



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

**Termosensibilidad de los fenoles totales y
de la capacidad antioxidante y
antirradicalaria de los hongos comestibles
Russula torulosa, *Lepista personata* y
*Lepista inversa***

Presentado por *Carmine Caruso* 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. Carmine Caruso puede ser presentado como Trabajo Fin de Máster en Investigación en Ciencias de la Salud de la Universidad de Valladolid.

Valladolid, a 1 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

RS. *Russula Torulosa*

LP. *Lepista personata*

LI. *Lepista Inversa*

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. Asimismo agradezco a Santiago de Castro Alfageme (Junta de Castilla y León), 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. Estructura	9
1.4. Reproducción	11
1.5. Fisiología de los hongos	12
1.6. Ecología de los hongos	13
1.7. Utilización de los hongos	14
1.8. Clasificación	15
1.9. Propiedades nutricionales de las setas	16
1.10. Propiedades medicinales de las setas	17
1.11. <i>Russula torulosa</i>	18
1.12. <i>Lepista personata</i>	20
1.13. <i>Lepista inversa</i>	21
1.14. Salud humana, efecto antioxidante y radicales libres (RLs)	23
1.15. Moléculas diana de los radicales libres	23
1.16. Antioxidantes	24
1.17. Compuestos fenólicos	25
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Material de laboratorio	30
3.1.1. Equipos	29
3.1.2. Material fungible	29
3.1.3. Reactivos químicos	30
3.1.4. Materiales biológicos	30
3.2. Determinación del contenido en humedad de los hongos	30
3.3. Determinación del contenido en cenizas de los hongos	32

3.4.	Obtención de los extractos	34
3.5.	Método de Folin-Ciocalteu	35
3.6.	Método de CUPRAC	36
3.7.	Método del radical DPPH	37
4.	RESULTADOS	39
4.1.	Humedad	40
4.2.	Determinación de cenizas	40
4.2.1.	Cenizas peso húmedo	40
4.2.2.	Cenizas peso seco	41
4.3.	Volúmenes de los extractos crudos de hongos	42
4.4.	Medida de de los fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	42
4.5.	Medida de la capacidad antioxidante por el método de CUPRAC	43
4.6.	Medida de la capacidad antirradicalaria por el método del radical DPPH	45
4.7.	Medida de la degradación por temperatura a 90°C y a diferentes tiempos de los fenoles totales, de la capacidad antioxidante y de la capacidad antirradicalaria por el método de Folin – Ciocalteu, método de CUPRAC y método del radical DPPH respectivamente	47
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	49

4.7.3.	Medida de la pérdida de capacidad antirradicalaria por temperatura a 90° C y a diferentes tiempos por el método del radical DPPH	51
4.8.	Medida de la degradación de los fenoles totales, de la capacidad antioxidante y de la capacidad antirradicalaria 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, método de CUPRAC y método del radical DPPH	53
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	53
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	55
4.8.3.	Medida de la pérdida de capacidad antirradicalaria a diferentes temperaturas (sin calentar, 20°C, 50°C, 70°C y 90°C) en un tiempo de 30 minutos por el método del radical DPPH	57
5.	DISCUSIÓN	59
6.	CONCLUSIONES	62
7.	BIBLIOGRAFÍA	64

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características generales del reino fungi

Los hongos (reino fungi) no realizan la fotosíntesis y son con frecuencia parásitos. Algunas veces se clasifican como plantas. Su pared celular puede estar compuesta de celulosa, pero en algunas ocasiones está constituida por quitina, una sustancia que se encuentra en el exoesqueleto de ciertos insectos y artrópodos.

1.2. Hongos

Los hongos son grupo diverso de organismos unicelulares o pluricelulares que se alimentan mediante la absorción directa de nutrientes.

Los alimentos se disuelven mediante enzimas que secretan los hongos; después se absorben a través de la fina pared de la célula y se distribuyen por difusión simple en el protoplasma. Junto con las bacterias, los hongos son los causantes de la putrefacción y descomposición de toda la materia orgánica. La disciplina científica que estudia los hongos se llama micología.

Los hongos figuraban en las antiguas clasificaciones como una división del reino plantas (*plantae*). Sin embargo, en la actualidad los científicos los consideran un grupo completamente separado, que evolucionó a partir de flagelados sin pigmentos. Ambos grupos se incluyen dentro del reino protistas, o bien se coloca a los hongos como un reino aparte, debido a la complejidad de su organización. Hay unas cien mil especies conocidas de hongos.

1.3. Estructura

La mayoría de los hongos están constituidos por finas fibras que contienen protoplasma, llamadas hifas. Éstas a menudo están divididas por tabiques llamados septos. En cada hifa hay uno o dos núcleos y el protoplasma se mueve a través de un diminuto poro que ostenta el centro de cada septo. No obstante, hay un filo de hongos, que se asemejan a algas,

cuyas hifas generalmente no tienen septos y los numerosos núcleos están esparcidos por todo el protoplasma. Las hifas crecen por alargamiento de las puntas y también por ramificación. La proliferación de hifas, resultante de este crecimiento, se llama micelio.

Dentro de la estructura de una seta se podrían distinguir las siguientes partes:

Sombrero o píleo, es la parte más carnosa de una seta. En los basidiomycetes, está cubierto con una capa fina llamada cutícula y generalmente tiene forma de paraguas. Podemos estudiarlo por su talla, forma, estructura, tacto, color, ornamentación, margen, etc. El sombrero es la parte de la seta que más llama nuestra atención en el bosque por nuestro punto de vista elevado sobre ésta.

Láminas. El himenio o parte inferior del sombrero de la seta, (carpóforo) es dónde se alojan los órganos que producen las esporas (parte fértil). A menudo está compuesto por láminas (especie de tabiques de la parte inferior del sombrero) y lamélulas (estas de menor tamaño) también puede estar compuesto por pliegues o falsas láminas, o tubos terminados en poros, por pequeños agujeros y puede incluso ser totalmente liso.

Pie. Es la parte de la seta que está en contacto con el micelio y se une con el sombrero o (carpóforo.) En el pie pueden apreciarse tres caracteres fundamentales: la cortina, el anillo o faldilla y la volva. Los clasificaremos por: forma, longitud, anillo, superficie, inserción con el sombrero y con el pie, restos de cortina, volva, bulbo, consistencia, color, decoración, etc.

Anillo. El velo parcial cerrado, cubre y protege las láminas. (es el resto membranoso adherido al pie cuyo origen es la apertura y desarrollo del anillo.) Cuando la seta posee anillo, es otra de las partes clave para su

identificación. Muchos anillos son muy fugaces y se desprenden con facilidad de la seta por lo que habrá que mirar atentamente cualquier resto que podamos encontrar adherido al pie. los anillos pueden ser simples o dobles, fijos o móviles.

Volva. Es el resto del velo general que envuelve a toda la seta, parte de este queda adherido al pie en el desarrollo de algunas setas. (amanitas y volvarias). La volva es característica de unos pocos géneros. Muchas de las setas más peligrosas se encuentran entre el género amanita, (todas poseen volva.) para observar la volva es imprescindible sacar la seta entera de la tierra, (nos ayudaremos de una navaja), la volva suele ser una parte bastante frágil que está enterrada.

1.4. Reproducción

La mayoría de los hongos se reproducen por esporas, diminutas partículas de protoplasma rodeado de pared celular. El champiñón silvestre puede formar doce mil millones de esporas en su cuerpo fructífero; así mismo, el cuesco de lobo gigante puede producir varios billones.

Las esporas se forman de dos maneras. En el primer proceso, las esporas se originan después de la unión de dos o más núcleos, lo que ocurre dentro de una o de varias células especializadas. Estas esporas, que tienen características diferentes, heredadas de las distintas combinaciones de genes de sus progenitores, suelen germinar en el interior de las hifas. Los cuatro tipos de esporas que se producen de esta manera (oosporas, zigosporas, ascosporas y basidiosporas) definen los cuatro grupos principales de hongos. Las oosporas se forman por la unión de una célula macho y otra hembra; las zigosporas se forman al combinarse dos células sexuales similares entre sí. Las ascosporas, que suelen disponerse en grupos de ocho unidades, están contenidas en unas bolsas llamadas ascas. Las basidiosporas, por su parte, se

reúnen en conjuntos de cuatro unidades, dentro de unas estructuras con forma de maza llamadas basidios. El otro proceso más común de producción de esporas implica la transformación de las hifas en numerosos segmentos cortos o en estructuras más complicadas de varios tipos. Este proceso sucede sin la unión previa de dos núcleos. los principales tipos de esporas reproductivas formadas así son: oídios, conidios y esporangiosporas. Estas últimas se originan en el interior de unos receptáculos, parecidos a vesículas, llamados esporangios. la mayoría de los hongos producen esporas sexuales y asexuales.

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 y la levulosa (D-fructosa), 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

Las esporas y los fragmentos de hifas de los hongos pueden viajar por la atmósfera y recorrer grandes distancias.

Los quitridiomicetes y los mohos acuáticos abundan en los hábitats acuáticos. Ciertos ascomicetes y deuteromicetes son también frecuentes, tanto en agua dulce como salada. En los últimos años se han descubierto numerosos hongos en ríos y arroyos contaminados. Éstos participan en la purificación natural de las aguas residuales. Algunas de estas especies son de especial interés, puesto que causan enfermedades en los seres humanos.

El suelo es el medio ambiente típico de los hongos saprofitos, los cuales viven sobre restos orgánicos. También contiene hongos parásitos que pueden infectar a plantas y animales. Los mohos acuáticos y los mildiús son habitantes comunes del suelo, como lo son algunos ascomicetes y muchos deuteromicetes. Numerosos hongos descomponen la celulosa y las proteínas; de esta manera, toman parte activa en la formación del humus.

Ciertos hongos viven en simbiosis con algas formando unas estructuras características llamadas líquenes. La mayoría de los hongos liquénicos son ascomicetes, pero unas pocas especies son basidiomicetes. Los hongos que se asocian de manera íntima con las raíces de las plantas superiores producen un tipo especial de crecimiento de las hifas, dando lugar a las micorrizas. En éstas, una porción del micelio envuelve a las raíces con una capa blanca aterciopelada, y otra penetra a través de la corteza de las mismas. Ciertas plantas dependen de esta relación para desarrollarse adecuadamente. Algunas especies de champiñones son destacadas formadoras de micorrizas.

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

A pesar de que en muchos textos se emplean sistemas de clasificación relativamente complicados, los micólogos utilizan por lo común un sistema sencillo, que tiene la ventaja de ser cómodo de usar. Según este sistema, los cuatro filos principales son: oomicetes (*oomycota*), zigomicetes (*zygomycota*), ascomicetes (*ascomycota*) y basidiomicetes (*basidiomycota*) y sus respectivos individuos forman oosporas, zigosporas, ascosporas y basidiosporas. Una gran variedad de especies se colocan, de forma arbitraria, en un quinto filo: deuteromicetes (*deuteromycota*), también llamados hongos imperfectos. Se incluyen en este grupo aquellos hongos en los que sólo se conocen procesos

de multiplicación vegetativa. Sin embargo, la mayoría de esas especies están emparentadas con los ascomicetes.

Algunos otros filos se consideran hongos, o bien, grupos relacionados estrechamente con los hongos: actinomicetes (*actinomycoata*), y acrasiomycetes (*acrasiomycota*). Los actinomicetes, con hifas muy delicadas y una reproducción que suele ser mediante oídios o conidios, constituyen un grupo intermedio entre las bacterias y los hongos. A los mixomicetes, o mohos plasmodiales del fango verdaderos, algunos micólogos los clasifican con los hongos, y otros con los protistas semejantes a hongos. En este grupo la fase nutricional es una masa de protoplasma con forma ameboide carente de pared, denominada plasmodio.

La fase reproductiva está representada por células nadadoras, llamadas células invasoras, las cuales se impulsan por medio de dos flagelos de distinta longitud. Los plasmodioforomicetes se parecen a los mixomicetes en que ambos tienen células invasoras y un estado plasmodial. Los labirintulomicetes y los acrasiomycetes tienen algunas características semejantes a los mohos plasmodiales del fango, pero su estado nutricional (llamado pseudoplasmodio) es diferente.

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.

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

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

1.11. *Russula torulosa*

Descripción. Sombrero 4 a 8 cm de diámetro, primero convexo a convexo-aplanado; margen regular incurvado. Cutícula untosa al tacto, brillante, suavemente rugosa, de color rojo púrpura oscuro con matices violáceos, más o menos uniforme.

Figura I1. *Russula torulosa*



- Láminas. Numerosas, apretadas, adherentes, blancas a crema pálido.
- Pie. Cilíndrico, corto, carnosos, duro, algo rugoso de color rojo púrpura violáceo o carmín violáceo, uniforme y oscuro, a veces blanquecino en la base.
- Carne. Granulosa, gruesa, dura, blanca, rojiza bajo la cutícula, sabor acre, olor a manzana.
- Localización. Nace en otoño, bajo los pinos (*Pinus pinaster*).
- Comestible. Sabor acre.

- Observaciones. *Russula torulosa* es una especie que se caracteriza por su sabor acre y por el color púrpura violáceo del sombrero y pie que contrastan con el blanco-crema de las láminas.

1.12. *Lepista personata*

- Nombre común. Pie violeta, pie azul, inverniza
- Comestibilidad. Comestible

• Figura I2. *Lepista personata*



- La seta de pie violeta es uno de nuestros más preciados manjares de finales de otoño.
- Se trata de una de las especies de aparición más tardía, pues tolera razonablemente bien el frío, e incluso fuertes heladas, lo que hace que podamos recogerla a finales del otoño y comienzos del invierno.
- El rasgo más característico de esta seta es su pie, de color azulado a violeta, muy vivo en los ejemplares jóvenes y generalmente menos intenso según la edad y humedad. Es un pie corto y robusto en relación al tamaño total de la seta, y suele estar engrosado en la base.

- La seta de pie violeta aparece en grupos, formando hileras o corros de brujas, tal y como se aprecia en la imagen siguiente, donde se muestra una corta hilera de carpóforos recién emergidos. Su hábitat son los jardines, praderas de montaña o páramos.
- En ocasiones, *Lepista personata* aparece cerca de otras especies de su género, como *L. nuda* (seta de pie azul) o *L. sordida*, que también lucen pies de tintes azulados a violáceos. Sin embargo, *L. personata* se distingue claramente de ellas gracias al color blanquecino de sus láminas, ya que únicamente tiene violeta el pie, mientras que las otras dos especies citadas visten sus láminas, sus pies, e incluso sus sombreros, de tonos violáceos. La seta de pie violeta presenta un sabor muy intenso y aromático, que a algunas personas resulta demasiado fuerte, por lo que prefieren no consumirla en solitario. Sin embargo, para nuestro gusto, se trata de una seta que da mucho juego en la cocina, por lo que la consumimos de todas las maneras. Su carne es muy consistente y jugosa.

1.13. *Lepista inversa*

- Sombrero. De 5-10 cm. de diámetro. Cutícula de color uniforme en toda la superficie, ocre anaranjado u ocre rojizo. No es higrófana, por lo que no tiene el margen estriado, suele ser fino en los ejemplares adultos, y involuto en los jóvenes.
- Láminas. Color crema, oscurecen solo cuando son viejas, casi sin laminillas, fácilmente separables de la carne del sombrero.

- Figura I3. *Lepista inversa*



- Pie. Ligeramente curvado, más o menos cilíndrico, de tamaño similar o algo más corto que el sombrero, de color blanquecino o crema, volviéndose rojizo-sucio con la edad o con el roce, fibriloso y con el micelio blanco.
- Carne. Fina pero compacta, de color crema de joven, y ocre. Rojiza cuando envejece, elástica, dura, fibrosa. Olor suave (fúngico). Sabor ligeramente amargo en crudo. Microscopía: Esporas elipsoidales, de 4,5 x 3 micras.
- Hábitat. Muy común en otoño y con lluvias primaverales, en bosques de coníferas y de planifolios, robles y hayas, también sobre suelos ricos en humus, formando hileras o corros.
- Comestible. Aprovecha sólo el sombrero, el pie es fibroso.
- Confusiones. Fácilmente reconocible, presenta dos formas de colores bien diferenciados según su habitat, por lo que antes se consideraba que

eran dos especies distintas. Se le llamaba *Lepista inversa* a las rojizas que salen bajo coníferas, y *Lepista flaccida* a las ocre anaranjadas que salen bajo planifólios.

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 (J.E. Basterrechea, Tesis Doctoral 2013).

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.

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.

1.16. Antioxidantes

Los alimentos e ingredientes antioxidantes son un componente importante de la industria alimentaria (J.E. Basterrechea, Tesis Doctoral 2013). 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.

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 *Russula torulosa*, *Lepista personata*, *Lepista inversa*, 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 *Russula torulosa*, *Lepista personata*, *Lepista inversa*, 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:

- *Russula torulosa*: recogida en Aldeamayor de San Martín (Valladolid).
- *Lepista personata*: recogida en Bustillo de Oro (Zamora).
- *Lepista inversa*: recogida en Alcañices (Zamora).

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 porcelan con cenizas de Lepista inversa



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 P_2 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 *Russula torulosa*, *Lepista personata* y *Lepista inversa*. 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.

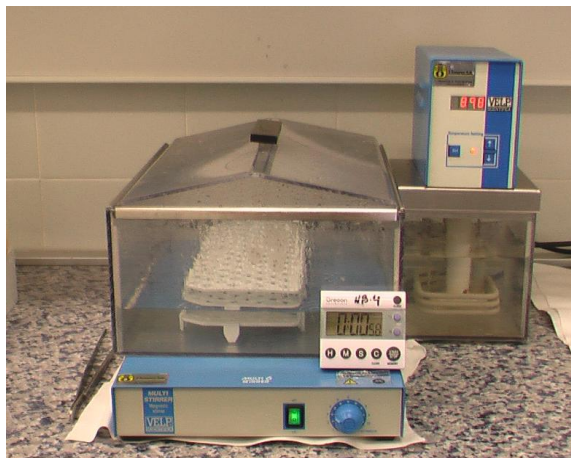
Los fenoles reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu dando un color azul propio de la reacción con fenoles. El reactivo de Folin-Ciocalteu se obtuvo ya preparado de casas comerciales (Sigma). El hecho de que la medida se realice a 760 nm, que es una longitud de onda muy elevada, en la que pueden 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.

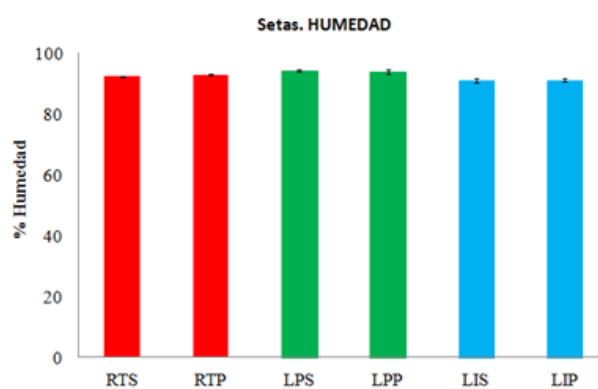
4. RESULTADOS

4.1. Humedad:

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

Hongo	Humedad (%) Sombrero	Humedad (%) Pie
<i>Russula torulosa</i>	92,28 ± 0,20	92,86 ± 0,19
<i>Lepista personata</i>	94,22 ± 0,39	93,79 ± 0,65
<i>Lepista inversa</i>	90,90 ± 0,69	91,03 ± 0,60

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



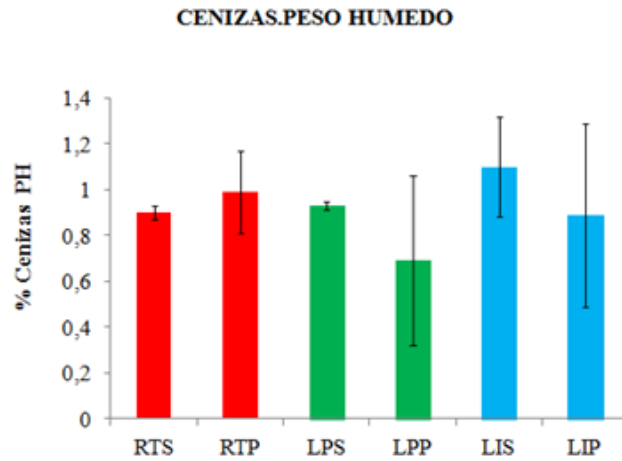
4.2. Determinacion de cenizas

4.2.1. Cenizas peso húmedo

Tabla R2. Cenizas (% del peso húmedo).

Hongo	Cenizas P.S (%) Sombrero	Cenizas P.S (%) Pie
<i>Russula torulosa</i>	0,90 ± 0,03	0,99 ± 0,18
<i>Lepista personata</i>	0,93 ± 0,02	0,69 ± 0,37
<i>Lepista inversa</i>	1,10 ± 0,22	0,89 ± 0,40

Figura R2. Cenizas (%). Peso húmedo

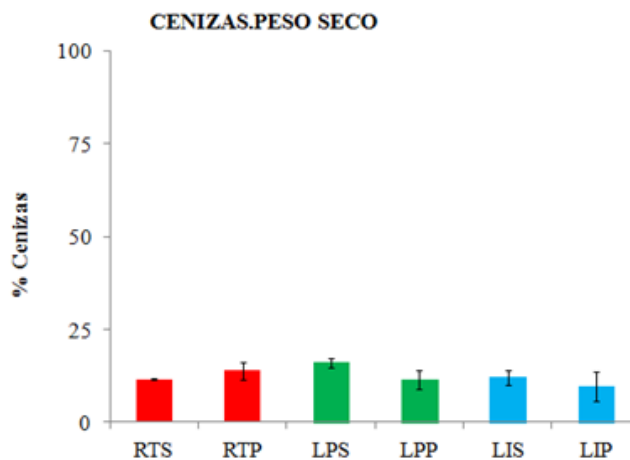


4.2.2. Cenizas peso seco

Tabla R3. Cenizas (% del peso seco)

Hongo	Cenizas P.H (%) Sombrero	Cenizas P.H (%) Pie
<i>Russula torulosa</i>	11,69 ± 0,10	13,88 ± 2,25
<i>Lepista personata</i>	16,06 ± 1,38	11,46 ± 2,45
<i>Lepista inversa</i>	12,07 ± 1,88	9,80 ± 3,91

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>Russula torulosa</i>	26 ml	27 ml
<i>Lepista personata</i>	35 ml	35 ml
<i>Lepista inversa</i>	26ml	29 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

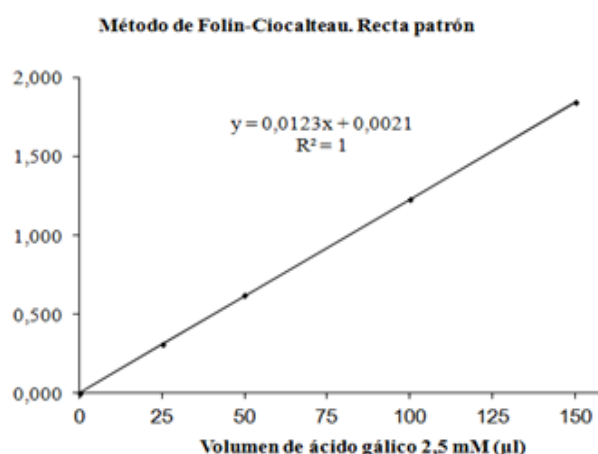
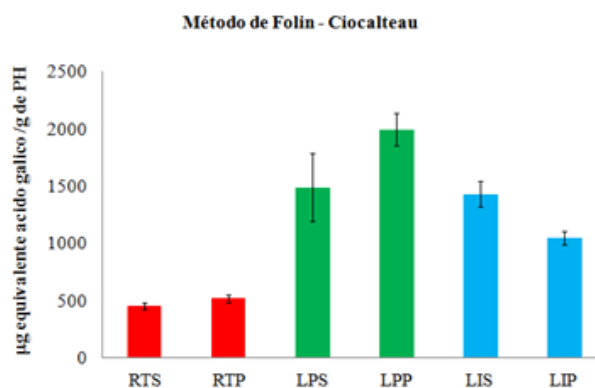


Tabla R5. Método de Folin-Ciocalteu. μg equiv. de ácido gálico/g de peso húmedo.

Método de Folin-Ciocalteu	μg equivalentes de ácido gálico/g de peso húmedo
RT. Sombrero	452 ± 28
RT. Pie	514 ± 31
LP. Sombrero	1486 ± 299
LP. Pie	1992 ± 143
LI. Sombrero	1426 ± 111
LI. Pie	1040 ± 58

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.

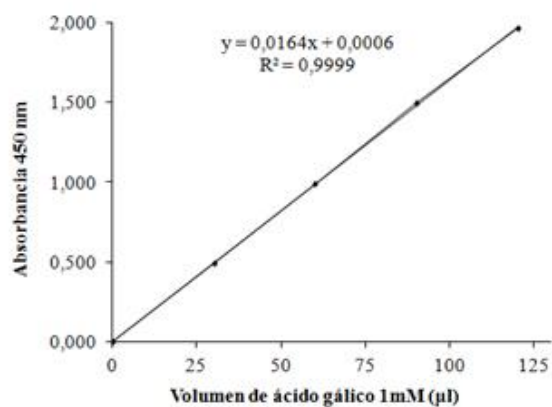


Tabla R6. Método de CUPRAC. µg equivalentes de ácido gálico/g de peso húmedo.

Método de CUPRAC	µg equivalentes de ácido gálico/g de peso húmedo
RT. Sombrero	16 ± 1
RT. Pie	14 ± 1
LP. Sombrero	207 ± 9
LP. Pie	213 ± 6
LI. Sombrero	63 ± 3
LI. Pie	51 ± 2

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

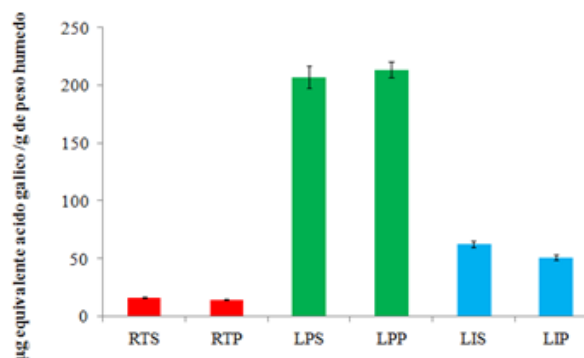
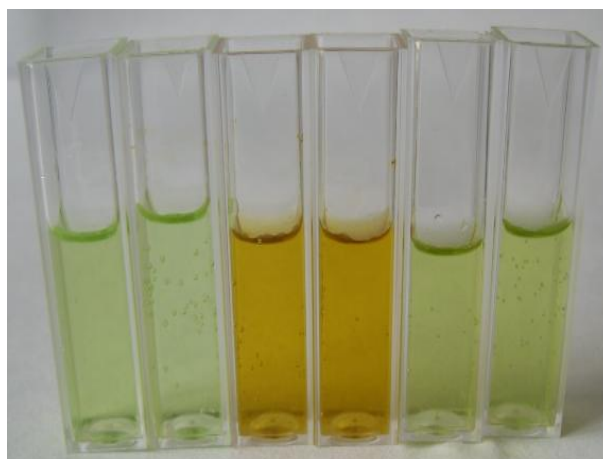


Figura R8. Método de CUPRAC. *Russula torulosa*, *Lepista personata* y *Lepista inversa*



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

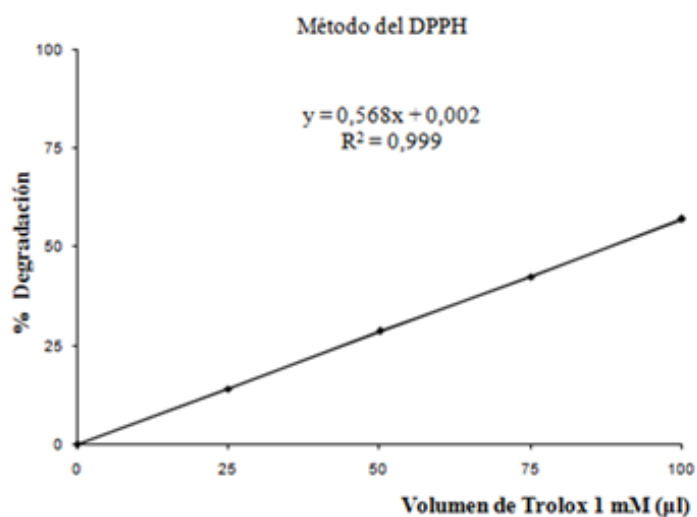


Tabla R7. Método del radical DPPH. μg equiv. de ácido Trolox/g de peso húmedo.

Método del radical DPPH	μg equivalentes de Trolox/g de peso húmedo
RT. Sombrero	37 ± 27
RT. Pie	42 ± 27
LP. Sombrero	293 ± 40
LP. Pie	598 ± 38
LI. Sombrero	213 ± 30
LI. Pie	135 ± 32

Figura R10. Método del radical DPPH. Recta patrón



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

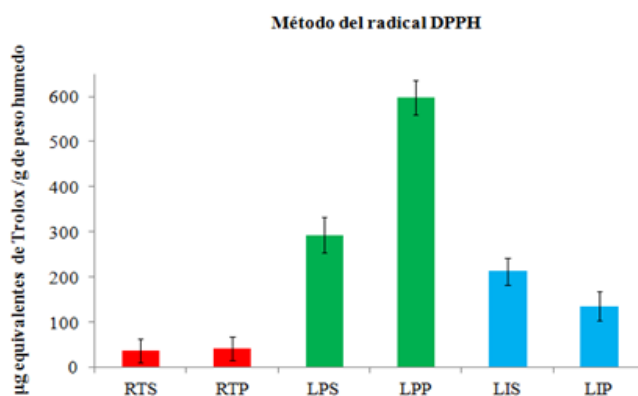
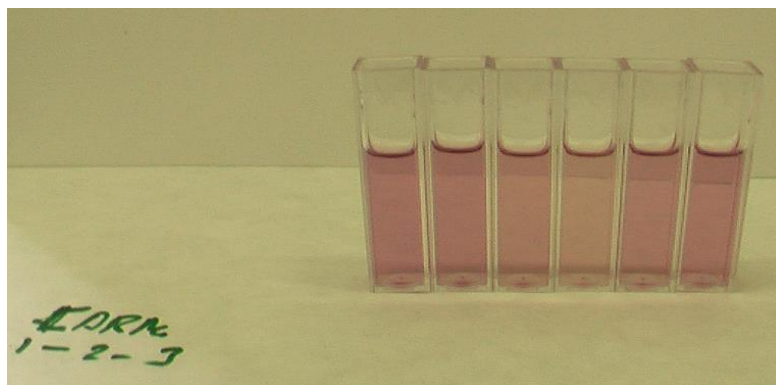


Figura R12. Método del radical DPPH. Sombreros de *Russula torulosa*, *Lepista personata* y *Lepista inversa*



4.7. Medida de la degradación por temperatura a 90°C y a diferentes tiempos de los fenoles totales, de la capacidad antioxidante y de la capacidad antirradicalaria por el método de Folin – Ciocalteau, método de CUPRAC y método del radical DPPH 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-Ciocalteau.

Se midió la degradación de los fenoles totales a diferentes tiempos por el método de Folin – Ciocalteau. 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)	RT Sombrero	RT Pie	LP Sombrero	LP Pie	LI Sombrero	LI Pie
0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
15	81 ± 7	83 ± 8	84 ± 7	80 ± 8	80 ± 4	82 ± 3
30	50 ± 7	58 ± 8	42 ± 4	40 ± 4	47 ± 2	51 ± 1
60	43 ± 7	43 ± 6	38 ± 4	32 ± 3	39 ± 2	40 ± 1
90	33 ± 7	33 ± 6	32 ± 3	28 ± 3	34 ± 2	30 ± 3
120	23 ± 6	26 ± 6	23 ± 3	23 ± 3	22 ± 1	25 ± 1

Figura R13. Método de Folin-Ciocalteu. Degradación a 90°C. *Russula Torulosa*

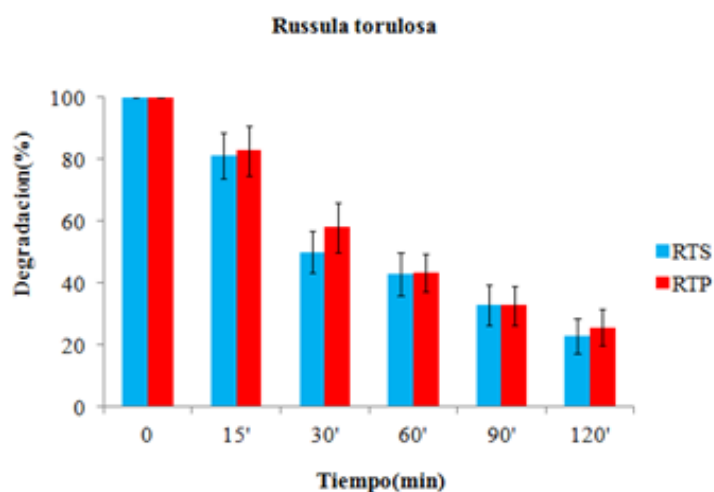


Figura R14. Método de Folin-Ciocalteu. Degradación a 90°C. *Lepista personata*

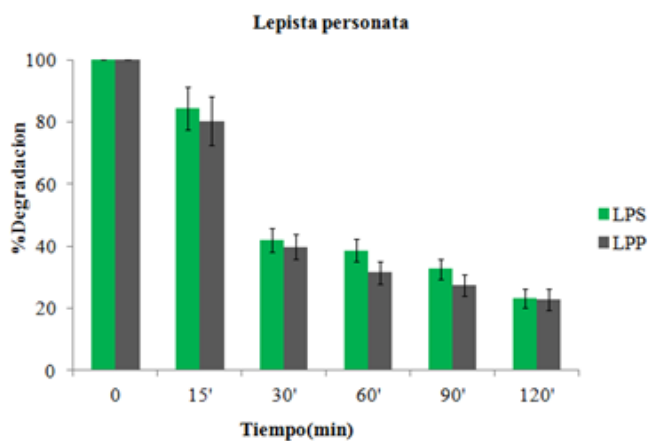
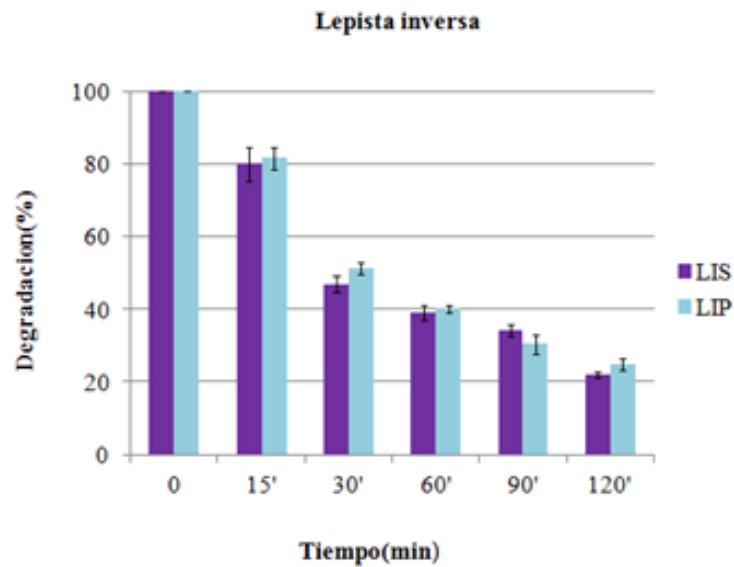


Figura R15. Método de Folin-Ciocalteu. Degradación a 90°C. *Lepista inversa*



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 *Russula torulosa*, *Lepista personata* y *Lepista inversa*

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)	RT Sombrero	RT Pie	LP Sombrero	LP Pie	LI Sombrero	LI Pie
0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
15	87 ± 5	89 ± 3	94 ± 6	87 ± 2	86 ± 1	89 ± 7
30	62 ± 20	73 ± 16	77 ± 5	82 ± 2	59 ± 2	75 ± 8
60	42 ± 21	53 ± 20	40 ± 3	56 ± 1	45 ± 1	57 ± 7
90	24 ± 9	32 ± 24	27 ± 2	41 ± 1	38 ± 3	41 ± 7
120	19 ± 10	20 ± 12	18 ± 2	26 ± 1	25 ± 2	17 ± 5

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

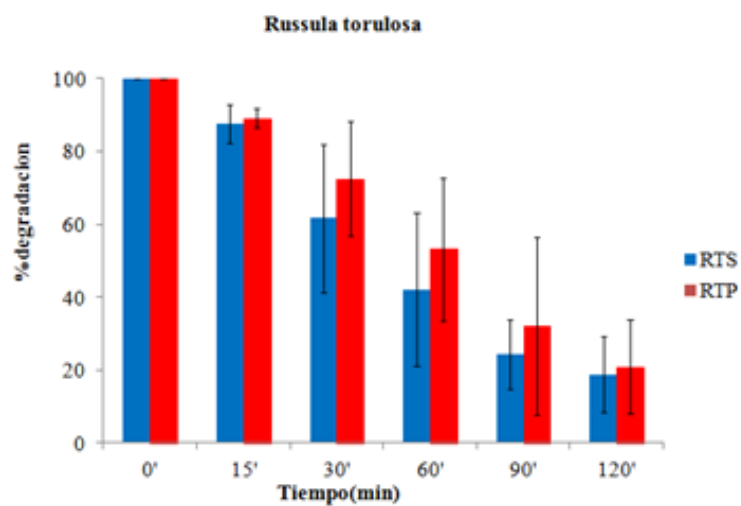


Figura R17. Método de CUPRAC. Degradación a diferentes tiempos. *Lepista personata*.

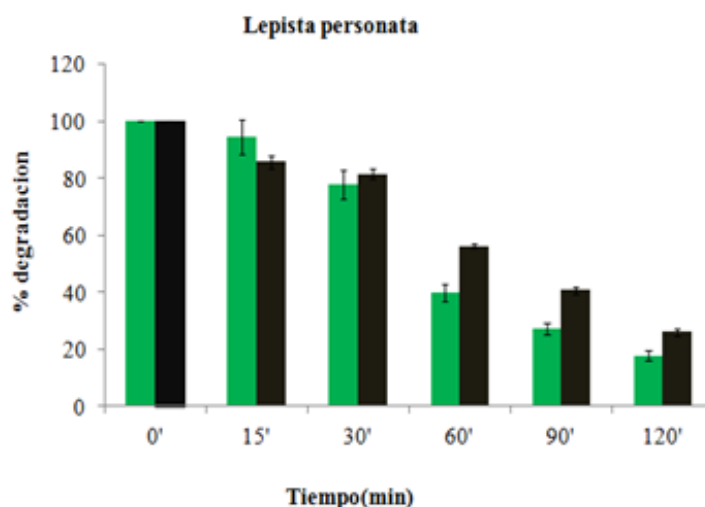
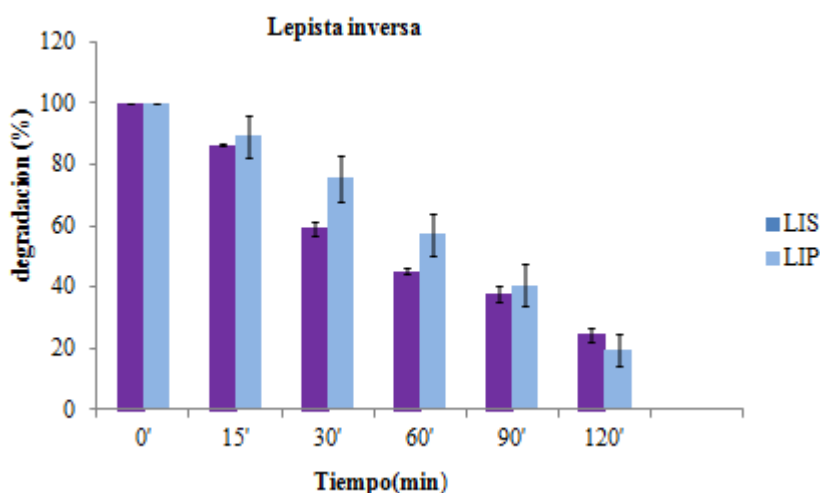


Figura R18. Método de CUPRAC. Degradación a diferentes tiempos. *Lepista inversa*.



4.7.3. Medida de la pérdida de capacidad antirradicalaria por temperatura a 90° C y a diferentes tiempos por el método del radical DPPH.

Se mide la pérdida de la capacidad antirradicalaria a diferentes tiempos por el método del radical DPPH. 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 las tres setas *Russula torulosa*,

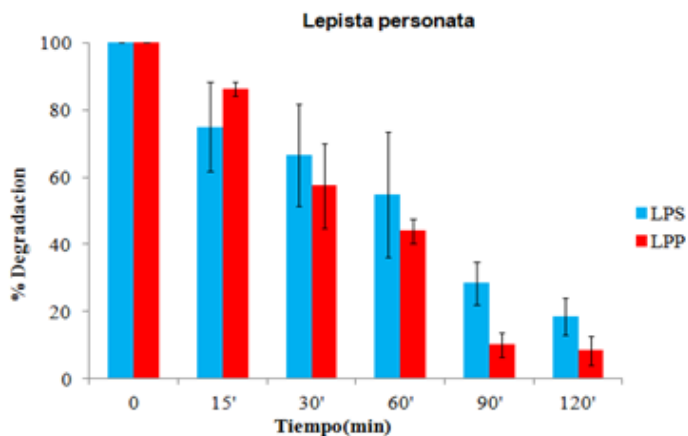
Lepista personata, *Lepista inversa*. Solamente se obtuvieron resultados significativos en *Lepista personata*.

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 μ moles equivalentes de Trolox 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 R10. Método DPPH. Incubación a 90° C

Tiempo (min)	LP Sombrero	LP Pie
0	100 ± 0	100 ± 0
15	75 ± 13	86 ± 2
30	62 ± 15	57 ± 13
60	55 ± 19	44 ± 4
90	28 ± 6	10 ± 4
120	19 ± 6	8 ± 4

Figura R19. Método del DPPH. Degradación a 90°C. *Lepista personata*



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

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	RT Sombrero	RT Pie	LP Sombrero	LP Pie	LI Sombrero	LI Pie
Sin calentar	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
20	94 ± 4	79 ± 7	97 ± 3	97 ± 3	99 ± 1	98 ± 2
50	83 ± 7	72 ± 11	91 ± 2	88 ± 7	95 ± 6	95 ± 3
70	71 ± 7	67 ± 9	58 ± 5	56 ± 5	68 ± 4	64 ± 3
90	50 ± 7	58 ± 8	42 ± 4	40 ± 4	47 ± 2	51 ± 1

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

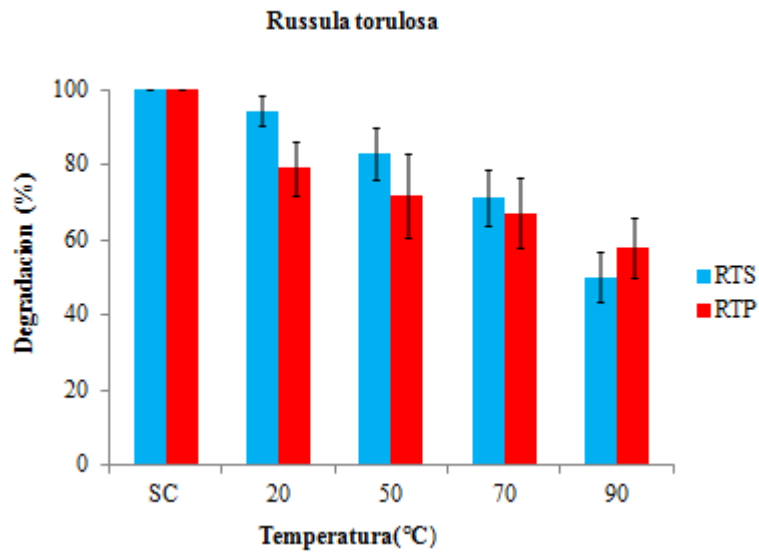


Figura R21. Método de Folin-Ciocalteu. Degradación a diferentes tiempos. Sin calentar SC, 20°, 50°, 70° y 90° grados a 30 minutos. *Lepista personata*.

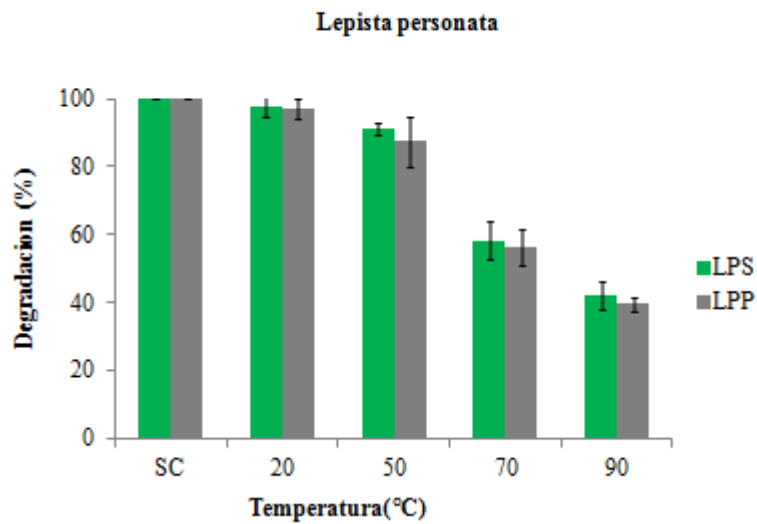
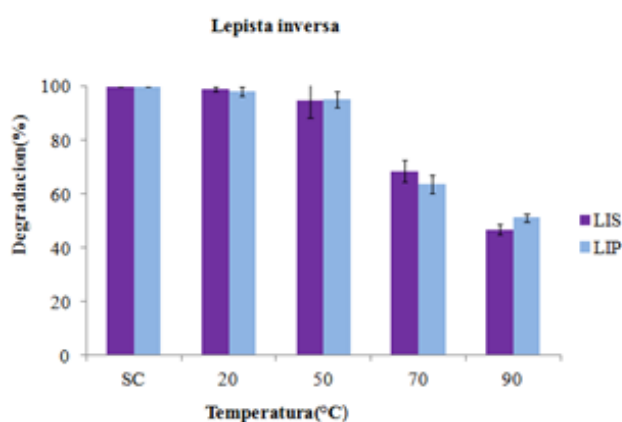


Figura R22. Método de Folin-Ciocalteu. Degradación a diferentes tiempos. Sin calentar SC, 20°, 50°, 70° y 90° grados a 30 minutos. *Lepista inversa*.



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	RT	RT	LP	LP	LI	LI
	Sombrero	Pie	Sombrero	Pie	Sombrero	Pie
Sin calentar	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
20	85 ± 3	88 ± 4	96 ± 1	97 ± 3	94 ± 1	89 ± 3
50	78 ± 6	78 ± 8	88 ± 1	88 ± 7	75 ± 3	82 ± 4
70	71 ± 5	75 ± 12	83 ± 2	56 ± 5	64 ± 3	79 ± 3
90	62 ± 20	73 ± 16	78 ± 5	40 ± 4	59 ± 2	75 ± 8

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

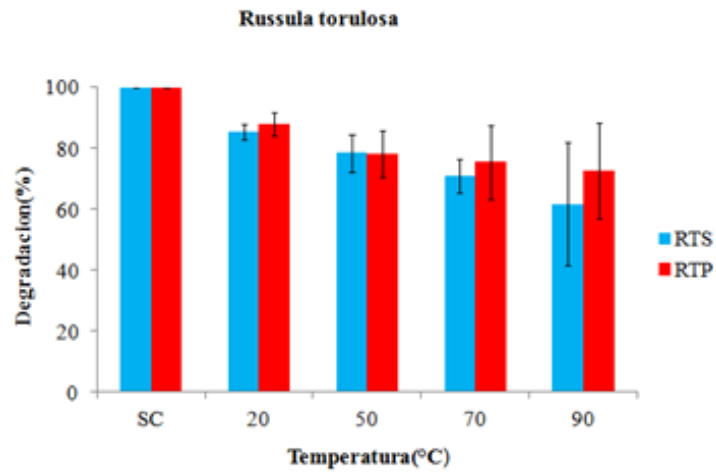


Figura R24. Método de CUPRAC. Degradación a diferentes temperaturas. Sin calentar SC, 20°, 50°, 70° y 90° grados Centígrados a 30 minutos. *Lepista personata* (Sombrero y pie)

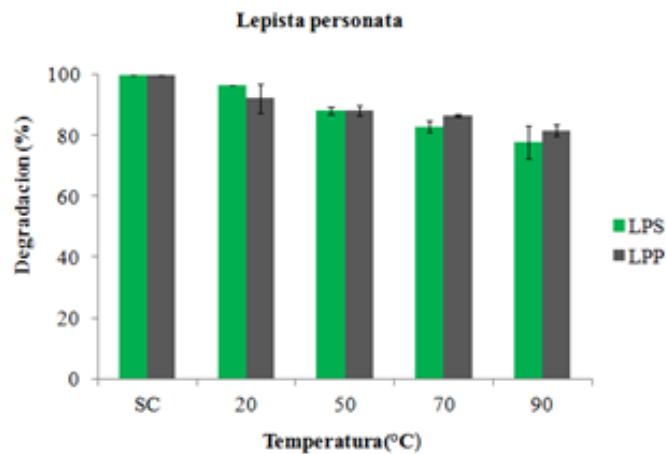
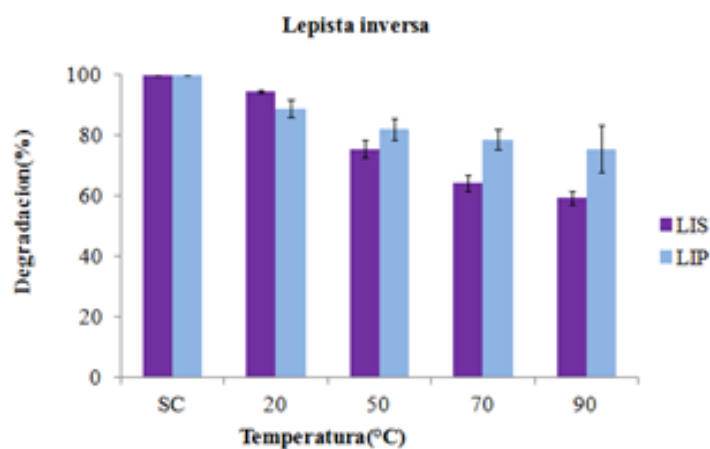


Figura R25. Método de CUPRAC. Degradación a diferentes temperaturas. Sin calentar SC, 20°, 50°, 70° y 90° grados Centígrados a 30 minutos. *Lepista inversa* (Sombrero y pie)



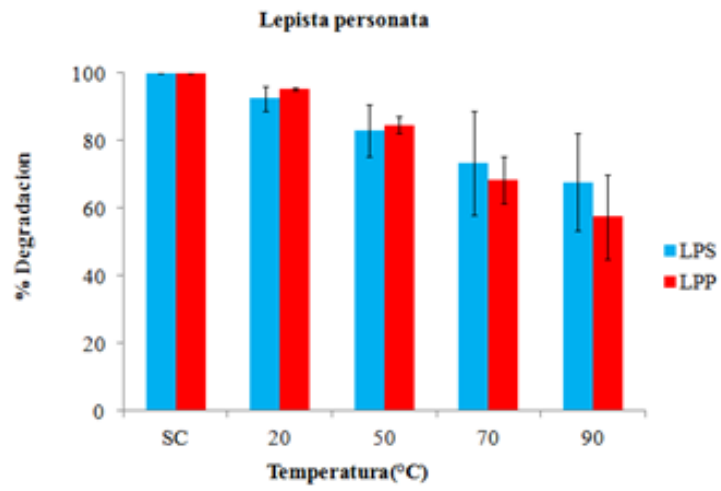
4.8.3. Medida de la pérdida de capacidad antirradicalaria a diferentes temperaturas (sin calentar, 20°C, 50°C, 70°C y 90°C) en un tiempo de 30 minutos por el método del radical DPPH.

Se midió la pérdida de la capacidad antirradicalaria a diferentes temperaturas (sin calentar, 20°C, 50°C, 70°C, 90°C) por el método del radical DPPH en un mismo tiempo de 30 minutos. Sólo se obtuvieron resultados significativos en *Lepista personata*.

Tabla R13. Método del DPPH . Degradación a diferentes temperaturas. Tiempo 30 minutos

Temperatura 0°C	LP Sombrero	LP Pie
Sin calentar	100 ± 0	100 ± 0
20	92 ± 4	95 ± 1
50	83 ± 8	85 ± 3
70	73 ± 15	68 ± 7
90	68 ± 14	58 ± 13

Figura R26. Método del DPPH. Degradación a diferentes temperaturas (Sin calentar SC, 20, 50, 70, 90 grados centígrados a 30 minutos). *Lepista personata*



5. DISCUSIÓN

Las setas comestibles son fuente de macro y micronutrientes. Entre estos últimos encontramos los minerales y una serie de compuestos con actividad farmacológica y metabólica. Entre los compuestos con actividad farmacológica se encuentran determinados polisacáridos, en particular los glucanos, que presentan actividad antitumoral e inmunoestimulante.

Entre los compuesto metabólicamente activos encontramos una gran colección de compuestos que tienen en común el ser polifenoles. Los polifenoles poseen gran capacidad antioxidante y antirradicalaria y por ello las setas comestibles se consideran como una fuente de actividad antioxidante nada desdeñable.

Las tres setas comestibles estudiadas en el presente trabajo contienen gran cantidad de fenoles, en particular la *Lepista personata*, es con mucho la especie que mayor cantidad de fenoles contiene y mayor actividad antioxidante y antirradicalaria presenta.

Poseen además 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 que conllevan temperaturas cercanas a los 100⁰C. Por ello se consideró que la incubación a estas temperaturas podría afectar al contenido de fenoles y a las capacidades antioxidantes y antirradicalarias.

Los resultados obtenidos así lo indican. Temperaturas superiores a los 50⁰C afectan al contenido de fenoles de una manera significativa. Sin

embargo afectan menos a la capacidad antioxidante y, al menos en *Lepista personata*, a la capacidad antirradicalaria. Esto indica que estas actividades se conforman no solo con fenoles, y que otras moléculas contribuyen a dichos efectos. Un ejemplo podrían ser la vitaminas C y E y los beta-carotenos.

Las setas comestibles se ingieren en pequeñas cantidades, normalmente como acompañamiento de otros alimentos, en base a los aromas y sabores especiales que las caracterizan. Por ello, la contribución de las setas comestibles a la ingesta total de alimentos es reducida y por tanto la incorporación de las sustancias antioxidantes derivadas de ellas, aunque relevantes, también lo son.

Los procedimientos de medida utilizados en este trabajo, aunque adaptados en el laboratorio del Prof. Girbés, han sido publicados previamente con gran detalle por diversos grupos de investigación, en particular el dirigido por el Prof. Prior. Son fiables y ampliamente aceptados.

Finalmente hay que resaltar que los valores dados en este trabajo son relativos por cuanto pertenecen a ejemplares recogidos en Castilla y León en determinadas zonas bioclimáticas. Se ha descrito que estos valores pueden variar en función de las zonas de recogida, en particular en lo que concierne a los minerales. Se sabe además que estas setas pueden acumular también metales pesados que pueden considerarse tóxicos en función de la dosis que se ingiera.

6. CONCLUSIONES

1. Las tres setas estudiadas en el presente trabajo tienen una humedad en el entorno del 90 %.

2. Las tres setas estudiadas en el presente trabajo tienen un contenido en cenizas de peso húmedo en el entorno del 1 % y en cenizas de peso seco en el entorno del 10 %.

3. *Lepista personata* es la seta comestible de las estudiadas que más cantidad de fenoles totales contiene siendo de aproximadamente 1.500 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.

4. *Lepista personata* es la seta que tiene una mayor capacidad antioxidante cuantificada por el método de CUPRAC. Los valores obtenidos fueron 207 μg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso húmedo en el sombrero y 213 μg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso húmedo en el pie.

5. *Lepista personata* es la seta que tiene también una mayor capacidad antirradicalaria cuantificada por el método del radical DPPH. Los valores obtenidos fueron 293 μg equivalentes de Trolox por gramo de peso húmedo en el sombrero y 598 μg equivalentes de Trolox por gramo de peso húmedo en el pie.

6. 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 de *Russula torulosa*, *Lepista personata* y *Lepista inversa* 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. Los resultados en *Lepista personata* por el método del radical DPPH fueron similares.

7. 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 *Russula torulosa*, *Lepista personata* y *Lepista inversa* fueron del orden del 15 % a 20° C, del 20 % fue a 50° del 30% a 90°C. Los resultados en *Lepista personata* por el método del radical DPPH fueron similares.

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.; Glud, L. L.; Simonetti, R. G.; Glud, 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.; Pallardo, 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, Lawrynowicz 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.