



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Área de Nutrición y Bromatología

**MÁSTER DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA
SALUD: FARMACOLOGÍA, NEUROBIOLOGÍA Y
NUTRICIÓN**

TRABAJO FIN DE MASTER

**Sensibilidad a la temperatura de los fenoles
totales y de la capacidad antioxidante y
antirradicalaria de los hongos comestibles
Clitocybe geotropa, *Hygrophorus gliocyclus*
y *Clitocybe alexandrii***

Presentado por *Aniello Tufano* para optar al grado de Máster por la
Universidad de Valladolid

Dirigido por: D. Tomás Girbés Juan y Dña. Pilar Jiménez

D. Tomás Girbés Juan, Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid y Dña. Pilar Jiménez López, Profesor Contratado Doctor de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, directores de este Trabajo Fin de Máster, certifican que el trabajo realizado por D. Aniello Tufano puede ser presentado como Trabajo Fin de Máster en Investigación en Ciencias de la Salud de la Universidad de Valladolid.

Valladolid, a 10 de agosto de 2013

Fdo. Tomás Girbés Juan

Fdo. Pilar Jiménez López

ABREVIATURAS

A. Absorbancia

Å. Angström.

AMT. Antocianidinas monoméricas totales.

CUPRAC. Reducción del ión Cobre actividad antioxidante

Da. Dalton.

DPPH. 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

FE. Factor de dilución.

Fig. Figura.

kD. KiloDalton.

ml. Mililitros

mg/L. miligramos por litro

nm. Nanómetros.

PH. Peso húmedo.

Pm. Peso molecular

p/v. Peso por volumen.

RLs. Radicales libres.

RIP. Proteína inhibidora de ribosomas.

ROS. Especies reactivas de oxígeno.

rpm. Revoluciones por minuto.

Trolox. 6-Hydroxi-2, 5,7, 8-tetrametilcromano-2-carboxilco ácido.

µg. Microgramos.

µl. Microlitros.

µm. Micrómetros

µmoles. Micromoles.

ε. Coeficiente de extinción molar

CG. *Clitocybe geotropa*

HG. *Hygrophorus gliocyclus*

CA. *Clitocybe alexandrii*

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Prof. Tomás Girbés Juan y a la Profa. Pilar Jiménez a los que estoy especialmente agradecido por darme la oportunidad de poder desarrollar dicho trabajo en su Departamento. Para mi es todo un honor haber trabajado con ellos. Agradezco también a Santiago de Castro Alfageme (Junta de Castilla y León) su ayuda por el suministro y clasificación de las setas.

ÍNDICE

	págs
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Características generales del reino fungi	9
1.2. Hongos	9
1.3. Partes de los hongos	9
1.4. Reproducción de los hongos	12
1.5. Fisiología de los hongos	13
1.6. Ecología de los hongos	15
1.7. Utilización de los hongos	17
1.8. Clasificación	18
1.9. Propiedades nutricionales de las setas	18
1.10. Propiedades medicinales de las setas	19
1.11. <i>Clitocybe geotropa</i>	21
1.12. <i>Hygrophorus gliocyclus</i>	22
1.13. <i>Clitocybe alexandrii</i>	23
1.14. Salud humana, efecto antioxidante y radicales libres (RLs)	25
1.15. Moléculas diana de los radicales libres	25
1.16. Antioxidantes	26
1.17. Compuestos fenólicos	27
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1. Material de laboratorio	31
3.1.1. Equipos	31
3.1.2. Material fungible	31
3.1.3. Reactivos químicos	32
3.1.4. Materiales biológicos	32
3.2. Determinación del contenido en humedad de los hongos	32
3.3. Determinación del contenido en cenizas de los hongos	34

3.4.	Obtención de los extractos	36
3.5.	Método de Folin-Ciocalteu	37
3.6.	Método de CUPRAC	38
3.7.	Método del radical DPPH	39
4.	RESULTADOS	41
4.1.	Humedad	42
4.2.	Determinación de cenizas	42
4.2.1.	Cenizas peso húmedo	42
4.2.2.	Cenizas peso seco	43
4.3.	Volúmenes de los extractos crudos de hongos	44
4.4.	Medida de de los fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	44
4.5.	Medida de la capacidad antioxidante por el método de CUPRAC	45
4.6.	Medida de la capacidad antirradicalaria por el método del radical DPPH	47
4.7.	Medida de la degradación por temperatura a 90°C y a diferentes tiempos de los fenoles totales y de la capacidad antioxidante por el método de Folin – Ciocalteu y método de CUPRAC respectivamente	49
4.7.1.	Medida de la degradación por temperatura a 90° C y a diferentes tiempos de los fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	49
4.7.2.	Medida de la pérdida de capacidad antioxidante por temperatura a 90° C y a diferentes tiempos por el método de CUPRAC	50

4.8.	Medida de la degradación de los fenoles totales y de la capacidad antioxidante a diferentes temperaturas (sin calentar, 20°C, 50°C, 70° C y 90° C) en un tiempo de 30 minutos por el método de Folin – Ciocalteau y método de CUPRAC	52
4.8.1.	Medida de la degradación de los fenoles totales a diferentes temperaturas (sin calentar, 20°C, 50°C, 70°C y 90°C) en un tiempo de 30 minutos por el método de Folin – Ciocalteau	52
4.8.2.	Medida de la pérdida de capacidad antioxidante a diferentes temperaturas (sin calentar, 20°C, 50°C, 70°C y 90°C) en un tiempo de 30 minutos por el método de CUPRAC	54
5.	DISCUSIÓN	57
6.	CONCLUSIONES	60
7.	BIBLIOGRAFÍA	62

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características generales del reino fungi

Fue Robert Whittaker en el año 1969, quien propuso la división de los seres vivos en cinco reinos diferenciados y consideró a los hongos como un reino aparte.

Citando a Francisco de Diego Calonge, diremos que se tiende a situar a estos seres en tres reinos distintos: *Chromista*, *Fungi* y *Protozoa*.

Los hongos se diferencian claramente del reino vegetal por la ausencia o presencia en sus tejidos de glucógeno.

1.2. Hongos y Setas

Escuchamos hablar indistintamente de «hongos» y «setas», incluso en algunas zonas determinadas setas reciben el apelativo de «hongo», pero desde un punto de vista micológico es necesario superar esta confusión. Las setas son una pequeña parte de un ser vivo más grande. La relación hongo-seta sería la misma que árbol-frutos. Esa «planta» que constituye el hongo, se extiende a semejanza de un sistema radicular, el micelio, compuesto por filamentos muy finos llamados hifas.

1.3. Partes de los hongos

Podemos distinguir los hongos en macroscópicos, como aquellos que pueden observarse a simple vista, y microscópicos, aquellos para los cuales es necesario la ayuda de potentes lupas o microscopios para ser vistos, por ejemplo las levaduras. Tanto unos como otros están formados fundamentalmente por dos partes diferenciadas:

Micelio: Se trata de la parte vegetativa de los hongos. Está formada por una red entrelazada de filamentos denominados hifas. Suele ser de color blanco y, en función de la forma de vida del hongo, se puede encontrar bajo la tierra, sobre restos vegetales o incluso sobre restos animales u otros hongos.

Cuerpo fructífero o carpóforo: Es la parte más visible y constituye el aparato reproductor de los hongos, cuya principal función consiste en producir esporas.

Para facilitar la comprensión, podríamos considerar la seta como el «fruto» de los hongos, mientras que bajo la seta se encontraría un entramado de filamentos a modo de «raicillas», el micelio, que es lo que equivaldría a la planta. De modo que cuando recolectamos una seta, estamos recogiendo de alguna manera el «fruto» del hongo.

La morfología de las setas puede ser realmente variada, desde una de cardo (*Pleurotus eryngii*) a los globosos cuescos de lobo (*Lycoperdon perlatum*), hay una amplia gama de formas que permiten al hongo adaptarse al hábitat en el que vive, de modo que pueda facilitar la producción y dispersión de sus esporas.

La seta típica, para la que no tenemos más que imaginar la típica *Amanita muscaria*, de sombrero rojo con manchitas blancas, más conocida como «seta de los enanitos», es aquella que estaría formada por las siguientes partes:

Sombrero: Es la parte superior del carpóforo y suele ser la más carnosa de la seta. A menudo tiene forma de paraguas más o menos abierto, aunque puede presentar numerosas variaciones en su forma.

Cutícula: Es la membrana exterior que a modo de piel recubre al sombrero y, a veces, el pie. Presenta una amplia gama de colores y variadas texturas.

Himenio: Se encuentra en la parte inferior del sombrero, donde se localizan las esporas. Puede estar formado por láminas como en *Agaricus* o *Amanita*,

poros como en *Boletus* o *Suillus*, pliegues como en *Cantharellus* o aguijones como en *Hydnum* o *Sarcodon*.

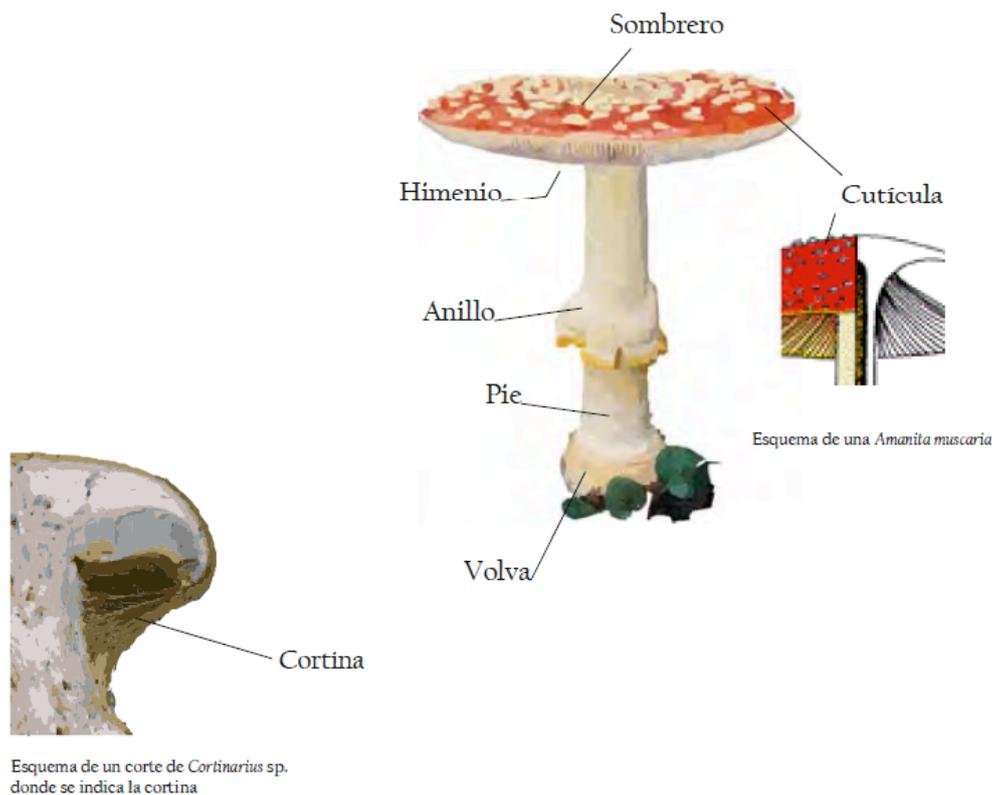
Pie: Es la parte de la seta que sostiene el sombrero y bajo el cual se encuentra el micelio. Su color, tamaño, forma y estructura son importantes para su identificación.

Anillo: Algunas setas, cuando son jóvenes, disponen para proteger el himenio de una membrana que une el pie con el sombrero. Cuando el sombrero se extiende al crecer la seta, esta membrana se rompe, quedando parte de ella en el pie, al que rodea, y dando lugar al anillo. La existencia o ausencia de anillo es importante al identificar los hongos.

Cortina: Está constituida por finas fibrillas en forma de tela de araña que unen el borde del sombrero con el pie.

Volva: Su origen está en el velo universal, que es una membrana que envuelve el carpóforo cuando es joven, y se rompe cuando la seta crece. Parte de ésta queda adherida al pie en el desarrollo de algunas setas, como en el género *Amanita*.

Figura I1. Esquema de las partes de los hongos



1.4. Reproducción de los hongos

La forma de reproducción de los hongos es algo compleja pero realmente interesante, por lo que vamos a hacer un esfuerzo por simplificar y sintetizar el ciclo partiendo de una seta típica con pie y sombrerillo.

Bajo el sombrero de la seta se encuentra el himenio, que al madurar produce las esporas, el equivalente funcional a las semillas de las plantas, aunque el origen y la estructura de ambas sean totalmente diferentes. Cada una de estas esporas tiene un juego de cromosomas básico «n», haploide, al igual que nuestros óvulos y espermatozoides, y por lo tanto podríamos hablar, para entendernos, que existen esporas «macho» y esporas «hembra», aunque en micología se suelen utilizar los signos «+» y «-», porque no se trata de sexos tal como los conocemos sino dos tipos de células complementarias.

Las esporas al caer sobre el substrato adecuado —que dependiendo de la especie podrá ser tierra, madera o incluso otros hongos— germinarán, dando lugar por multiplicación celular a filamentos de células llamados hifas.

El conjunto de varias hifas constituye el llamado micelio primario, también haploide. Dicho micelio sólo se puede reproducir asexualmente. Para producir cuerpos fructíferos, o setas en nuestro caso, es necesaria la unión de dos micelios primarios pero de distinto «sexo», es decir, un micelio procedente de la germinación de una espora macho «+» se ha de unir con otro originado por una espora «-», lo que dará como resultado un micelio secundario. Este micelio estará formado por células dicarióticas, es decir, que presentan dos núcleos no fusionados, «+» y «-» procedentes de ambos micelios. Las células del micelio dicariótico organizan su estructura de crecimiento hasta formar el cuerpo fructífero, en nuestro caso la seta.

La parte más importante de la seta es el sombrero, donde se encuentra el himenio, en cuyo extremo los núcleos del micelio dicariótico se fusionan para formar una única célula diploide, que por meiosis dará lugar a 4 células, esporas haploides, cerrando de este modo el ciclo.

1.5. Fisiología de los hongos

En la mayoría de los hongos las paredes de las hifas están compuestas principalmente por quitina y algunas hemicelulosas. La celulosa, que está presente sólo en unos pocos grupos de hongos, es característica de los oomicetes. La proporción de agua de los hongos mucilaginosos generalmente es mayor del 90%. Las esporas pueden tener menos del 50% de agua; otras estructuras de resistencia, tales como los esclerocios, contienen aún menos.

Los hongos requieren oxígeno para su crecimiento, así como grandes cantidades de agua y de hidratos de carbono u otras fuentes de carbono. la mayoría de los hongos utilizan azúcares como la glucosa, pero algunos usan otros compuestos orgánicos como alimento, según su capacidad para

sintetizar las enzimas adecuadas. Ciertas micorrizas toman directamente el nitrógeno de la atmósfera; sin embargo, todos los demás hongos lo obtienen de nitratos, sales de amonio u otros compuestos orgánicos o inorgánicos de nitrógeno. los hongos, además, precisan otros elementos como potasio, fósforo, magnesio y azufre. También son necesarios, aunque en muy pequeñas cantidades, hierro, manganeso, cobre, molibdeno, zinc y galio; así como factores de crecimiento. Determinados hongos son deficitarios, al menos en parte, en uno o más factores de crecimiento.

Las enzimas de los hongos pueden actuar sobre una gran variedad de sustancias. Un grupo de enzimas, llamado el complejo zimasa, permite a las levaduras llevar a cabo la fermentación alcohólica. Otras enzimas, como la protopectinasa, la pectasa y la pectinasa, hidrolizan los compuestos pectídicos que hay en las capas medias de las paredes celulares de las plantas. La amilasa, celobiasa, citasa, dextrinasa, invertasa, lactasa, maltasa, proteasa y la tanasa son también enzimas producidas por los hongos.

El glucógeno, sustancia relacionada con el almidón y con la dextrina, es la reserva de hidratos de carbono más común en los hongos. Además, algunos hongos forman polisacáridos y alcoholes polihidroxílicos, como el manitol y la glicerina. Otros producen proteínas y grasas en abundancia. Muchos hongos sintetizan ácido oxálico y otros ácidos orgánicos, como cítrico, fórmico, pirúvico, succínico, málico y acético; la producción de ácido láctico sólo la realiza una familia de hongos. Otros productos del metabolismo fúngico son compuestos de azufre, sustancias que contienen cloro y numerosos pigmentos. Unos cuantos hongos tienen la facultad de formar compuestos volátiles de arsénico cuando crecen sobre sustratos que lo contienen.

1.6. Ecología de los hongos

Es importante recordar que los hongos, debido a su carencia de clorofila, tienen que relacionarse con otros organismos o sus restos, buscando los nutrientes orgánicos que ellos son incapaces de producir. Existen fundamentalmente cuatro formas de vida:

Hongos parásitos. Son aquellos que obtienen sus nutrientes a costa de otros seres vivos provocándoles un daño, que pueden ser animales, vegetales e incluso otros hongos. Algunos son capaces de comportarse, en ocasiones, como saprófitos, caso de la *Armillaria mellea*, hongo que cuando actúa como saprófito se nutre de árboles muertos, mientras que en su fase parásita produce importantes daños tanto en bosques de coníferas como de frondosas. Existen otros parásitos que nos pueden resultar muy beneficiosos en la lucha biológica contra las plagas. Un claro ejemplo de esto sería *Cordyceps militaris*, hongo que parasita de manera específica crisálidas y orugas de la procesionaria del pino (*Thaumetopoea pytiocampa*), con lo que colabora en el control biológico de sus poblaciones y reduce los daños que puedan ocasionar en los pinos.

Hongos saprófitos. Obtienen los nutrientes a partir de la descomposición de la materia orgánica muerta. Para ello tienen unas enzimas capaces de degradar la celulosa, la lignina o el almidón en moléculas sencillas que les sirven de alimento. Estos hongos son importantísimos en los ecosistemas forestales pues, junto con algunas bacterias e invertebrados, son los seres vivos mayoritarios capaces de descomponer la madera y contribuyen a la formación del suelo, lo que convierte su labor en trascendental. Pueden considerarse como los «basureros» del monte, pues sin su presencia las hojas, ramas, árboles y arbustos muertos tardarían mucho más en descomponerse y se acumularían, con el consiguiente riesgo para los incendios y hasta el punto

de poder agotarse los nutrientes del suelo que necesitan las plantas para crecer y que no tendrían disponibles.

Hongos micorrícicos. Son aquellos que viven en simbiosis con las plantas. Las hifas del micelio se asocian con las raíces de las plantas, obteniendo de ellas los nutrientes (fundamentalmente azúcares) que necesitan para vivir. Por otra parte, el entramado de hifas unido a las raíces permite a la planta aumentar enormemente la extensión radicular, proporcionándole la capacidad de absorber una mayor cantidad de nutrientes del suelo, especialmente fósforo y agua. La importancia de las micorrizas en los ecosistemas mediterráneos es realmente trascendente pues, tanto por la baja fertilidad del suelo como por las escasas e irregulares precipitaciones, hacen que muchas de las plantas se encuentren a menudo en situaciones límite de pervivencia. Este entramado miceliar que rodea a las raíces, permite poner a disposición de la planta una mayor cantidad de nutrientes de los distintos horizontes (profundidades) del suelo, que de otro modo serían incapaces de ser asimilados por la planta. De esta manera le permite aprovechar el agua que no alcanzaría de los horizontes superiores (superficiales) del suelo (caso de las típicas tormentas de verano, cuya agua a menudo tiene una escorrentía superficial y apenas moja los primeros centímetros), explorando un volumen de suelo superior al que pueden utilizar las plantas no micorrizadas (un cm de raíz micorrizada puede tener hasta 80 cm de hifas externas). Se podría llegar a decir que prácticamente se haría imposible la supervivencia de muchos árboles y otras plantas sin la formación de micorrizas.

Hongos liquenizados. Organismos simbiotes comúnmente llamados líquenes. Están formados por la íntima asociación de un hongo o micobionte, mayoritariamente de la División *Ascomycota*, y un alga, que puede ser un alga verde-azulada (cianobacteria) o un alga verde (cloroficea). El hongo forma

una estructura que protege al alga de la desecación y el exceso de radiación solar, mientras que el alga realiza la fotosíntesis aportando azúcares al hongo. Estos organismos están capacitados para resistir las condiciones más duras y colonizar los ecosistemas más adversos. Además muchas especies son muy sensibles, por lo que son consideradas buenas indicadores de los niveles de contaminación atmosférica y de la calidad de los ecosistemas forestales.

1.7. Utilización de los hongos

Las enzimas de los hongos se utilizan en diversos procesos industriales. Cuando crecen sobre salvado caliente de trigo o de arroz, algunas especies fúngicas producen una amilasa que se usa en la fermentación alcohólica. Las proteasas que se obtienen de otros hongos se emplean en la fabricación de pegamento líquido.

Los hongos se utilizan en la producción industrial de ácido cítrico, de ácido glucónico y de ácido gálico, que todavía se emplea en la fabricación de tintas y colorantes. Algunas resinas se elaboran a partir de ácido fuma rico formado por el moho negro del pan. El ácido giberélico, que provoca aumento del crecimiento de las células vegetales, lo produce un hongo que causa una enfermedad en las plantas de arroz. Grasas y aceites que se utilizan comercialmente se obtienen de especies de varios géneros y también hay una especie que es una fuente práctica de proteínas comestibles. La vitamina D se forma al irradiar el ergosterol, una sustancia obtenida a partir de los residuos de la levadura de cerveza. Cierta hongo, semejante a las levaduras, proporciona riboflavina; la biotina se acumula durante el proceso de producción de ácido fumárico por parte de otro hongo. También se utilizan organismos fúngicos en la elaboración del queso roquefort, así como en la maduración del queso camembert.

Los hongos se han utilizado en medicina desde tiempos remotos. El uso de hongos como purgantes ya no es tan común; sin embargo el alcaloide

presente en el esclerocio del cornezuelo del centeno se emplea para conseguir contracciones uterinas durante el parto. De los alcaloides del cornezuelo se obtiene también la dietilamida del ácido lisérgico, más conocida como lsd, la cual provoca efectos alucinógenos. La utilización de los antibióticos en la práctica médica comenzó cuando se descubrieron las propiedades antibióticas de la penicilina. Hoy se fabrican muchos antibióticos a partir de microorganismos que no son hongos. La griseofulvina, sin embargo, es un antibiótico antifúngico producido por varias especies de un género de hongos.

1.8. Clasificación

La clasificación de los hongos está basada principalmente en las características de las esporas sexuales y de los cuerpos fructíferos presentes durante los estadios sexuales de su ciclo biológico. Los hongos con un estado sexual conocido se denominan Hongos perfectos. Muchos hongos sólo producen esporas sexuales. Para los hongos sin estados sexuales conocidos denominados Hongos imperfectos deben utilizarse en su clasificación otras características distintas. Entre ellas figura la morfología de sus esporas asexuales y de los micelios. Existen cuatro clases de hongos verdaderos o filamentosos en el reino Fungi: *Phycomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* y *Deuteromycetes*.

1.9. Propiedades nutricionales de las setas

Proteínas. El porcentaje de proteína en peso seco puede variar entre 10 y 30% aunque puede llegar a ser hasta del 40%.

Carbohidratos. Tienen un contenido elevado de carbohidratos de entre el 10 al 50%. Dentro de los carbohidratos que contienen dichos hongos, se encuentran hexosas, sacarosa, etc. (Breene, 1990; Burns et al, 1994).

Lípidos. Contiene del 3 al 5% de lípidos en peso seco. Los fosfolípidos del 60 al 70 % (Breene, 1990).

Vitaminas. Los hongos suelen ser una fuente de tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina, biotina y ácido ascórbico (vitamina C).

Minerales. Los hongos absorben todos los minerales que contiene el substrato donde son cultivados, por lo general contienen buena cantidad de fósforo y potasio, y calcio en menor cantidad.

1.10. Propiedades medicinales de las setas

Efectos antitumorales. Los polisacáridos actúan como potenciadores de las células de defensa que posteriormente destruyen las células cancerosas sin ocasionar efectos colaterales al enfermo (Miles y Shu-Ting, 1997).

Efectos antivirales. Se ha encontrado que el micelio del *Pleurotus* contiene una mezcla de diferentes polisacáridos de bajo peso molecular y sustancias similares a la Zeatina, las cuales contienen citoquinina, estas son sustancias similares a fitohormonas que parece podrían tener un cierto poder antiviral (Nada, Shokukin, 1998).

Efecto antiinflamatorio. Unas sustancias con actividad antibiótica son los componentes aromáticos volátiles que caracterizan a la mayoría de las especies de *Pleurotus* o Setas, estos son componentes de 8 carbonos en su estructura molecular, y son las moléculas que originan el aroma y sabor característico que distingue a este tipo de hongos, estas sustancias han demostrado tener una fuerte capacidad antibacteriana y por tanto antiinflamatoria contra diferentes tipos de agentes infecciosos (Beltrán García et al., 1997).

Control del colesterol. Se ha demostrado a nivel experimental con ratas de laboratorio que el consumo frecuente de setas disminuye el nivel de ácidos grasos en sangre y el colesterol en el hígado (Bobek et al., 1990. Opletal et al., 1997).

Efecto hepatoprotector. En otros experimentos que se realizaron con ratas de laboratorio a las que se suministró setas deshidratadas en un 2%, con una dieta rica en grasa, durante 6 meses, se demostró que lograron bajar los niveles de colesterol y triglicéridos en un 65-80%, en comparación con las ratas control.

Efectoantihipertensión. La ingesta de setas, permite una mejor absorción de minerales a nivel intestinal, esto debido a la presencia de metaloproteínas (Hobbs C, 1996)

Efectoantioxidante. Algunas pueden constituir una fuente potencial de bio-antioxidantes, o de preparaciones complejas con propiedades antioxidantes (Capich y Shashkina, 1992).

1.11. *Clitocybe geotropa*

Descripción. Sombrero duro, carnosos, convexo-mamelonado de joven, luego plano, finalmente deprimido, conservando el mamelón central, de 80-180 mm de diámetro, liso, seco, mate, de color crema a ocre claro, con el margen algo incurvado, luego plano. Láminas apretadas, decurrentes, blanquecinas a crema. Pie de 100-160 x 20-30 mm, algo claviforme, del mismo color que el sombrero o algo más claro. Carne espesa, de color blanco, con un olor particular (ciánico o a heno recién cortado).

Figura I2. *Clitocybe geotropa*



Hábitat. Crece generalmente en otoño, en bosques de planifolios, en todo tipo de suelos, aunque en nuestra zona la encontramos preferentemente en suelos ácidos.

Comestible. Especie considerada como comestible, debido a su carnosidad y su sabor agradable.

Observaciones. En las zonas más termófilas del centro peninsular es más abundante la variedad máxima, con sombrero de mayor tamaño (hasta 250mm), de color ocrecárneo a ocre-anaranjado, con las láminas menos decurrentes, de color crema a crema-ocráceo. Pie más corto en relación con el diámetro del sombrero, del mismo color, a veces con pruina blanquecina en el ápice.

1.12. *Hygrophorus gliocyclus*

Descripción. *Sombrero* que por regla general oscila entre los 3 y los 7 cm de diámetro, de forma globosa en un principio, después convexo y con una especie de joroba, y finalmente extendido. Aun en estado desarrollado y extendido mantiene el borde involuto casi siempre, siendo además fino. Es de color amarillento, sobre todo en el centro, siendo más pálido, casi blanquecino, hacia el borde. Su superficie es viscosa en tiempo seco. Tiene láminas de color crema, separadas entre sí, arqueadas y decurrentes sobre el pie, más bien gruesas. *Pie* cilíndrico aunque algo atenuado en la base, con color con el sombrero y también viscoso, aunque mucho menos que este.

Puede presentar una especie de pseudoanillo viscoso al quedar adheridos los restos del velo, aunque no es norma general que lo tenga ya que tiende a desaparecer. *Carne* espesa y consistente de color blanco, con olor débil, poco significativo, y sabor dulce y suave.

Figura I3. *Hygrophorus gliocyclus*



Hábitat. Especie que fructifica durante el otoño en los pinares. Es una especie frecuente y abundante en algunas zonas.

Observaciones. Es una especie comestible apreciada en algunas zonas de nuestra geografía, en algunos sitios la denominan llenega blanca, denominación que en otras zonas corresponde al *Hygrophorus eburneus*, diferenciable de este por ser más blanquecino y aromático. Otra especie que puede parecerse algo es el *Hygrophorus chrysodon*, cuyo pie está decorado de granulaciones amarillas evidentes.

1.13. *Clitocybe alexandrii*

Descripción. Sombrero duro, carnoso, de 70-130 mm de diámetro, convexo de joven, luego plano, finalmente deprimido, de aspecto untuoso en tiempo húmedo, de color pardo-grisáceo, ocre-parduzco, con el margen enrollado largo tiempo. Láminas apretadas, algo decurrentes, a veces anastomosadas cerca del pie, de color crema a ocráceas, con la arista irregular. Pie corto en relación con el diámetro del sombrero, de 50-90 x 15-35 mm, lleno, del mismo color que el sombrero o algo más claro. Carne espesa, de color crema y de sabor dulce.

Figura I4. *Clitocybe alexandrii*



Hábitat. Tanto bajo coníferas como planifolios, en la montaña y en zonas más bajas. Suele fructificar en otoño, tras las primeras lluvias, sin fallar nunca, aunque el año sea malo.

Comestible. Comestible pero de baja calidad.

Observaciones. Fácilmente distinguible, entre otras características, por su gran tamaño, bastante inusual en las especies del género *Clitocybe*.

También de buen tamaño es la Pardilla (*Clitocybe nebularis*) de sombrero grisáceo a pardo-grisáceo, liso, láminas crema-blanquecinas, pie algo claviforme, blanco y carne de olor fuerte y sabor dulce. Esta especie es comestible, aunque provoca reacciones alérgicas en ciertas personas.

1.14. Salud humana. Efecto antioxidante y radicales libres (RLs)

Los radicales libres se generan siempre que exista actividad vital, como consecuencia de las reacciones metabólicas en las cuales se oxidan sustratos, en particular en el proceso de fosforilación oxidativa.

Un radical libre es cualquier especie que contiene uno o más electrones desapareados y que es capaz de mantener una existencia independiente. Los radicales libres más frecuentes son los derivados del oxígeno y colectivamente se denominan ROS (especies reactivas de oxígeno). Existen también radicales libres de otros átomos, en particular los del azufre. Los antioxidantes son moléculas que a bajas concentraciones, respecto a las de un sustrato oxidable, retardan o previenen su oxidación.

Los antioxidantes dietarios son muy variados, pero se podría asegurar que entre los más importantes podemos incluir la vitamina C o ácido ascórbico, los tocoferoles, los carotenos y sus derivados y las sustancias fenólicas, fundamentalmente los polifenoles. (J.E. Basterrechea, Tesis Doctoral 2013).

1.15. Moléculas diana de los radicales libres

ADN. Los radicales libres reaccionan con el ADN dañando su estructura.

Lípidos. Especialmente los que contienen ácidos grasos poli-insaturados, son susceptibles de desarrollar procesos de oxidación no controlados, inducidos por radicales libres.

Proteínas. Los aminoácidos que forman proteínas pueden verse afectados por los ataques de los radicales, originando modificaciones que alteran su estructura impidiendo su acción biológica

Carbohidratos. La proporción de ataques es inferior, pero hay algún azúcar como la glucosa que puede reaccionar con radicales hidroxilo y originar sustancias reactivas. (J.E. Basterrechea, Tesis Doctoral 2013).

1.16. Antioxidantes

Los alimentos e ingredientes antioxidantes son un componente importante de la industria alimentaria. En el pasado, los antioxidantes se utilizaron principalmente para controlar la oxidación y retardar el envejecimiento. Sin embargo, el tradicional mensaje de que el estrés oxidativo, implica la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estos serían la causa de las enfermedades y el envejecimiento está siendo reexaminado.

Los antioxidantes tienen una larga historia de uso en la nutrición y en la salud, así como de aplicación en la industria alimentaria. El conocimiento tradicional nos dice que los productos químicos antioxidantes (carotenos, flavonoides, vitamina C, etc.) promueven la salud mediante la eliminación de especies reactivas que de otra manera pueden ejercer efectos metabólicos perjudiciales.

El término "antioxidante" por tanto, se ha convertido en un término ambiguo. Una búsqueda en la base de datos PubMed de los términos "antioxidante", produce más de 19.000 visitas. La evidencia reciente ha cambiado muchos puntos de vista con respecto a la función real de estas sustancias así como cual debería ser la dosis óptima en la dieta. Harman postuló por primera vez en 1956 que los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS) subyacen en el daño progresivo que caracteriza el proceso de envejecimiento. (J.E. Basterrechea, Tesis Doctoral 2013).

1.17. Compuestos fenólicos

Los fenoles o compuestos fenólicos son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a al menos un grupo funcional. Los compuestos fenólicos de las plantas son un grupo heterogéneo de productos con más de 10.000 compuestos. Los compuestos fenólicos son atrapadores de radicales libres y

se dividen en fenilpropanoides simples, cumarinas y derivados del ácido benzoico. Los fenoles complejos se clasifican en lignanos y flavonoides. (J.E. Basterrechea, Tesis Doctoral 2013).

2. OBJETIVOS

Los objetivos concretos de este trabajo fueron:

1. Medida de los fenoles totales, la capacidad antioxidante y antirradicalaria de las setas comestibles *Clitocybe geotropa*, *Hygrophorus gliocyclus*, *Clitocybe alexandrii*, mediante los métodos Folin–Ciocalteu, CUPRAC y DPPH.
2. Estudio de la degradación a diferentes temperaturas y tiempos de los fenoles totales y pérdida de la capacidad antioxidante y antirradicalaria de, *Clitocybe geotropa*, *Hygrophorus gliocyclus*, *Clitocybe alexandrii*, mediante los métodos Folin–Ciocalteu, CUPRAC y DPPH.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material de laboratorio.

3.1.1. Equipos.

Autoclave de esterilización.

Agitador de tubos: Raypa.

Agitador magnético ACS-160: J.Jimeno S.A.

Balanza de precisión: KERN ABS.

Balanza: KERN 572.

Baño de agua: Velp Scientifica (multistirrer 6).

Centrifuga: Digiten-R ORTO ALRESA.

Congelador -24°C: Fago

Equipo de agua Hellix. Millipore.

Espectrofotómetro: HELIOS α Thermo.

Estufa: P.SELECTA 150 litros.

Equipo pHmetro: pH-meter basic 20 + CRISON.

Pipetas automáticas: Proline Plus de Biohit

3.1.2. Material fungible

Botellas de vidrio de diversos volúmenes, desde 5 ml hasta 5 litros.

Cubetas de plástico de espectrofotometría de 4,5ml.

Espátulas.

Frascos Erlenmeyers de vidrio de diferentes volúmenes.

Gradillas para tubos Falcon y para microtubos.

Guantes de látex.

Imanes agitadores.

Matraces erlenmeyers de diferentes volúmenes.

Microtubos de plástico de 1,5 y 2 ml.

Papel de filtro convencional (Afora).

Pinzas y tijeras de acero inoxidable.

Pipetas de plástico estériles de 5, 10 y 25 ml.

Probetas de vidrio y de plástico de diferentes volúmenes.

Puntas de pipeta automática.

Tubos Falcon de 15 y 50 ml.

Vasos de precipitados de vidrio y plástico de diferentes volúmenes.

3.1.3. Reactivos químicos.

A continuación se muestra una lista de los productos químicos utilizados, así como la casa comercial de la que provienen y su referencia. Todos los productos son aptos para el uso en experimentos analíticos, siendo de una alta pureza.

3.1.4. Material biológico.

El material biológico empleado para la obtención de los extractos que se han utilizado para la realización del trabajo de investigación fueron los tres hongos de estudio recogidos e identificados por D. Santiago de Castro Alfageme (Junat de Castilla y León) en:

- *Clitocybe geotropa*: recogida en Aldeamayor de San Martín (Valladolid).
- *Hygrophorus gliocyclus*: recogida en Trabazos (Zamora).
- *Clitocybe alexandrii*: recogida en Piornedo (Lugo).

3.2. Determinación del contenido de humedad en los hongos

La humedad, o el contenido de agua, de un alimento se define como la pérdida de masa que experimenta dicho alimento después de someterlo a un proceso de desecación expresada en porcentaje.

Antes de determinar la humedad, se prepararon las cápsulas de acero inoxidable. En primer lugar se metieron las cápsulas necesarias en la estufa a 130 °C y se mantuvieron durante 1 hora a fin de eliminar su humedad.

Figura M1. Muestras de setas en el desecador



Transcurrido este tiempo, se sacaron las cápsulas y se transfirieron al desecador (para evitar que capten humedad ambiental), donde se dejaron enfriar hasta que alcanzaron temperatura ambiente. Posteriormente, se pesaron y se anotó el peso de cada una. Este procedimiento se repitió hasta que el peso de las cápsulas fue constante.

A continuación, se pesaron entre 5 y 7 gramos de cada hongo y se trituraron lo más posible con ayuda de unas tijeras. Una vez triturados se puso cada muestra en su correspondiente cápsula y se introdujeron en la estufa a 100 °C durante 90 minutos. Para finalizar, se pesaron las cápsulas con la muestra desecada. Se calculó la humedad de las muestras utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_1 - P_2}{P_1 - P_0} \times 100$$

En la que P_0 es la masa en gramos de la cápsula vacía, P_1 es la masa en gramos de la cápsula con la muestra antes de la desecación y P_2 es la masa en gramos de la cápsula con la muestra después de la desecación.

3.3. Determinación del contenido de cenizas en los hongos

Las cenizas son el residuo que queda tras la incineración completa de los componentes orgánicos de un alimento en unas condiciones determinadas que está relacionado con el contenido en minerales del alimento.

Para eliminar la humedad de las cápsulas de porcelana se introducen en la mufla a 535°C y se mantienen durante 20 minutos. Después se sacaron las cápsulas y se llevaron al desecador, donde se enfriaron hasta alcanzar la temperatura ambiente. Posteriormente se pesaron las cápsulas y cuando su peso fue constante, se pesaron y trituraron separando sombrero y pie de cada seta y se colocaron en las cápsulas de porcelana sin comprimirlos. Se introdujeron en la mufla a 535°C durante 14 horas hasta

Figura M2. Mufla para la obtención de cenizas de las muestras de setas



que se produjo la calcinación total de la muestra. La incineración es completa si el resultado es un residuo blanco o grisáceo. En los casos en los que después de transcurrir las 14 horas no se consiguió este residuo sino un residuo negro, se añadió 1 ml. de agua destilada y se volvieron a meter en la mufla hasta que se obtuvo el residuo blanco. Una vez conseguido este residuo, se sacaron las cápsulas y se colocaron en el desecador hasta que se enfriaron. Finalmente se pesaron.

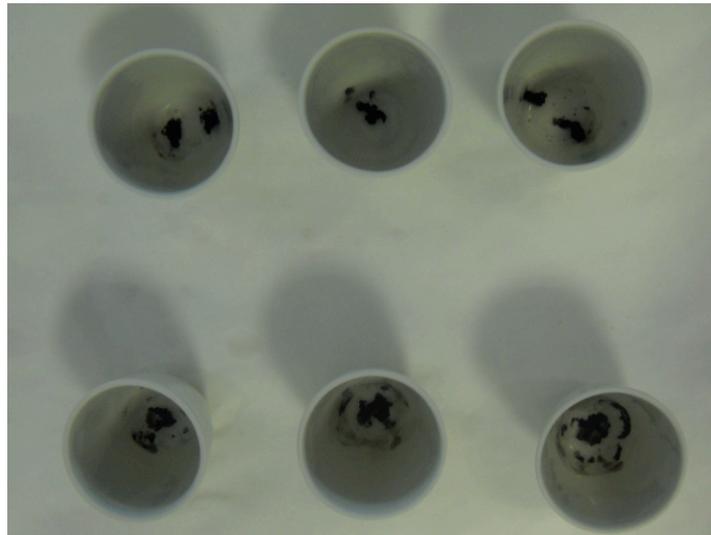
El porcentaje de cenizas sobre sustancia fresca se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas (SF) } = \frac{P_2 - P_0}{P_1 - P_0} \times 100$$

Mientras que el contenido de cenizas sobre sustancia seca se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ Cenizas (SF) } = \frac{\% \text{ Cenizas (SF) }}{100 - \text{ Humedad}} \times 100$$

Figura M3. Cápsulas de porcelana con cenizas



En la que P_0 es la masa en gramos de la cápsula de porcelana vacía, P_1 es la masa en gramos de la cápsula con la muestra antes de la incineración y

P₂ es la masa en gramos de la cápsula con la muestra después de la incineración.

3.4. Obtención de los extractos.

Para la obtención de los extractos se partió de muestras de *Clitocybe geotropa*, *Hygrophorus gliocyclus* y *Clitocybe alexandrii*. Se descongelaron las setas, se cortaron en trozos pequeños diferenciando dos partes pie y sombrero, posteriormente se trituraron en una batidora con 50 ml de agua para cada parte (5g de sombrero en 50 ml y 5 g de pie en 50 ml), guardando siempre la cadena de frío (0°C).

Se pasaron las muestras a un vaso de precipitados de 100 ml con los 50 ml de extracto en agitación constante y a una temperatura de 4° C durante 30 minutos en cámara fría. El extracto se filtró con una doble gasa de nylon y el filtrado obtenido se sometió a una primera centrifugación de 45 min a 3.500 r.p.m (equilibrar los tubos) en centrífuga Digicen-R de rotor basculante RT142 en tubos de 50 ml cada uno a una temperatura de trabajo de 4° C. Se recuperó el sobrenadante y se sometió a una segunda centrifugación de 30 min a 3.500 r.p.m y 4° C de temperatura.

El sobrenadante se recogió y filtró a través de un filtro de papel de doble capa con pliegues (Anoia de 73 g/m²). Se apuntaron los volúmenes recogidos. El volumen recuperado en este proceso es la base para la posterior purificación o análisis y se denomina extracto crudo. Se midieron medimos los volúmenes recogidos de los diferentes extractos crudos y se pasó a su posterior análisis.

Los extractos así obtenidos se repartieron en alícuotas de 1500 µl en tubos eppendorf, se etiquetaron y se colocaron en el congelador a -20° C.

3.5. Método de Folin – Ciocalteu

El procedimiento seguido es el descrito por J.E. Basterrechea, Tesis Doctoral presentada el 24.06.2013 y aprobada por la comisión de Doctorado el 12.07.13.

Los fenoles reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu dando un color azul propio de la reacción con fenoles. El reactivo de Folin-Ciocalteu se obtuvo ya preparado de casas comerciales (Sigma). El hecho de que la medida se realice a 760 nm, que es una longitud de onda muy elevada, en la que pueden interferir muchos compuestos coloreados, así como que el método se basa en una reacción de reducción muy genérica, hace que una gran cantidad de sustancias puedan interferir en este ensayo: azúcares, ácido ascórbico, ácidos orgánicos, Fe (II), etc.

Para realizar la recta patrón se añadió la cantidad de agua destilada correspondiente, así como la cantidad de ácido gálico 2,5 mM en agua (patrón). Se añadieron a cada tubo 600 µl de solución de carbonato sódico al 7,5 % y se agitaron los tubos en el “vortex” (aproximadamente un segundo).

Posteriormente se añadieron a cada tubo 200 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu y se agitó nuevamente. Se colocaron la gradilla con los tubos en un baño de agua precalentado a 50°C y se incubaron 10 minutos. A continuación se midió la absorción de las disoluciones a 760 nm en el espectrofotómetro.

Los resultados se interpolaron en la curva de calibrado de ácido gálico (2,5 mM) y se expresaron en µg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco. Para los ensayos de degradación las muestras se hirvieron a 90° C y a diferentes tiempos; y también a diferentes temperaturas. Los resultados se expresaron en tanto por ciento (%) de degradación.

Figura M4. Baño para calentar las muestras de setas



3.6. Método de CUPRAC

El procedimiento seguido es el descrito por J.E. Basterrechea, Tesis Doctoral presentada el 24.06.2013 y aprobada por la comisión de Doctorado el 12.07.13. En este ensayo medimos la capacidad antioxidante (CA). Este método está basado en la reducción de Cu (II) a Cu (I) por la acción combinada de todos los antioxidantes (agentes reductores) en una muestra. El ensayo de CUPRAC usa como reactivo la neocuproína (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline).

Para realizar la recta patrón se utilizó el ácido gálico (1mM en etanol) como patrón. Se añadieron a cada tubo 1ml de Cloruro de Cobre (II) (10 mM), así como la misma cantidad (1 ml) de neocuproína (7,5 mM en etanol) y se agitó el tubo en el “vortex” (aproximadamente un segundo).

Posteriormente se añaden a cada tubo 1ml de acetato de amonio (1 M pH = 7) y se agitó nuevamente. Se añadieron los diferentes volúmenes del patrón de ácido gálico y la cantidad correspondiente de agua. Se esperó 1 hora

Figura M5. Espectrofotómetro Helios Epsilon utilizado para los métodos de Folin-Ciocalteu, CUPRAC y DPPH



y se realiza la medida a 450 nm. Los resultados se interpolaron en la curva de calibrado de ácido gálico (1 mM) y se expresaron en μg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco. Para los ensayos de degradación las muestras se hirvieron a 90°C y a diferentes tiempos; y también a diferentes temperaturas. Los resultados se expresaron en tanto por ciento (%) de degradación.

3.7. Método del radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

El procedimiento seguido es el descrito por J.E. Basterrechea, Tesis Doctoral presentada el 24.06.2013 y aprobada por la comisión de Doctorado el 12.07.13.

El DPPH es un radical orgánico estable que sirve para medir la capacidad antioxidante (CA). En presencia de sustancias antioxidantes se produce un descenso de la absorbancia del radical DPPH a 515 nm (Brand - Williams, Cuvelier et al. 1995). El radical tiene una coloración púrpura que se

pierde progresivamente. El DPPH sólo puede disolverse en medio orgánico (en nuestro caso metanol) y la concentración que se utilizó fue 0,1 mM. La cuantificación se realizó empleando una solución patrón de trolox (1 mM en metanol).

La reacción se midió a los 10 minutos del inicio, ya que en este intervalo, la mayoría de sustancias completan la reacción con el DPPH. El ensayo DPPH es un método rápido y sencillo.

Representamos la recta patrón de degradación del radical DPPH con respecto a los volúmenes de Trolox 1 mM añadidos. Para los cálculos tuvimos en cuenta el volumen de extracto utilizado y el volumen de extracto de partida (extracto crudo).

Los resultados se interpolaron en la curva de calibrado de Trolox (1 mM) y se expresaron en μg equivalentes de Trolox por gramo de peso fresco. Para los ensayos de degradación las muestras se hierven a 90°C y a diferentes tiempos; y también a diferentes temperaturas. Los resultados se expresan en tanto por ciento (%) de degradación.

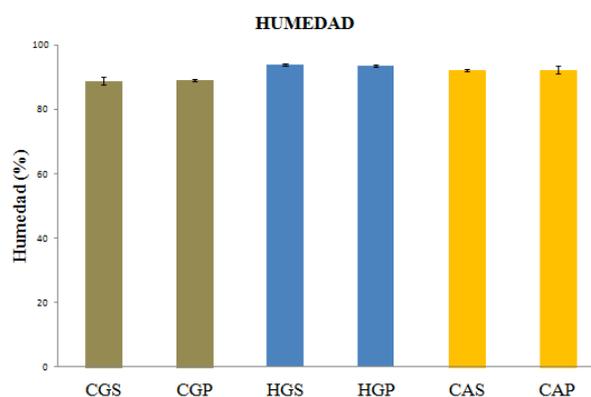
4. RESULTADOS

4.1. Humedad:

Tabla R1. Humedad (%). Sombrero y pie.

Hongo	Humedad (%) Sombrero	Humedad (%) Pie
<i>Clitocybe geotropa</i>	88,90 ± 1,25	89,24 ± 0,33
<i>Hygrophorus gliocyclus</i>	93,94 ± 0,33	93,53 ± 0,31
<i>Clitocybe alexandrii</i>	92,25 ± 0,41	92,39 ± 1,06

Figura R1. Histograma. Humedad (%). Sombrero y pie.



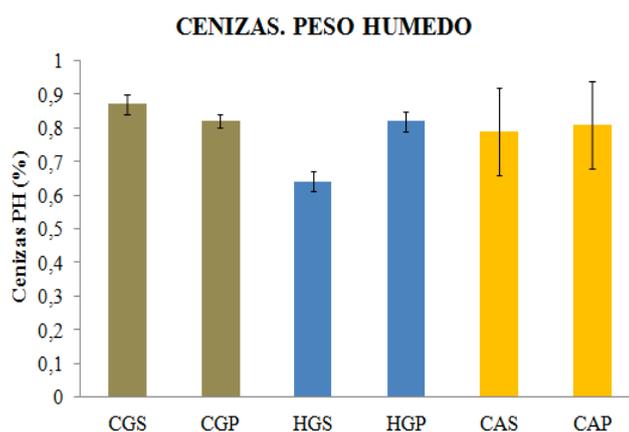
4.2. Determinacion de cenizas

4.2.1. Cenizas peso húmedo

Tabla R2. Cenizas (% del peso húmedo).

Hongo	Cenizas P.S (%) Sombrero	Cenizas P.S (%) Pie
<i>Clitocybe geotropa</i>	0,87 ± 0,03	0,82 ± 0,02
<i>Hygrophorus gliocyclus</i>	0,64 ± 0,03	0,82 ± 0,03
<i>Clitocybe alexandrii</i>	0,79 ± 0,13	0,81 ± 0,13

Figura R2. Cenizas (%). Peso húmedo

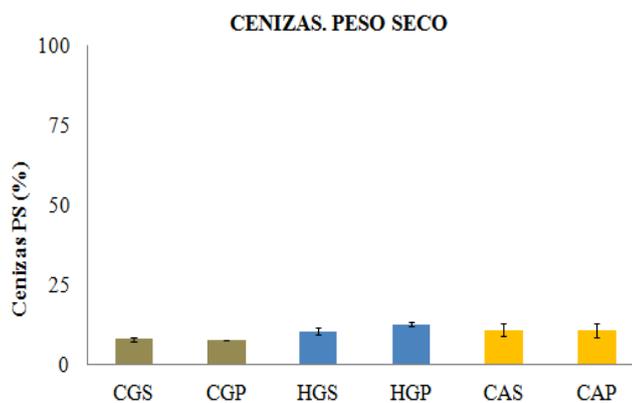


4.2.2. Cenizas peso seco

Tabla R3. Cenizas (% del peso seco)

Hongo	Cenizas P.H (%) Sombrero	Cenizas P.H (%) Pie
<i>Clitocybe geotropa</i>	7,92 ± 0,76	7,62 ± 0,16
<i>Hygrophorus gliocyclus</i>	10,31 ± 1,10	12,63 ± 0,64
<i>Clitocybe alexandrii</i>	10,81 ± 2,00	10,81 ± 2,23

Figura R3. Cenizas (%). Peso seco



4.3. Volúmenes de los extractos crudos de hongos

Se realizaron las diferentes extracciones por triplicado y se apuntaron los volúmenes de los diferentes extractos crudos obtenidos. Estos volúmenes se utilizarán para los cálculos en los diferentes métodos espectrofotométricos: Folin-Ciocalteu, CUPRAC y radical DPPH.

Tabla R4. Volúmenes media de los extractos de sombrero y pie

Especie	Sombrero	Pie
<i>Clitocybe geotropa</i>	39 ml	35 ml
<i>Hygrophorus gliociclus</i>	27 ml	29 ml
<i>Clitocybe alexandrii</i>	31 ml	31 ml

4.4. Medida de los fenoles totales por el método de Folin – Ciocalteu

Realizamos la recta patrón por triplicado y calculamos el valor medio de las diferentes absorbancias y representamos la recta patrón.

Figura R4. Recta patrón. Método de Folin-Ciocalteu

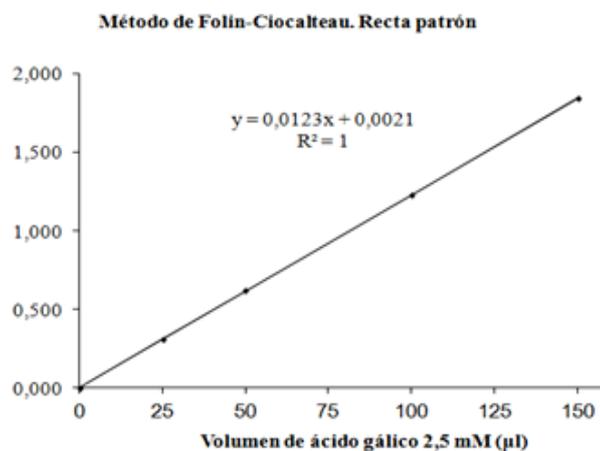
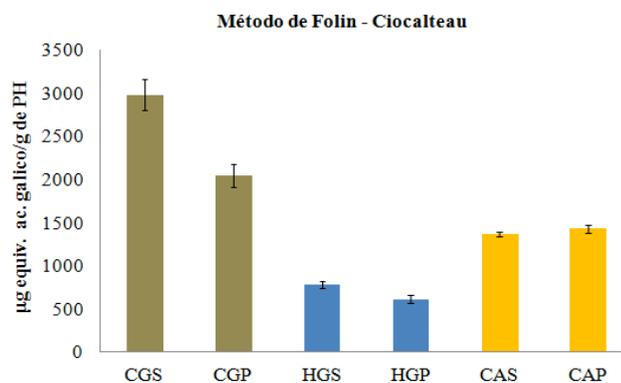


Tabla R5. Método de Folin-Ciocalteu. μg equiv. de ácido gálico/g de peso húmedo

Método de Folin-Ciocalteu	μg equivalentes de ácido gálico/g de peso húmedo
CG. Sombrero	2.974 ± 42
CG. Pie	2.033 ± 133
HG. Sombrero	776 ± 44
HG. Pie	611 ± 40
CA. Sombrero	1.365 ± 29
CA. Pie	1.421 ± 44

Figura R5. Método de Folin-Ciocalteu. μg equiv. de ácido gálico/g de peso húmedo



4.5. Medida de la capacidad antioxidante por el método de CUPRAC.

Se realizó la recta patrón por triplicado y se calculó el valor medio de las diferentes absorbancias y después representamos la recta patrón.

Figura R6. Recta patrón. Método de CUPRAC

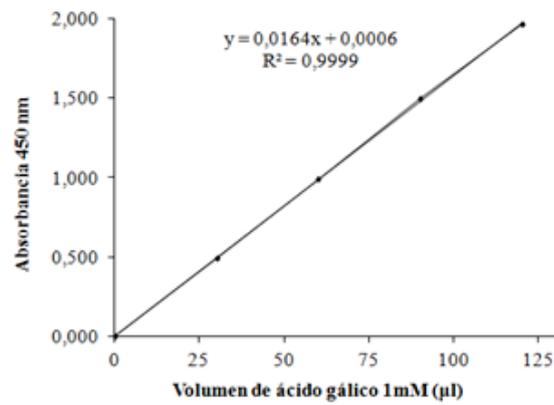


Tabla R6. Método de CUPRAC. µg equivalentes de ácido gálico/g de peso húmedo

Método de CUPRAC	µg equivalentes de ácido gálico/g de peso húmedo
CG. Sombrero	169 ± 5
CG. Pie	110 ± 12
HG. Sombrero	70 ± 5
HG. Pie	67 ± 1
CA. Sombrero	107 ± 3
CA. Pie	98 ± 3

Figura R7. Método de CUPRAC. μg equivalentes de ácido gálico/g de peso húmedo

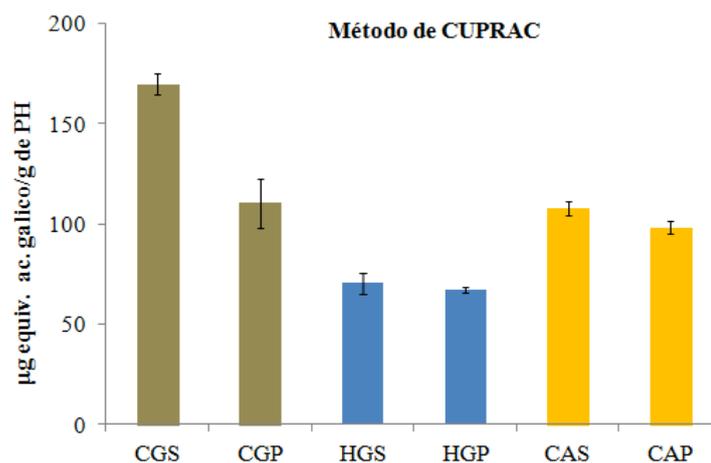
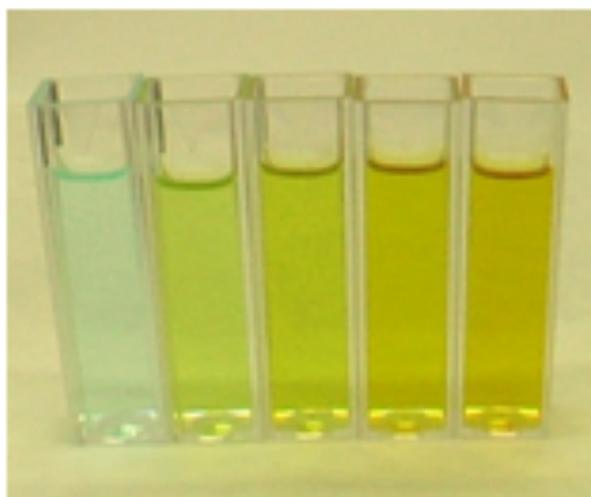


Figura R8. Recta patrón de CUPRAC



4.6. Medida de la capacidad antirradicalaria. Método del radical DPPH.

Realizamos la recta patrón por triplicado y calculamos el valor medio de las diferentes absorbancias y representamos la recta patrón.

Figura R9. Recta patrón. Método del radical DPPH

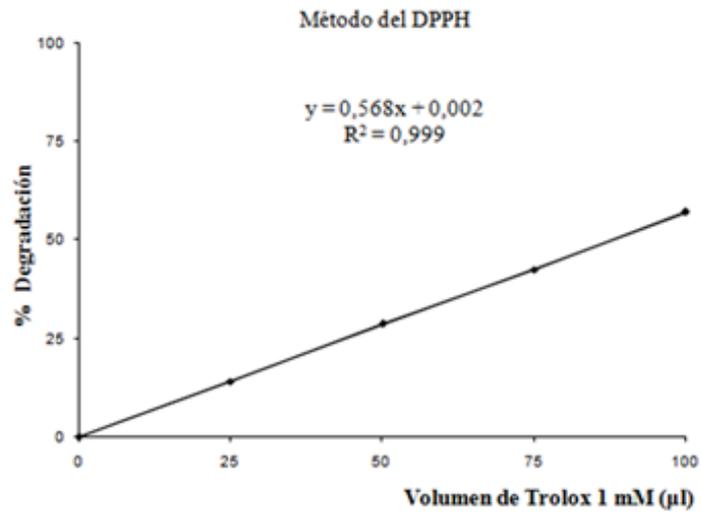


Tabla R7. Método del radical DPPH. µg equiv. de ácido Trolox/g de peso húmedo

Método del radical DPPH	µg equivalentes de Trolox/g de peso húmedo
CG. Sombrero	180 ± 47
CG. Pie	303 ± 27
HG. Sombrero	87 ± 35
HG. Pie	50 ± 30
CA. Sombrero	97 ± 40
CA. Pie	135 ± 37

Figura R10. Método del radical DPPH. Recta patrón

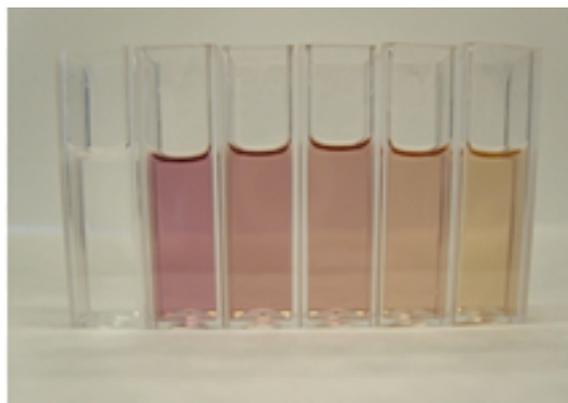
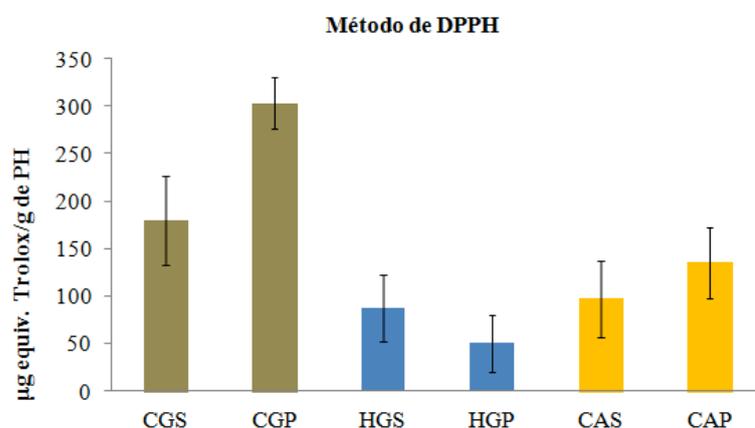


Figura R11. Método del radical DPPH. Histograma. μg equivalentes de ácido Trolox/g de peso húmedo.



4.7. Medida de la degradación por temperatura a 90°C y a diferentes tiempos de los fenoles totales y de la capacidad antioxidante por el método de Folin – Ciocalteu y método de CUPRAC respectivamente.

4.7.1. Medida de la degradación por temperatura a 90° C y a diferentes tiempos de los fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Se midió la degradación de los fenoles totales a diferentes tiempos por el método de Folin – Ciocalteu. Se hierven los extractos crudos a 90° C a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60, 90, 120 minutos).

Tabla R8. Método del Folin-Ciocalteu. Degradación (%) a 90° C

Tiempo (min)	CG Sombrero	CG Pie	HG Sombrero	HG Pie	CA Sombrero	CA Pie
0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
15	83,48 ± 4,14	69,85 ± 2,18	78,50 ± 1,51	78,40 ± 3,50	83,83 ± 1,45	70,17 ± 1,38
30	54,71 ± 4,84	41,23 ± 2,87	49,52 ± 0,53	63,71 ± 3,48	56,02 ± 1,35	48,16 ± 0,73
60	46,58 ± 3,45	37,53 ± 2,07	31,02 ± 1,61	41,77 ± 2,04	50,88 ± 1,43	38,86 ± 1,15
90	32,53 ± 0,57	29,65 ± 1,59	26,46 ± 1,32	35,04 ± 1,46	36,54 ± 1.10	29,65 ± 0,39
120	28,48 ± 1,32	24,78 ± 0,57	20,48 ± 0,49	22,91 ± 1,37	21,90 ± 0,97	23,74 ± 0,46

Figura R12. Método de Folin-Ciocalteu. Degradación a 90°C. *Clitocybe geotropa*

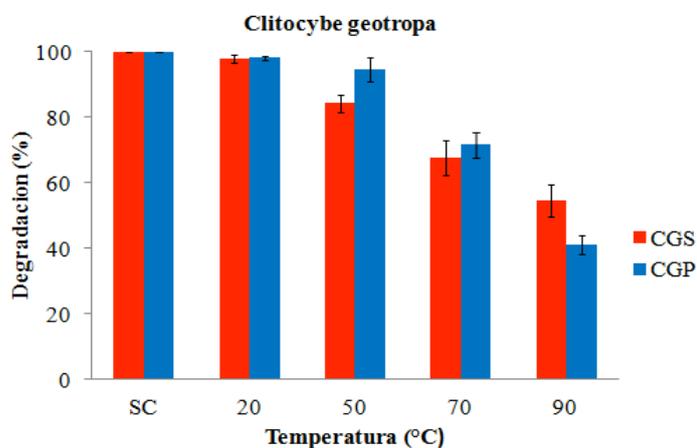


Figura R13. Método de Folin-Ciocalteu. Degradación a 90°C. *Hygrophorus gliocyclus*

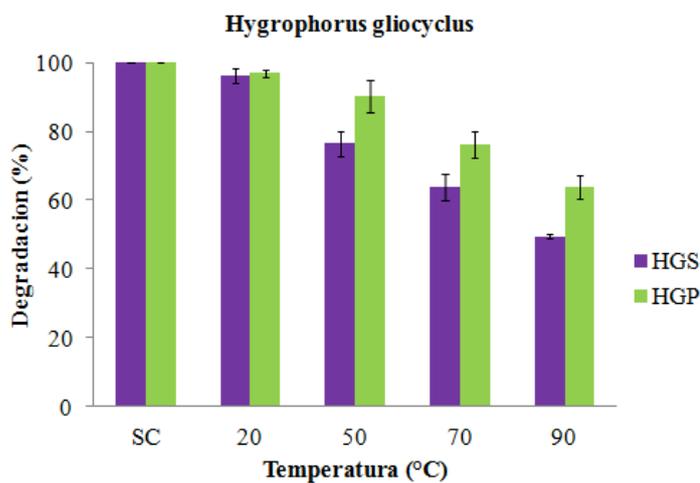
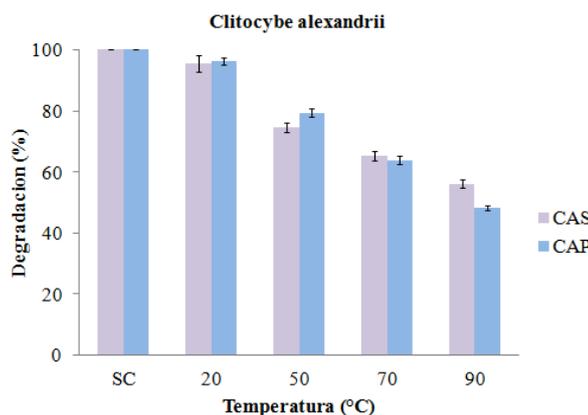


Figura R14. Método de Folin-Ciocalteu. Degradación a 90°C. *Clitocybe alexandrii*



4.7.2. Medida de la pérdida de capacidad antioxidante por temperatura a 90° C y a diferentes tiempos por el método de CUPRAC.

Se midió la pérdida de la capacidad antioxidante a diferentes tiempos por el método de CUPRAC. Se hierven los extractos crudos a 100° C a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60, 90, 120 minutos).

Los experimentos de degradación se realizaron con extractos de *Clitocybe geotropa*, *Hygrophorus gliocyclus* y *Clitocybe alexandrii*.

La recta patrón utilizada es la misma que en el apartado anterior y también son coincidentes los factores de dilución. La capacidad antioxidante se expresa en µg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco. A partir de ahí se obtienen las tablas de tanto por ciento (%) de degradación respecto del tiempo y las gráficas correspondientes.

Tabla R9. Método del CUPRAC. Degradación (%) a 90° C

Tiempo (min)	CG Sombrero	CG Pie	HG Sombrero	HG Pie	CA Sombrero	CA Pie
0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
15	94,80 ± 1,90	90,66 ± 8,73	90,69 ± 4,56	93,28 ± 1,87	98,97 ± 3,69	94,60 ± 2,20
30	71,24 ± 2,74	70,14 ± 6,59	83,36 ± 6,33	73,11 ± 2,79	76,58 ± 2,80	76,42 ± 0,43

60	51,00 ± 2,40	57,59 ± 5,89	47,34 ± 1,44	48,89 ± 3,04	38,51 ± 2,13	51,86 ± 1,40
90	35,82 ± 2,90	37,06 ± 2,10	36,74 ± 2,14	38,13 ± 2,9	35,79 ± 2,93	35,80 ± 2,93
120	21,22 ± 1,46	25,74 ± 1,63	26,61 ± 0,40	28,24 ± 1,72	25,98 ± 1,89	30,10 ± 0,32

Figura R15. Método de CUPRAC. Degradación a diferentes tiempos. *Clitocybe geotropa* (Sombrero y pie)

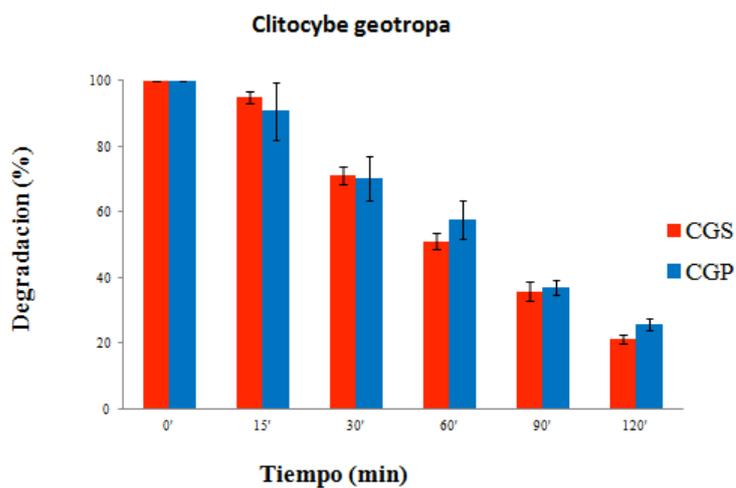


Figura R16. Método de CUPRAC. Degradación a diferentes tiempos. *Hygrophorus gliocyclus* (Sombrero y pie)

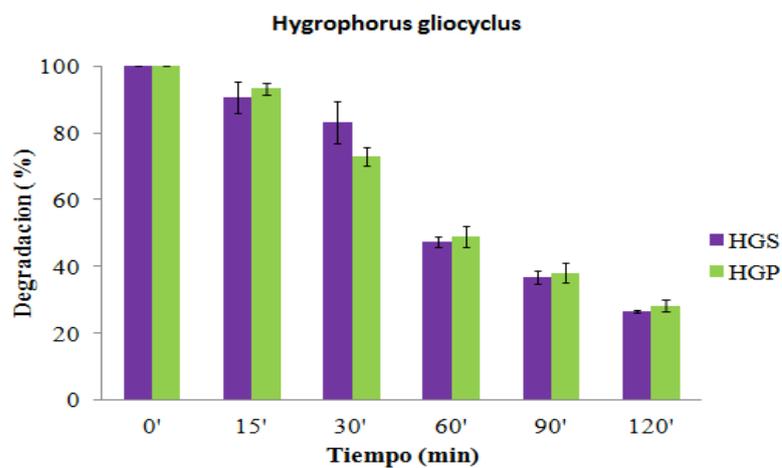
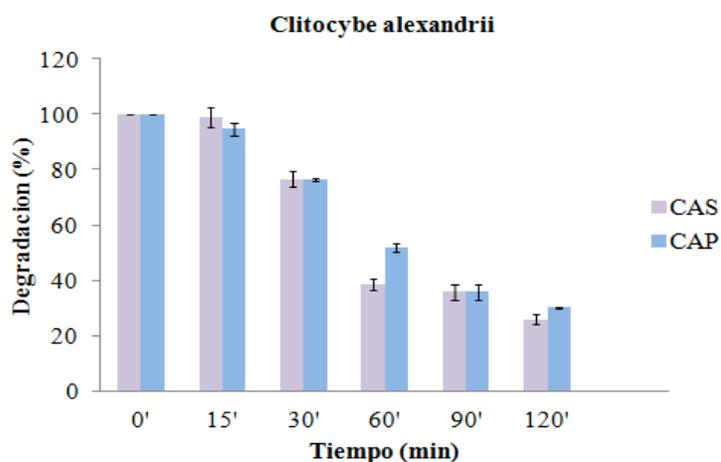


Figura R17. Método de CUPRAC. Degradación a diferentes tiempos. *Clitocybe alexandrii*.
(Sombrero y pie)



4.8. Medida de la degradación de los fenoles totales y de la capacidad antioxidante a diferentes temperaturas por los métodos de Folin – Ciocalteu y método de CUPRAC.

4.8.1. Medida de la degradación de los fenoles totales a diferentes temperaturas (sin calentar, 20°C, 50°C, 70°C y 90°C) en un tiempo de 30 minutos por el método de Folin – Ciocalteu.

Se midió la degradación de los fenoles totales a diferentes temperaturas (sin calentar, 20°C, 50°C, 70°C, 90°C) por el método de Folin – Ciocalteu en un mismo tiempo de 30 minutos.

Tabla R11. Método del Folin-Ciocalteu. Degradación diferentes temperaturas. Tiempo 30 minutos

Temperatura 0°C	CG Sombrero	CG Pie	HG Sombrero	HG Pie	CA Sombrero	CA Pie
Sin calentar	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
20	94,80 ± 1,90	90,66 ± 8,73	90,69 ± 4,56	93,28±1,87	98,97 ± 3,69	94,60 ± 2,20
50	71,24 ± 2,74	70,14 ± 6,59	83,36 ± 6,33	73,11±2,79	76,58 ± 2,80	76,42 ± 0,43
70	51,00 ± 2,40	57,59 ± 5,89	47,34 ± 1,44	48,89±3,04	38,51 ± 2,13	51,86 ± 1,40
90	35,82 ± 2,90	37,06 ± 2,10	36,74 ± 2,14	38,13 ± 2,9	35,79 ± 2,93	35,80 ± 2,93
	21,22 ± 1,46	25,74 ± 1,63	26,61 ± 0,40	28,24±1,72	25,98 ± 1,89	30,10 ± 0,32

Figura R18. Método de Folin-Ciocalteu. Degradación a diferentes temperaturas. Sin calentar SC, 20°, 50°, 70° y 90° grados a 30 minutos. *Clitocybe geotropa*.

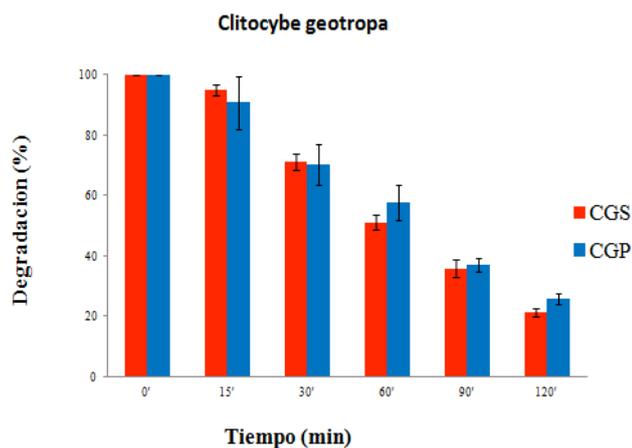


Figura R19. Método de Folin-Ciocalteu. Degradación a diferentes tiempos. Sin calentar SC, 20°, 50°, 70° y 90° grados a 30 minutos. *Hygrophorus gliocyclus*.

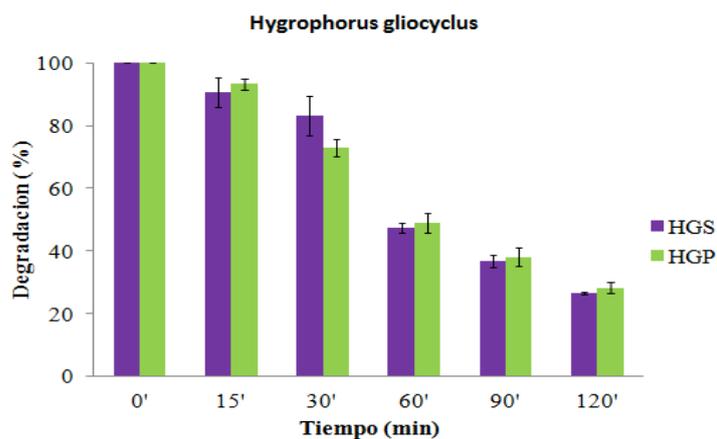
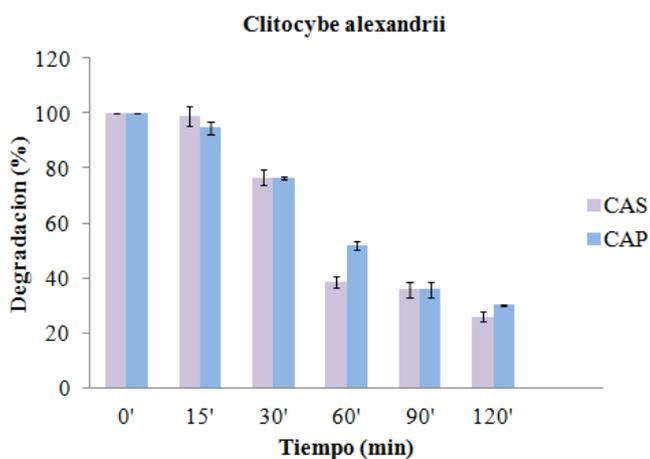


Figura R20. Método de Folin-Ciocalteu. Degradación a diferentes tiempos. Sin calentar SC, 20°, 50°, 70° y 90° grados a 30 minutos. *Clitocybe alexandrii*



4.8.2. Medida de la pérdida de capacidad antioxidante a diferentes temperaturas (sin calentar, 20°C, 50°C, 70°C y 90°C) por el método de CUPRAC.

Se midió la pérdida de la capacidad antioxidante a diferentes temperaturas (sin calentar, 20°C, 50°C, 70°C, 90°C) por el método de CUPRAC en un mismo tiempo de 30 minutos.

Tabla R12. Método del CUPRAC. Degradación a diferentes temperaturas. Tiempo 30 minutos

Temperatura 0°C	CG Sombrero	CG Pie	HG Sombrero	HG Pie	CA Sombrero	CA Pie
Sin calentar	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
20	95,27 ± 2,55	93,86 ± 7,66	89,50 ± 7,32	90,60 ± 2,34	89,24 ± 3,60	93,09 ± 4,13
50	88,59 ± 1,39	87,70 ± 8,74	82,38 ± 5,63	85,68 ± 3,70	83,28 ± 3,69	82,16 ± 2,22
70	75,90 ± 5,61	76,05 ± 6,58	78,93 ± 5,38	77,60 ± 2,38	75,50 ± 2,47	76,92 ± 2,21
90	49,44 ± 2,69	45,66 ± 5,19	36,74 ± 2,14	49,69 ± 2,11	41,06 ± 7,37	46,63 ± 6,84

Figura R21. Método de CUPRAC. Degradación a diferentes temperaturas. Sin calentar SC, 20°, 50°, 70° y 90° grados Centígrados a 30 minutos. *Clitocybe geotropa* (Sombrero y pie)

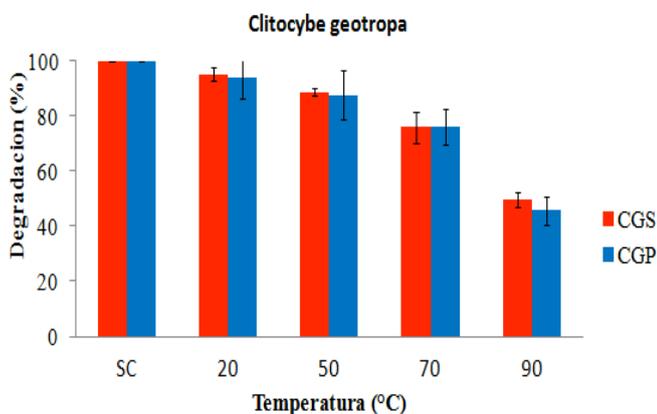


Figura R22. Método de CUPRAC. Degradación a diferentes temperaturas. Sin calentar SC, 20°, 50°, 70° y 90° grados Centígrados a 30 minutos. *Hygrophorus gliocyclus* (Sombrero y pie)

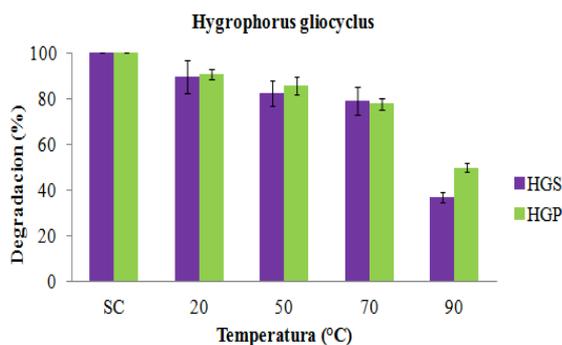
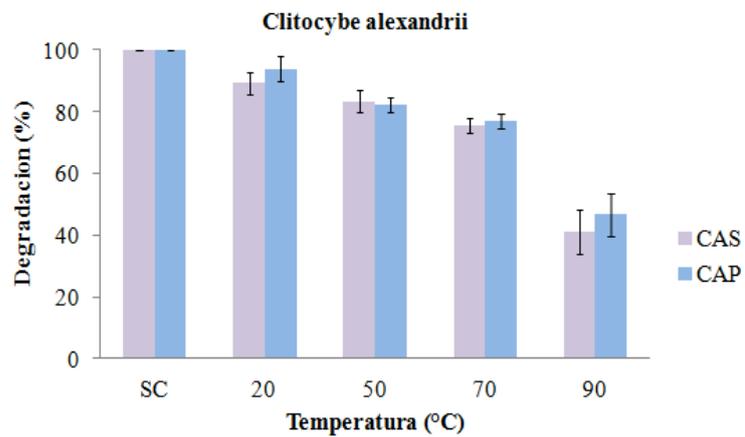


Figura R23. Método de CUPRAC. Degradación a diferentes temperaturas. Sin calentar SC, 20°, 50°, 70° y 90° grados Centígrados a 30 minutos. *Clitocybe alexandrii* (Sombrero y pie)



5. DISCUSIÓN

Desde tiempos inmemoriales las setas comestibles son fuente de distintos nutrientes. Cabe resaltar la presencia en algunas setas de compuestos con actividad farmacológica y metabólica que son de gran utilidad nutricional.

Entre los compuestos con actividad farmacológica más relevantes se encuentran determinados glucanos, algunos de los cuales presentan actividad antitumoral e inmunoestimulante.

Otros compuestos metabólicamente activos son los denominados polifenoles. Los polifenoles poseen gran capacidad antioxidante y antirradicalaria y por ello las setas comestibles se consideran como una fuente de actividad antioxidante importante desde el punto de vista nutricional y gastronómico.

Las tres setas comestibles estudiadas en el presente trabajo contienen gran cantidad de fenoles, en particular la *Clitocybe geotropa*. Esta seta es la especie con mayor cantidad de fenoles y mayor actividad antioxidante. Las tres setas poseen una buena capacidad antioxidante medida por el método CUPRAC, método que posee una elevada sensibilidad. Por lo tanto, los extractos de estas tres setas podrían utilizarse como fuente natural de antioxidantes.

Las setas comestibles suelen consumirse previa cocción por procedimientos con temperaturas cercanas a los 90°C. Por ello se consideró que la incubación a estas temperaturas podría afectar al contenido de fenoles y a las capacidades antioxidantes. Los resultados obtenidos en el presente trabajo así lo indican. Las temperaturas superiores a los 50°C afectan al contenido de fenoles de una manera significativa. En contraste afectan menos a la capacidad antioxidante. Esto indica que estas actividades antioxidantes dependen no solo de fenoles, y que otras moléculas contribuyen a dichos efectos, por ejemplo las vitaminas C y E y los beta-carotenos.

Las setas comestibles se ingieren en pequeñas cantidades, normalmente como acompañamiento de otros alimentos, por los aromas y sabores

especiales que las caracterizan. La contribución de las setas comestibles a la ingesta total de alimentos es reducida y por ello la ingesta de antioxidantes de setas es también limitada.

Los procedimientos de medida utilizados en este trabajo son fiables y ampliamente aceptados, y aunque han sido adaptados en el laboratorio de los profesores Tomas Girbés y Pilar Jiménez, han sido publicados previamente con gran detalle por diversos grupos de investigación, en particular el dirigido por el profesor Ronald Prior.

Los valores obtenidos en este trabajo son relativos ya que pertenecen a ejemplares recogidos en Castilla y León en determinadas zonas geográficas sometidas a climatología y condiciones ambientales diferentes. Se sabe que estos parámetros varían en función de las zonas de recogida. Se sabe además que estas setas pueden acumular también metales pesados que pueden considerarse tóxicos en función de la dosis que se ingiera por lo que hay que tener cuidado en la recogida y utilización culinaria.

6. CONCLUSIONES

1. Las tres setas estudiadas en el presente trabajo tienen una humedad en el entorno del 90 % y un contenido en cenizas referidas a peso húmedo en el entorno del 1 % y en cenizas referidas a peso seco en el entorno del 10 %.

2. De las setas comestibles estudiadas en este trabajo *Clitocybe geotropa* es la que más cantidad de fenoles totales contiene, siendo de aproximadamente 2.900 µg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso húmedo en el sombrero y aproximadamente 2.000 µg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso húmedo en el pie.

3. *Clitocybe geotropa* tiene una mayor capacidad antioxidante cuantificada por el método de CUPRAC. Los valores obtenidos fueron 169 µg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso húmedo en el sombrero y 110 µg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso húmedo en el pie.

4. *Clitocybe geotropa* tiene también una mayor capacidad antirradicalaria cuantificada por el método del radical DPPH. Los valores obtenidos fueron 180 µg equivalentes de Trolox por gramo de peso húmedo en el sombrero y 303 µg equivalentes de Trolox por gramo de peso húmedo en el pie.

5. Los diferentes extractos crudos de *Clitocybe geotropa*, *Hygrophorus gliocyclus* y *Clitocybe alexandrii* presentan sensibilidad a la temperatura. La medida obtenida de la degradación de los fenoles totales y la pérdida de capacidad antioxidante por calentamiento (90° C) de los diferentes extractos crudos a los 15 minutos fue del orden del 21 %, a los 60 minutos del orden del 58 % y a los 120 minutos se obtuvieron degradaciones superiores al 80 % por los métodos de Folin-Ciocalteu y CUPRAC.

6. La medida obtenida de la degradación de los fenoles totales y la pérdida de capacidad antioxidante por calentamiento a diferentes temperaturas durante 30 minutos de los diferentes extractos crudos de *Clitocybe geotropa*, *Hygrophorus gliocyclus* y *Clitocybe alexandrii* fueron del orden del 15 % a 20° C, del 20 % a 50° y del 30% a 90°C.

7. BIBLIOGRAFÍA.

Albanes, D.; Heinonen, O. P.; Huttunen, J. K.; Taylor, P. R.; Virtamo, J.; Edwards, B. K.; Haapakoski, J.; Rautalahti, M.; Hartman, A. M.; Palmgren, J.; et al. Effects of R-tocopherol and β -carotene supplements on cancer incidence in the R-Tocopherol β -Carotene Cancer Prevention Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995, 62 (6 Suppl.), 1427S_1430S.

Arrate Lacalle. Antioxidantes en alimentación: diferentes formas de expresar su actividad antioxidante. Tipos de unidades y métodos de análisis. Conferencia. Barcelona, 2007.

Arroyo Acevedo J.L. Curso Nacional teórico Práctico Antioxidantes en Recursos Fitoterapéuticos. Fuentes vegetales de moléculas frente a estrés oxidativo y nitrosativo en sistemas biológicos. Octubre 2012.

Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL. (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol*; 14(10):1269-1273.

Barros L, Cruz T, Baptista P, Estevinho LM, Ferreira IC. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chem Toxicol.* 2008 Aug;46(8):2742-7. doi: 10.1016/j.fct.2008.04.030. Epub 2008 Apr 29.

Barros L, Venturini BA, Baptista P, Estevinho LM, Ferreira IC. Chemical composition and biological properties of portuguese wild mushrooms: a comprehensive study. *J Agric Food Chem.* 2008 May 28;56(10):3856-62. doi: 10.1021/jf8003114. Epub 2008 Apr 25.

Barros L, Baptista P, Correia DM, Morais JS, Ferreira IC. Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *J Agric Food Chem.* 2007 Jun 13;55(12):4781-8. Epub 2007 May 12.

Bjelakovic, G.; Nikolova, D.; Gluud, L. L.; Simonetti, R. G.; Gluud, C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.* 2007, 297 (8), 842_857.

Borchers AT, Stern JS, Hackman RM, Keen CL, Gershwin ME. Mushrooms, tumors, and immunity. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999 Sep;221(4):281-93.

Bridle, P., Garcia-Viguera, C. (1997) Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC *Food Chemistry*, 59: 299-304.

Cejpek K, Malousova I, Konecny M and Velisek J. Antioxidant activity variously prepared elderberry foods and supplements. *Czech. Food Sci*. Vol 29. 45-49 (2009).

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(2):95-134.

De Kok, M. C. M.; de Waard, P.; Wilms, L. C.; van Breda, S. G. J. Diesner SC, Untersmayr E, Pietschmann P, Jensen-Jarolim E.(2011) Food allergy: only a pediatric disease. *Gerontology*; 57(1): 28-32.

Dikeman CL, Bauer LL, Flickinger EA, Fahey GC Jr. Effects of stage of maturity and cooking on the chemical composition of select mushroom varieties. *J Agric Food Chem*. 2005 Feb 23;53(4):1130-8.

Diplock, A. T.; Charleux, J. L.; Crozier-Willi, G.; Kok, F. J.; Rice-Evans, C.; Roberfroid, M.; Stahl, W.; Vina-Ribes, J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br. J. Nutr.* 1998, 80 (Suppl. 1), S77_S112 (review).

Dotan, Y.; Pinchuk, I.; Lichtenberg, D.; Leshno, M. Decision analysis supports the paradigm that indiscriminate supplementation of vitamin E does more harm than good. *Arterioscler. Thromb.*

Falandysz J, Bona H, Danisiewicz D. Silver content of wild-grown mushrooms from northern Poland. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1994 Sep;199(3):222-4.

Ferreira IC, Barros L, Abreu RM. Antioxidants in wild mushrooms. *Vasc. Biol*. 2009, 29 (9), 1304_1309. *Curr Med Chem*. 2009;16(12):1543-60.

Font Quer, P. (1999) *Plantas Medicinales: El Dioscorides Renovado*. Península, Barcelona.

Fortin H, Tomasi S, Delcros JG, Bansard JY, Boustie J. In vivo antitumor activity of clitocine, an exocyclic amino nucleoside isolated from *Lepista inversa*. *ChemMedChem*. 2006 Feb;1(2):189-96.

Fu L, Chen H, Dong P, Zhang X, Zhang M. Effects of ultrasonic treatment on the physicochemical properties and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from mushroom *Inonotus obliquus*. *J Food Sci*. 2010 May;75(4):C322-7. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01590.x.

Girbés T, Ferreras JM, Arias FJ, Stirpe F.(2004) Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini-Rev Med Chem*; 4: 461-476.

Gomez-Cabrera, M. C.; Borrás, C.; Pallardó, F. V.; Sastre, J.; Ji, L. L.; Viana, J. Decreasing xanthine oxidase mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J. Physiol.* (London) 2005, 567, 113–120.

Guillamón E, García-Lafuente A, Lozano M, D'Arrigo M, Rostagno MA, Villares A, Martínez JA. Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*. 2010 Oct;81(7):715-23. doi: 10.1016/j.fitote.2010.06.005. Epub 2010 Jun 13.

Guo YJ, Deng GF, Xu XR, Wu S, Li S, Xia EQ, Li F, Chen F, Ling WH, Li HB. Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible mushrooms.

Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol*. 1956, 11, 298–300.

Harman, D. The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981;78 (11), 7124_7128.

Hayes, J. D.; McMahon, M.; Chowdry, S.; Dinkova-Kostova, A. T. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the keap1-Nrf2 pathway. *Antioxid. Redox Signal.* 2010, 13, 1713–1749.

He JZ, Ru QM, Dong DD, Sun PL. Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from four common edible mushrooms. *Molecules.* 2012 Apr 11;17(4):4373-87. doi: 10.3390/molecules17044373.

Heleno SA, Barros L, Martins A, Queiroz MJ, Santos-Buelga C, Ferreira IC. Phenolic, polysaccharidic, and lipidic fractions of mushrooms from northeastern Portugal: chemical compounds with antioxidant properties. *J Agric Food Chem.* 2012 May 9;60(18):4634-40. doi: 10.1021/jf300739m. Epub 2012 Apr 27.

Huang, F.; Nie, C.; Yanf, Y.; Yue, W.; Ren, Y. Selenite induces redox-dependent Bax activation and apoptosis in colorectal cancer cells. *Free Radical Biol. Med.* 2009, 46, 1186–1196.

Huang PL, Chen HC, Kung HF, Huang PL, Huang P, Huang HI, Lee-Huang S.(1992) Anti-HIV plant proteins catalyze topological changes of DNA into inactive forms. *Biofactors*; 4: 37-41.

Jeney, V.; Balla, J.; Yachie, A.; Varga, Z.; Vercellotti, G. M.; Eaton, J. W.; Balla, G. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood.* 2002, 100 (3), 879–887.

Jeong SC, Koyyalamudi SR, Hughes J, Khoo C, Bailey T, Marrisudi K, Park JP, Kim JH, Song CH. Antioxidant and immunomodulating activities of exo- and endopolysaccharide fractions from submerged mycelia cultures of culinary-medicinal mushrooms. *Int J Med Mushrooms.* 2013;15(3):251-66.

John W. Finley, Ah-Ng Kong, Korry J. Hintze, Elizabeth H. Jeffery, Li Li Ji and Xin Gen Lei. Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2011, 59, 6837–6846).

Jones, D. P. Redefining oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 2006, 8, 1865–1879.

Kalb VF Jr, Bernlohr RW. (1977) A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Anal Biochem*; 82(2):362-371.

Kanwar J, Taskeen M, Mohammad I, Huo C, Chan TH, Dou QP.(2012) Recent advances on tea polyphenols. *Front Biosci* (Elite Ed). 2012 Jan 1; 4:111-31.

Kiselova Y, Ivanova D, Chervenkov T, Gerova D, Galunska B, Yankova T. Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. *Phytother Res.* 2006, 20(11):961-965).

Larrea Posadas, J. Obtención de extractos polifenólicos a partir de uva para uso alimentario. Máster de Tecnología y calidad de las industrias agroalimentarias. Septiembre, 2012.

Lemieszek M, Rzeski W. Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. *Contemp Oncol(Pozn)*. 2012;16(4):285-9. doi: 10.5114/wo.2012.30055. Epub 2012 Sep 29.

Mattila P, Suonpää K, Piironen V. Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition.* 2000 Jul-Aug;16(7-8):694-6.

Mayne, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.* 2003, 133, 933S–940S.

Murcia MA, 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 Oct;65(10):1614-22

Nagl M, Eder R, Wendelin S, Reich G, Sontang G. Analytical and quantitative analysis of phenolic constituents in elderberry juices. *Nutrition.* Vol 30/NR.10 (2006), 409-415.

Ness, A.; Egger, M.; Smith, G. D. Role of antioxidant vitamins in prevention of cardiovascular diseases. Meta-analysis seems to exclude benefit of vitamin C supplementation. *Br. Med. J.* 1999, 319 (7209), 577.

Pellegrini N, Miglio C, Del Rio D, Salvatore S, Serafini M, Brighenti F. Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *Int J Food Sci Nutr.* 2009;60 Suppl 2:12-22. doi: 10.1080/09637480802175212. Epub 2009 Mar 2.

Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53 (10).

Queirós B, Barreira JC, Sarmiento AC, Ferreira IC. In search of synergistic effects in antioxidant capacity of combined edible mushrooms. *Int J Food Sci Nutr.* 2009;60 Suppl 6:160-72.

Rajewska J, Bałasińska B. [Biologically active compounds of edible mushrooms and their beneficial impact on health]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2004;58:352-7.

Reis FS, Pereira E, Barros L, Sousa MJ, Martins A, Ferreira IC. Biomolecule profiles in inedible wild mushrooms with antioxidant value. *Molecules.* 2011 May 25;16(6):4328-38. doi: 10.3390/molecules16064328.

Ren L, Perera C, Hemar Y. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. 4290_4302 *Food Funct.* 2012 Nov; 3(11):1118-30. doi: 10.1039/c2fo10279j.

Ristow, M.; Zarse, K.; Oberbach, A.; Klötting, N.; Birringer, M.; Kiehntopf, M.; Stumvoll, M.; Kahn, C. R.; Blüher, M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009 106 (21), 8665_8670.

Robaszkiewicz A, Bartosz G, Lawrynówicz M, Soszyński M. The Role of Polyphenols, β -Carotene, and Lycopene in the Antioxidative Action of the

Extracts of Dried, Edible Mushrooms. *J Nutr Metab.* 2010;2010:173274. doi: 10.1155/2010/173274. Epub 2010 Dec 23.

Schönthal A.H.(2011) Adverse effects of concentrated green tea extracts. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011, 55,874-885.

Shimizu M, Adachi S, Masuda M, Kozawa O, Moriwaki H. (2011) Cancer chemoprevention with green tea catechins by targeting receptor tyrosine kinases. *Mol Nutr Food Res.* 55(6), 832-43.

Sloan AE. Top 10 global food trends. *Food Technol* 2005; 59(4):20–32.

Szajdek A, Brorowsky E.J. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods Hum Nutr.* (2008) 63: 147-15.

Timberlake C.F, Bridle, P. (1977) Anthocyanins: colour augmentation with catechin and acetaldehyde. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 28:539-544.

Tlili N, Khaldi A, Triki S, Munné-Bosch S. Phenolic compounds and vitamin antioxidants of caper (*Capparis spinosa*). *Plant Foods Hum Nutr* (2010) 65:260-265.

Thole J, Kraft T, Sueiro L, Kang Y, Gills J, Cuendent M, Pezzuto J, Seigle D, Lila M. A comparative evaluation of the anticancer properties of European and American elderberry fruits. *J. Med. Food.* 9(4), 2006, 498-504.

Vanaclocha B, Cañigueral S.(2003) *Fitoterapia, Vademécum de Prescripción*, 4ª edición. Barcelona: Masson.

Vaz JA, Heleno SA, Martins A, Almeida GM, Vasconcelos MH, Ferreira IC. Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: in vitro antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines. *Food Chem Toxicol.* 2010 Oct;48(10):2881-4. doi: 10.1016/j.fct.2010.07.021. Epub 2010 Jul 18.

Wasser SP. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011 Mar;89(5):1323-32. doi: 10.1007/s00253-010-3067-4. Epub 2010 Dec 29.

Witkowska AM, Zujko ME, Mirończuk-Chodakowska I. Comparative study of wild edible mushrooms as sources of antioxidants. *Int J Med Mushrooms.* 2011;13(4):335-41.