**VII SIMPOSIO INTERNACIONAL DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**Título**

**Propiedades nutracéuticas y toxicidad de un suplemento nutricional de la seta comestible-medicinal *Pleurotus ostreatus*.**

***Title***

***Nutraceutical properties and toxicity of a nutritional supplement from the edible-medicinal mushroom Pleurotus ostreatus.***

**Yamila Lebeque1, Humberto J. Morris1, Yaixa Beltrán1, Gabriel Llauradó1, Serge Moukha2, Rosa C. Bermúdez1**

1- Yamila Lebeque. Universidad de Oriente, Cuba. ylebeque@uo.edu.cu

2- Humberto J. Morris. Universidad de Oriente, Cuba. jquevedo@uo.edu.cu

3- Yaixa Beltrán. Universidad de Oriente, Cuba. yaixa@uo.edu.cu

4- Gabriel Llauradó. Universidad de Oriente, Cuba. gabriel@uo.edu.cu

5- Serge Moukha. Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Burdeos, Francia. serge.moukha@u-bordeaux.fr

6- Rosa C. Bermúdez. Universidad de Oriente, Cuba. catalina@uo.edu.cu

**Resumen:**

Las potencialidades nutricionales y medicinales de las setas comestibles, han sido aprovechadas en la formulación de alimentos funcionales y nutracéuticos. En el mundo abundan los productos desarrollados a partir de setas, pero Cuba adolece de un mercado de suplementos dietéticos obtenidos de estas fuentes naturales. En nuestro trabajo, se desarrolló un suplemento nutricional de la seta comestible-medicinal *Pleurotus ostreatus*, formulado como tabletas, a partir de la biomasa seca y pulverizada de cuerpos fructíferos, obtenidos por fermentación en estado sólido sobre pulpa de café. El estudio de la composición del polvo arrojó carbohidratos (55 g/100g de peso seco) y proteínas (27.45 g/100g) como componentes principales, mientras el contenido de grasa fue bajo (4 g/100g). Se identificaron, además, micronutrientes (minerales: Fe, Cu, Zn, Mn, Mg y Co), así como no nutrientes (fenólicos) con potencial antioxidante. Un extracto acuoso derivado del polvo evidenció un contenido de compuestos fenólicos de 138 mg/100g y la presencia de β-1,3-1,6-D-glucanos (1,54 g/100g). La prueba de toxicidad aguda demostró su seguridad después de la administración oral a ratones Balb/c a una dosis de 2000 mg/kg. La combinación de una composición nutricional rica, bioactividad y seguridad en el polvo de *P. ostreatus* destacó su potencial como alimento nutracéutico/funcional que promueve la salud y la calidad de vida.

**Palabras Clave:** Setas comestibles-medicinales; *Pleurotus ostreatus;* Toxicidad; Nutracéuticos.

***Abstract:***

*The nutritional and medicinal potentialities of edible mushrooms have been exploited in the formulation of functional and nutraceutical foods. While products developed from mushrooms abound in the world, Cuba suffers from a market of dietary supplements obtained from these natural sources. In our work, a nutritional supplement of the edible-medicinal mushroom Pleurotus ostreatus, formulated as tablets, was developed from the dry and pulverized biomass of fruiting bodies, obtained by fermentation in solid state on coffee pulp. A compositional study was carbohydrates (55 g/100 g dry weight [dw]) and proteins (27.45 g/100 g dw) appear to be the major components, but fat content was low (4 g/100 g dw). Pleurotus powder has important micronutrients such as minerals (Fe, Cu, Zn, Mn, Mg, and Co), as well as nonnutrients (i.e., phenolics) with antioxidant potential. A powder-derived aqueous extract had a phenolic compound content of 138 mg/100 g and the presence of β-1,3-1,6-D-glucans was also demonstrated (1.54 g/100 g). An acute toxicity test proved that Pleurotus poder was safe after oral administration to Balb/c mice at a dose of 2000 mg/kg. The combination of rich nutritional composition, bioactivity, and safety in P. ostreatus fruiting-body powder highlights its potential as a nutraceutical agent promoting health and life quality.*

***Keywords:*** *Edible and medicinal mushrooms; Pleurotus ostreatus; Acute toxicity; Nutraceuticals.*

**1. Introducción**

El uso de setas representa una parte importante del patrimonio cultural; se han utilizado durante mucho tiempo como alimento y en medicamentos de acuerdo con el conocimiento ecológico tradicional, y su uso actual está respaldado por evidencias científicas.23,28 Varias revisiones exhaustivas del valor nutricional de los hongos comestibles indican que son una fuente de proteínas, carbohidratos, fibra y vitaminas, con bajo contenido de lípidos. Sin embargo, se han expresado diversas opiniones con respecto a su verdadero valor nutritivo.8,33

Las setas pueden usarse principalmente como alimento en un estado saludable, como un medicamento durante un estado de enfermedad y como suplementos dietéticos en ambos estados.10

La mayoría de las sustancias y preparaciones derivadas de las setas (es decir, extractos, polvos y tabletas) generalmente se incluyen en las siguientes categorías de productos: suplementos dietéticos, alimentos funcionales, alimentos de diseño, nutracéuticos, nutricéuticos, fitoquímicos e inmunocéuticos.34

Pleurotus es un género importante de basidiomicetos que comprende algunos de los hongos comestibles más populares; su cultivo ha aumentado enormemente en todo el mundo durante las últimas décadas. Esta popularidad se ha expandido debido a su vigoroso crecimiento en una variedad de sustratos agroforestales y porque se considera un alimento de alto valor nutricional que contiene compuestos biológicamente activos con efectos terapéuticos.14,24 La implementación de tecnologías para el cultivo de *Pleurotus spp*. en sustratos agrícolas, además de la generación de alimentos para el consumo humano, pueden abrir las investigaciones hacia nuevos nutracéuticos de setas, relevantes para las industrias alimentaria y farmacéutica.

Tanto los cuerpos fructíferos como los micelios se han estudiado en la búsqueda de moléculas con efectos biológicos para aplicaciones prácticas, sostenibles y biotecnológicas.17 Por lo tanto, los cuerpos fructíferos de Pleurotus se pueden usar en la formulación de productos biológicamente activos como polvos, cápsulas, y tabletas. Sin embargo, la composición nutricional y nutracéutica de estos y su bioactividad, puede variar según las especies y/o cepas utilizadas, los sustratos y las condiciones de cultivo.

En nuestro país, estas investigaciones tienen un carácter novedoso. Mientras en muchos países como China, Japón, Francia, España, Canadá, México, EE.UU. y Brasil, se formulan suplementos dietéticos de setas; en Cuba, hasta la fecha, no se conoce ningún producto natural elaborado a partir de esta fuente.18

Los productos ahora se comercializan de manera claramente diferente a los del pasado. Por lo tanto es necesario para examinar el valor nutricional y la toxicidad de estas nuevas preparaciones. Siguiendo el trabajo realizado por nuestro grupo de investigación para demostrar las prometedoras propiedades de mejora de la salud de la seta Pleurotus (inmunomoduladora y antioxidante)4,21,22, en este trabajo se realizó un estudio de composición (nutrientes, compuestos bioactivos) y toxicidad de un suplemento nutricional desarrollado a partir de la biomasas seca y pulverizada de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*.

**2. Metodología**

**2.1 Obtención de la Materia Prima del Suplemento (Biomasa Seca y Pulverizada de *Pleurotus ostreatus).***

Se utilizó la cepa de *P. ostreatus* CCEBI-3024 (Pleurotaceae), depositada en la Colección de Cultivos del Centro de Estudios para Biotecnología Industrial (CEBI). Se propagó el micelio en placas Petri con medio Agar Extracto Malta (BIOCEN, Cuba). Incubadas a 37ºC durante 7 días en incubadora AISET®, YLD-6000 (China) hasta lograr el crecimiento micelial en toda la superficie.

El ciclo productivo de Pleurotus se desarrolló mediante fermentación en estado sólido sobre pulpa de café pasteurizada, bajo condiciones de cultivo adecuadas (sanitarias), referidas por Bermúdez y col. (2001)5. Una vez cosechados los cuerpos fructíferos se fragmentaron en trozos de 1 cm2 y se secaron durante 24 h a 45ºC. El material seco se molió y el polvo resultante se conservó de la luz y la humedad en bolsas de plástico para su posterior uso.

**2.2 Evaluación nutricional**

En las muestras analizadas se determinó la composición química (proteínas, grasa, fibra dietética total y ceniza) utilizando procedimientos aprobados por AOAC.2

El contenido de proteína cruda (N × 4,38) se estimó mediante el método de micro-Kjeldahl, mientras que los niveles de proteína verdadera se analizaron utilizando el método de Lowry.20 La grasa cruda se determinó por extracción del peso conocido de una muestra de polvo con éter de petróleo, usando un Aparato Soxhlet y el contenido de cenizas se determinó por incineración a 600 ± 15 ºC. Los carbohidratos totales se estimaron utilizando el método del ácido fenol-sulfúrico con una curva estándar de glucosa.12 El valor energético se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación basada en el Reglamento (UE) No. 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo (25 de octubre, 2011): Energía (kcal) = 4 × (g de proteína + g de carbohidratos totales) + 2 × (g de fibra) + 9 × (g de grasa). Las concentraciones de minerales se determinaron utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica (AAnalyst 400; Perkin-Elmer).16

**2.3 Composición nutracéutica**

Se realizó la cuantificación de polisacáridos del tipo β-1,3-1,6-glucanos por el método de Nitschke y col. (2011)25, basado en la reacción colorimétrica con el rojo-congo, según una modificación del método de Sietsma y Wessels (1977)30. La concentración fue referida a una curva de calibración preparada con una solución patrón del Esquizofilano (β-1,3-1,6-glucano), Selco Wirkstoffe Vertriebs GmbH (Wald-Michelbach, Alemania) con una concentración de 150 μg/mL. Se midió la A (523 nm) en un espectrofotómetro Espectroquant® Pharo 300 (MERCK, Alemania).

Para el tamizaje micoquímico de los extractos del suplemento, se utilizaron los ensayos descritos en la “Guía Metodológica para la Investigación de las Plantas Medicinales” del MINSAP13. Se emplearon tres réplicas para cada ensayo.

Los fenoles totales se determinaron utilizando el ensayo Folin-Ciocalteu.31 Se homogeneizaron muestras de 25 g durante 15 minutos a temperatura ambiente en 50 ml de agua destilada, usando una batidora de cocina seguida de un tratamiento de ultrasonido (modelo Scientz-IID; Ning Bo Scientz Biotechnology, China) durante 10 minutos. Después de la centrifugación a 9000 g durante 10 minutos, el sobrenadante se concentró hasta aproximadamente 10 ml utilizando un roto-evaporador de vacío (VV 2000-WB 2000; Heildolph, Schwabach, Alemania). Los extractos concentrados se diluyeron hasta 25 ml con agua destilada y se almacenaron a 4ºC hasta el análisis. La solución del extracto (1 ml) se mezcló con reactivo de Folin-Ciocalteu (5 ml, previamente diluido con agua 1:10, v/v) y carbonato de sodio (75 g/L, 4 mL). Los tubos fueron agitados en un vortex durante 15 segundos y se dejaron reposar durante 30 minutos a 40 ºC. Se midió la absorbancia a 765 nm. Se usó ácido tánico para obtener la curva estándar (0,0094-0,15 mg/ml) y los resultados se expresaron en miligramos de ácido tánico equivalentes por 100 g de extracto de setas.

**2.4 Evaluación de toxicidad**

La toxicidad oral aguda se evaluó mediante un test de clasificación (Acute Toxic Class Method) de acuerdo con la Directriz 423 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (1996, revisado Octubre de 2000).26 Se utilizaron ratones Balb/C machos y hembras (de 8 semanas de edad, con un peso promedio de 20 a 22 g), comprados en el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba). Los animales se mantuvieron en nuestro laboratorio durante 1 semana antes de su uso, luego se alojaron en una habitación de animales con una temperatura de 23 ± 2°C, una humedad relativa de 60 % a 65 % y un período de oscuridad de 12 horas. Los animales fueron alimentados con una dieta convencional, granulado comercial (ALYco, La Habana, Cuba). Los estudios fueron aprobados por el comité de ética institucional (Universidad de Oriente) y se realizaron de acuerdo con la legislación cubana y las Directrices del Consejo Nacional de Investigación para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

El polvo de Pleurotus se administró en una dosis única de 2 000 mg/kg de peso corporal, a través de una sonda oral a tres animales de cada sexo (límite del test). Se realizaron observaciones clínicas diariamente durante 14 días. Las observaciones del estado general de los animales incluyeron posibles cambios en la piel y pelaje, ojos, patrones de comportamiento y actividad somato-motora, respiratoria y circulatoria. La atención también fue dirigida a observaciones de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. Todos los animales testados fueron sometidos a necropsia macroscópica y estudios histopatológicos.

**2.5 Análisis estadístico**

Los experimentos se realizaron por triplicado. Todos los datos (media aritmética ± desviación estándar de tres replicas) se analizaron utilizando el software SPSS (versión 16.0 para Windows; IBM, Armonk, NY). Diferencias en P < 0.05 fueron consideradas como significativas.

**3. Resultados y discusión**

***3.1 Estudios nutricionales***

La información sobre la composición proximal y energética es de gran interés para que los cuerpos fructíferos sean utilizados como alimento o en la formulación de alimentos saludables.29 La composición bioquímica del polvo del cuerpo fructífero de Pleurotus, en base al peso seco, demostró ser rico en proteínas, fibras y carbohidratos, en contraste con los niveles bajos de grasa, que lo hacen adecuado para su incorporación a dietas bajas en calorías. El contenido de proteína fue de 27.4% y 20% en términos de proteína cruda y verdadera, respectivamente. En *Pleurotus spp*., los niveles de proteína cruda varían entre el 10,5 % y el 30,4 % .6,9

Los carbohidratos fueron los macronutrientes más abundantes (55%) en las muestras analizadas, que también incluyen fibra dietética. En este contexto, el análisis de la composición nutricional de cinco especies culinarias medicinales silvestres del género Pleurotus [*P. floridanus*, *P. pulmonarius*, *P. sapidus*, *P. cystidiosus* y *P. sajor-caju*] recolectados del noroeste de la India mostraron que los carbohidratos (85.86 % a 88.38 %) predominaban sobre las proteínas y otros macronutrientes.3 Aunque los polisacáridos parecen ser el componente bioactivo más importante con respecto a la inmunomodulación, un grupo de nuevas proteínas purificadas de hongos medicinales, poseen propiedades inmunomoduladoras y tienen un gran potencial para ser aplicadas en alimentos o productos farmacéuticos.27 En nuestro estudio, la fibra dietética total fue del 7,5 %, el valor de la grasa en el polvo de Pleurotus fue del 4 %, y el contenido de cenizas fue del 7,57 %. Estos resultados concuerdan con los de diferentes estudios9,17,33 que, en general, reportan rangos entre 7.5 % y 8.7 % de fibra dietética total, entre 1.6 % y 2.2 % de grasa y entre 6.1 % y 9.8 % de cenizas en *Pleurotus spp*.

La estimación de minerales (micronutrientes), mostró concentraciones de Mg y Fe más altas con valores promedio de 343 y 50 mg/100g, respectivamente, seguidos de Zn con 8 mg/100 g. El contenido de manganeso (Mn) fue de 2 mg/100g y el contenido de Cu y Co fue de 1 mg/100g. Los resultados minerales del polvo de cuerpo fructífero de Pleurotus indican claramente el potencial de su uso como fuente de alimento de buena calidad. Da Silva et al.11 obtuvieron resultados similares en *P. ostreatus* cultivados en cáscaras de café en términos de los contenidos minerales de Fe, Zn, Mn, Cu, Cr y Se.

***3.2 Evaluación de componentes nutracéuticos***

Además de los macronutrientes, el polvo del cuerpo fructífero de Pleurotus estudiado también tenía importantes micronutrientes (minerales) y no nutrientes (fenólicos y β-glucano). Estas moléculas parecen desempeñar un papel protector en las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como el cáncer 7.

Los compuestos fenólicos dietéticos han recibido una atención especial en los últimos 15 años debido a su papel putativo en la prevención de varias enfermedades humanas. Se ha descrito que ejercen una variedad de acciones biológicas, como la eliminación de radicales libres, la quelación de metales y la modulación de la actividad enzimática. También se ha encontrado que afectan la transducción de señales, la activación de los factores de transcripción y la expresión génica.32 El contenido fenólico total del extracto acuoso de Pleurotus fue de 138 mg/100g, comparativamente más alto que los valores reportados en cinco especies silvestres medicinales de Pleurotus recolectadas del noroeste de la India (6.76–16.92 mg/100 g).3 Este resultado está de acuerdo con un tamizaje fitoquímico previo en el que dos extractos (acuoso y etanólico) obtenidos del cuerpo fructífero de Pleurotus, mostraron compuestos fenólicos como flavonoides y taninos21.

En otro de nuestros estudios, el contenido de fenoles totales se determinó en cinco extractos de cuerpos fructíferos de Pleurotus, obtenidos con solventes de diferentes polaridades. El contenido de polifenoles en los extractos disminuyó en el siguiente orden: agua> etanol> acetona> acetato de etilo> n-hexano.4

Los β-glucanos se han identificado como uno de los elementos con la actividad biológica más fuerte en los hongos. La literatura sugiere que los β-glucanos son efectivos para tratar enfermedades como el cáncer, una variedad de infecciones microbianas, hipercolesterolemia y diabetes, así como para ayudar a los pacientes con sistemas inmunitarios deteriorados o que se recuperan de la quimioterapia y la radioterapia.36 Los valores de β-glucano dependen en gran medida del método empleado.16 En nuestro estudio, el 1.54 % del polvo de cuerpo fructífero de Pleurotus consistió en β-1,3-1,6-glucanos, medidos usando un método colorimétrico basado en el colorante rojo congo, específico para los β-glucanos de triple hélice . Estos resultados fueron más bajos que los del micelio de *P. ostreatus* (2,97 %) pero más altos que los de *P. pulmonarius* (0,41 %).25

***3.3 Estudios de seguridad***

La confianza en el uso tradicional de las setas como una indicación de seguridad implica también un peligro, que es la poca información disponible desde la antigüedad. Además, muchas setas o preparaciones de setas que tradicionalmente se toman como tratamientos para afecciones específicas, ahora se comercializan con frecuencia como agentes profilácticos. Debido a que carecemos de muchos datos sobre la seguridad de muchas preparaciones de hongos, hicimos estimados basados en el conocimiento científico disponible. Por lo tanto, las evaluaciones de seguridad y las preocupaciones regulatorias de los productos derivados de hongos son relevantes.35

La administración oral del pulverizado de Pleurotus a ratones machos y hembras en una dosis única (2000 mg/kg de peso corporal) no causó alteraciones en los signos clínicos de los animales. Todos los animales tratados sobrevivieron más allá del período de observación de 14 días. Del mismo modo, no se detectaron cambios en el peso corporal, la tasa de crecimiento o el consumo de alimentos y agua (datos no mostrados). El examen anatomopatológico realizado no mostró evidencia de alteraciones en los órganos de ratones tratados. Por lo tanto, el producto a la dosis ensayada puede clasificarse como potencialmente no tóxico.

Se han registrado intoxicaciones locales esporádicas después de la ingestión humana y animal de grandes cantidades de setas frescas de Pleurotus y se sugirió que las mismas están asociadas con la termolábilidad de moléculas proteicas.1 La letalidad y la acción cardiorrespiratoria tóxica de la ostreolisina (citolisina tóxica formadora de poros) la hace candidata a causar los efectos adversos registrados en los hongos ostra.37 En nuestro estudio, el tratamiento de secado de los cuerpos fructíferos a 45ºC durante 24 horas, podría explicar la ausencia de efectos tóxicos a una dosis de 2000 mg/kg.

**4. Conclusiones**

En general, Pleurotus es uno de los géneros más estudiados en todo el mundo, pero como alimento y no como suplementos como en este estudio. En vista de los resultados logrados durante la presente investigación, es evidente que el polvo del cuerpo fructífero de la seta Pleurotus es nutricionalmente un alimento bien balanceado (con altos niveles de proteínas y carbohidratos pero baja concentración de grasas) y tiene micronutrientes nutricionalmente importantes (β-glucanos y fenólicos). Como una fuente natural y segura de antioxidantes, de fácil acceso y bajo costo, el suplemento derivado de los cuerpos fructíferos de la seta Pleurotus, se puede usar en la dieta como alimento nutracéutico y / o funcional para mantener y promover la salud, la longevidad y la calidad de vida. Serán necesarios más estudios para aislar nuevos componentes bioactivos y establecer su eficacia farmacológica. La información generada en este trabajo enriquecería la información existente sobre su composición química y su potencial nutracéutico.

**5. Referencias bibliográficas**

1. Al-Deen HIS, Twaij HAA, Al-Badr AA, Istarabad TAW. Toxicologic and histopathologic studies of *Pleurotus ostreatus* mushroom in mice. J Ethnopharmacol. 1987; 21:297–305.
2. AOAC International. Official methods of analysis. 16th ed. Arlington (VA): AOAC International; 1995.
3. Atri NS, Sharma SK, Joshi R, Gulati A, Gulati A. Nutritional and nutraceutical composition of five wild culinary-medicinal species of genus Pleurotus (higher Basidiomycetes) from Northwest India. Int J Med Mushrooms. 2013; 15:49–56.
4. Beltrán Y, Morris HJ, Aguirre RI, Quevedo Y, Armando T, Vázquez R, Llauradó G, Bermúdez RC, Lebeque Y, Moukha S, Gaime-Perraud I, Cos P. Phenolic content and in-vitro antioxidant activities of fruiting bodies extracts from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. J Int Soc Antioxid Nutr Health (Special Issue for 15th International Antioxidant Congress). 2015;1(1). DOI: 10.18143/JISANH\_v1i1.
5. Bermúdez RC, García N, Gross P, Serrano M. Cultivation of Pleurotus and agricultural substrates in Cuba. Micol Aplic Int 2001; 13 (1): 25-29.
6. Bermúdez RC, Morris HJ, Donoso C, Martínez CE, Ramos EI. Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus* var. florida [in Spanish]. Rev Cubana Invest Biomed. 2003; 22:226–31.
7. Carrasco-González JA, Serna-Saldívar SO, Gutiérrez-Uribe JA. Nutritional composition and nutraceutical properties of the Pleurotus fruiting bodies: potential use as food ingredient. J Food Compos Anal. 2017; 58:69–81.
8. Chang ST, Buswell JA. Medicinal mushrooms—a prominent source of nutriceuticals for the 21st century. Curr Top Nutraceut Res. 2003; 1:257–80.
9. Chang ST, Miles PG. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2004.
10. Chang ST, Wasser SP. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. Int J Med Mushrooms. 2012; 14:95–134.
11. da Silva MCS, Naozuka J, Da Luz JMR, De Assunção LS, Oliveira PV, Vanetti MCD. Enrichment of Pleurotus ostreatus mushrooms with selenium in coffee husks. Food Chem. 2012; 131:558–63.
12. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem. 1956; 28:350–6.
13. Guía Metodológica para la Investigación en Plantas Medicinales. La Habana, Cuba. MINSAP. 1997.
14. Gomes-Corrêa RC, Brugnari T, Bracht A, Peralta RM, Ferreira ICFR. Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of Pleurotus *spp*. (oyster mushroom) related with its chemical composition: a review on the past decade findings. Trend Food Sci Technol. 2016; 50:103–17.
15. Gründemann C, Garcia-Käufer M, Sauer B, Scheer R, Merdivan S, Bettin P, Huber R, Lindequist U. Comparative chemical and biological investigations of ß-glucan-containing products from shiitake mushrooms. J Funct Foods. 2015; 18:692–702.
16. Jackson ML. Soil chemical analysis. New Delhi (India): Prentice Hall; 1967.
17. Khan A, Tania M. Nutritional and medicinal importance of Pleurotus mushrooms: an overview. Food Rev Int. 2012; 28:313–29.
18. Lebeque Y, Morris HJ, Llauradó G, Beltrán Y, Bermúdez RC, Serrano M, Diaz A, Cos P. Estrategia para el desarrollo y registro de un suplemento nutricional a partir de la seta comestible Pleurotus *sp*. Revista Ciencia y Tecnología de los Alimentos, No. Especial XIII Conferencia Internacional sobre Ciencia y Tecnología de los Alimentos CICTA 13. p. 57-67.
19. Li GSF, Chang ST. The nucleic acid content of some edible mushrooms. Eur J Appl Microbiol Biotechnol. 1982; 15:237–40.
20. Lowry HO, Rosebrough A, Farr L, Randall JR. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193:265–75.
21. 13. Llauradó G, Morris HJ, Lebeque Y, Gutiérrez A, Fontaine R, Bermúdez RC, Gaime-Perraud I. Phytochemical screening and effects on cell-mediated immune response of Pleurotus fruiting bodies powder. Food Agric Immunol. 2013; 24:295–304.
22. Morris HJ, Llauradó G, Beltrán Y, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC y Rodríguez S. 2011. Procedimiento para la obtención de un preparado inmunocéutico de Pleurotus *spp*. Certificado No. 23717 (Resolución 1754/2011) Ref: 2011/1337.
23. Morris HJ, Llauradó G, Beltrán Y, Lebeque Y, Bermúdez RC, García N, Gaime-Perraud I, Moukha S. The use of mushrooms in the development of functional foods, drugs and nutraceuticals. In: Ferreira I, Barros L, Morales P, editors. Wild plants, mushrooms and nuts: functional food properties and applications. Chichester (UK): John Wiley & Sons; 2017. p. 123–57.
24. Mukhopadhyay R, Guha AK. A comprehensive analysis of the nutritional quality of edible mushroom Pleurotus sajor-caju grown in deproteinized whey medium. LWT- Food Sci Technol. 2015; 61:339–45.
25. Nitschke J, Modick H, Busch E, Rekowski RW, Altenbach HJ, Mölleken H. A new colorimetric method to quantify β-1,3-1,6-glucans in comparison with total β-1,3-glucans in edible mushrooms. Food Chem. 2011; 127:791–6.
26. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD guideline for the testing of chemicals. Guideline 423: acute oral toxicity-acute toxic class method. Adopted March 22, 1996; revised October 2000. Paris (France): OECD.
27. Ou CC, Hsiao YM, Wang WH, Ko JL, Lin MY. Stability of fungal immunomodulatory protein, FIP-gts and FIP-fve, in IFN-g production. Food Agric Immunol. 2009; 20:319–32.
28. Quin DW, Gu Z, Guo JY. Medicinal mushroom for prevention of disease of modern civilization. Evid Based Compl Alt Med. 2015:812725.
29. Reis FS, Barros L, Martins A, Ferreira ICFR. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an interspecies comparative study. Food Chem Toxicol. 2012; 50:191–7.
30. Sietsma J, Wessels JGH. Chemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*. Biochymica and Biophysica Acta 1977; 496: 225-239.
31. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Method Enzymol. 1999; 299:152–78.
32. Srinivasan M, Rukkumani R, Ram Sudheer A, Menon VP. Ferulic acid, a natural protector against carbon tetrachlorideinduced toxicity. Fund Clin Pharmacol. 2005; 19:491–6.
33. Ulziijargal E, Mau JL. Nutrient compositions of culinary-medicinal mushroom fruiting bodies and mycelia. Int J Med Mushrooms. 2011; 13:343–9.
34. Wasser SP, Didukh M, Nevo E. Dietary supplements from culinary-medicinal mushrooms: a variety of regulations and safety concerns for the 21th century. Int J Med Mushrooms. 2004; 6:231–48.
35. Wasser SP. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. Int J Med Mushrooms. 2010; 12:1–16.
36. Zhu F, Du B, Bian Z, Xu B. Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: characteristics, physicochemical and biological activities. J Food Compos Anal. 2015; 41:165–73.
37. Zŭzěk MC, Maček P, Sepčić K, Cestnik V, Frangež R. Toxic and lethal effects of ostreolysin, a cytolytic protein from edible oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), in rodents. Toxicon. 2006; 48:264–71.