas (%)	18.05
Capacidad de retención (%)	37
Materia orgánica total (%)	81.95
Carbono oxidable (%)	37.19
Nitrógeno (%)	1.28
Relación C/N	37
Extracto Húmico total (EHT) (%)	7.96
Ácidos húmicos (AH) (%)	2.88
Ácidos Fúlvicos (AF) (%)	5.08
pH (extracto acuoso 1:10, p/p)	7.11
Conductividad eléctrica (extracto acuoso 1:10, p/p)	1.93
Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) (%)	0.70
Potasio (K <sub>2</sub> O) (%)	0.88
Calcio (%)	6.91
Magnesio (%)	0.79
Índice de grosor (% partícula >1 mm)	89,84

(Sánchez y Mata, 2012)

### 2.9.2 Compuestos bioactivos de interés

Los compuestos bioactivos (CB), también conocidos como fitoquímicos, son sustancias que están presentes en los alimentos, las cuales, a pesar de no tener una función nutrimental bien definida o que sean consideradas como esenciales para la salud humana, son de interés en la salud. Dentro de los CB se pueden

distinguir 4 grupos que son las sustancias nitrogenadas, las azufradas, las terpénicas y las de mayor enfoque, las sustancias fenólicas (Martínez *et al.*, 2008).

### **2.9.2.1 Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos (CF) se encuentran en su mayoría en las frutas de color rojo y morado, así como en los cítricos (Martínez *et al.*, 2008) y están implicados en el mecanismo de defensa ante agresiones de patógenos o de la luz ultravioleta. Los CF se pueden clasificar en flavonoides, fenilterpenoides y derivados del ácido benzoico. De estas sustancias, el principal grupo es el de los flavonoides (el más abundante), los cuales, poseen una alta capacidad de reaccionar con otros compuestos como proteínas, hormonas, ácidos nucleicos, etc., lo que les permite tener efectos fisiológicos benéficos llamadas actividades biológicas, como la actividad antiinflamatoria, antidiabética, antimicrobiana, antioxidante, etc. (García, 2016).

#### **2.9.2.1.1 Actividad biológica**

##### **2.9.2.1.1.1 Actividad antioxidante**

Los antioxidantes tienen la capacidad de reaccionar con radicales libres y por tanto también son llamados antioxidantes terminadores de cadena. Desde hace años se han estudiado los compuestos antioxidantes por su capacidad de oxidarse en lugar de otras sustancias (Londoño, 2012). Los flavonoides muestran actividad antioxidante (AA) para muchos compuestos que se oxidan con facilidad. Está comprobado que las plantas que crecen con menor exposición al sol tienen menos flavonoides puesto que las plantas los desarrollan como defensa ante los rayos UV (Duran y Borja, 1993). Los antioxidantes desempeñan un papel importante dentro de la salud humana, en apoyo a enfermedades cardiovasculares, cáncer, procesos asociados al envejecimiento como las cataratas o enfermedades degenerativas, reduciendo la probabilidad de padecer Alzheimer mediante el bloqueo de radicales libres, etc., por lo que la actividad antioxidante se convierte en la madre del resto de las actividades biológicas (Londoño, 2012).

## **2.10 Ultrasonido**

El ultrasonido (US) es una tecnología novedosa en el área de alimentos puesto que ayuda en la modificación de procesos productivos, o bien, mejora los que ya existen, además de que apoya en la conservación y la extracción de compuestos (Robles *et al.*, 2012).

El US se basa en un principio fisicoquímico llamado cavitación que consiste en la formación y colapso de burbujas creadas gracias a la aplicación de ondas sonoras que, al propagarse en la matriz estudiada, provoca una presión negativa en el solvente y forma vacíos microscópicos (burbujas). Posteriormente, cuando estas burbujas se llenan de vapor de agua o bien de gas, se comprimen y expanden hasta que colapsan (Carreira *et al.*, 2021).

El US es considerado como una tecnología “verde”, esto gracias a que para su uso se requiere de poca energía y poco solvente, un reducido espacio de trabajo es de bajo costo, y además es de fácil operación. Gracias a esas características, la industria alimentaria utiliza el US como un método eficaz para la extracción de biomoléculas (Ojha *et al.*, 2020).

## **2.11 Optimización del proceso de extracción de compuestos bioactivos**

### **2.11.1 Metodología de superficie de respuesta**

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas utilizadas en la investigación para estudiar la relación que existe entre variables dependientes e independientes con el objetivo de optimizar las variables de respuesta (variables dependientes) mediante un modelo matemático que mejor les ajuste a los datos obtenidos. Existen modelos matemáticos de primer orden (lineal) sin interacciones, modelo de primer orden con interacciones y modelo de segundo orden (cuadrático); todos los modelos toman en cuenta el ruido o error que pudiera haber en la respuesta (Contreras *et al.*, 2010).

Los resultados son expresados mediante superficies (sábanas) y graficas de contorno que pueden presentar un mínimo y una cresta elevada como representaciones de la influencia que tiene la variación de las variables

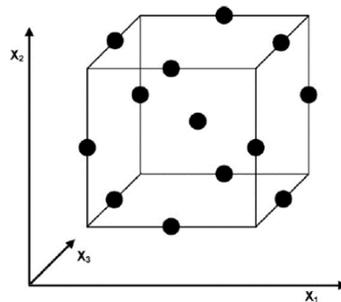
independientes sobre las dependientes (Figuroa, 2003). Existen varios diseños de MSR desarrollados para la optimización según requiera el experimento, como el diseño central compuesto, el diseño factorial, el diseño Draper- Lin y el diseño Box-Behnken.

### 2.11.2 Diseño box. Behnken

El diseño Box-Behnken (DBB) es una herramienta empleada para la optimización de procesos. Es un diseño de segundo orden casi giratorio de tres niveles (bajo, medio y alto) que permite una mejor estimación de los coeficientes de primer y segundo orden, suele tener menos puntos de diseño (menor número de tratamientos), por lo que es menos costoso (Ferreira *et al.*, 2007). Los puntos del diseño se encuentran en combinaciones de tratamientos que estén en los puntos medios de los bordes y el espacio experimental como se puede observar en la Figura 5.

**Figura 5**

CUBO PARA DISEÑO BOX- BEHNKEN (FERREIRA ET AL., 2007).



## 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con cada año que pasa, la demanda global de alimentos ricos en proteínas y de precio accesible aumenta enormemente debido al crecimiento de la población mundial. Los hongos han surgido como una alternativa llamativa ante esta necesidad, por su alto valor nutricional, además, gracias a que su cultivo es simple

y su crecimiento rápido, su consumo aumenta y como consecuencia el volumen de producción. Sin embargo, en el cultivo de los hongos se genera una gran cantidad de subproductos, entre ellos un sustrato agotado de hongos, el cual es un material que resulta al final de varias cosechas de hongos y está compuesto principalmente por micelio fúngico, enzimas extracelulares excretadas por el hongo para su degradación de sustancias y de sustratos lignocelulísticos no utilizados. Este sustrato agotado no solo tiene un impacto ambiental negativo, sino que también eleva los costos de gestión de residuos de la industria, puesto que la producción de 1 kilogramo de cualquier especie de hongo da como resultado 5-6 kg de subproductos. Uno de los hongos más producidos en México es el *Pleurotus spp.*, específicamente *P. ostreatus* sembrado sobre desechos agrícolas como aserrín de madera y varias fibras vegetales que son modificados con ciertos carbohidratos y proteínas para optimizar sus requisitos de crecimiento, este hongo al igual que el resto, genera subproductos que tienen un alto valor nutritivo y que puede fungir como una materia prima para nuevas aplicaciones y para el desarrollo de nuevos productos. El sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* ha sido investigado ampliamente como biorremediador, plaguicida, producción de cultivos, fertilizante, alimento para ganado, manejo de plagas, generación de energía y más aplicaciones, sin embargo, actualmente no existe información disponible sobre la extracción de compuestos bioactivos a partir del sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* utilizando tecnología de ultrasonido. Por otro lado, estos compuestos bioactivos pueden presentar actividades biológicas importantes como la actividad antioxidante, por lo que resulta interesante abordar estos temas.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Con el desarrollo de este proyecto de investigación se pretende, en primera instancia, promover el uso de sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* como una materia prima y no como un residuo puesto que es el principal subproducto en peso y volumen de la industria de los hongos, además de que es rico en compuestos que le confieren un alto valor nutritivo y actividades biológicas importantes, lo que

permitirá su introducción al sector agroindustrial de manera eficaz, ya sea adicionándolo a algún alimento, como fuente de antioxidantes, etc. Por último y bajo la perspectiva a largo plazo, este proyecto busca aportar, desde la ciencia de los alimentos, nuevos conocimientos para la utilización de residuos de esta naturaleza y así mitigar en la medida de lo posible su impacto ambiental y los costos de gestión de desechos para la industria de los hongos.

## 5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

### 5.1 Objetivo general

Conocer las condiciones óptimas de extracción (asistida por ultrasonido) de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de un sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* empleando la metodología de superficie de respuesta, a fin de obtener extractos ricos en biocompuestos con potenciales aplicaciones agroindustriales posteriores.

### 5.2 Objetivos específicos

- Conocer la composición química de un sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* mediante la realización de un análisis proximal.
- Establecer un diseño experimental utilizando las variables de procesamiento: amplitud de onda de ultrasonido (%), tiempo de ultrasonificación (min) y concentración de metanol (%), el cual permita obtener extractos ricos en biocompuestos y capacidad antioxidante.
- Evaluar el efecto de las variables de procesamiento sobre el contenido de fenoles totales, flavonoides, taninos e inhibición de radicales ABTS y DPPH de los extractos de un sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus*.
- Obtener las condiciones óptimas de extracción de compuestos bioactivos de sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* mediante un análisis de superficie de respuesta.

## 6. HIPOTESIS

La amplitud de onda, tiempo de ultrasonido y concentración de metanol son variables de procesamiento que influirán positivamente en la extracción óptima de compuestos bioactivos de un sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus*.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Material vegetal

El sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* se obtuvo de la empresa local Monarca, ubicada en Cuauhtepic de Hinojosa Hidalgo, México. Coordenadas N 20° 1.315" O 98° 20' 13.64".

### 7.2 Composición química del sustrato agotado

Se realizó un análisis químico proximal que incluyó humedad, cenizas, proteína, fibra cruda y extracto etéreo siguiendo las metodologías oficiales de la AOAC.

#### 7.2.1 Humedad

Se pesaron 5g de muestra de sustrato en capsulas a peso constante, se secaron a 105 °C en un horno de aire caliente (CRAFT) hasta peso constante y luego se calculó el contenido de humedad. Posteriormente las muestras de sustrato seco se molieron en un molino manual para obtener un polvo fino y así realizar más tarde el análisis de composición (Lee *et al.*, 2005). El contenido de humedad se obtuvo mediante la Ecuación 1:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{(M - m)}{M} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

M Peso inicial en gramos de la muestra

m Peso en gramos del producto seco

#### 7.2.2 Cenizas

Se pesaron 5 g de muestra seca en crisoles a peso constante y se calentó a fuego lento hasta la carbonización completa del material, después, se colocó el crisol en un horno de mufla marca Felisa, modelo 3703 durante 6 horas a 600° C. Una vez que el crisol haya alcanzado la temperatura ambiente, se pesó en una balanza convencional marca DENVER INSTRUMENTS modelo APX-200 y el contenido de ceniza se calculó empleando la Ecuación 2:

$$Cenizas (\%) = \frac{(P1 - P2)}{P} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

P Peso en gramos de la cápsula con muestra

P1 Peso en gramos de la cápsula con las cenizas

P2 Peso en gramos de la capsula vacía

(Lee *et al.*, 2005)

### 7.2.3 Proteína

El contenido de proteína se estimó empleando el método Kjeldahl reportado por el manual de procedimientos de la AOAC en 2005. En este método se determina primeramente el contenido de nitrógeno en cada muestra y el contenido final de proteína se obtiene de la multiplicación de los valores del nitrógeno total por el factor de conversión de nitrógeno de proteína 6.25. Se tomó 1 gramo de muestra junto con la muestra digestora. Posteriormente la digestión se realizó en un destilador marca BÜCHI modelo K- 350 y finalmente se tituló utilizando rojo de metilo como indicador (Lee *et al.*, 2005).

### 7.2.4 Grasa

El contenido de grasa cruda se determina por extracción con éter de petróleo usando un aparato Soxhlet marca BÜCHI modelo E816-HE (Lee *et al.*, 2005). Se empleó la Ecuación 3:

$$Contenido\ de\ grasa\ (\%) = \frac{\text{Peso del vaso con grasa} - \text{peso del vaso}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

### 7.2.5 Fibra

La fibra cruda del SAPO se analizó mediante la metodología descrita por la AOAC utilizando un equipo Labconco modelo LAC300001-00. Esta determinación se lleva a cabo mediante una hidrolisis ácida con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) seguida por una

hidrolisis alcalina con hidróxido de sodio (NaOH) (Lee *et al.*, 2005). Para el cálculo del contenido de fibra se empleó la Ecuación 4:

$$\text{Contenido de fibra (\%)} = \frac{P1 - P2}{P} \times 100 \quad \text{Eq. (4)}$$

P Peso inicial de la muestra

P1 Peso del crisol conteniendo la muestra seca

P2 Peso del crisol conteniendo muestra calcinada

### 7.2.6 Carbohidratos

El contenido de carbohidratos de las muestras del SAPO se determinará de manera indirecta por diferencia al 100% del resto de los componentes químicos (Lee *et al.*, 2005). Para el cálculo se empleó la Ecuación 5:

$$\text{Carohidratos (\%)} = 100\% - (\% \text{ humedad} + \% \text{ grasa} + \% \text{ proteína} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ fibracruda}) \quad \text{Eq. (5)}$$

### 7.3 Obtención del extracto por ultrasonido

Para la obtención del extracto, primeramente, se elaboró un polvo del sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* (SAPO) Según el método planteado por Sharayei *et al.* (2019) con algunas modificaciones. El SAPO fresco se secó en una estufa con flujo de aire a 40° C marca Felisa, modelo 242 A durante 72 horas, se molió finamente y se tamizó con un tamiz de malla #35 (500 micras). Para llevar a cabo la extracción, se colocaron 10 g de muestra del polvo con 140 ml de agua destilada (1:14 p/v) en un recipiente. La mezcla se sometió a diferentes tiempos (5, 10 y 15 minutos) y amplitudes (20, 60 y 100%), con una potencia máxima de 400 W a una frecuencia de 20 KHZ utilizando un ultrasonido con sonda marca BRANSTON,

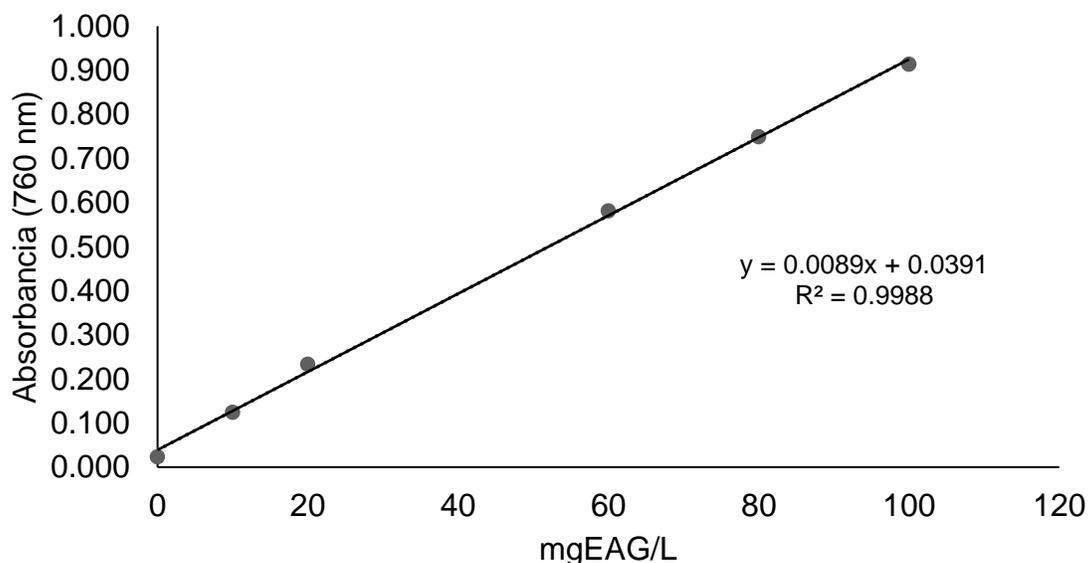
modelo 3510R-DTH. Posterior a la extracción por ultrasonido, se agitó la muestra en oscuridad a temperatura ambiente por 3 horas. Terminado el proceso de extracción, se centrifugó la muestra a 12000 rpm, 2°C por 10 minutos en una centrifuga marca Hermle, modelo Z 36 HK y se filtró la mezcla con papel filtro. El extracto obtenido del sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* (ESAPO) se guardó a -20°C para su posterior análisis de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante total.

#### **7.4 Determinación del contenido de fenoles totales (CFT)**

El contenido de fenoles totales se determinó utilizando el método de Folin-Ciocalteu reportado por Elsakhawy y tawfik (2019) y por Morales *et al.* (2012), con algunas modificaciones. Primeramente, se tomaron 0.5 ml del ESAPO previamente diluido con agua destilada (1:14) y se mezcló en tubos de ensayo con 2.5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua a razón de 1:10 (v/v). Posteriormente se incubaron durante 7 minutos en oscuridad y se añadieron 2 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Reasol) al 7.5% p/v. Los tubos se dejaron 2 horas en oscuridad para el desarrollo del color azul y se leyó la absorbancia a 760 nm en espectrofotómetro UV-Vis JENWAY 6715. El contenido de FT se determinó mediante interpolación de la absorbancia en una curva estándar de ácido gálico previamente diseñada. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico (Fermont) por cada 100 g de SAPO (mgEAG/100 g).

**Figura 6**

**CURVA PATRÓN DE ÁCIDO GÁLICO UTILIZADA PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES**

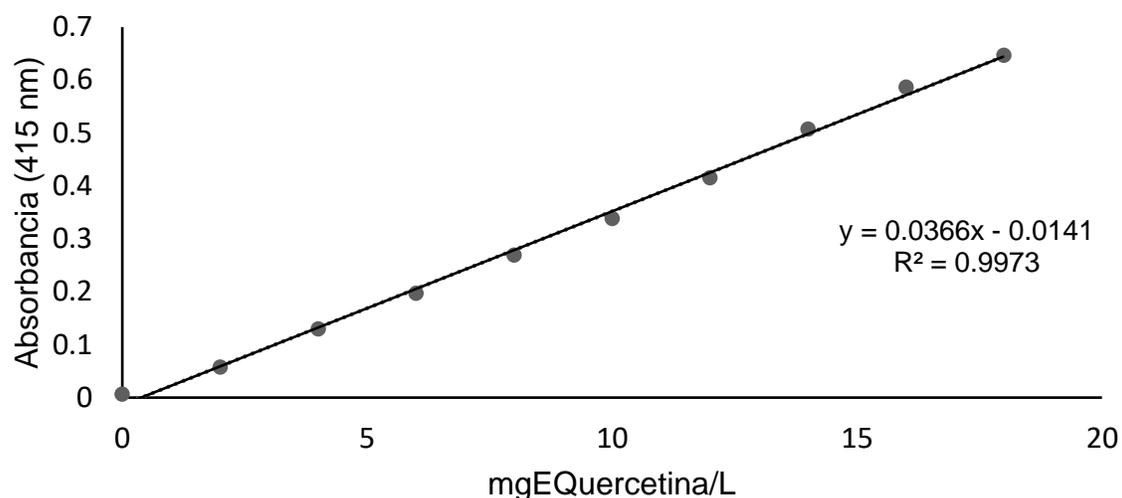


### **7.5 Determinación del contenido de flavonoides (CF)**

El contenido de flavonoides totales se determinó empleando tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ), de acuerdo con lo descrito por Espinosa *et al.* (2017), con algunas modificaciones. De manera general, se preparó una solución de  $\text{AlCl}_3$  (Meyer) al 2% con metanol (p/v) y se agregaron 2 ml en tubos de ensayo con 2 ml del ESAPO previamente diluido en agua destilada 1:14 (v/v). Los tubos se sometieron a agitación y se dejaron en completa oscuridad por 20 minutos. La absorbancia se midió a 415 nm en un espectrofotómetro JENWAY 6715 empleando celdas de 1.5 ml y empleando una curva de calibración realizada con quercetina obtenida de Sigma Aldrich. Finalmente, los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina por cada 100 g de SAPO (mgEQ/100 g).

**Figura 7**

**CURVA PATRÓN DE QUERCETINA UTILIZADA PARA LA DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES**

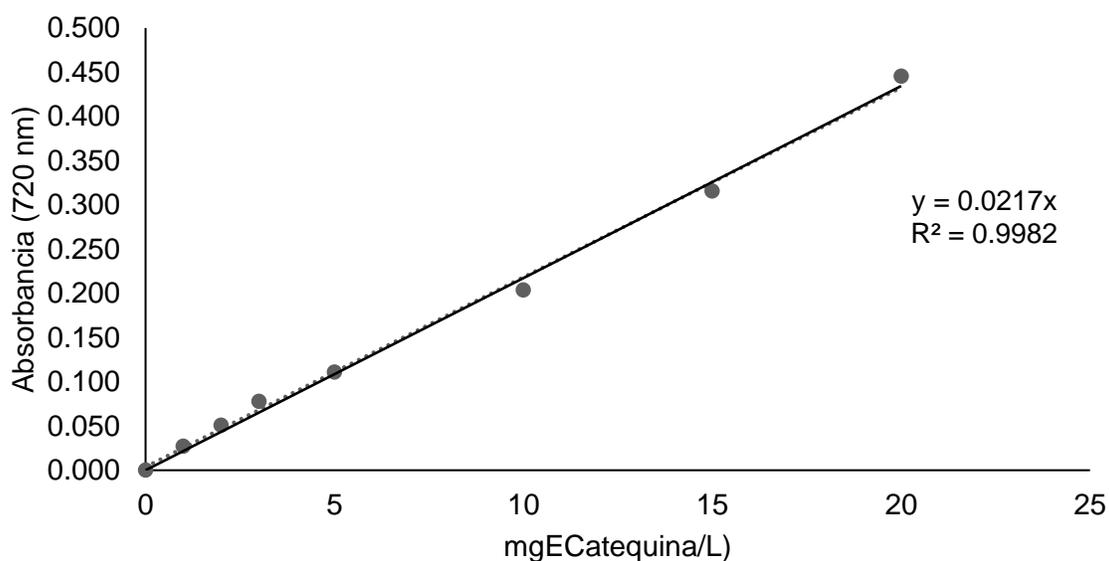


### **7.6 Determinación de taninos (TN)**

El contenido de taninos se determinó utilizando el método postulado por Biol *et al.* (1985) y por Seah *et al.* (1969) con algunas modificaciones. Para ello, se agregaron en tubos de ensayo 3 ml de ESAPO 3 ml de tricloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) (Meyer) val 0.1 M preparado con ácido clorhídrico (HCl) (J.T Baker) al 0.1 N, se agitó vigorosamente y se dejaron reposar por 5 minutos en oscuridad. Posteriormente, se adicionaron 3 ml de ferrocianuro de potasio ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) (J.T Baker) y se dejó reposar durante 10 minutos para el desarrollo del color. La lectura se realizó a 720 nm en un espectrofotómetro JENWAY 6715 utilizando como blanco agua destilada. La curva estándar se realizó con catequina (Fluka) y los resultados fueron expresados en mg equivalentes de catequina por cada 100 g de ESAPO (mgEC/100 g).

**Figura 8**

CURVA PATRÓN DE CATEQUINA UTILIZADA PARA LA DETERMINACIÓN DE TANINOS



## 7.7 Determinación de la capacidad antioxidante total (CAT)

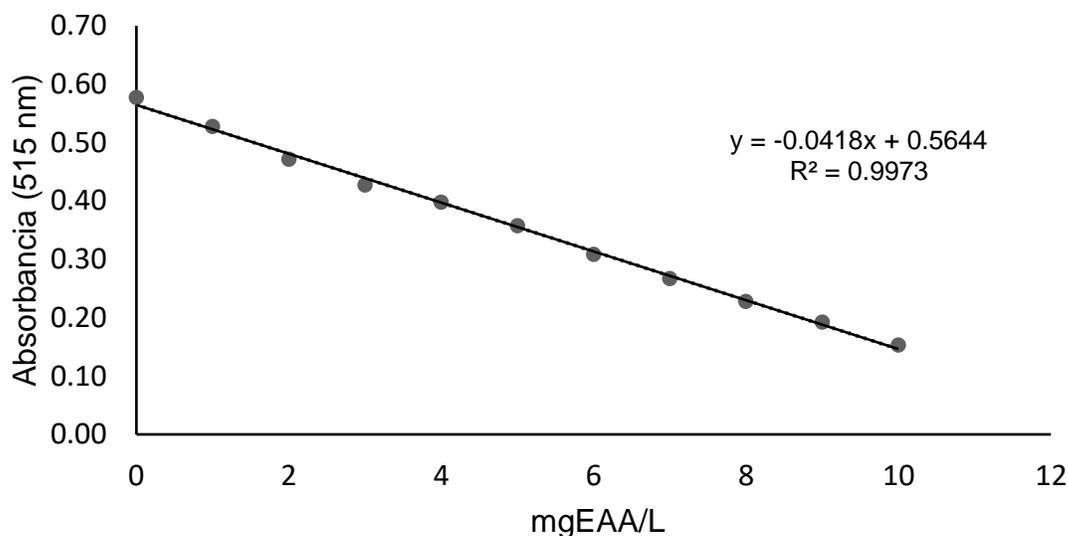
### 7.7.1 Inhibición del radical DPPH

La capacidad de eliminación del radical DPPH del ESAPO se determinó según el método postulado por Brand-Williams *et al.* (1995) y lo descrito por Ma *et al.* (2018) con algunas modificaciones. EL radical DPPH (Sigma-Aldrich) se preparó con una concentración de  $6 \times 10^{-5}$  mol/L en solución metanólica al 80% en ausencia de luz y con agitación moderada durante 2 horas. Después en tubos de ensayo se mezclaron 0.5 ml del ESAPO y 2.5 ml del radical; se agitaron vigorosamente y se dejaron desarrollar el color durante 1 hora en oscuridad. La lectura se llevó a cabo a 515 nm en un espectrofotómetro JENWAY 6715 y la actividad antioxidante, en términos de capacidad de inhibición del radical DPPH se calculó empleando la Ecuación 6:

$$\text{Tasa de eliminación de DPPH (\%)} = 1 - \frac{\text{Abs}_{\text{radical}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{radical}}} \times 100 \quad \text{Eq. (6)}$$

**Figura 9**

**CURVA PATRÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZADA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH**



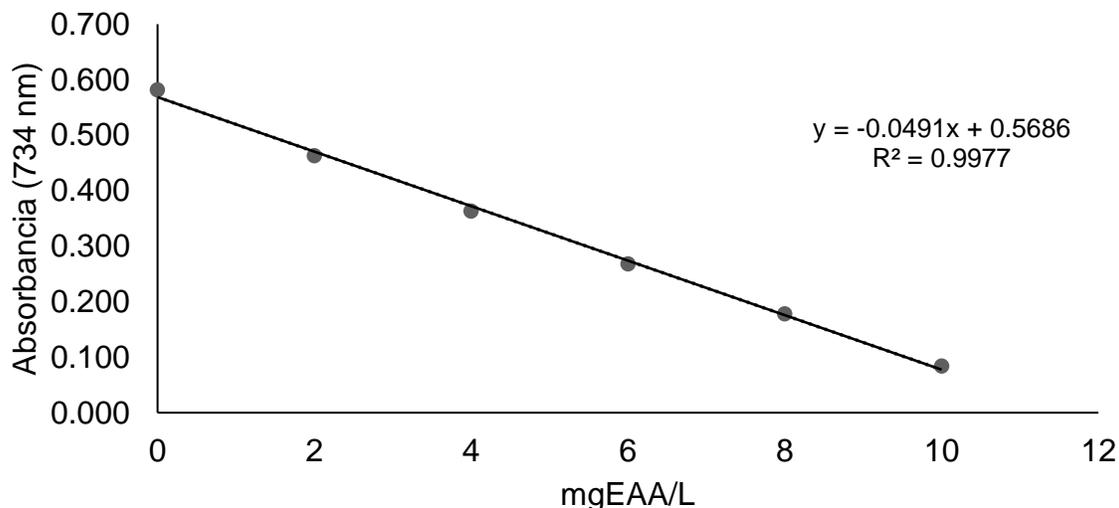
### 7.7.2 Inhibición del radical ABTS

La capacidad Del ESAPO para estabilizar el radical ABTS también se evaluó a fin de conocer su actividad antioxidante. Se siguió el método propuesto por Ma *et al.* (2018) con ligeras modificaciones; se preparó el radical ABTS (Sigma- Aldrich) a una concentración de 7 mM/L en 2.45 mM/L de persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) (J.T. Baker) en proporción 1:1 y se mantuvo a temperatura ambiente en oscuridad durante 16 horas bajo agitación constante. El ABTS se estandarizó hasta una absorbancia de  $0.70 \pm 0.02$  a 734 nm. Posteriormente en tubos de ensayo se colocaron 0.2 ml del ESAPO y 2 ml del radical, se agitaron y se dejaron en oscuridad durante 20 minutos a 25°C. Para estimar la capacidad de inhibición de ABTS se muestra la Ecuación 7:

$$\text{Tasa de eliminación de ABTS(\%)} = 1 - \frac{Abs_{radical} - Abs_{muestra}}{Abs_{radical}} \times 100 \quad \text{Eq. (7)}$$

**Figura 10**

CURVA PATRÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZADA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL RADICAL ABTS



### 7.8 Diseño experimental y análisis estadístico

Para el diseño de experimentos, la construcción de modelos y el análisis de datos se utilizó el software Design Expert. Las variables independientes de interés en este estudio fueron la amplitud de ultrasonido ( $X_1$ ) (20 – 100%), el tiempo de ultrasonido ( $X_2$ ) (5 – 15 min) y la concentración de metanol ( $X_3$ ) (10 –30%)(Meregalli *et al.*, 2020a). La influencia de estas variables sobre la cantidad de fenoles totales, flavonoides, taninos y la capacidad antioxidante del SAPO se determinó utilizando metodología de superficie de respuesta. El diseño constó de 15 tratamientos, cada uno por triplicado de acuerdo con un diseño Box-Behnken con tres factores y 3 bloques (ver tabla 2). Los límites de dichas variables independientes se fijaron con base en lo anteriormente reportado en estudios similares (Chelladurai *et al.*, 2020). Para el análisis de las variables dependientes se empleó un modelo matemático polinomial de segundo orden dada por la Ecuación 8.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + e \quad \text{Eq. (8)}$$

**Tabla 2**

*Variables independientes y su valor codificado y real utilizado para la optimización*

Símbolo	Nombre (unidades)	Rango	
		Min	Max
X <sub>1</sub>	Amplitud (%)	20	100
X <sub>2</sub>	Tiempo (min)	5	15
X <sub>3</sub>	Concentración de metanol (%)	10	30

## 7.9 Variables de proceso

Las variables de proceso dentro del proyecto de investigación se encuentran descritas en la tabla 3.

**Tabla 1**

*Descripción de las variables de proceso*

<b>Variables independientes</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Instrumento de medición</b>	<b>Unidad de medida</b>	<b>Operacionalización</b>
Amplitud de onda de ultrasonido	Ordinal	Equipo de ultrasonificación	%	Ultrasonido con sonda marca Branstone con nivel de amplitud de 1 a 100%
Tiempo de ultrasonido	Ordinal	Equipo de ultrasonificación	min	Ultrasonido con sonda marca Branstone con rango de tiempo de 1 a 60 minutos
Concentración de metanol	Ordinal	-	%	Solución metanólica porcentual (v/v)
<b>Variables dependientes</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Instrumento de medición</b>	<b>Unidad de medida</b>	<b>Operacionalización</b>
Fenoles totales	Escalar	Espectrofotometría	mgEAG/100 g	Método Folin- Ciocalteu reportado por Elsakhawy y tawfik en 2019 y por Morales <i>et al.</i> en 2012
Flavonoides totales	Escalar	Espectrofotometría	mgEQ/100 g	Método de tricloruro de aluminio reportado por Espinosa <i>et al.</i> en 2017
Taninos	Escalar	Espectrofotometría	mgEC/100 g	Método de tricloruro férrico postulado por Biol <i>et al.</i> en 1985 y por Seah <i>et al.</i> en 1969
Inhibición de DPPH	Escalar	Espectrofotometría	μmol EAA/100g	Según el método postulado por Brand-Williams <i>et al.</i> en 1995 y lo descrito por Ma <i>et al.</i> en 2018
Inhibición de ABTS	Escalar	Espectrofotometría	μmol EAA/100g	Según Ma <i>et al.</i> en 2018

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 8.1 Composición química del sustrato agotado

El análisis de la composición química del SAPO arrojó un contenido de humedad de  $66.07 \pm 0.37$  g/100g, cenizas  $7.63 \pm 1.04$  g/100g, proteína  $1.29 \pm 0.13$  g/100g, grasa  $0.91 \pm 0.53$  g/100g, fibra  $8.54 \pm 0.71$  g/100g y carbohidratos totales  $15.55 \pm 1.41$ g/100g. Fanadzo *et al.* (2010) analizaron la composición de SAPOs a base de paja y rastrojo de maíz y reportaron contenidos de proteína de 6.87% (1.1% N x 6.25) y 2.5% (0.4% N x 6.25), respectivamente, los cuales fueron similares a los obtenidos en este estudio. Del mismo modo, el contenido de cenizas (5.29%), proteína (1.61%) y grasa (2.31%) de un SAPO de paja de maíz reportado por Abd *et al.* (2015) fue semejante al observado en esta investigación.

### 8.2 Modelo

En este estudio se propuso encontrar las condiciones óptimas de extracción de compuestos bioactivos de interés agroalimentario de un sustrato agotado del hongo *P. ostreatus* mediante el análisis de superficie de respuesta bajo un diseño experimental factorial de Box-Behnken. Las variables o factores de control que se consideraron en este estudio fueron la amplitud de onda de ultrasonido ( $X_1$ , AOU), el tiempo de ultrasonido ( $X_2$ , TU) y la concentración de metanol ( $X_3$ , cMeOH), mientras que las variables de respuesta fueron el contenido de fenoles totales (CFT), flavonoides totales (CF), taninos (TN) y capacidad antioxidante total (CAT), como inhibición de los radicales DPPH y ABTS. La tabla 2 muestra el contenido de CFT, CF, TN y CAT de un total de 15 experimentos realizados, según el diseño experimental factorial Box-Behnken empleado en esta investigación (primeras cuatro columnas a la izquierda). De manera general, el contenido de fenoles totales en todos los experimentos fue cercano a los ~200 mgEAG/100g SAPO; el contenido de flavonoides osciló entre los 55 y los 97 mgEQ/100g. Los taninos mostraron valores de ~400-500 mgEC/100g. La capacidad antioxidante total medida como inhibición de los radicales DPPH y ABTS arrojó valores de ~300-500  $\mu$ mol EAA/100g y 1800-2200  $\mu$ mol EAA/100g de SAPO, respectivamente.

### 8.3 Influencia de los parámetros de extracción sobre el contenido de fenoles totales del ESAPO

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas de gran importancia biológica dada su capacidad de estabilizar potenciales radicales libres (Fatiha *et al.*, 2012). Los gráficos en 3-D de la figura 11 reflejan la influencia del tiempo (min) y la amplitud de ultrasonido (%) sobre CFT, a una concentración de 10% (figura 11a) y 30% (figura 11b) de MeOH. Las superficies de respuesta observadas en estos gráficos revelan que el contenido de fenoles totales está relacionado inversamente con la concentración de MeOH, es decir, entre mayor fue el contenido de solvente empleado, menor fue el CFT recuperado del SAPO, ya que los tres mayores contenidos de fenoles totales  $245.05 \pm 4.81$  ( $X_1=100\%$ ,  $X_2=10$  min,  $X_3=10\%$  MeOH),  $242.96 \pm 8.51$  ( $X_1=60\%$ ,  $X_2=15$  min,  $X_3=10\%$  MeOH) y  $242.69 \pm 2.40$  mg ( $X_1=60\%$ ,  $X_2=5$  min,  $X_3=10\%$  MeOH) EAG/100g ( $X_1=60\%$ ,  $X_2=5$  min,  $X_3=10\%$  MeOH) se observaron en los experimentos realizados empleando una concentración de MeOH de 10%, mientras que los experimentos realizados con MeOH al 30% arrojaron los CFT más bajos  $204.94 \pm 2.53$  ( $X_1=60\%$ ,  $X_2=5$  min,  $X_3=30\%$  MeOH) y  $205.73 \pm 6.78$  mg ( $X_1=100\%$ ,  $X_2=10$  min,  $X_3=30\%$  MeOH) EAG/100g (tabla 4). Algunos autores también han reportado disminución del CFT en extractos de hongo zeta a medida que la concentración de solventes orgánicos aumenta (Bhattacharya *et al.*, 2014). Esto podría atribuirse a la capacidad limitada del metanol y/o etanol para arrastrar compuestos dentro de una gama amplia de polaridades en comparación con el agua. Por otro lado, la tabla de ANOVA mostró que los factores amplitud de onda de ultrasonido ( $X_1$ ) y concentración de MeOH ( $X_3$ ) tuvieron una influencia significativa ( $p < 0.02$  y  $p < 0.0001$ , respectivamente) en la extracción de compuestos fenólicos del SAPO, sin embargo, el tiempo de ultrasonido ( $X_2$ ) no influyó significativamente ( $p = 0.022$ ) en CFT. Además, la prueba de falta de ajuste para CFT mostró un valor F de falta de ajuste de 7.08 en relación con el error puro y un valor  $p$  no significativo de  $p = 0.13$ , lo cual sugiere que el modelo de regresión es adecuado.

En resumen, la concentración de MeOH ( $X_3$ ) fue la variable de proceso con mayor influencia en la extracción de compuestos fenólicos de SAPO ( $p < 0.0001$ ), seguido de la amplitud de onda ( $X_1$ ,  $p < 0.02$ ). de tal manera que si lo que se desea es obtener un mayor rendimiento de fenólicos de SAPO, la concentración de MeOH debe mantenerse baja (10% en este estudio), pudiendo mejorar la extracción con un aumento en la amplitud de onda de ultrasonido, durante un tiempo menor a 15 min puesto que, según el análisis de superficie, el tiempo no influye significativamente en el CFT ( $p = 0.022$ ), permitiendo reducción de la energía empleada por el aparato de ultrasonido durante la realización de la extracción.

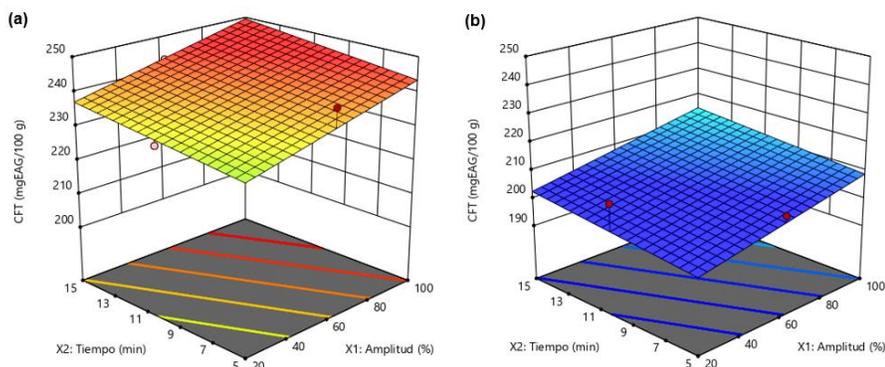
A fin de describir mejor las relaciones entre las variables de proceso y el CFT se construyó la ecuación de regresión simplificada (Eq. 9), la cual no incluye términos cuadráticos ni interacciones puesto que durante el análisis de superficie no se encontraron dichos comportamientos (tabla 5).

$$Y_1 = 222.983 + 6.20479X_1 - 17.2943X_3 \quad \text{Eq. (9)}$$

donde  $Y_1$  es el CFT en mgEAG/100 g SAPO,  $X_1$  es la amplitud de onda de ultrasonido (%) y  $X_3$  es la concentración de MeOH (%).

**Figura 11**

**GRÁFICOS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA EN 3-D QUE MUESTRAN EL EFECTO DE LA INTERACCIÓN DEL TIEMPO DE ULTRASONIDO (MIN) Y LA AMPLITUD DE ONDA DE ULTRASONIDO (%) SOBRE LA EXTRACCIÓN DE FENOLES TOTALES (CFT) A UNA CONCENTRACIÓN DE 10 (A) Y 30% (B) DE MEOH COMO SOLVENTE DE EXTRACCIÓN.**

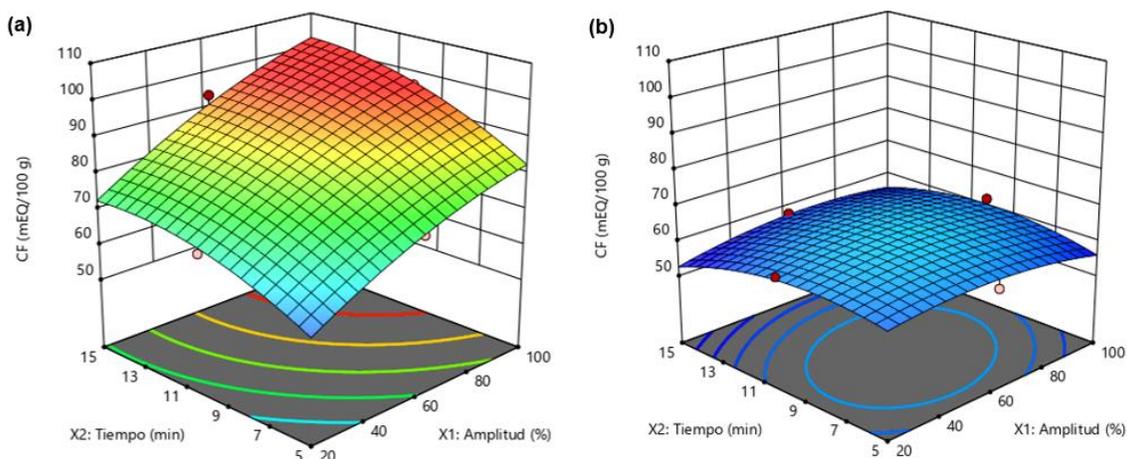


## 8.4 Influencia de los parámetros de extracción sobre el contenido de flavonoides

Los flavonoides son una clase de compuestos de bajo peso molecular que incluyen las chalconas, flavonas, flavonoles e isoflavonas, los cuales exhiben potentes actividades antioxidantes tanto en las plantas superiores (lo cual las protege contra las plagas) como en organismos que los consumen, gracias a su capacidad de inhibir enzimas como las xantinas oxidasas, ciclooxigenasas y lipoxigenasas (Panche *et al.*, 2016). La tabla 4 muestra el contenido de flavonoides obtenidos en los 15 tratamientos de este estudio. El contenido máximo de fenoles totales (CF) se encontró en los experimentos 6 ( $96.45 \pm 5.91$  mgEQ/100g) y 10 ( $93.41 \pm 4.13$  mgEQ/100g) y el menor en el experimento 1 ( $55.64 \pm 1.48$  mgEQ/100g) (ver tabla 4). La figura 12 muestra los gráficos en 3-D de superficie de respuesta obtenidos bajo el modelo polinomial. El CF se comportó de manera similar a CFT con respecto a  $X_3$ , es decir, a medida que la concentración de MeOH disminuyó, el CF aumentó (figura 12a y 12b). Esto es un comportamiento de tipo inversamente proporcional. Sin embargo, a diferencia del CFT, en la figura 12a se puede observar que una mayor amplitud de onda de ultrasonido y un mayor tiempo de ultrasonido si influyeron en la obtención de un mayor CF. La tabla de ANOVA reveló que las 3 variables de procesamiento, es decir la AOU ( $X_1$ ,  $p=0.0006$ ), el tiempo de ultrasonido ( $X_2$ ,  $p=0.0117$ ) y la concentración de MeOH ( $X_3$ ,  $p<0.0001$ ) tuvieron un impacto significativo ( $p<0.05$ ) en la extracción de flavonoides, siendo  $X_3$  la variable más determinante en dicha extracción, seguida de AOU y, por último, el tiempo. Las interacciones  $X_1X_3$  y  $X_2X_3$ , y las funciones cuadráticas  $X_2^2$  y  $X_3^2$  también mostraron influencia significativa (tabla 4) Aun así, los valores F (23.56) y p (0.04) de falta de ajuste fueron significativos ( $p<0.05$ ), lo cual indica que el modelo de regresión no es adecuado para CF. Aunque todos los flavonoides se caracterizan por poseer una estructura básica de 3 anillos  $C_6C_3C_6$  y una pobre acidez a razón de sus grupos hidroxilo, existen flavonoides polimetoxilados, glucósidos de flavonoides y una diversidad amplia de estos compuestos que exhiben distintas polaridades (Xu *et al.*, 2019), por lo cual la falta de ajuste en este tipo de modelos donde se incluye el solvente como una variable de proceso, suele ser un hallazgo habitual (Fernández-Barbero *et al.*, 2019). Aun así, el análisis de superficie de respuesta permitió obtener condiciones de alto rendimiento de extracción de CF.

**Figura 12**

GRÁFICOS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA EN 3-D QUE MUESTRAN EL EFECTO DE LA INTERACCIÓN DEL TIEMPO DE ULTRASONIDO (MIN) Y LA AMPLITUD DE ONDA DE ULTRASONIDO (%) SOBRE LA EXTRACCIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES (CF) A UNA CONCENTRACIÓN DE 10 (A) Y 30% (B) DE MEOH COMO SOLVENTE DE EXTRACCIÓN.



### 8.5 Influencia de los parámetros de extracción sobre el contenido de taninos

Los mayores contenidos de taninos se observaron en los experimentos 7 ( $499.98 \pm 2.78$  mgEC/100g), 8 ( $508.78 \pm 4.16$  mgEC/100g) y 11 ( $496.02 \pm 2.78$  mgEC/100g) y los menores en los experimentos 9 ( $410.02 \pm 9.25$  mgEC/100g) y 10 ( $409.01 \pm 12.95$  mgEC/100g) (tabla 4). La figura 13a muestra el efecto de  $X_1$  y  $X_3$ , es decir, la AOU y la concentración de MeOH sobre el contenido de taninos del SAPO a un tiempo de 10 min. Curiosamente, a diferencia de CFT y CF, el contenido de TN se comportó de manera proporcional con respecto a  $X_3$ ; es decir, a mayor cantidad de MeOH, el rendimiento de TN en el SAPO incrementó. Este incremento en la eficiencia de extracción de taninos al emplear soluciones de MeOH más concentradas ya ha sido observado anteriormente (Chavan *et al.*, 2001; Manivannan y Johnson, 2020). El contenido de TN también se vio influenciado significativamente ( $p=0.0025$ ) por  $X_2$  (tiempo de ultrasonido) y la interacción  $X_2X_3$  ( $p=0.028$ ). La figura 13b refleja una curvatura de la superficie de respuesta en el eje del tiempo (z), destacando que la extracción óptima de TN se sitúa en un tiempo intermedio cercano a los 10-11 min y no a un tiempo máximo de 15 min, como podría

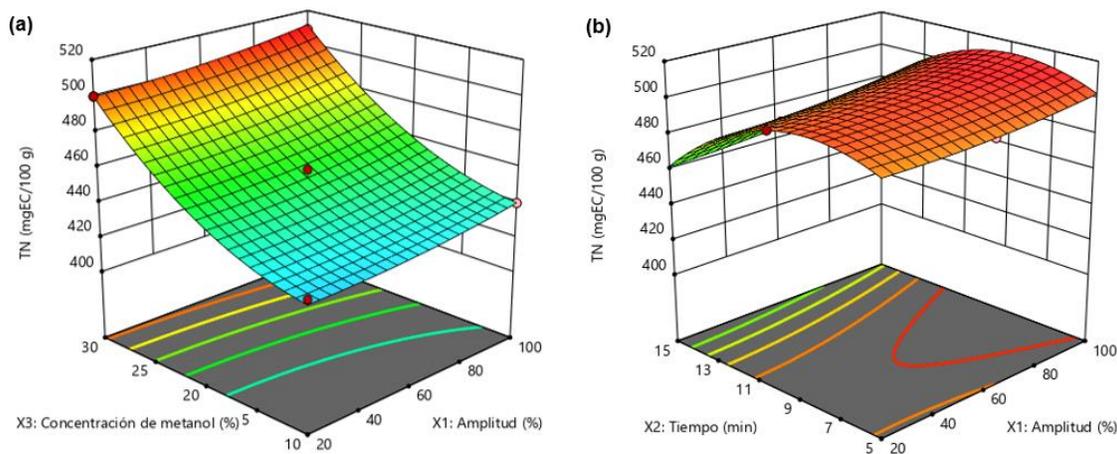
pensarse. Esto podría ser debido a que un tiempo prolongado de exposición a la sonda de ultrasonido empleada supuso un incremento en la temperatura del sistema, lo cual pudo generar una degradación de las moléculas con efecto antioxidante presentes en el SAPO, entorpeciendo su cuantificación. Además, un mayor TU supone una exposición mayor al poder del ultrasonido, lo que causa destrucción estructural de los compuestos debido al aumento de la presión y temperatura creado por la intensidad del colapso de las microburbujas de cavitación (Meregalli *et al.*, 2020b). En resumen, la influencia de las 3 variables de procesamiento fue significativa sobre TN, en el orden  $X_3 > X_2 > X_1$  (tabla 4). La Eq (10) expresa la correlación entre las variables de procesamiento y el contenido de TN.

$$Y_3 = 454.424 + 5.54357 X_1 - 8.0835 X_2 + 35.4381 X_3 - 6.25926 X_2 X_3 - 21.4957 X_2^2 + 13.3266 X_3^2 \quad \text{Eq. (10)}$$

donde  $Y_3$  es el contenido de TN en mgEC/100g,  $X_1$  es AOU,  $X_2$  corresponde al TU y  $X_3$  es la cMeOH.

**Figura 13**

GRÁFICOS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA EN 3-D QUE MUESTRAN EL EFECTO DE LA (A) CONCENTRACIÓN DE MEOH Y LA AMPLITUD DE ONDA DE ULTRASONIDO (%) A UN TIEMPO DE 10 MIN SOBRE LA EXTRACCIÓN DE TANINOS (TN) Y EL (B) TIEMPO DE ULTRASONIDO (MIN) Y LA AMPLITUD DE ONDA DE ULTRASONIDO (%) A UNA CONCENTRACIÓN DE MEOH DE 30%.



**Tabla 2**

*Diseño Box- Behnken con las respuestas observadas para el contenido de fenoles totales, flavonoides, taninos y para la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) del sustrato gastado del Pleurotus ostreatus.*

Tratamiento	Variables independientes			Variables dependientes (respuesta)				
	X <sub>1</sub> : Amplitud (%)	X <sub>2</sub> : Tiempo (min)	X <sub>3</sub> : MeOH (%)	Y <sub>1</sub> : Fenoles totales mgEAG/100g	Y <sub>2</sub> : Flavonoides mgEQ/100g	Y <sub>3</sub> : Taninos mgEC/100g	Y <sub>4</sub> : DPPH μmol EAA/100g	Y <sub>5</sub> : ABTS μmol EAA/100g
1	20	5	20	206.25 ± 1.82	55.64 ± 1.48	439.76 ± 0.93	313.51 ± 13.17	1842.02 ± 31.05
2	100	5	20	219.62 ± 4.54	65.18 ± 0.42	449.90 ± 14.80	339.35 ± 13.68	2164.93 ± 30.06
3	20	15	20	210.69 ± 5.67	56.34 ± 0.00	417.19 ± 2.31	324.15 ± 1.76	1891.88 ± 21.37
4	100	15	20	238.50 ± 1.20	72.19 ± 2.16	434.85 ± 13.42	345.43 ± 3.16	2249.99 ± 24.94
5	20	10	10	232.47 ± 6.87	68.54 ± 4.45	432.23 ± 2.31	295.26 ± 11.61	2098.45 ± 29.66
6	100	10	10	245.05 ± 4.81	96.45 ± 5.91	439.99 ± 4.16	390.10 ± 4.64	2407.11 ± 17.18
7	20	10	30	209.14 ± 3.43	61.25 ± 0.88	499.98 ± 2.78	530.22 ± 4.64	1908.50 ± 22.06
8	100	10	30	205.01 ± 5.94	61.95 ± 1.70	508.78 ± 4.16	485.31 ± 5.27	2172.05 ± 21.41
9	60	5	10	242.69 ± 2.40	73.45 ± 6.01	410.02 ± 9.25	450.12 ± 9.16	1960.73 ± 24.94
10	60	15	10	242.96 ± 8.51	93.41 ± 4.13	409.01 ± 12.95	480.11 ± 13.80	2091.32 ± 24.67
11	60	5	30	204.94 ± 2.53	58.06 ± 1.11	496.02 ± 2.78	581.93 ± 11.81	1918.32 ± 13.18
12	60	15	30	205.73 ± 6.78	57.46 ± 2.12	469.97 ± 5.55	560.32 ± 3.83	1818.27 ± 15.81
13	60	10	20	230.33 ± 6.11	70.79 ± 0.97	459.05 ± 4.16	508.12 ± 7.90	2067.58 ± 11.95
14	60	10	20	225.97 ± 2.76	69.66 ± 2.32	454.15 ± 4.63	508.12 ± 4.56	2050.10 ± 14.31
15	60	10	20	225.39 ± 9.51	69.66 ± 1.70	450.07 ± 7.40	485.31 ± 6.97	2100.30 ± 11.71

**Tabla 3**

*ANOVA de optimización para la extracción de fenoles totales, flavonoides, taninos y actividad antioxidante(DPPH Y ABTS) del sustrato agotado de Pleurotus ostreatus*

Contenido de fenoles totales (CFT)														
Fuente	Modelo	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	Residua l	Falta de ajuste	Error	Cor Total
Suma de cuadrados	2774.95	308.00	74.22	2392.73	-	-	-	-	-	-	479.22	464.64	14.58	3254.17
Grados de libertad	3	1	1	1	-	-	-	-	-	-	11	9	2	14
Cuadrado medio	924.98	308.00	74.22	2392.73	-	-	-	-	-	-	43.57	51.63	7.29	
Valor F	21.23	7.07	1.70	54.92	-	-	-	-	-	-		7.08		
Valor p	<0.0001	0.0222	0.2185	<0.0001	-	-	-	-	-	-		0.1298		
Contenido de flavonoides (CF)														
Suma de cuadrados	2067.71	364.48	91.66	1084.36	9.96	185.09	105.60	36.04	77.391	97.34	30.05	29.66	0.8393	2098.21
Grados de libertad	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	3	2	14
Cuadrado medio	229.75	364.48	91.66	1084.36	9.96	185.09	105.60	36.04	77.39	97.34	6.10	9.89	0.4197	
Valor F	37.66	59.75	15.03	177.76	1.63	30.34	17.31	5.91	12.69	15.96		23.56		
Valor p	0.0005	0.0006	0.0117	0.0001	0.2575	0.0027	0.0088	0.0593	0.0162	0.0104		0.0410		
Taninos (TN)														
Suma de cuadrados	13561.52	245.85	522.74	10046.84	14.15	0.2701	156.71	22.97	1706.08	655.75	83.80	43.38	40.42	13645.32
Grados de libertad	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	3	2	14
Cuadrado medio	1506.84	245.85	522.74	10046.84	14.15	0.2701	156.71	22.97	1706.08	655.75	16.76	14.46	20.21	
Valor F	89.91	14.67	31.19	599.49	0.8446	0.0161	9.35	1.37	101.80	39.13		0.7156		
Valor p	<0.0001	0.0122	0.0025	<0.0001	0.4002	0.9039	0.0282	0.2944	0.0002	0.0015		0.6275		
DPPH														
Suma de cuadrados	1.277E+05	1177.58	78.77	36746.59	5.20	4882.83	665.61	63753.02	5473.62	11625.32	2101.37	1754.63	346.74	1.298E+05
Grados de libertad	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	3	2	14
Cuadrado medio	14188.14	1177.58	78.77	36746.59	5.20	4882.83	665.61	63753.02	5473.62	11625.32	420.27	584.88	173.37	
Valor F	33.76	2.80	0.1874	87.43	0.0124	11.62	1.58	151.69	13.02	27.66		3.37		
Valor p	0.0006	0.1550	0.6831	0.0002	0.9157	0.0191	0.2638	<0.0001	0.0154	0.0033		0.2370		
ABTS														
Suma de cuadrados	3.642E+05	1.963E+05	3422.33	68537.21	309.76	508.79	13298.21	24798.88	50899.26	241.47	5640.45	4341.72	1298.74	3.698E+05
Grados de libertad	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	3	2	14
Cuadrado medio	40462.73	1.963E+05	3422.33	68537.21	309.76	508.79	13298.21	24798.88	50899.26	241.47	1128.09	1447.24	649.39	
Valor F	35.87	174.03	3.03	60.76	0.2746	0.4510	11.79	21.98	45.12	0.2140		3		
Valor p	0.0005	<0.0001	0.1420	0.0006	0.6227	0.5316	0.0186	0.0054	0.0011	0.6630		0.3247		

\*Factores del modelo: A= Amplitud (%), B= Tiempo (min), C= Concentración de metanol (%)

## 8.6 Influencia de los parámetros de extracción sobre la capacidad antioxidante total

Debido a las diferencias entre la gran diversidad de sistemas disponibles, los resultados de un solo método solo pueden brindar información limitada sobre las propiedades antioxidantes de los extractos (Muñiz *et al.*, 2013). Por ello, en este estudio, la CAT se evaluó mediante dos métodos, DPPH y ABTS. La mayor CAT contra DPPH se observó en los experimentos 11 ( $581.93 \pm 11.81 \mu\text{mol EAA}/100\text{g}$ ) y 12 ( $560.32 \pm 3.83 \mu\text{mol EAA}/100\text{g}$ ) y el menor en el experimento 5 ( $295.26 \pm 11.61 \mu\text{mol EAA}/100\text{g}$ ). Todos los demás experimentos mostraron valores intermedios de CAT.

El gráfico 3-D (figura 14a) y la tabla de ANOVA (tabla 5) reflejaron una influencia significativa de  $X_3$  (cMeOH,  $p < 0.0002$ ) sobre DPPH.  $X_1$  (AOU) y  $X_2$  (TU) no mostraron influencia significativa por sí solas ( $p = 0.155$  y  $0.683$ , respectivamente), sin embargo, la interacción  $X_1X_3$  ( $p = 0.019$ ) sí fue determinante para la optimización de la inhibición del radical DPPH. De la misma manera que sucedió con la determinación de TN, el aumento en cMeOH mejoró la CAT, de tal manera que una alta cMeOH (30%) permitió obtener una CAT cercana a los  $600 \mu\text{mol EAA}/100\text{g}$  para DPPH. Se ha reportado que las mezclas de alcoholes y agua en proporciones adecuadas pueden aumentar los rendimientos de extracción de compuestos y la CAT, ya que el agua, al promover el hinchamiento del material en cuestión, confiere al alcohol una mayor superficie de contacto con la matriz vegetal, permitiendo extraer mejor los compuestos deseables y sus propiedades (Muñiz *et al.*, 2013).

La mayor inhibición de ABTS se observó en los experimentos 2 ( $2164.93 \pm 30.06 \mu\text{mol EAA}/100\text{g}$ ), 4 ( $2249.99 \pm 24.94 \mu\text{mol EAA}/100\text{g}$ ) y 8 ( $2172.05 \pm 21.41 \mu\text{mol EAA}/100\text{g}$ ) y la menor en los experimentos 1 ( $1842.02 \pm 31.05 \mu\text{mol EAA}/100\text{g}$ ) y 12 ( $1818.27 \pm 15.81 \mu\text{mol EAA}/100\text{g}$ ). La AOU ( $X_1$ ) fue la variable de proceso con mayor influencia directa sobre la inhibición de ABTS ( $p < 0.0001$ ), seguida de la cMeOH ( $p = 0.0006$ ) (figura 14b). El tiempo de ultrasonido ( $X_2$ ) por sí solo no tuvo influencia significativa en ABTS ( $p = 0.142$ ), sin embargo, la interacción  $X_2X_3$  sí mostró un efecto significativo directo sobre ABTS ( $p = 0.019$ ). El modelo propuesto

mostró un buen ajuste tanto para DPPH ( $p=0.237$ ) como para ABTS ( $p=0.324$ ) (tabla 5), por lo que las ecuaciones simplificadas Eq. (11) y Eq (12) permiten predecir acertadamente la interacción de las variables de procesamiento con la CAT.

$$Y_4 = 500.514 + 67.7741 X_3 - 34.9386 X_1 X_3 - 131.402 X_1^2 - 38.5025 X_2^2 + 56.1117 X_3^2 \quad \text{Eq. (11)}$$

$$Y_5 = 2072.66 + 156.655 X_1 - 92.5589 X_3 - 57.6589 X_2 X_3 + 81.9534 X_1^2 - 117.41 X_2^2 \quad \text{Eq. (12)}$$

donde  $Y_4$  y  $Y_5$  corresponden a la CAT para DPPH y ABTS mgEAA/100g, respectivamente en,  $X_1$  es AOU,  $X_2$  corresponde al TU y  $X_3$  es la cMeOH.

Es destacable que en el ensayo DPPH la mayor inhibición se observó a una AOU de 60% y que la máxima AOU (100%) no incrementó al máximo la CAT contra este radical mientras que en ABTS la CAT fue directamente proporcional a AOU. (Sharayei *et al.*, 2019b) reportaron un comportamiento similar al evaluar la optimización de la CAT contra DPPH de un extracto de granada. Este fenómeno podría atribuirse al siguiente razonamiento: la intensidad de ultrasonido está estrechamente relacionada con la amplitud y la frecuencia, por lo que un incremento en la amplitud también incrementa la intensidad, mejorando en muchas ocasiones la extracción de antioxidantes puesto que, al aumentar la amplitud, también se aumenta el número de ciclos de compresión y rarefacción de las ondas de ultrasonido. Es decir, teóricamente un incremento en la amplitud de ultrasonido incrementa la cavitación, mejorando la extracción de compuestos. Sin embargo, una intensidad de ultrasonido más alta (causada por aumentos en la frecuencia o en la amplitud) también puede ocasionar la descomposición de algunos compuestos bioactivos naturales sensibles, por lo que, muchas veces, la realización de un proceso de optimización es necesaria (Sharayei *et al.*, 2019b). Además, el aumento en la cavitación supone un aumento en la turbulencia del sistema por el exceso de energía transferida por la sonda, ocasionando una incorporación de aire rico en oxígeno, el cual, en contacto con otros componentes cercanos, fácilmente puede dar origen a oxirradicales que, a su vez, serán estabilizados por cualquier molécula reductante (antioxidante). Bajo este panorama, solo cierta cantidad de antioxidantes

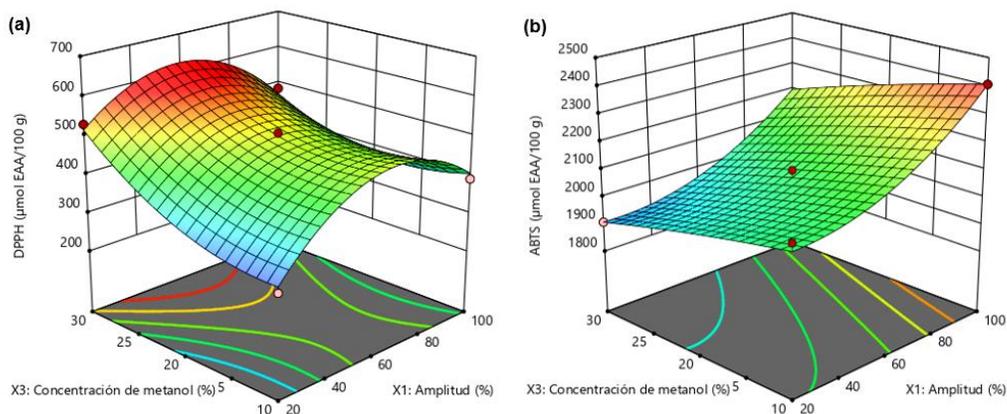
provenientes del material vegetal evaluado estarán disponibles para la estabilización de los radicales DPPH o ABTS, lo cual podría explicar el comportamiento de los resultados de este experimento con respecto a  $X_1$ .

### **8.7 Optimización**

A lo largo de este trabajo se han descrito las ecuaciones de regresión que permiten obtener los valores teóricos más altos de CFT, TN y CAT de manera independiente, según el análisis de superficie de respuesta empleado. Una vez que se realizó el análisis del efecto de las variables de procesamiento sobre la extracción de compuestos de SAPO, con ayuda del programa Design Expert se realizó una jerarquización de las variables de respuesta, a fin de obtener un optimizado teórico único, el cual permitiera obtener el mayor rendimiento de extracción posible tanto de compuestos bioactivos como de actividad antioxidante. Las condiciones óptimas arrojadas por el modelo matemático fueron  $X_1 = 85\%$  de AOU,  $X_2 = 11.26$  min de TU y  $X_3 = 10\%$  MeOH, las cuales permitirían obtener contenidos teóricos de compuestos bioactivos y TAC (tabla 6), con un valor de deseabilidad de 0.740. Después, el CFT, CF, TN, DPPH y ABTS se determinaron experimentalmente bajo las condiciones óptimas arrojadas por el modelo y se obtuvieron los valores recogidos en la tabla 6.

**Figura 14**

GRÁFICOS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA QUE MUESTRAN EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE MEOH Y LA AMPLITUD DE ONDA DE ULTRASONIDO SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN TÉRMINOS DE PODER DE INHIBICIÓN DE LOS RADICALES (A) DPPH Y (B) ABTS A UN TIEMPO DE ULTRASONIDO DE 10 MIN.



**Tabla 4**

Valores de respuesta predichos y experimentales en las condiciones óptimas

	X <sub>1</sub> : Amplitud (%)	X <sub>2</sub> : Tiempo (min)	X <sub>3</sub> : Concentración de metanol (%)	Y <sub>1</sub> : Fenoles totales	Y <sub>2</sub> : Flavonoides	Y <sub>3</sub> : Taninos	Y <sub>4</sub> : DPPH	Y <sub>5</sub> : ABTS
Valores predichos	84.323	11.264	10	244.81	96.00	434.89	470.35	2303.11
Valores experimentales	85	11.26	10	241.12	95.05	427.11	485.31	2357.25
% exactitud*				98.49	99	98.21	96.92	97.70

\*Calculado como la diferencia porcentual entre los valores predichos por el modelo y los valores obtenidos experimentalmente

## 9. CONCLUSIONES

El sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* (SAPO) contiene compuestos bioactivos con capacidad antioxidante los cuales se pueden extraer en condiciones óptimas al utilizar un análisis de superficie de respuesta, en el cual se encontraron las mejores condiciones de extracción de compuestos bioactivos del SAPO, puesto que al comparar los datos predichos por el modelo con los datos experimentales se obtuvo una exactitud superior al 96% en todas las variables dependientes. Este estudio demostró que la Amplitud de onda del ultrasonido (AOU) y la concentración del metanol (cMeOH) son los parámetros más influyentes sobre la extracción óptima de biocompuestos del SAPO, y que el ultrasonido representa una alternativa viable para la mayor extracción de compuestos antioxidantes.

## 10. REFERENCIAS

- Abd Rasib, N. A., Zakaria, Z., Tompang, M. F., Abdul Rahman, R., & Othman, H. (2015). Characterization of biochemical composition for different types of spent mushroom substrate in Malaysia. *Malays. J. Anal. Sci*, *19*(1), 41–45.
- Abdallah, M. M. F., Emara, M. F. Z., & Mohammady, T. F. (2000). Open field interplanting of oyster mushroom with cabbage and it's effect on the subsequent eggplant crop. *Annals of Agricultural Science (Cairo)*, *45*(1), 281–293.
- Adamovic, M., Bocarov-Stancic, A., Milenkovic, I., Strbac, S., & Adamovic, I. (2007). The quality of silage of corn grain and spent *P. ostreatus* mushroom substrate. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, *113*, 211–218. <https://doi.org/10.2298/zmspn0713211a>
- Alborés, S., Pianzzola, M. J., Soubes, M., & Cerdeiras, M. P. (2006). Biodegradation of agroindustrial wastes by *Pleurotus* spp for its use as ruminant feed. *Electronic Journal of Biotechnology*, *9*(3), 215–220. <https://doi.org/10.2225/vol9-issue3-fulltext-2>
- Antunes, F., Marçal, S., Taofiq, O., Morais, A. M. M. B., Freitas, A. C., Ferreira, I. C. F. R., & Pintado, M. (2020a). Valorization of mushroom by-products as a source of value-added compounds and potential applications. *Molecules*, *25*(11). <https://doi.org/10.3390/molecules25112672>
- Antunes, F., Marçal, S., Taofiq, O., Morais, A. M. M. B., Freitas, A. C., Ferreira, I. C. F. R., & Pintado, M. (2020b). Valorization of mushroom by-products as a source of value-added compounds and potential applications. *Molecules*, *25*(11). <https://doi.org/10.3390/molecules25112672>
- Aslam, S. (2013). *ORGANIC MANAGEMENT OF ROOT KNOT NEMATODES IN TOMATO WITH SPENT MUSHROOM COMPOST* (Vol. 29, Issue 1).
- Bhattacharya, M., Srivastav, P. P., & Mishra, H. N. (2014). Optimization of process variables for supercritical fluid extraction of ergothioneine and polyphenols from *Pleurotus ostreatus* and correlation to free-radical scavenging activity. *Journal of Supercritical Fluids*, *95*, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.07.031>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). *Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity* (Vol. 28).
- Byrnes, B. H., & Bumb, B. L. (2017). Population growth, food production and nutrient requirements. In *Nutrient use in crop production* (pp. 1–27). CRC Press.

- Cabrales, J., Lara, J., Barraza, B., & Mendez, K. (2017). *Evaluación del efecto del sustrato agotado de pleurotus sp. En la germinación de las semillas de cilantro (coriandrum sativum)*.
- Carreira-Casais, A., Otero, P., Garcia-Perez, P., Garcia-Oliveira, P., Pereira, A. G., Carpena, M., Soria-Lopez, A., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). Benefits and drawbacks of ultrasound-assisted extraction for the recovery of bioactive compounds from marine algae. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(17). <https://doi.org/10.3390/ijerph18179153>
- Chang, B. V., Hsu, F. Y., & Liao, H. Y. (2014). Biodegradation of three tetracyclines in swine wastewater. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 49(6), 449–455. <https://doi.org/10.1080/03601234.2014.894784>
- Chavan, U. D., Shahidi, F., & Naczki, M. (2001). *Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section Extraction of condensed tannins from beach pea (Lathyrus maritimus L.) as affected by different solvents*. [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)
- Chelladurai, S. J. S., Murugan, K., Ray, A. P., Upadhyaya, M., Narasimharaj, V., & Gnanasekaran, S. (2020). Optimization of process parameters using response surface methodology: A review. *Materials Today: Proceedings*, 37(Part 2), 1301–1304. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.06.466>
- Chia-Chay, T., Redzwan, G., Hong-Hooi, L., Soon-Kong, Y., Surif, S., & Abdul-Talib, S. (2010). Copper (II) biosorption characteristic of Pleurotus spent mushroom compost. *2010 International Conference on Science and Social Research (CSSR 2010)*, 6–10.
- Chiu, S. W., Ching, M. L., Fong, K. L., & Moore, D. (1998). Spent oyster mushroom substrate performs better than many mushroom mycelia in removing the biocide pentachlorophenol. *Mycological Research*, 102(12), 1553–1562.
- Chiu, S.-W., Gao, T., Chan, C. S.-S., & Ho, C. K.-M. (2009). Removal of spilled petroleum in industrial soils by spent compost of mushroom Pleurotus pulmonarius. *Chemosphere*, 75(6), 837–842.
- Contreras, M. J., Baesler, F., & Maldonado, L. (2010). *Optimización de las operaciones portuarias mediante simulación y metodología de superficie de respuesta optimization of harbor operations using simulation and surface response methodology*.
- Cunha Zied, D., & Pardo-Giménez, A. (2017). *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications*.

- Duran, P. R. M., & Borja Padilla, R. (1993). *Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos* (Vol. 44, Issue 2). <http://grasasyaceites.revistas.csic.es>
- Eggen, T. (1999). Application of fungal substrate from commercial mushroom production—*Pleurotus ostreatus*—for bioremediation of creosote contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 44(2–3), 117–126.
- Elsakhawy, T., & tawfik, wael. (2019). Evaluation of Spent Mushroom Substrate extract as biofertilizer for growth improvement of Rice (*Oriza sativa*). *Egyptian Journal of Soil Science*, 0(0), 0–0. <https://doi.org/10.21608/ejss.2019.18835.1320>
- Ernesto, J., El, S., De La, C., Sur, F., & Royse, D. J. (2017). *La Biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas Pleurotus spp. Edible mushroom cultivation View project oxidoreductases enzymes View project*. [www.ecosur.mx](http://www.ecosur.mx)
- Espinosa-Muñoz, V., Roldán-cruz, C. A., Hernández-Fuentes, A. D., Quintero-Lira, A., Almaraz-Buendía, I., & Campos-Montiel, R. G. (2017). Ultrasonic-Assisted Extraction of Phenols, Flavonoids, and Biocompounds with Inhibitory Effect Against *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus Aureus* from Cactus Pear. *Journal of Food Process Engineering*, 40(2). <https://doi.org/10.1111/jfpe.12358>
- Fanadzo, M., Zireva, D. T., Dube, E., & Mashingaidze, A. B. (2010). Evaluation of various substrates and supplements for biological efficiency of *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus ostreatus*. *African Journal of Biotechnology*, 9(19), 2756–2761. <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Fatiha, B., Khodir, M., Farid, D., Tiziri, R., Karima, B., Sonia, O., & Mohamed, C. (2012). *Pharmacognosy Communications Optimisation Of Solvent Extraction Of Antioxidants (Phenolic Compounds) From Algerian Mint ( Mentha spicata L. )*. 2. <https://doi.org/10.5530/pc.2012.4.10>
- Fernández-Barbero, G., Pinedo, C., Espada-Bellido, E., Ferreira-González, M., Carrera, C., Palma, M., & García-Barroso, C. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) fruit through a box-behnken experimental design. *Food Science and Technology (Brazil)*, 39(4), 1018–1029. <https://doi.org/10.1590/fst.16918>
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., & dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the

optimization of analytical methods. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 597, Issue 2, pp. 179–186). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>

Figuroa Preciado, G. (2003). *Mosaicos Matemáticos No. 11 Nivel Superior Diciembre*.

Frutos, I., GÃ¡rate, A., & Eymar, E. (2008). Applicability of spent mushroom compost (SMC) as organic amendment for remediation of polluted soils. *IV International Symposium on Ecologically Sound Fertilization Strategies for Field Vegetable Production 852*, 261–268.

García Mayordomo, P. (2016). *Compuestos bioactivos en alimentos de origen vegetal*.

Gea Alegría, F. J., & Laínez, M. C. (2011). *Cultivo de setas" Pleurotus"*.

González, A., Cruz, M., Losoya, C., Nobre, C., Loredó, A., Rodríguez, R., Contreras, J., & Belmares, R. (2020). Edible mushrooms as a novel protein source for functional foods. *Food & Function*, 11(9), 7400–7414.

Gouel, C., & Guimbard, H. (2019). Nutrition transition and the structure of global food demand. *American Journal of Agricultural Economics*, 101(2), 383–403. <https://doi.org/10.1093/ajae/aay030>

Hernández, C. E. O. (2021). El potencial de la biorremediación. *Herreriana*, 2(2), 30–33.

Herrero-Hernández, E., Andrades, M. S., Marín-Benito, J. M., Sánchez-Martín, M. J., & Rodríguez-Cruz, M. S. (2011). Field-scale dissipation of tebuconazole in a vineyard soil amended with spent mushroom substrate and its potential environmental impact. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(6), 1480–1488. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.023>

J Biol, E. W., J Sci, J. C., Plant, C. A., & Julkunen-Tiitto, R. (1985). Food Ckem. In *Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety* (Vol. 33, Issue 92). Addison-Wesley.

Karas, P., Metsoviti, A., Zisis, V., Ehaliotis, C., Omirou, M., Papadopoulou, E. S., Menkissoglou-Spiroudi, U., Manta, S., Komiotis, D., & Karpouzias, D. G. (2015). Dissipation, metabolism and sorption of pesticides used in fruit-packaging plants: Towards an optimized deuration of their pesticide-contaminated agro-industrial effluents. *Science of the Total Environment*, 530–531, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.086>

Kensa, V. M. (2011). Bioremediation-an overview. *I Control Pollution*, 27(2), 161–168.

- Kim, Y. I., Lee, Y. H., Kim, K. H., Oh, Y. K., Moon, Y. H., & Kwak, W. S. (2012). Effects of supplementing microbially-fermented spent mushroom substrates on growth performance and carcass characteristics of hanwoo steers (a Field Study). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(11), 1575–1581. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12251>
- Kwack, Y., Song, J. H., Chun, C., Shinohara, Y., & Maruo, T. (2012). Comparison of six spent mushroom composts as growing media for transplant production of lettuce. *Compost Science and Utilization*, 20(2), 92–96. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2012.10737031>
- Lee, J., Durst, R., & Wrolstad, R. (2005). AOAC official method 2005.02: total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 2.
- Lee, R. (2011). The outlook for population growth. In *Science* (Vol. 333, Issue 6042, pp. 569–573). <https://doi.org/10.1126/science.1208859>
- Londoño, J. A. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. In *Desarrollo y transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*. Corporación Universitaria Lasallista.
- Ma, L., Zhao, Y., Yu, J., Ji, H., & Liu, A. (2018). Characterization of Se-enriched *Pleurotus ostreatus* polysaccharides and their antioxidant effects in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.152>
- Manivannan, V., & Johnson, M. (2020). Total phenolic, tannin, triterpenoid, flavonoid and sterol contents, anti-diabetic, anti-inflammatory and cytotoxic activities of *Tectaria paradoxa* (Fee.) Sledge. *Toxicology Reports*, 7, 1465–1468.
- Marín-Benito, J. M., Herrero-Hernández, E., Andrades, M. S., Sánchez-Martín, M. J., & Rodríguez-Cruz, M. S. (2014). Effect of different organic amendments on the dissipation of linuron, diazinon and myclobutanil in an agricultural soil incubated for different time periods. *Science of the Total Environment*, 476–477, 611–621. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.052>
- Martínez-Navarrete, N., del Mar Camacho Vidal, M., & José Martínez Lahuerta, J. (2008). Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. In *Actividad Dietética* (Vol. 12, Issue 2, pp. 64–68). [https://doi.org/10.1016/S1138-0322\(08\)75623-2](https://doi.org/10.1016/S1138-0322(08)75623-2)
- Medina, E., Paredes, C., Pérez-Murcia, M. D., Bustamante, M. A., & Moral, R. (2009). Spent mushroom substrates as component of growing media for

- germination and growth of horticultural plants. *Bioresource Technology*, 100(18), 4227–4232. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.055>
- Meregalli, M. M., Puton, B. M. S., Camera, F. D. M., Amaral, A. U., Zeni, J., Cansian, R. L., Mignoni, M. L., & Backes, G. T. (2020a). Conventional and ultrasound-assisted methods for extraction of bioactive compounds from red araçá peel (*Psidium cattleianum* Sabine). *Arabian Journal of Chemistry*, 13(6), 5800–5809. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.04.017>
- Meregalli, M. M., Puton, B. M. S., Camera, F. D. M., Amaral, A. U., Zeni, J., Cansian, R. L., Mignoni, M. L., & Backes, G. T. (2020b). Conventional and ultrasound-assisted methods for extraction of bioactive compounds from red araçá peel (*Psidium cattleianum* Sabine). *Arabian Journal of Chemistry*, 13(6), 5800–5809. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.04.017>
- Morales, P., Ramírez-Moreno, E., de Cortes Sanchez-Mata, M., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* FAC Weber ex Diguët and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. *Food Research International*, 46(1), 279–285.
- Muñiz-Márquez, D. B., Martínez-Ávila, G. C., Wong-Paz, J. E., Belmares-Cerda, R., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2013). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1149–1154. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.02.008>
- Nakajima, V. M., Soares, F. E. de F., & Queiroz, J. H. de. (2018). Screening and decolorizing potential of enzymes from spent mushroom composts of six different mushrooms. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 58–61. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.011>
- Nidadavolu, S. V. S. S. L. H. B., Metuku, R. P., Burra, S., Byram, R., & Maringanti, S. C. (2012). Bioactive compounds from discarded mushroom beds. *Turkish Journal of Biology*, 36(3), 275–284. <https://doi.org/10.3906/biy-1011-168>
- Noonsong, V., Puttakun, N., Tinsirisuk, M., & Seephueak, P. (2016). Recycling of spent *Pleurotus* compost for production of the *Agrocybe cylindracea*. *Mycosphere*, 7(1), 36–43. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/7/1/4>
- Ojha, K. S., Aznar, R., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2020). Ultrasound technology for the extraction of biologically active molecules from plant, animal and marine sources. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 122). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115663>

- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. In *Journal of Nutritional Science* (Vol. 5). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Parada, R. Y., Murakami, S., Shimomura, N., & Otani, H. (2012). Suppression of fungal and bacterial diseases of cucumber plants by using the spent mushroom substrate of *Lyophyllum decastes* and *Pleurotus eryngii*. *Journal of Phytopathology*, 160(7–8), 390–396. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01916.x>
- Pardo-Giménez, A., Figueirêdo, V. R. de, Zied, D. C., & Pardo González, J. E. (2012). Sustratos de cobertura y suplementación del compost en cultivo de champiñón. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47, 1125–1132.
- Perez Chávez, A. M., Mayer, L., & Alberto, E. O. (2017). *Proyecto para evaluar la generación de biogás a partir de los desechos de biomasa (sustrato gastado) de la producción de hongos comestibles*. Comisión de Investigaciones Científicas.
- Phan, C. W., & Sabaratnam, V. (2012). Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 96, Issue 4, pp. 863–873). <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4446-9>
- Pineda-Insuasti, C., Amílcar, J., Ramos-Sánchez, ;, Beltrán, L., Soto-Arroyave, ;, & Patricia, C. (2014). *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 48(2), 13–23. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223131465002>
- Pinzón, J. P., Uitzil-Colli, E. M. O., & Garibay, F. L. E. I. (2021). Figura 1. Representación de algunos hongos comestibles silvestres de México presentes en la península de Yucatán. A. *Pleurotus dja-mor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn. B. *Auricularia mesenterica* (Dicks.) Pers. C. *Favolus tenuiculus* P. Beauv. D. *Tremelloscypha gelatinosa* (Murrill) Oberw. & K. Wells. E. *Schizophyllum commune* Fr. F. *Phillipsia domingensis* (Berk.) Berk. ex Denison. (Fotografías: AB. *Centro*, 13, 102–109.
- Robles-Ozuna, Le, Ochoa, -Martínez, & La. (2012). *Redalyc. ULTRASONIDO Y SUS APLICACIONES EN EL PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81325441002>
- Rodríguez-Cruz, M. S., Herrero-Hernández, E., Ordax, J. M., Marín-Benito, J. M., Draoui, K., & Sánchez-Martín, M. J. (2012). Adsorption of pesticides by sewage sludge, grape marc, spent mushroom substrate and by amended soils. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 92(8), 933–948. <https://doi.org/10.1080/03067319.2011.609933>

- Rubiano, L. A. S. (2006). Alimentos funcionales, una nueva alternativa de alimentación. *Orinoquia*, 10(1), 16–23.
- Sánchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 85, Issue 5, pp. 1321–1337). <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2343-7>
- Sánchez, J. E., & Mata, G. (2012). Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: investigación y desarrollo en un entorno multicultural. In *Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: investigación y desarrollo en un entorno multicultural* (p. 393).
- Seah, B., Price, M. L., & Butler, L. G. (1969). Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain. In *J. Assoc. Off. Anal. Chem* (Vol. 47).
- Sharayei, P., Azarpazhooh, E., Zomorodi, S., & Ramaswamy, H. S. (2019a). Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *LWT*, 101, 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.031>
- Sharayei, P., Azarpazhooh, E., Zomorodi, S., & Ramaswamy, H. S. (2019b). Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *LWT*, 101, 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.031>
- Singh, A. D., Vikineswary, S., Abdullah, N., & Sekaran, M. (2011). Enzymes from spent mushroom substrate of *Pleurotus sajor-caju* for the decolourisation and detoxification of textile dyes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 535–545. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0487-3>
- Tay, C. C., Liew, H. H., Redzwan, G., Yong, S. K., Surif, S., & Abdul-Talib, S. (2011). *Pleurotus ostreatus* spent mushroom compost as green biosorbent for nickel (II) biosorption. *Water Science and Technology*, 64(12), 2425–2432. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.805>
- Xu, M., Ran, L., Chen, N., Fan, X., Ren, D., & Yi, L. (2019). Polarity-dependent extraction of flavonoids from citrus peel waste using a tailor-made deep eutectic solvent. *Food Chemistry*, 297. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124970>
- Zadrazil, F., & Puniya, A. K. (1995). Studies on the effect of particle size on solid-state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi. *Bioresource Technology*, 54(1), 85–87.
- Zhu, H. J., Liu, J. H., Sun, L. F., Hu, Z. F., & Qiao, J. J. (2013). Combined alkali and acid pretreatment of spent mushroom substrate for reducing sugar and

biofertilizer production. *Bioresource Technology*, 136, 257–266.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.121>

*La única forma que conocen los humanos de llegar a alguna parte es dejando  
algo atrás*

*Tercera ley de Newton*