

## Contenido de fenoles totales en extractos de *Pleurotus* obtenidos con solventes de diferente polaridad

### Content of total phenols in *Pleurotus* sp. extracts obtained with solvents of different polarity

MSc. Yaixa Beltrán Delgado,<sup>I</sup> Dr. C. Humberto J. Morris Quevedo,<sup>II</sup>  
Lic. Enrique Reynaldo de la Cruz,<sup>III</sup> Yanelis Quevedo Morales,<sup>II</sup> Dra. C. Rosa  
Catalina Bermúdez Savón<sup>II</sup>

<sup>I</sup> Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente. Cuba.

<sup>II</sup> Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente. Cuba.

<sup>III</sup> Centro de Investigación y Servicios Ambientales y Tecnológicos (CISAT-CITMA). Cuba.

---

#### RESUMEN

**Introducción:** Los hongos comestibles han sido utilizados desde tiempos inmemoriales por sus propiedades nutricionales y farmacológicas.

**Objetivo:** Con el objetivo de desarrollar en Cuba nuevas formulaciones de valor terapéutico a partir de *Pleurotus*, han sido investigados los efectos inmunomoduladores de tres preparaciones de cuerpos fructíferos.

**Métodos:** En la investigación se pudo determinar el contenido de fenoles totales en 5 extractos de cuerpos fructíferos de setas comestibles tipo *Pleurotus* sp. obtenidos con solventes de diferente polaridad: n-hexano, acetato de etilo, acetona, etanol y agua. La determinación del contenido de polifenoles se realizó con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Los datos relacionados con el contenido de sólidos totales en los extractos fueron procesados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple.

**Resultados:** La concentración de sólidos totales resultó superior en los extractos acuoso y etanólico, con valores tres y cinco veces mayores con respecto a los alcanzados con solventes menos polares ( $p < 0,05$ ). En los cinco extractos se detectaron compuestos fenólicos; sin embargo, los niveles más elevados se encontraron en aquellos obtenidos con los solventes más polares (agua y etanol) con valores de 138,4 y 86,37 mg/100 g, base seca, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Se constató la existencia de una correlación positiva entre el contenido de fenoles y la constante dieléctrica de los solventes ( $r = 0,92$ ).

**Conclusiones:** Los resultados sugieren la evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones polares de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* en modelos *in vitro* e *in vivo*.

**Palabras clave:** fenoles totales, extractos, *Pleurotus sp.*

---

## ABSTRACT

**Background:** Edible mushrooms have been used since the immemorial because of their nutritional and pharmacological properties.

**Objective:** Immunomodulating effects of three preparations of fruit bodies have been investigated with the aim of developing new formulations of therapeutic value from *Pleurotus* in Cuba.

**Methods:** In this research, the content of total phenols was determined in five extracts of fruit bodies of *Pleurotus sp.* mushrooms, obtained with solvents of different polarity: n-hexan, ethyl acetate, acetone, ethanol and water. The content of polyphenols was determined using the Folin-Ciocalteu reagent. The data related to the content of total solids in the extracts were processed by a simple analysis of variance (ANOVA).

**Results:** The concentration of total solids was higher in the aqueous and ethanolic extracts, with three and five times higher values than the ones obtained with less polar solvents ( $p < 0.05$ ). Phenolic compounds were detected in the five extracts; however, the highest levels were found in those obtained with the most polar solvents (water and ethanol) with values of 138.4 and 86.37 mg/100 g, dry base, respectively ( $p < 0.05$ ). A positive correlation between the phenol contents and the solvent dielectric constant was observed ( $r = 0.92$ ).

**Conclusions:** The results suggest the evaluation of the antioxidant activity of the polar fractions of fruit bodies of *Pleurotus* both in "in vitro" and "in vivo" models.

**Key words:** total phenols, extracts, *Pleurotus sp.*

---

## INTRODUCCIÓN

Los hongos comestibles han sido utilizados desde tiempos inmemoriales por sus propiedades nutricionales y farmacológicas. No obstante, las investigaciones en este campo se han enfocado fundamentalmente al estudio de su valor dietético y, en consecuencia, existe poca información relacionada con su actividad antioxidante y su posible uso en la terapia de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. En este sentido, se puede corroborar cómo los hongos superiores representan una fuente natural de potentes metabolitos bioactivos antioxidantes.<sup>1,2</sup> Al igual que en el reino vegetal, también en los hongos han comenzado a ser identificados metabolitos fenólicos que exhiben ventajas antioxidantes. *Pleurotus* es un género de hongos superiores, perteneciente a la clase *Basidiomycetes*, ampliamente distribuido a nivel mundial e incluye especies comestibles de alto valor económico en muchos países;<sup>3,4</sup> resulta particularmente interesante desde el punto de vista nutricional por la presencia de vitaminas, minerales, fibra dietética, beta-glucanos y compuestos con actividad antioxidante.<sup>5</sup> Con el objetivo de desarrollar en Cuba nuevas formulaciones

---

de valor terapéutico a partir de *Pleurotus*, han sido investigados los efectos inmunomoduladores de tres preparaciones de cuerpos fructíferos.<sup>6</sup> Sin embargo, poco se conoce acerca de la influencia de la polaridad del solvente en el contenido de fenoles con efecto antioxidante en extractos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus*. Tomando en consideración estos antecedentes, este trabajo se enfocó en la concentración de fenoles totales en cinco extractos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* obtenidos con solventes de diferente polaridad: n-hexano, acetato de etilo, acetona, etanol y agua. Ello permitirá seleccionar las fracciones más representativas para la futura evaluación de la actividad antioxidante en modelos *in vitro* e *in vivo*.

## MÉTODOS

### Microorganismo utilizado

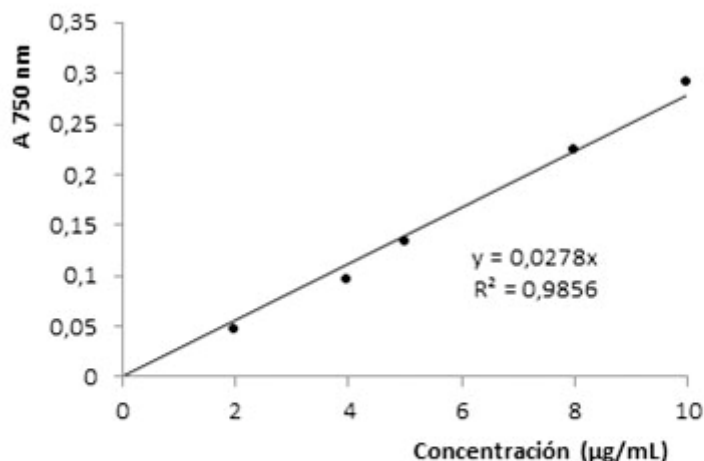
Se utilizó la cepa de *Pleurotus* sp. (CCEBI-3024), depositada en la Colección de Cultivos del CEBI. Los cuerpos fructíferos fueron obtenidos por fermentación en estado sólido utilizando como sustrato pulpa de café, bajo las condiciones de cultivo adecuadas referidas por *Bermúdez y otros*.<sup>7</sup>

### Obtención de los extractos a partir de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp.

Una vez colectados, los cuerpos fructíferos se fragmentaron en trozos pequeños que fueron secados en estufa 24 h a 45 °C y a continuación, se sometieron a un proceso de molinado para lograr el tamaño de partícula deseado. Se utilizaron 5 muestras del preparado seco y pulverizado de cuerpos fructíferos de 25 g cada una y 5 solventes de diferente polaridad: n-hexano, acetato de etilo, acetona, etanol y agua. Para la obtención de los extractos se adicionó a cada muestra 50 mL del solvente y se procedió a la agitación durante 15 min en agitador magnético. Los extractos fueron tratados 10 min a 25 °C en una cámara ultrasónica celular con agitación moderada (modelo *Scientz-IID, Ning Bo Scientz Biotechnology. Co. LTD*). Posteriormente, se centrifugaron durante 10 min a 6 000 rpm en centrifuga refrigerada (*Heal Force*). Se ajustó el volumen de los extractos a 25 mL con cada solvente y estos fueron conservados a 4 °C hasta el momento de su utilización. En paralelo, se determinó el contenido de sólidos totales en los diferentes extractos.<sup>8</sup>

### Cuantificación de fenoles totales

La determinación del contenido de polifenoles se realizó con el reactivo de Folin-Ciocalteu.<sup>9</sup> A 250 µL de los extractos obtenidos con cada solvente, se añadió 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu al 10 %, con un tiempo de reacción de 2 min a temperatura ambiente. Luego, se adicionó 250 µL de la solución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y después de 1 h de reposo en cuarto oscuro, se determinó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Ray Leigh, vis-723 G). Se comparó con una curva de calibración realizada con ácido tánico ( $y = 0,027x$ ;  $R^2 = 0,985$ ) (Fig. 1). Los resultados fueron expresados como mg en equivalentes de ácido tánico por 100 mg de los extractos, base seca.



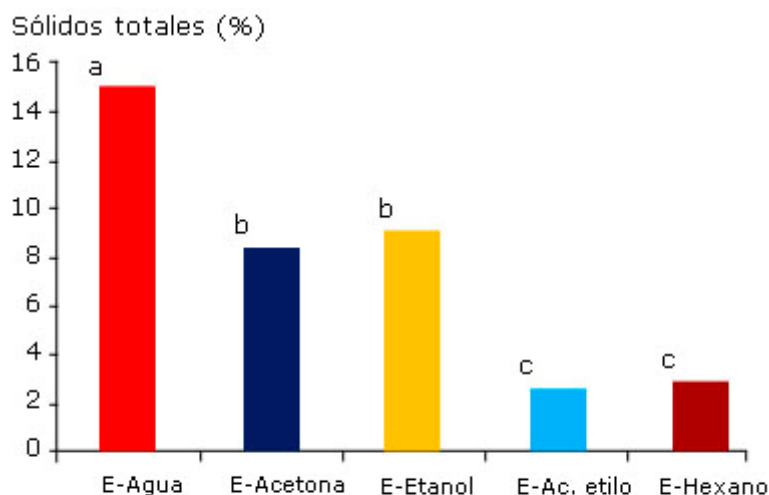
**Fig. 1.** Curva de calibración referida al ácido tánico empleada en la determinación del contenido fenólico de los diferentes extractos de *Pleurotus sp.*

### Análisis estadístico

Los datos relacionados con el contenido de sólidos totales en los extractos, fueron procesados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple por rangos de *Kruskal-Wallis*, acoplado a la prueba de *Student-Newman-Keuls* no paramétrica, para la comparación de las medianas. Por su parte, los datos de concentración de fenoles se analizaron mediante un ANOVA paramétrico, asociado a la prueba de *Tukey* para la comparación de las medias *a posteriori*. En todos los casos se asumió como nivel de significación  $p < 0,05$ . Para la confección de la curva de calibración de ácido tánico, se realizó un análisis de regresión lineal simple. Se desarrolló además, un análisis de correlación entre los datos de concentración de fenoles en los distintos extractos y las constantes dieléctricas de los solventes. Se utilizó el software profesional *Statgraphics Plus* versión 5.1 (*Statistical Graphics Corporation*, 1994-2001).

## RESULTADOS

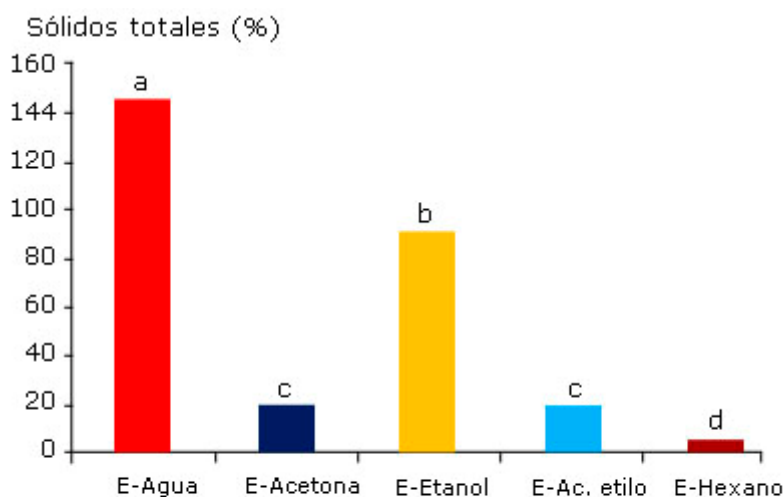
*Contenido de sólidos totales.* El contenido de sólidos totales en los extractos, obtenidos a partir de la biomasa seca y pulverizada de cuerpos fructíferos de *Pleurotus sp.* con solventes de diferente polaridad, se muestra en la figura 2. La concentración de sólidos totales se comportó en el siguiente orden: agua > etanol > acetona > n-hexano > acetato de etilo. En particular, se destaca el extracto acuoso con una concentración del 15 % (base seca).



**Fig. 2.** Contenido de sólidos totales en extractos obtenidos con solventes de diferente polaridad a partir de la biomasa seca y pulverizada de cuerpos fructíferos de *Pleurotus sp.* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

*Cuantificación de fenoles.* El orden obtenido en la concentración de polifenoles en extractos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus sp.* con solventes de diferente polaridad fue: agua > etanol > acetona > acetato de etilo > n-hexano. Las muestras se expresan en mg equivalentes de ácido tánico en 100 g de biomasa seca. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA-Tukey,  $p < 0,05$ ) (Fig. 3).

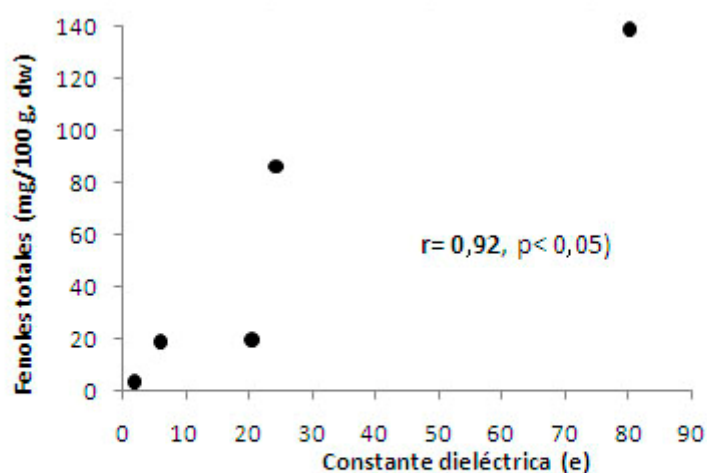
Se encontró una correlación positiva entre la concentración de fenoles y la constante dieléctrica de los solventes empleados ( $R = 0,92$ ,  $P < 0,05$ ) (tabla y Fig. 4).



**Fig. 3.** Concentración de compuestos fenólicos totales en extractos obtenidos con solventes de diferente polaridad a partir de la biomasa seca y pulverizada de cuerpos fructíferos de *Pleurotus sp.*

**Tabla.** Valores de fenoles totales (mg/100 g, base seca) en función de la constante dieléctrica de los solventes empleados en la extracción

Solvente	Constante dieléctrica (e)	Fenoles totales (mg/100)
Agua	80,1	138,4
Etanol	24,5	86,37
Acetona	20,7	18,92
Acetato de etilo	6,02	18,44
Hexano	1,89	3,2



**Fig. 4.** Correlación existente entre el contenido de fenoles totales en los extractos obtenidos a partir de la biomasa seca y pulverizada de cuerpos fructíferos de *Pleurotus sp.* y la constante dieléctrica de los solventes empleados.

## DISCUSIÓN

Los antioxidantes representan la principal defensa del organismo contra la toxicidad mediada por las especies reactivas de oxígeno.<sup>10</sup> En este sentido, los hongos comestibles, han sido descritos como una fuente de biomoléculas antioxidantes como las vitaminas A, C y el  $\beta$ -caroteno; contienen además, numerosos compuestos fenólicos, potentes secuestradores de radicales peróxilo.<sup>11</sup> Por ejemplo, Mau y otros<sup>12</sup> refirieron una elevada actividad antioxidante en *Ganoderma lucidum* y demostraron que los fenoles constituían los componentes mayoritarios con esta acción farmacológica.

Las propiedades químicas moleculares de un solvente son importantes no solo para incrementar la selectividad de los componentes extraídos a partir de setas, sino también para mejorar el rendimiento de la extracción.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo con relación a la concentración de sólidos totales en los extractos, se comportaron de manera similar a los referidos por Brujin y otros.<sup>8</sup> Estos autores informaron el siguiente orden en cuanto al contenido de sólidos totales en extractos de cuerpos fructíferos de *Grifola gargaral* con solventes de

diferente polaridad: etanol > agua > acetona > n-hexano > acetato de etilo. Aunque en un sentido estricto las mayores concentraciones de sólidos la obtuvieron con etanol, éstas no fueron estadísticamente diferentes respecto a las del extracto acuoso.

Para la determinación del contenido fenólico se utilizó una curva de calibración referida a ácido tánico. Ello obedece a que según *Ferreira* y otros.<sup>13</sup>, los ácidos fenólicos se consideran los polifenoles mayoritarios presentes en los hongos. Entre los principales compuestos fenólicos detectados en extractos acuosos de diferentes hongos comestibles silvestres de la India, figuran los ácidos gálico, tánico, protocatéquico y el gentísico.<sup>14</sup>

Llauradó y otros<sup>15</sup> informaron entre los metabolitos secundarios de mayor relevancia farmacológica presentes en extractos acuosos y etanólicos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. CCEBI-3024 a los fenoles y flavonoides. A pesar de que el tamizaje fitoquímico ofrece información cualitativa, permite identificar las clases de sustancias mayoritarias presentes en los extractos, lo que representa un antecedente para la realización de estudios fitoquímicos más profundos.

Se ha descrito la existencia de una correlación positiva entre la actividad antioxidante de extractos de hongos comestibles-medicinales, con el contenido de compuestos fenólicos. Lim y otros<sup>16</sup> refirieron una elevada correlación entre la actividad secuestradora de radicales libres, la inhibición de la producción de óxido nítrico por células inflamatorias y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en extractos de *Tricholoma matsutake*.

Los niveles de extracción de polifenoles en extractos de *Pleurotus* sp. en solventes de diferente polaridad obtenidos en nuestro trabajo, fueron similares a los referidos por Brujin y otros<sup>8</sup>, quienes informaron para la extracción de polifenoles y flavonoides a partir de cuerpos fructíferos de *Grifola gargar*, el siguiente orden de solventes: agua > etanol > acetona > acetato de etilo > n-hexano. La extracción acuosa de estos metabolitos, reviste particular importancia para aplicaciones en el diseño de alimentos funcionales, suplementos dietéticos y formulaciones farmacéuticas.

El agua y el etanol son solventes polares en los que son solubles diferentes solutos polares e iónicos, como proteínas, carbohidratos y sales minerales. Por otra parte, solventes no polares como el n-hexano solo disuelven compuestos apolares, como los lípidos. Los solventes dipolares como la acetona y el acetato de etilo, en cambio, tienen una polaridad relativamente intermedia y solubilizan a solutos con una polaridad relativa similar. En el trabajo se observó una correlación positiva entre la concentración de fenoles en los extractos y la constante dieléctrica de los solventes empleados ( $R= 0,92$ ,  $P < 0,05$ ), lo que evidencia una asociación relativamente fuerte entre ambas variables.

De forma general, los extractos de *Pleurotus* en el estado de fructificación, constituyen candidatos potenciales para la obtención de compuestos de interés para la salud humana, como los polifenoles. De este modo, podrían encontrar futuras aplicaciones en las industrias alimentaria y médico-farmacéutica, en el diseño de productos útiles en el manejo de las enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

La extracción de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. con solventes de diferente polaridad posibilitó la obtención de preparaciones que difieren en el contenido de sólidos totales y compuestos fenólicos; los extractos obtenidos con agua y etanol presentaron valores significativamente superiores en estos parámetros con respecto a los obtenidos con solventes de menor polaridad. Los resultados sugieren la evaluación

de la actividad antioxidante de las fracciones polares de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* en modelos *in vitro* e *in vivo*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yang JH, Lin HC, Mau JL. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chem.* 2002;77:229-35.
2. Jayakumar T, Thomas PA, Sheu JR, Geraldine P. *In-vitro* and *in-vivo* antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Food Res Int.* 2011;44:851-61.
3. Bermúdez RC, Morris HJ, Donoso C, Martínez CE, Ramos EI. Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 2003;22:226-31.
4. Martínez-Carrera D, López-Martínez de Alva L. Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México II: éxitos y fracasos durante el período 1991-2009. En: Martínez-Carrera D, Curvetto N, Sobal M, Morales P, Mora VM, eds. Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: avances y perspectivas en el siglo XXI. Puebla: COLPOS-UNS-UAEM-IMINAP; 2010. p. 513-51.
5. Gregori A, Švagel M, Pohleven J. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technol Biotechnol.* 2007;45:238-49.
6. Morris HJ, Llauradó G, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, García N, Gutiérrez A. Productos inmunocéuticos derivados del hongo comestible-medicinal *Pleurotus* sp. cultivado sobre pulpa de café en Cuba. En: Sánchez JE, Mata G, eds. Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica. Investigación y desarrollo en un entorno multicultural. Tapachula (Chiapas): El Colegio de la Frontera Sur e Instituto de Ecología, 2012:303-14.
7. Bermúdez RC, García N, Gross P, Serrano M. Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba. *Micol Apl Int.* 2001;13(1):25-9.
8. Brujin J, Loyola C, Aqueveque P, Cañumir J, Cortéz M, France A. Antioxidant properties of extracts obtained from *Grifola gargar* mushrooms. *Micol Apl Int.* 2009;21(1):11-8.
9. Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analyses: automation and comparison with manual method. *Am J Enol Vitic* 1977;28:49-55.
10. Janardhanan K, Jose N. Antioxidant and antitumor activity of *Pleurotus florida*. *Curr Sci.* 2000;79:941-3.
11. Murcia AM, Martínez-Tomé M, Jiménez AM, Vera AM, Honrubia M, Parras P. Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing. *J Food Prot.* 2002;65(10):1614-22.
12. Mau J, Lin HC, Chen CC. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *J Agric Food Chem.* 2002;50:6072-7.



13. Ferreira I, Baptista P, Vilas-Boas M, Barros L. Free radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal. *Food Chem.* 2007;100:1511-6.
14. Puttaraju NG, Venkateshaiah SU, Dharmesh SM, Urs SMN, Somasondaram R. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *J Agric Food Chem.* 2006;54(26):9764-72.
15. Llauradó G, Morris HJ, Lebeque Y, Gutiérrez A, Fontaine R, Bermúdez RC, et al. Phytochemical screening and effects on cell-mediated immune response of *Pleurotus* fruiting bodies powder. *Food Agric Immunol.* 2012; DOI:10.1080/09540105.2012.686988 (en prensa).
16. Lim HW, Yoon JH, Kim YS, Lee MW, Choi SY. Free radicals scavenging and inhibition of nitric oxide production by four grades of pine mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.). *Food Chem.* 2007;103:1337-42.

Recibido: 14 de diciembre de 2012.  
Aprobado: 22 de febrero de 2013.

**Yaixa Beltrán Delgado.** Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente, Cuba. Correo electrónico: yaixa@cnt.uo.edu.cu