



---

**Universidad de Valladolid**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Biología Celular, Histología y  
Farmacología**

TESIS DOCTORAL

**“Estudio de la capacidad antioxidante y el  
contenido en  $\beta$ -(1,3-1,6-) glucanos de diversas  
setas comestibles de Castilla y León”**

Presentada por Ana Cristina Aldavero Peña para optar al grado  
de

Doctor por la **Universidad de Valladolid**

Dirigida por: Dña. Pilar Jiménez López, D. Jesús Tejero del Río y  
D. Tomás Girbés Juan.

---

D. Tomás Girbés Juan, Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, Dña. Pilar Jiménez López, Profesora Titular de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid y D. Jesús Tejero del Río, Profesor Asociado de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, directores de esta Tesis Doctoral certifican que el trabajo realizado por Dña. Ana Cristina Aldavero Peña puede ser presentado para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valladolid.

Valladolid, a 6 de octubre de 2014

Fdo.: Tomás Girbés Juan

Fdo.: Pilar Jiménez López

Fdo.: Jesús Tejero del Río

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a los directores de la tesis Profa. Pilar Jiménez López, Prof. Jesús Tejero del Río y Prof. Tomás Girbés Juan, todo lo que me han enseñado, su apoyo y su ayuda constante.

Muchas gracias a todos.

Dedicada a mi madre, M<sup>a</sup> Ascensión Peña Martínez.

---

## **PUBLICACIONES CIENTÍFICAS EN REVISTAS.**

Los resultados de esta Tesis Doctoral han dado lugar a los trabajos siguientes:

Pilar Jiménez, Cristina Aldavero, Silvia Gómez, Jesús Tejero, Damián Córdoba-Díaz, José E. Basterrechea, Santiago de Castro and Tomás Girbés. Thermal sensitivity of the antioxidant and free-radical scavenging activities of water-extracts of edible mushrooms from Northwestern Spain. *Food and Nutrition Sciences*, (2014).

Pilar Jiménez, Cristina Aldavero, Jesús Tejero, José E. Basterrechea, Damián Córdoba-Díaz and Tomás Girbés.  $\beta$ -1,3-1,6-glucan content in wild edible mushrooms. En preparación para *Molecules*, (2014).

## **COMUNICACIONES A CONGRESOS.**

Las técnicas utilizadas han permitido la presentación de una comunicación a congreso:

Estudio comparado de las capacidades antioxidantes y antirradicalarias y contenido total de polifenoles en distintos tipos de té. Jesús Tejero, Sara Gayoso, José E. Basterrechea, Damián Córdoba-Díaz, Cristina Aldavero, Victoria García, Tomás Girbés y Pilar Jiménez. 34 Symposium de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). 4 y 5 de junio 2014, Madrid.

## **FINANCIACIÓN.**

La investigación ha sido financiada en parte por el Grupo de Investigación reconocido GIR “Inmunotoxinas antitumorales”. Organismo financiador: Universidad de Valladolid. Coordinador: Tomas Girbés.

---

*«En la naturaleza nada hay superfluo»*

**Averroes**

---

## ABREVIATURAS.

**A.** Absorbancia.

**A<sub>450</sub>.** Absorbancia a 450 nanómetros.

**A<sub>760</sub>.** Absorbancia a 760 nanómetros.

**A<sub>531</sub>.** Absorbancia a 531 nanómetros.

**A<sub>515</sub>.** Absorbancia a 515 nanómetros.

**a.C.** Antes de Cristo.

**° C.** Grado centígrado.

**CA.** Capacidad antioxidante.

**CC.** *Cantharellus cibarius*.

**CCH.** Harina de *Cantharellus cibarius*.

**CCP.** *Cantharellus cibarius* pie.

**CCS.** *Cantharellus cibarius* sombrero.

**CCO.** *Craterellus cornucopioides*.

**CCOP.** *Craterellus cornucopioides* pie.

**CCOS.** *Craterellus cornucopioides* sombrero.

**CCOH.** Harina de *Craterellus cornucopioides*.

**CL.** *Cantharellus lutescens*.

**CLS.** *Cantharellus lutescens* sombrero.

**CLP.** *Cantharellus lutescens* pie.

**CLH.** Harina de *Cantharellus lutescens*.

**CT.** *Cantharellus tubaeformis*.

**CTH.** Harina de *Cantharellus tubaeformis*.

**CTP.** *Cantharellus tubaeformis* pie.

**CTS.** *Cantharellus tubaeformis* sombrero.

**Cols.** Colaboradores.

**DE.** Desviación estándar.

**DPPH.** 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

**equiv.** Equivalentes.

**g.** Gramo.

**HR.** *Hydnum repnadum*.

**HRS.** *Hydnum repnadum* sombrero.

---

**HRP.** *Hydnum repnadum* pie.  
**HRH.** Harina de *Hydnum repnadum*.  
**HRU.** *Hydnum rufescens*.  
**HRUS.** *Hydnum rufescens* sombrero.  
**HRUP.** *Hydnum rufescens* pie.  
**HRUH.** Harina de *Hydnum rufescens*.  
**Kg.** Kilogramo.  
**M.** Molar.  
**m<sup>2</sup>.** Metro cuadrado.  
**ml.** Mililitros.  
**mg/Kg.** miligramos por Kilo.  
**mg/l.** miligramos por litro.  
**ml/min.** Mililitro por minuto.  
**mM.** Milimolar.  
**nm.** Nanómetros.  
**P.E.** *Pleurotus eryngii*.  
**P.E.H.** Harina de *Pleurotus eryngii*.  
**pH.** Medida de la acidez o la alcalinidad de una disolución.  
**PH.** Peso húmedo.  
**Pm.** Peso molecular.  
**ppm.** Partes por millón.  
**p/v.** Peso por volumen.  
**RLs.** Radicales libres.  
**ROS** Especies reactivas de oxígeno.  
**r.p.m.** Revoluciones por minuto.  
**v/v.** Volumen por volumen.  
**µg.** Microgramos.  
**µl.** Microlitros.  
**µm.** Micrómetros.  
**µmoles.** Micromoles.  
**%.** Tanto por ciento.

---

<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>11</b>
1.1. Introducción.	12
1.2. Breve reseña histórica.	13
1.3. Características macroscópicas de los hongos.	17
1.4. Características microscópicas de los hongos.	19
1.5. Clasificación de los hongos sometidos a estudio.	20
1.5.1. <i>Hydnum repandum</i> .	22
1.5.2. <i>Hydnum rufescens</i> .	23
1.5.3. <i>Cantharellus cibarius</i> .	24
1.5.4. <i>Craterellus cornucopioides</i> .	25
1.5.5. <i>Craterellus lutescens</i> .	26
1.5.6. <i>Craterellus tubaeformis</i> .	27
1.6. Propiedades químicas y nutricionales de las setas.	28
1.7. Propiedades medicinales de las setas.	29
1.8. Las setas silvestres como fuente de sustancias antioxidantes naturales.	33
1.8.1. Compuestos fenólicos.	34
1.8.2. Otros compuestos antioxidantes presentes en las setas.	35
1.9. Los $\beta$ -glucanos en las setas y sus propiedades terapéuticas.	38
1.9.1. Caracterización química.	38
1.9.2. Características funcionales de $\beta$ -1,3/1,6-glucano. Efectos en el sistema inmune.	39
1.9.3. Importancia de los $\beta$ -1,3/1,6-glucanos en el tratamiento del cáncer.	40
1.9.4. Importancia de los beta-1,3/1,6-glucanos en el tratamiento de otras enfermedades.	41
1.9.5. Factores que influyen en la eficiencia de los tratamientos con $\beta$ -glucanos.	42
<b>2. OBJETIVOS DE LA TESIS.</b>	<b>44</b>
2.1. Objetivos.	45
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>46</b>
3.1. Materiales de laboratorio.	47
3.1.1. Equipos.	47

---

3.1.2. Material fungible.	47
3.1.3. Reactivos químicos.	48
3.1.4. Materiales biológicos.	49
3.2. Métodos.	50
3.2.1. Determinación de la humedad de las setas.	50
3.2.2. Determinación del contenido de cenizas en los hongos.	50
3.2.3. Obtención de extractos.	51
3.2.4. Método de Folin – Ciocalteau.	52
3.2.5. Método de CUPRAC.	53
3.2.6. Método del radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).	54
3.2.7. Detección de $\beta$ -glucanos mediante el método del Rojo Congo.	55
3.3. Análisis estadístico.	57
4. RESULTADOS	58
4.1. Contenido en humedad de las setas.	59
4.2. Contenido en cenizas de las setas.	60
4.3. Volúmenes medios de los diferentes extractos.	61
4.4. Medida de los fenoles totales. Método de Folin – Ciocalteau.	62
4.5. Medida de la capacidad antioxidante. Método de CUPRAC.	66
4.6. Medida de la capacidad antirradicalaria. Radical DPPH.	69
4.7. Correlación entre los diferentes métodos de análisis.	73
4.8. Medida de la degradación a temperatura constante y diferentes tiempos en <i>Craterellus cornucopioides</i> .	76
4.8.1. Medida de la degradación de los fenoles totales.	76
4.8.2. Medida de la pérdida de la capacidad antioxidante.	77
4.8.3. Medida de la pérdida de la capacidad antirradicalaria.	79
4.9. Medida de la degradación a tiempo constante y diferentes temperaturas de <i>Cantharellus cornucopioides</i> .	80
4.9.1. Medida de la degradación de los compuestos fenólicos.	80
4.9.2. Medida de la degradación de la capacidad antioxidante.	82
4.9.3. Medida de la pérdida de la capacidad antirradicalaria.	83
4.10. Medida de la degradación a temperatura constante y diferentes tiempos de <i>Cantharellus tubaeformis</i> .	84
4.10.1. Medida de la degradación de los compuestos fenólicos.	85

---

<b>4.10.2. Medida de la pérdida de la capacidad antioxidante.</b>	<b>86</b>
<b>4.10.3. Medida de la pérdida de la capacidad antirradicalaria.</b>	<b>87</b>
<b>4.11. Medida de la degradación a tiempo constante y diferentes temperaturas de <i>Cantharellus tubaeformis</i>.</b>	<b>88</b>
<b>4.11.1. Medida de la degradación de los compuestos fenólicos.</b>	<b>88</b>
<b>4.11.2. Medida de la pérdida de la capacidad antioxidante.</b>	<b>89</b>
<b>4.11.3. Medida de la pérdida de la capacidad antirradicalaria.</b>	<b>90</b>
<b>4.12. Medida de <math>\beta</math>-glucanos en setas y harina de setas.</b>	<b>91</b>
<b>4.12.1. Determinación de la longitud de onda y la concentración de Rojo Congo.</b>	<b>92</b>
<b>4.12.2. Temperatura de reacción.</b>	<b>94</b>
<b>4.12.3. Recta Patrón de la seta <i>Pleurotus eryngii</i>.</b>	<b>96</b>
<b>4.12.4. Determinación del contenido de <math>\beta</math>-glucanos en setas frescas.</b>	<b>98</b>
<b>4.12.5. Recta Patrón de harina de <i>Pleurotus eryngii</i>.</b>	<b>98</b>
<b>4.12.6. Contenido de <math>\beta</math>-glucanos en harina de setas.</b>	<b>100</b>
<b>5. DISCUSIÓN.</b>	<b>101</b>
<b>6. CONCLUSIONES.</b>	<b>105</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>108</b>

---

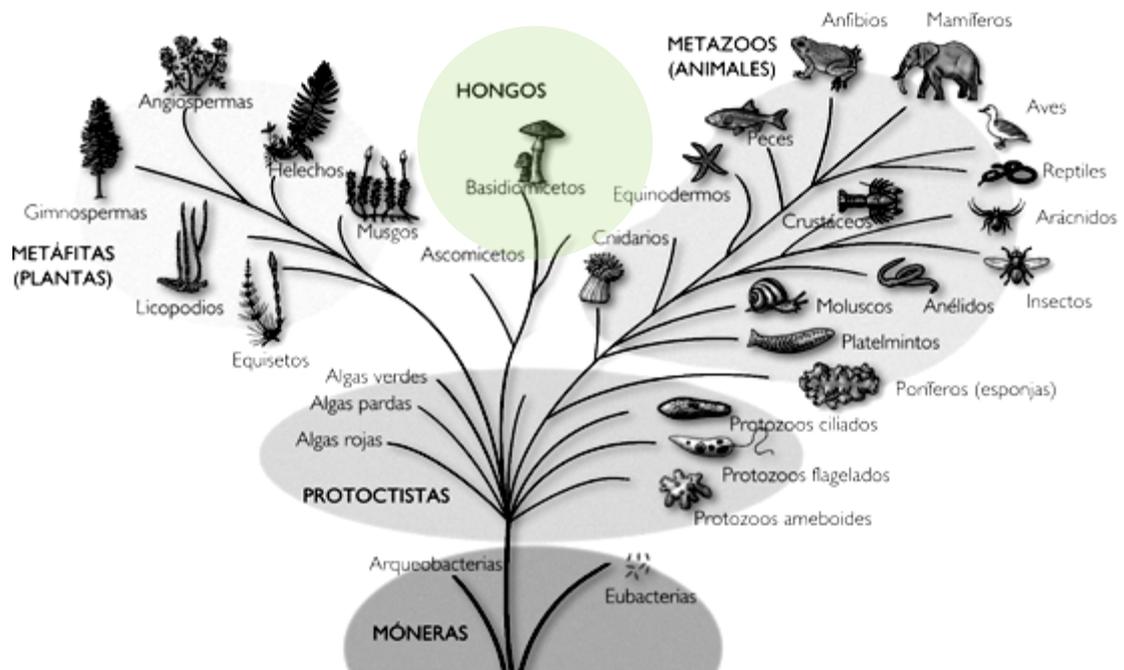
# **1. INTRODUCCION.**

## 1.1. INTRODUCCIÓN.

Los hongos se definen como organismos vivos que se reproducen por esporas y que carecen de clorofila, por lo que deben vivir a costa de otros seres, haciéndolo de forma saprofítica, simbiótica o parásita (García Blanco y Sánchez Rodríguez., 2009).

Actualmente han sido descritas unas 80.000 especies de hongos, sin embargo, se estima que podrían existir aproximadamente 1.5 millones (Hawksworth., 2001). De las especies conocidas, aproximadamente el 50% podrían ser comestibles, de éstas, alrededor de 2000 lo son con toda seguridad, y alrededor de 700 especies son conocidas por sus importantes propiedades farmacológicas (Chang ST., 1999; Wasser SP., 2012).

Los hongos, no pertenecen al reino animal ni al reino vegetal, forman un reino propio denominado “Reino Fungi” (Whittaker., 1969).



**Figura 11. Esquema clasificatorio de Whittaker en forma de árbol filogenético (Whittaker., 1969).**

Las setas, que son los cuerpos fructíferos de los hongos, forman parte de la dieta humana desde hace miles de años y su consumo aumenta progresivamente. Las setas se consideran un alimento saludable debido a que son bajas en calorías, grasas y ácidos

---

grasos esenciales mientras que son ricas en proteínas, vitaminas y minerales (Kalac., 2009).

El interés en investigar en profundidad este reino se ha intensificado en las tres últimas décadas estudiándose su valor nutricional (Kalac., 2013), su capacidad antioxidante (Barros y cols., 2009), la calidad de sus proteínas (Dabbour y Takruri., 2002) y el contenido y caracterización de polisacáridos con propiedades inmunomoduladoras y antitumorales (Wasser., 2002; Reis y cols., 2012).

## 1.2. BREVE RESEÑA HISTÓRICA.

Desde hace milenios, los hongos han sido valorados por el ser humano como alimento y fuente de sustancias con propiedades medicinales y psicotrópicas (Calonge., 2011).

Los últimos hallazgos que permiten saber la antigüedad de los hongos provienen de restos fósiles en ámbar (Fig. I2) procedente del Valle Hukawng (Myanmar) con una edad estimada de 100 millones de años tal y como demuestran los estudios de Poinar de la Universidad de California (Poinar y Buckley., 2007).



**Figura I2.**Sombrero de un hongo en ámbar del período Cretácico llamado *Paleo Agaracites antiquus*. (Poinar y Buckley., 2007).

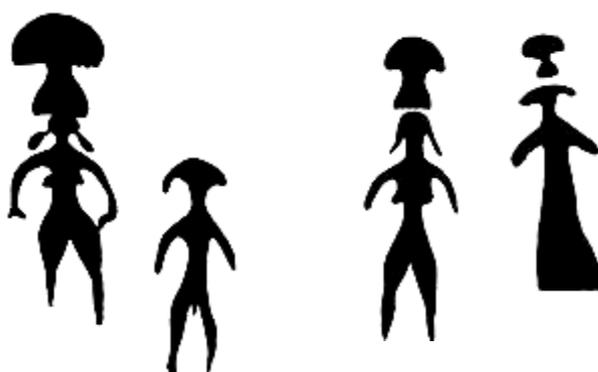
Hace 5.300 años, la especie humana ya tomaba antibióticos naturales obtenidos de las setas (Capasso., 1999). Diferentes investigaciones (Müller-Karpe., 1959), permitieron demostrar que en la civilización lacustre suiza, en el Neolítico, ya se consumían setas como la *Fistulina Hepática*. Los restos arqueológicos del hombre

---

primitivo, hallado congelado en los Alpes en 1991, han permitido rescatar de sus ropas, restos de setas como *Fomes fomentarius*, que es efectivo como antitusígeno y que servía, a partir de las chispas provocadas con pedernal, para encender el fuego. Se han encontrado también restos de *Piptoporus betulinus*, que tiene propiedades antibióticas (Campos y Arregui., 2010).

Son numerosos los petroglifos encontrados en diversas zonas del planeta, que datan de más de 3000 años a.C. en los que se pueden encontrar simbología de figuras antropomorfas y formas de hongos (Wasson y cols., 1957), como los que se muestran en la Figura I3, descubiertos por N. N. Dikov.

Los egipcios conocían los hongos y pudieron utilizarlos con fines rituales, así lo manifiestan las pinturas murales de la tumba del faraón Amenemhet que data de 1450 a.C. (Puharich y cols., 1959). En otros restos arqueológicos (vasijas de las tumbas faraónicas), se han encontrados restos de setas molidas a las cuales se les atribuyen fines curativos. La producción de alimentos fermentados, consecuencia de la acción de hongos y levaduras microscópicos se manifiesta en numerosos restos arqueológicos de ésta época.



**Figura I3. Petroglifos a orillas del río Pegtymel, en la región de Chukotka (Rusia) 3000 años a.C. Los alucinógenos en el mito. Relatos sobre el origen de las plantas psicoactivas (Samorini y cols., 2001).**

En Grecia, Nicander de Colofón, 185 años a.C., decía que los hongos se originaban del suelo por acción de la lluvia en su libro de venenos y antidotos "Alexifarmaca", constituyendo una de las primeras referencias de la micología (Towaide., 1997).

---

La propia civilización griega, ha dejado múltiples huellas y restos de la presencia y uso de los hongos. Teofrasto, filósofo y naturalista, definió a los hongos como plantas imperfectas, exentas de raíces, de hojas, de flores y de frutos. Dioscórides, médico griego del siglo I, propone una separación entre "Fungi esculenti" y "Fungi perniciosi" (González., 2002; Font Quer., 1962).

En el Imperio Romano (Fig. I4), ya se empieza a conocer el uso y consumo de los hongos y setas de forma habitual, donde esclavos escogidos realizaban su recolección. Algunas setas de exquisito sabor deben su nombre a la degustación de los propios Césares romanos y como prueba de ello recibieron su nombre (*Amanita caesarea*). Marco Gavio Apicio, en su tratado de cocina "De Re Coquinaria", recoge varias recetas con trufas y setas (Edwards., 1984). El naturalista romano Plinio el Viejo, establece en sus escritos, las primeras normas para distinguir los hongos comestibles de los venenosos (Historia natural XII-XVI de Plinio el Viejo., 1995).



**Figura I4. Detalle de setas pintadas en una pared de la ciudad romana de Herculaneum. Museo Nacional de Nápoles.**

Algunas tribus del norte de Europa utilizaban la seta *Amanita muscaria* como alucinógeno en sus fiestas y ritos religiosos, (Hofmann., 2000; Samorini., 2001) en la actualidad todavía hay pequeñas tribus siberianas que siguen practicando estos ritos.

Durante la Edad Media, periodo comprendido entre el siglo V y el XV, los conocimientos procedentes de los naturalistas griegos y romanos pasaron al olvido, las creencias populares sin criterios científicos tan sólo distinguían entre hongos comestibles y venenosos.

En el Renacimiento, siglos XV y XVI, la aparición de la imprenta permite de nuevo progresar en el conocimiento de los hongos ayudando a la difusión de obras como "*Theatrum fungurum*" de Johannes Franciscus Van Sterbeeck (1630-1693)

---

sacerdote y boticario alemán con el primer texto dedicado a los hongos, cuya finalidad era ayudar a la identificación precisa de las variedades comestibles (Mehrotra., 1990).

Fray Bernardino de Sahagún, en su estancia en Nueva España (México) recopila en “Los Códices Matritenses” (capítulo XII) información sobre los hongos de los libros sagrados “Popol Vuh” y “Las Historias del Quiché” de los indios quichés que habitaban Guatemala (Fig. I5). En esta cultura los hongos tenían un rango elevado y eran considerados comida de dioses y reyes, probablemente por su carácter alucinógeno más que por los beneficios alimenticios que obtenían de ellos (Tudela., 1952).



**Figura I5. Piedras talladas en forma de hongo del área maya de Guatemala, sur de México y El Salvador. Fechadas entre el 1000 a.C. y el 500 d.C. “Plants of de Gods” (Schultes y Hoffman., 1980).**

Linneo (1753), biólogo sueco, desarrolló el concepto de la nomenclatura binomial de los seres vivos en diferentes niveles jerárquicos y para los hongos crea un Reino, específico.

En el siglo XVII, los hongos, comenzaron a ser consumidos por la nobleza, en sus platos de cocina refinada y dejaron de tener la consideración de un alimento básico para los pobres.

Van Leeuwenhoek fabrica los primeros microscopios, lo cual permite el inicio y desarrollo de los estudios sistemáticos en los hongos así como el conocimiento de los hongos microscópicos.

Durante los siglos XVIII y XIX es cuando la Micología adquiere la categoría de auténtica disciplina científica y comienzan a aparecer los primeros sistemas de clasificación. Se identifican y definen las esporas y se clasifican los hongos en Basidiomycetos y Ascomycetos. Christiaan Hendrik Persoon (1801), micólogo

---

sudafricano y considerado el padre de la Micología, establece en su tratado la *Synopsis Methodica Fungorum* la sistemática de los hongos por géneros, adoptando el método linneano para la micología. Destacan en ésta época eminentes micólogos como Jean Baptiste François Pierre Bulliard y Jacob Christian Gottlieb (Mehrotra., 1990).

El naturalista sueco Elías Fries (1794-1878), otro de los padres de la Micología, es el creador de la moderna taxonomía y sistemática actual de los hongos. Sus publicaciones *Systema mycologicum* y *Elenchus fungorum* (1818-1828), han servido para establecer una clasificación por el color de las esporas, conjuntamente con la clasificación de acuerdo al tipo de himenóforo: láminas, poros, pliegues y aguijones, como principales caracteres taxonómicos. Llegó a caracterizar 2770 especies, la abreviatura “Fr” sirve, acompañando al nombre del género y la especie, para designar a este gran micólogo como el primero en describirla (Deacon., 1990).

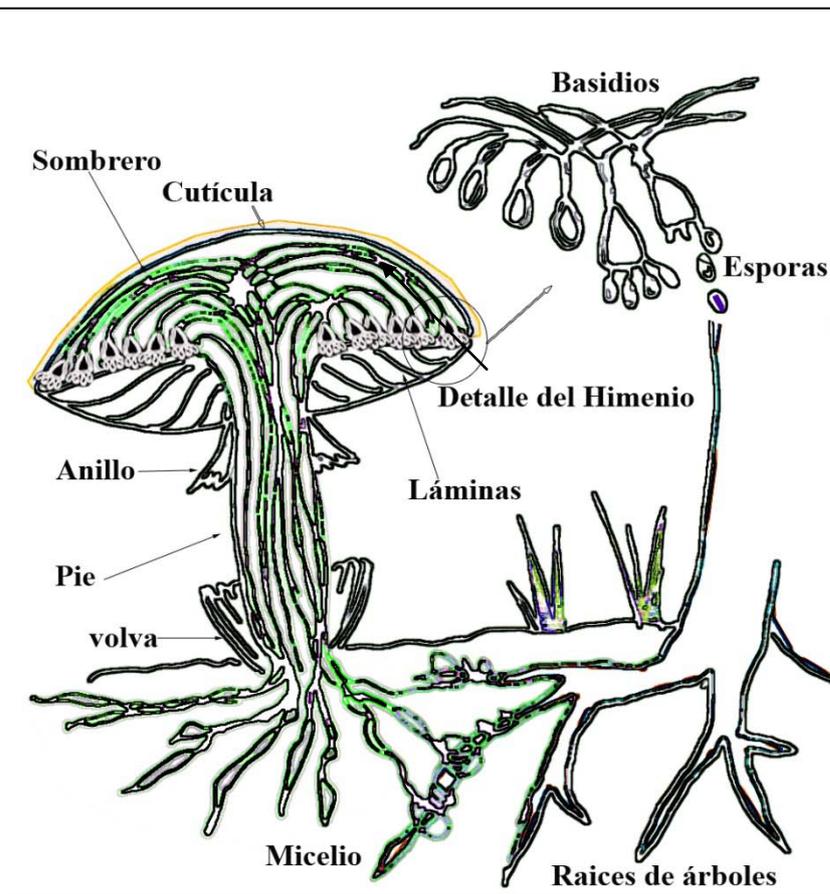
Joseph-Henri Leveillé, micólogo francés, considerado como el precursor de la Micología moderna, es el primero en dar una descripción completa del basidio y del cistidio de los hongos basidiomicetos. Estudia su microscopía y comprueba que las esporas maduran en los basidios. Establece la clasificación por los caracteres microscópicos y estudia las reacciones químicas que se producen en los hongos por medio de reactivos químicos. (Deacon., 1990).

Whittaker en el año 1969 separa a los hongos en un reino aparte de las otras formas de tipo vegetal. Relevantes micólogos estudian, clasifican y establecen nuevos conceptos sobre toxicidad de distintas especies, desechando creencias populares erróneas, usadas para determinar su comestibilidad. A partir de esta época es cuando comienza el estudio de los principios bioactivos de las setas con fines medicinales. (Deacon., 1990).

### **1.3. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LOS HONGOS.**

Escuchamos hablar indistintamente de «hongos» y «setas», incluso en algunas zonas determinadas las setas reciben el apelativo de «hongos», pero desde un punto de vista micológico es necesario superar esta confusión. Las setas son el cuerpo fructífero del hongo (Campos y Arregui., 2010).

Los hongos constan de las siguientes partes (Fig. I6) (Alexopoulos., 1996; Campos y Arregui., 2010).



**Figura I6. Diferentes partes de un hongo. Elaboración propia.**

**Sombbrero:** la forma más conocida es la semejante a un paraguas con pie y sombrero (Fig. I7), aunque puede presentar numerosas variaciones según el tipo de himenio. Igualmente puede presentar una amplia gama de formas y colores: redondo, plano, cóncavo, convexo, con mamelón, embudado, hemisférico, acampanado, etc.



**Fig. I7. Detalle de sombreros de *Cantharellus tubaeformis*.**

Como parte del sombrero está la cutícula, membrana exterior que recubre al sombrero. Tiene importancia tanto por su estructura como por su color. Puede ser viscosa o seca, lisa o escamosa, cuarteada o agrietada, fibrosa, verrugosa, tener o no

---

placas y separarse fácil o difícilmente de la carne. Además el borde del sombrero puede ser liso, ondulado, estriado, acanalado, festonado, delgado, grueso, etc.

**Himenio:** es la parte fértil del carpóforo, donde se localizan las esporas. Las **láminas** son unos tabiques verticales delgados que se encuentran situados en la parte inferior del sombrero, dichas láminas, pueden ser separadas, libres, escotadas cuando tienen un entrante en la proximidad del pie, adnatas o adheridas cuando tocan el pie en una pequeña parte o decurrentes si recubren una parte del pie.

El **pie** es la parte de la seta que sostiene al sombrero. El color, el tamaño, la estructura fibrosa o granulosa o si es hueco o macizo, son caracteres indispensables para la taxonomía. El pie ser central, lateral o excéntrico, delgado o grueso, curvado, sinuoso, radicante, atenuado, claviforme, bulboso, fibroso, cartilaginoso o granuloso, en ocasiones, en el pie aparece un **anillo** cuya formación se debe a la rotura total o parcial del velo himenial al crecer la seta y extenderse el sombrero, quedando parte de esta membrana rodeando el pie. La existencia de este anillo ayuda en la determinación y la clasificación de las setas, sin embargo, en algunas setas desaparece fácilmente.

La **volva** es un resto membranoso del velo universal que tiene forma de vaina y que a menudo se mantiene en la base del pie. Este velo universal cubre y protege a la seta totalmente al nacer y al crecer desaparece total o parcialmente.

La **carne** se caracteriza por su consistencia (fibrosa, granulosa, dura o blanda, compacta o esponjosa, viscosa, coriácea, higrófana), su color (varía dependiendo de la oxidación y el clima), su olor (anís, ajo, harina fresca, fenol, almendras amargas, cloro, patatas crudas) y su sabor (dulce, amargo, picante, agradable, desagradable).

#### **1.4. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE LOS HONGOS.**

En la determinación y caracterización de los hongos es imprescindible la observación microscópica de las hifas, cistidios, pelos y esporas.

Las **hifas** son las unidades estructurales de la mayoría de los hongos, sobre todo de los filamentosos. Las hifas septadas presentan tabiques transversales en forma y número regular, con un poro de comunicación en el centro; las hifas aceptadas carecen de dicho tabique. El conjunto de hifas recibe el nombre de micelio. Se puede observar al microscopio el grosor de la pared, el diámetro del filamento, la presencia o no de bucles o fíbulas, etc.

---

Las **ascas** son los sacos donde se desarrollan las esporas de los *Ascomycetes* mientras que los **basidios** son los órganos donde se desarrollan las esporas de origen sexual de los *Basidiomycetes*. Los **cistidios** son células estériles que rodean a los basidios.

Los **pelos** son elementos estériles de morfología variada que aparecen tanto en la cutícula como en el himenio o en el pie.

Las **esporas** son los órganos de origen sexual encargados de perpetuar y extender la especie. Es importante el color de la esporada (conjunto de esporas que deja caer el carpóforo cuando está maduro), debido a que es significativo a la hora de identificar la especie, además, las esporas son muy variables en cuanto a forma, ornamentación, y tamaño. Las formas de las esporas pueden ser esféricas, ovales, globosas, poligonales, estrelladas, cilíndricas, helicoidales, etc; sus superficies pueden ser lisas, rugosas, reticuladas, verrugosas y espinosas; además, pueden presentar tabiques tanto longitudinales como transversales. El tamaño suele variar entre 3 y 20 micras.

## 1.5. CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS SOMETIDOS A ESTUDIO.

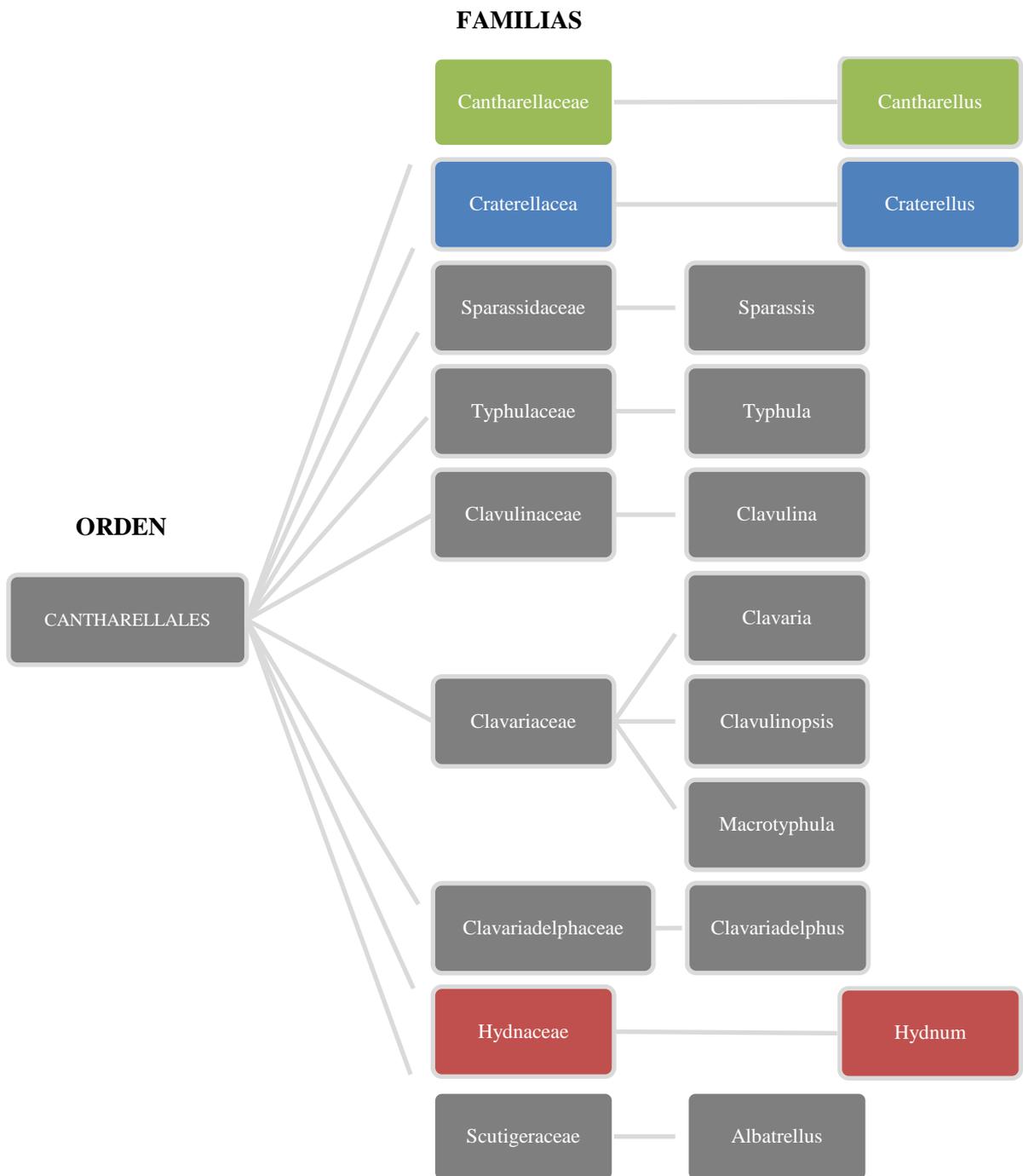
La ordenación Taxonómica de este Reino distingue entre división, subdivisión, clase, subclase, orden, familia, género y especie.

Las setas objeto de este estudio pertenecen a la División: *Basidiomycota*, Subdivisión: *Basidiomycotina*, Clase: *Homobasidiomycetes*, Subclase: *Aphyllaphoromicetidae*, Orden: *Cantharellales*.

Los *Cantharellales* son un orden de hongos *Basidiomycotas* (Hibbett y cols., 2007), tienen forma de embudo con el borde ondulado, sinuoso, y el himenio en pliegues espaciados como laminillas que bajan por el pie, anastomizadas, es decir que se juntan y ramifican. La especie comestible más apreciada es *Cantharellus cibarius*. Los *Cantharellales* suelen formar micorrizas con coníferas y árboles de madera dura.

Dentro de este orden, se agrupan varias familias (Fig. I8). El grupo de hongos que se someten a estudio en este trabajo pertenecen a la familia de:

- *Cantherallaceae*: *Cantharellus cibarius* **CC** (verde).
- *Craterellaceae*: *Craterellus cornucopioides* **CCO**, *Craterellus lutescens* **CL** y *Craterellus tubaeformis* **CT** (azul).
- *Hydnaceae*: *Hydnum repandum* **HR**, *Hydnum rufescens* **HRU** (rojo).



**Figura I8. Clasificación taxonómica de las muestras dentro del Orden de las *Cantharellales*. Elaboración propia.**

NOTA: En otras bibliografías consultadas CT y CL son considerados de la familia *Cantharellaceae*. Estas especies se nombrarán indistintamente de las dos maneras: CL: *Cantharellus lutescens* o *Craterellus lutescens*; CT: *Craterellus tubaeformis* o *Craterellus tubaeformis*. En esta clasificación se han utilizado los datos recogidos en el libro Guía de “Setas de la península Ibérica y de Europa”. Ed. Everest (García y Sánchez., 2009)

### 1.5.1. *Hydnum repandum*

Género y especie

***Hydnum repandum*** L.: Fr.

Otros nombres:

Nombre común: Lengua de vaca, gamuza.  
Sinónimo: *Hydnum flavidum* Schaeff.

#### Taxonomía:

División	Subdivisión	Clase	Subclase	Orden	Familia
Basidiomycota	Basidiomycotina	Homobasidiomycetes	Aphyllporomyceidae	Cantharellales	Hydnaceae

#### Características Macroscópicas:

Sombrero de hasta 15 cm, de color variable, desde beige a amarillento, aunque predominantemente de color gamuza. Es carnoso y seco, con la superficie lisa o ligeramente afieltrada, su forma es convexa pero muy irregular, con el margen lobulado en los ejemplares adultos.

Himenóforo formado por agujones muy frágiles que se caen con solo tocarlos, de unos 6 mm de largo, de color blanquecino o crema, decurrentes sobre el pie.

Pie normalmente corto y grueso, en ocasiones excéntrico, de color bastante pálido.

Carne quebradiza y blanca, aunque puede amarillear débilmente.

#### Características microscópicas:

Sistema de hifas monomitico. Hifas generativas hialinas, con fibulas, de pared delgada, de diámetro variable, de 3-15  $\mu\text{m}$  Ø. Esporas subglobosas, de 5,5-7 x 4,5-6  $\mu\text{m}$ , de pared delgada, hialinas, lisas, ni amiloides ni dextrinoides. Esporada blanca.

#### Hábitat

Aparece desde finales de verano en bosques de caducifolios, en corros o hileras, en los pinares sin embargo es una seta tardía, que sale con el otoño ya avanzado y que incluso aguanta hasta la llegada de las nieves. Común y abundante

#### Observaciones:

Constituye un buen comestible, más adecuada para acompañar guisos que para comerla sola.

#### Referencias

(Linnaeus) Fries, 1821 (Smith, 1949; Smith, Smith & Weber, 1981; Arora, 1986; Phillips, 1991/2005; Lincoff, 1992; Persson, 1997 Herb. Kuo 2007.

Texto

Calonge FD. 2011; García A., Sánchez J. 2009;

Imagen

[www.mushroomexpert.com/hydnum\\_repandum.html](http://www.mushroomexpert.com/hydnum_repandum.html)



Figura I9: Ficha técnica *Hydnum repandum*. Elaboración propia.

### 1.5.2. *Hydnum rufescens*

Género y especie

***Hydnum rufescens*** (Pers.) Fr.

Otros nombres:

Nombre común: Lengua de gato, tripaki  
gorriska, picornell de pi.

Sinónimo: *Hydnum carnosum* Batsch.

#### Taxonomía:

División	Subdivisión	Clase	Subclase	Orden	Familia
Basidiomycota	Basidiomycotina	Homobasidiomycetes	Aphyllporomyceidae	Cantharellales	Hydnaceae

#### Características Macroscópicas:

Sombrero de poco porte y aspecto poco carnoso, el diámetro de los ejemplares más desarrollados apenas supera los 5 cm en el mejor de los casos. Tiene una forma convexa en sus primeras etapas y aplanada al desarrollarse plenamente, con la zona central umbilicada o resaltada según las diferentes formas o variedades. Su superficie es de color ocre anaranjado, lisa y no separable de la carne, aunque puede tener tonalidades diferentes según su estado, los matices anaranjados están siempre presentes. El margen es regular y tiende a ondularse en los ejemplares viejos. Láminas formadas por agujones frágiles y quebradizos que se desprenden con facilidad al menor roce, estos agujones no decurren sobre el pie de forma habitual aunque este es un carácter un tanto inconstante y en ejemplares viejos con sombrero ondulado si pueden decurrir. Pie generalmente delgado, alargado o proporcionado al sombrero, de color que va del blanquecino inicial a tonos ocráceo anaranjados claros o rosados, ensuciándose un tanto al ser manipulado, es lleno y de consistencia quebradiza. Carne no demasiado espesa de color blanquecino o crema, al corte tiende a teñirse de anaranjado claro, quebradiza.

#### Características microscópicas:

Sistema de hifas monomitico. Hifas generativas hialinas, con fibulas, de pared delgada, de hasta 15 µmØ. Esporas anchamente elipsoidales a subglobosas, de 8-9 x 6-7 µm, de pared delgada, hialinas, lisas, ni amiloides ni dextrinoides. Esporada blanca

#### Hábitat

Se trata de una especie bastante frecuente en muchas zonas de la península ibérica, puede brotar tanto en bosques de planifolios como bajo diversas coníferas, se ve con frecuencia en hayedos donde brota durante el otoño y puede llegar a permanecer hasta avanzado el invierno. Es una especie que suele fructificar en grupos, muchas veces en corros o hileras.

#### Observaciones:

Esta especie es comestible de olor es suave y afrutado, poco perceptible, y su sabor inicialmente es dulce pero pasado un rato de masticación puede resultar algo amargo, para evitarlo, someterla a fuerte cocción.

#### Referencias

(Linnaeus) Fries, 1821 (Smith, 1949; Smith, Smith & Weber, 1981; Arora, 1986; Phillips, 1991/2005; Lincoff, 1992; Persson, 1997 Herb. Kuo M. 2003.

Texto

Calonge, F.D. 2011; García A., Sánchez J. 2009;  
Kuo, M. 2003

Imagen

<http://www.fichasmicologicas.com/?micos=1&alf=H&art=209>



Figura I10: Ficha técnica *Hydnum rufescens*. Elaboración propia.

### 1.5.3. *Cantharellus cibarius*

Género y especie

***Cantharellus cibarius*** Fr.

Otros nombres:

Nombre común: Rebozuelo, saltaperretxico, zizahori, rosignol.  
Sinónimo: *Cantharellus edulis* Sacc.

#### Taxonomía:

<i>División</i>	<i>Subdivisión</i>	<i>Clase</i>	<i>Subclase</i>	<i>Orden</i>	<i>Familia</i>
<i>Basidiomycota</i>	<i>Basidiomycotina</i>	<i>Homobasidiomycetes</i>	<i>Aphyllphoromyceidae</i>	<i>Cantharellales</i>	<i>Cantharellaceae</i>

#### Características Macroscópicas:

Sombrero que puede superar los 5 cm de diámetro, de color fundamentalmente amarillo, a veces muy pálido y otras casi naranja, lo que da pie a la existencia de unas cuantas variedades. Su forma de joven es plano-convexa, con el tiempo se va deprimiendo y hundiendo por el centro. Su cutícula es lisa y el margen suele estar enrollado y lobulado irregularmente.

Láminas que en realidad no son tales, sino pliegues bifurcados y muy decurrentes, también de un color amarillo muy llamativo, prácticamente con colores con el sombrero.

Pie lleno y macizo, atenuado hacia la base, más bien corto, de color amarillo, con color o algo más pálido que el resto del carpóforo.

Carne espesa en la zona central del sombrero, más delgada hacia el borde, de color amarillento, olor agradable afrutado y sabor suave.

#### Características microscópicas:

Sistema de hifas monomítico. Hifas generativas con fibulas, de 2-4  $\mu\text{m}\varnothing$ . Esporas anchamente elipsoidales, de 8-10 x 5-  $\mu\text{m}$ , hialinas, lisas, no amiloides. Basidios de bispóricos a hexaspóricos. Esporada: de amarillo pálido a blanco cremoso.

#### Hábitat

Cuando más aparece es en los veranos lluviosos, pero también se encuentra en el otoño, suele preferir los bosques de planifolios, aunque con menos profusión sale también en coníferas. La var. *amethysteus* suele salir bajo alerces.

#### Observaciones:

Esta especie es un excelente comestible. Sabor no distintivo o ligeramente picante; olor fragante y dulce, como los albaricoques.

KOH en sombrero negativo a rojizo; amoniaco en sombrero negativo. Branquias falsas grisáceo a gris oscuro con sales de hierro.

#### Referencias

Fries, 1821 (Coker, 1919; Smith, 1968; Bigelow, 1978; Weber & Smith, 1985; Metzler y Metzler, 1992; Horn, Kay & Abel, 1993; Barron, 1999; roody, 2003; McNeil, 2006 ; Kuo, 2007;. Binion et al, 2008).

#### Texto

Calonge FD. 2011; García A., Sánchez J. 2009; Kuo, M. 2011;

#### Imagen

<http://stuffpoint.com/nature/image/394645/golden-beauty-cantharellus-cibarius-picture/art=209>



Figura I11: Ficha técnica *Cantharellus cibarius*. Elaboración propia.

#### 1.5.4. *Craterellus cornucopioides*

Género y especie

***Craterellus cornucopioides***  
(L. Fr.) Pers.

Otros nombres:

Nombre común: Trompeta de los muertos.  
Sinónimo: *Cantharellus cornucopioides*

#### Taxonomía:

División	Subdivisión	Clase	Subclase	Orden	Familia
Basidiomycota	Basidiomycotina	Homobasidiomycetes	Aphyllorphomycetidae	Cantharellales	Craterellaceae

#### Características Macroscópicas:

Sombrero de hasta 10 cm de diámetro, de color variable según el grado de humedad del espécimen, desde negro a gris mate, con una cutícula lisa o ligeramente veteada de fibrillas y con el borde lobulado de manera irregular. Su forma es de trompeta y posee una cavidad en el centro que se prolonga casi hasta la base del pie.

Láminas inexistentes, el himenio de esta especie es completamente liso, y de color gris ceniciento, si acaso débilmente arrugado.

Pie que se puede considerar como una mera prolongación del sombrero, es hueco, y su color es similar al del himenio o ligeramente más oscuro.

Carne delgada y quebradiza, escasa, de consistencia elástica, de color gris a negruzca.

#### Características microscópicas:

Sistema de hifas monomítico. Hifas de diámetro variable, las de la trama hasta 20 µm. Esporas anchamente elipsoidales, de 12-16 x 7-10 µm. Esporada blanca.

#### Hábitat

Aparece en bosque de robles y hayas, en verano pero sobre todo en los meses otoñales, en placas de numerosos ejemplares. Le gustan los terrenos muy húmedos.

#### Observaciones:

Excelente comestible es además una seta que se presta a ser desecada para su posterior rehidratación, o para convertirla en polvo con el que aderezar los guisos. Puede confundirse con el *Cantharellus cinereus*, que sin embargo tiene el himenio con pliegues bien marcados, especie también comestible.

De olor aromático agradable y buen sabor.

#### Referencias

(Linnaeus, 1753) Persoon, 1825 (Smith, 1949; Corner, 1966; Smith, 1968; Petersen, 1975; Bigelow, 1978; Smith, Smith & Weber, 1981; Thiers, 1985; Weber & Smith, 1985; Arora, 1986; Phillips, 1991/2005; Lincoff, 1992; Metzler y Metzler, 1992; Horn, Kay & Abel, 1993; Persson, 1997; Barron, 1999; Pilz et al, 2003; Roody, 2003; McNeil, 2006; Miller & Miller, 2006; Kuo, 2007)

Texto

Calonge, F.D. 2011; García A., Sánchez J. 2009;

Imagen

<http://www.mushroomexpert.com/>.html



Figura I12: Ficha técnica *Craterellus cornucopioides*. Elaboración propia.

### 1.5.5. *Craterellus lutescens* o *Cantharellus lutescens*

Género y especie

***Craterellus lutescens*** (Pers.) Fr.

Otros nombres:

Nombre común: trompeta amarilla, saltsa-perretxiko hori, camagroc.

Sinónimo: *Cantharellus lutescens*

#### Taxonomía:

División	Subdivisión	Clase	Subclase	Orden	Familia
Basidiomycota	Basidiomycotina	Homobasidiomycetes	Aphyllporomyceidae	Cantharellales	Craterellaceae

#### Características Macroscópicas:

Sombrero de aproximadamente 5 cm de diámetro en estado adulto, con forma embudada o plana, pero con una especie de ombligo en su zona central. De color marrón grisáceo recubierto por fibras oscuras sobre un fondo algo amarillento. El borde suele ser más oscuro, y está ondulado e involuto de forma un tanto irregular, siendo además muy fino.

Láminas inexistentes, el himenio de esta seta es liso o arrugado, como con unas ondulaciones a modo de pliegues que decurren notablemente sobre el pie. De color amarillento o carneo pálido. Pie mucho más largo que el diámetro del sombrero, de color amarillo fuerte o amarillo anaranjado, generalmente liso. A veces con un surco longitudinal. Es hueco.

Carne fina, delgada y frágil, más dura en el pie y más flexible en el sombrero, de color amarillo.

#### Características microscópicas:

Sistema de hifas monomítico. Hifas generativas confibulas, de diámetro variable, hasta 12 µmØ, pared algo gruesa. Esporas anchamente elipsoidales, de 9-11 x 6,5-7,5 µm, hialinas, lisas, no amiloides. Esporada crema amarillenta. Basidios de bispóricos a hexaspóricos.

#### Hábitat

Es una seta que aparece durante el otoño, de forma gregaria, formando a veces verdaderas alfombras, en zonas musgosas dentro de los pinares, con predilección por los terrenos calizos. Localmente frecuente y abundante.

#### Observaciones:

Es un buen comestible habitualmente recolectado por los seteros, que incluso puede desecarse para su posterior uso. Se puede confundir con el *Cantharellus tubaeformis*, cuyo himenio tiene auténticas nervaduras, no pliegues o arrugas como esta seta, además su olor a humedad es característico, y sus colores no son tan vivos.

Olor bastante fuerte, afrutado, y sabor dulce.

#### Referencias

(Bulliard) Quelet, 1888 (Corner, 1966; Smith, 1968; Bigelow, 1978; Smith, Smith & Weber, 1981; Thiers, 1985; Weber & Smith, 1985; Arora, 1986; Phillips, 1991/2005; Lincoff, 1992; Persson, 1997; Barron, 1999; Pilz et al, 2003; Roody, 2003; McNeil, 2006; Miller & Miller, 2006; Kuo, 2007)

Texto

Calonge, F.D. 2011; García A., Sánchez J. 2009;

Imagen

<http://www.setasysitios.com>



Figura I13. Ficha técnica de *Craterellus lutescens* o *Cantharellus lutescens*.

Elaboración propia.

### 1.5.6. *Craterellus tubaeformis* o *Cantharellus tubaeformis*

Género y especie

***Craterellus tubaeformis***

(Bull.) Quéél.

Otros nombres:

Nombre común: Angula de monte.

Sinónimo: *Cantharellus tubaeformis*, *Cantharellus infundibiliformis*

#### Taxonomía:

División	Subdivisión	Clase	Subclase	Orden	Familia
Basidiomycota	Basidiomycotina	Homobasidiomycetes	Aphyllaphoromyceidae	Cantharellales	Craterellaceae

#### Características Macroscópicas:

Sombrero de 2 a 6cm, embudado (forma de tuba o trompeta), hueco hasta el pie, color pardo o marrón, con matices amarillento-ocráceos. Margen más amarillo, sinuoso, irregular, incurvado y ondulado. Cutícula seca, mate, escamosa y finamente vellosa. En vez de láminas, presenta pliegues o nervaduras bien marcadas, anastomasadas, intervenadas, anchas, separadas, decurrentes, color grisáceo, sobre fondo liso amarillento.

Pie cilíndrico, centrado, liso, estrecho y hueco, a menudo soldado a otros pies, de color amarillo mate (no vivo), a marrón oscuro, a veces grisáceo.

Carne escasa, muy fina, flexible, más dura en el pie, color amarillo pálido.

#### Características microscópicas:

Esporas ovoides de 8-10 x 6-8 µm, hialinas, lisas, no amiloides. Esporada crema pálido.

#### Hábitat

Bosques húmedos de coníferas (pino, abeto) y caducifolios (roble, haya, castaño). Bajo el musgo o humus del suelo, monte bajo de brezo omatorral. Gregaria, grupos numerosos. Se da principalmente en primavera, fin de verano y otoño. En el sur, hasta mediado el invierno.

#### Observaciones:

Es un buen comestible. Olor a moho y sabor dulce, no desagradable. Se conoce en ambientes gastronómicos como angula de monte.

#### Referencias

(Bulliard) Quelet, 1888 (Corner, 1966; Smith, 1968; Bigelow, 1978; Smith, Smith & Weber, 1981; Thiers, 1985; Weber & Smith, 1985; Arora, 1986; Phillips, 1991/2005; Lincoff, 1992; Persson, 1997; Barron, 1999; Pilz et al, 2003; Roody, 2003; McNeil, 2006; Miller & Miller, 2006; Kuo, 2007)

Texto

Calonge FD. 2011; García A., Sánchez J. 2009;

Imagen

<http://www.setasysitios.com>



Figura I14. Ficha técnica de *Craterellus tubaeformis* o *Cantharellus tubaeformis*.

Elaboración propia.

---

## 1.6. PROPIEDADES QUÍMICAS Y NUTRICIONALES DE LAS SETAS.

Las setas contienen una cantidad muy elevada de agua (entre el 82-92%). Son consideradas como alimento saludable, ya que son bajas en calorías y grasa pero ricas en proteínas y fibras dietéticas (Manzi y cols., 1999; Barros y cols., 2008; Kalac., 2013).

Los principales componentes que se han encontrado en las setas son:

**Las proteínas:** su porcentaje en peso seco puede variar entre el 10 y el 30%. Las proteínas de los hongos contienen los nueve aminoácidos esenciales requeridos por los seres humanos. El contenido de proteína cruda de hongos comestibles es generalmente alto, pero es muy variable y se ve afectado por factores como la especie y la fase de desarrollo (Longvah y Deosthale., 1998). El contenido de proteína cruda de algunas setas comestibles comunes varía aproximadamente entre el 10 y el 40% (Barros y cols., 2009; Longvah y Deosthale., 1998).

El contenido de **aminoácidos esenciales** (g/100 g de proteína) en las setas oscila aproximadamente entre el 34 a 47%. Los perfiles de aminoácidos esenciales de setas revelan deficiencias en los aminoácidos que contienen azufre, incluyendo metionina y cisteína, sin embargo, los hongos comestibles son comparativamente ricos en treonina y valina. La lisina, leucina, isoleucina, y el triptófano son los aminoácidos característicos de algunas proteínas de hongos comestibles (Barros y cols., 2009; Cheung., 2003).

**Vitaminas.** Las Setas son una buena fuente de varias vitaminas, como la riboflavina, niacina y folatos. El contenido de vitamina B2 en los hongos es mayor que el que generalmente se encuentra en los vegetales (Black, M., 2012), y según las variedades incluso mayor que el que contiene los huevos o el queso (Mattila y cols., 2001). Además, la biodisponibilidad de los folatos es tan buena como la del ácido fólico (Clifford y cols., 1991). Las setas contienen también vitamina C, vitamina A, ergosterol, vitamina K, y ácido pantoténico, tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, y niacina (Kalac., 2009).

**Los carbohidratos** de hongos comestibles varían con la especie. El contenido oscila entre 35 a 70% en peso fresco (Mau y cols., 2001). Las setas comestibles contienen un alto nivel de oligosacáridos y sólo un bajo nivel de azúcares solubles totales (Bano y Rajarathnam., 1988).

**Polisacáridos:** la quitina, el glucógeno, el manitol y la trehalosa son componentes típicos. El glucógeno es el polisacárido de reserva de las setas. La quitina,

---

al igual que la celulosa es un polisacárido estructural insoluble en agua, que no se digiere, por lo que algunos ejemplares resultan bastante indigestos (Kalac., 2009). Los  $\beta$ -glucanos, uno de los grupos más ampliamente investigados de moléculas bioactivas de setas, poseen propiedades antitumorales e inmunomoduladoras, y se usan en el tratamiento clínico (Guillamón y cols., 2010; Wasser., 2011; He y cols., 2014).

El nivel de **ácidos grasos** en los hongos es generalmente bajo (2 al 8%) (Kavishree., 2008). El nivel de ácidos grasos poliinsaturados en comparación con los ácidos grasos saturados es bastante alto, constituyendo más del 75% de los ácidos grasos totales, de los cuales los ácidos oleico y linoleico son los más significativos (Ribeiroa y cols., 2009), mientras que el ácido palmítico es el ácido graso saturado principal.

**Minerales:** aportan una cantidad notable y los más destacados son, el potasio, fósforo, hierro, magnesio, yodo, zinc, selenio y calcio. Un factor a tener en cuenta en su recolección es que tienden a absorber los metales pesados de los residuos y las aguas contaminadas.

## **1.7. PROPIEDADES MEDICINALES DE LAS SETAS.**

El uso de los hongos como medicina se remonta al año 3000 a.C cuando los hongos superiores eran utilizados como terapia para el tratamiento de enfermedades, sobre todo en la medicina oriental. La penicilina, descubierta por el doctor Alexander Flemming en 1928, abre una nueva era en la medicina con la aplicación de los hongos en la obtención de antibióticos, es a partir de este momento cuando los hongos comienzan a considerarse como un recurso natural de antibióticos y otros compuestos bioactivos (Zaidman y cols., 2005).

La investigación de sus propiedades medicinales y funcionales ha seguido evolucionando, en 1984 se elaboró la ciclosporina, un inmunodepresor utilizado en los trasplantes de órganos o de médula a partir del hongo *Tolytocladium inflatum*. En 1987 los laboratorios Merck, presentaron «Mevacor», el primer medicamento para disminuir el colesterol que contiene lovastatina, sustancia derivada del hongo *Aspergillus terreus* (Arregui A., 2010).

---

La valoración de las setas como un alimento sano y como una fuente importante de principios activos biológicos con valor medicinal (Cheung y cols., 2003) es relativamente actual. Los hongos tienen diferentes efectos beneficiosos:

- **Hongos como antioxidantes.**

Muchos estudios han concluido que los hongos comestibles poseen potentes antioxidantes. (Mau y cols., 2001; Yang y cols., 2002; Vamanu E., 2013; Mondal, T., 2013).

En la mayoría de estos estudios se encontró una correlación positiva entre el contenido fenólico total en los extractos de hongos y sus propiedades antioxidantes, lo que confirma que los hongos comestibles tienen un buen potencial como antioxidantes naturales debido a la capacidad de sus compuestos fenólicos para inhibir la oxidación de lípidos.

- **Hongos como agentes hipocolesterolémicos.**

La enfermedad cardiovascular se asocia con la arteriosclerosis, la oxidación de LDL, y la hipercolesterolemia, y por lo tanto la regulación del nivel de colesterol es importante para la prevención y el tratamiento de esta enfermedad. Las setas comestibles son un alimento ideal para la prevención dietética de la arteriosclerosis debido a su alto contenido de fibra y bajo contenido de grasa. La inclusión de hongos comestibles en una dieta natural hipocolesterolémica se prescribe a menudo en la medicina oriental (Ishikawa y cols., 1984).

- **Hongos como agentes hipoglucémicos.**

Tras una extensa búsqueda de remedios naturales para la diabetes se ha llegado a la conclusión de que los hongos comestibles son un alimento ideal para la prevención dietética de la hiperglucemia debido a su alto contenido de fibra dietética y proteínas y bajo contenido de grasa (Alarcón-Aguilara y cols., 1998; Da Silva., 2012).

**Tabla I1. Tabla resumen de los principales compuestos bioactivos presentes en los hongos y su potencial en aplicaciones terapéuticas. (Moradali y cols., 2007).**

<b>Compuesto principal</b>	<b>Ejemplo</b>	<b>Aplicaciones en medicina</b>
<b>Polisacáridos</b>	Grifolan, Lentinan Schizophyllan	Immunomodulador Antitumoral; Antiviral, Antibiótico.
<b>Polisacáridos- péptidos</b>	PSP, PSK	Antitumoral; Antiviral, Citotóxico, Antimicrobial
<b>Proteínas</b>	Ácido Ganodérico, Ganoderiol, Ácido Ganoderénico, Ácido Lucidénico	Regula la actividad de HIV, Immunomodulador, Modulador de Histamina, Citotóxico, Antitumoral.
<b>Terpenoides</b>	Ácido Ganolucídico, Ácido Aplanoxidico	Hipertension, Antiinflamatorio, ACE inhibidor.
<b>Esteroides</b>	Derivados polioxigenados del Ergosterol	Citotóxico.
<b>Ácidos Grasos</b>	Ácido Linolénico, Ácido Palmítico	Antitumoral, Antibiótico, Antimutagénico.
<b>Germanio</b>	Bis- $\beta$ -carboxietil germaniosesquióxido	Antitumoral, Inmunomodulador.
<b>Nucleótidos</b>	Adenosina	Inhibidor de agregado de plaquetas.
<b>Compuestos poliacetilénicos</b>	Biformina Quadrifidina	Antibiótico.

La seta *Cordyceps militaris* se ha utilizado durante mucho tiempo en Asia Oriental como un nutracéutico y en la medicina tradicional china como tratamiento para pacientes con cáncer. Los nuevos descubrimientos en oncología molecular han dado a conocer una gran cantidad de dianas específicas para la terapia del cáncer, incluyendo una variedad de compuestos de moléculas pequeñas que las inhiben o las estimulan (Ukawa y cols., 2000; Hossain y cols., 2012). La actividad antitumoral de los extractos de cuerpos fructíferos de *Basidiomycetes* superiores como *Boletus edulis* y otros *Homobasidiomycetes* fueron probados contra la línea del sarcoma 180 en ratones (Lucas y cols., 1957) y se encontró que tienen una actividad significativa. Son muchas las setas que se han investigado a partir de estos hallazgos (Chatterjee1., 2011)

En Europa del Este, los cuerpos fructíferos de *I. obliquus* se han utilizado como una medicina popular para el cáncer y enfermedades del estómago desde el siglo XVI

---

(Molitoris., 1994). Se han demostrado efectos antitumorales de varios extractos y compuestos aislados de hongos en sistemas de células tumorales y en ensayos con animales (Kahlo y cols., 1987; Burczyk y cols., 1996.)

- **Hongos como inmunomoduladores.**

En Japón, China, Corea y otros países del este de Asia se han utilizado desde hace décadas sustancias provenientes de hongos como inmunomoduladores. Algunos polisacáridos son capaces de estimular el sistema inmunológico no específico y ejercer actividad antitumoral a través de la estimulación del mecanismo de defensa del huésped (Chihara y cols., 1969; Mizuno., 1999; Wasser y Weis., 1999; Reshetnikov y cols., 2001). Estos fármacos activan las células efectoras como macrófagos, linfocitos T y células NK, secretan citoquinas como a TNF-a, IFN-g, IL-1b, etc, que son antiproliferativas e inducen la apoptosis y la diferenciación en células tumorales (Cha y cols., 2012; Hossain y cols., 2012). Hay evidencia de que los  $\beta$ -D-glucanos inducen una respuesta biológica mediante la unión al complemento de membrana de tipo receptor 3 (CR3, alphaM $\beta$ 2 integrina o CD11b / CD18) en las células efectoras inmunes (Zhou y Gao., 2002).

- **Hongos como agentes antimicrobianos.**

Los hongos necesitan compuestos antibacterianos y antifúngicos para sobrevivir en su ambiente natural. Por lo tanto, son una rica fuente de antibióticos naturales. (Benedict y Brady., 1972; Kupra y cols., 1979; Lindequist y cols., 1990; Mondal y cols., 2013). Varios compuestos extraídos de las setas han revelado actividad antifúngica y antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* (Takazawa y cols., 1982).

- **Hongos como agentes anti-inflamatorios.**

Los ácidos ganodéricos A, B, G y H, aislados de *Ganoderma lucidum* mostraron en ensayos con animales un efecto más fuerte que el ácido acetilsalicílico. (Koyama y cols., 1997). El extracto metanólico de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus pulmonarius*

---

(500 y 1000 mg / kg) redujo el edema inducido en ratones. La actividad fue comparable a la de diclofenaco de referencia (10 mg / kg).

- **Hongos como reguladores del Sistema Nervioso central.**

Aparte de hongos psicoactivos bien investigados como la *Amanita muscaria* o especies de *Psilocybe* se han encontrado algunos extractos y compuestos de setas con otros efectos que podrían ser de interés farmacológico y podrían tener un efecto beneficioso en la demencia de Alzheimer (Mizuno., 1999). Otros estudios indican además efectos beneficiosos en relación con el asma, la hepatitis, la osteoporosis, el riñón, y los ojos (Roupas y cols., 2012).

## **1.8. LAS SETAS SILVESTRES COMO FUENTE DE SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES NATURALES.**

Los antioxidantes son moléculas que a bajas concentraciones, respecto a las de un sustrato oxidable, retardan o previenen su oxidación. El antioxidante al chocar con el radical libre cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico. Los antioxidantes dietarios son muy variados (Diplock y cols., 1998), pero se podría asegurar que entre los más importantes podemos incluir la vitamina C o ácido ascórbico, los tocoferoles, los carotenos y sus derivados así como las sustancias fenólicas, fundamentalmente los polifenoles (Robaszkiewicz y cols., 2010).

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). Dentro de los radicales libres del oxígeno, los más importantes son el oxígeno singulete ( $O_2$ ), el radical superóxido ( $H_2O_2$ ), el radical nitrosilo ( $ONOO^-$ ) y el ozono ( $O_3$ ).

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.

Por tanto aunque se asocian al estrés oxidativo y el envejecimiento, es necesario cierto nivel de ROS para los procesos celulares y la eliminación de demasiadas especies reactivas de oxígeno puede tener consecuencias perjudiciales para el organismo.

---

En general, las setas contienen diferentes antioxidantes tales como compuestos fenólicos, tocoferoles, ácido ascórbico, carotenoides que pueden ser extraídos con el propósito de ser utilizados como ingredientes funcionales, es decir, contra las enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo (Palacios y cols., 2011).

### 1.8.1. Compuestos fenólicos.

Los compuestos antioxidantes fenólicos, han cobrado gradualmente importancia por su capacidad para proteger el cuerpo humano contra el daño producido por radicales libres que inducen la aparición de cáncer, la arterioesclerosis y el envejecimiento (Rhee y cols., 2009; Aruoma., 2003; Cho y cols., 2006).

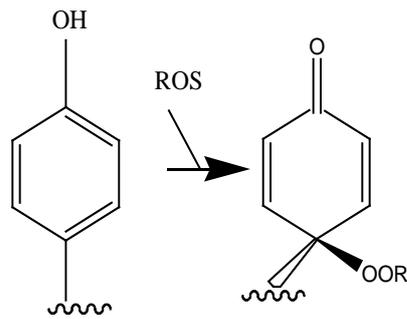
Poseen uno o más grupos fenol, un anillo aromático con al menos un grupo funcional. Muchos son metabolitos secundarios de las plantas (Apak y cols., 2007). Según su estructura química podemos clasificarlos en fenoles simples y fenoles complejos. Los fenoles simples se dividen en tres grupos:

1. Fenilpropanoides simples.
2. Lactonas fenilpropanoides.
3. Derivados del ácido benzoico.

En cuanto a los fenoles complejos, se dividen en:

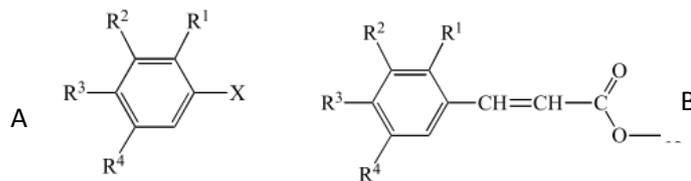
1. Lignanós.
2. Flavonoides.

El mecanismo de reacción de los fenoles es el descrito en la figura (Fig. I15). En esta reacción el fenol se oxida a quinona y después a peróxido (-OOR). El peróxido más sencillo es el peróxido de hidrógeno de fórmula  $H_2O_2$  (HO-OH). Los peróxidos superiores se forman sustituyendo un hidrógeno del HO-OH por un resto **R** (RO-OH). Cuando el peróxido se forma en una biomolécula, se pierde la función de dicha biomolécula y ello puede provocar daños serios en el funcionamiento de las células y los tejidos.



**Figura I15. Mecanismo de reacción de los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos se oxidan por sustancias fuertemente oxidantes y por radicales libres generando quinonas.**

Los compuestos fenólicos principales encontrados en las setas son ácidos fenólicos que a su vez se pueden dividir en dos grupos principales, ácidos hidroxibenzoico y ácidos hidroxicinámicos (Fig. I16).



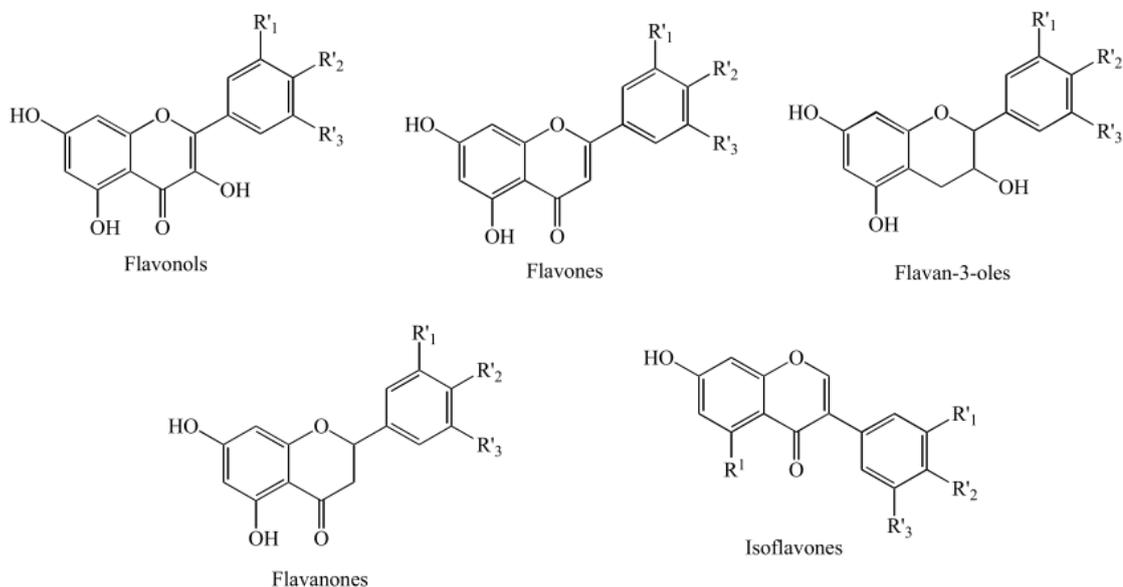
**Figura I16. Estructura química. (A) Derivados del ácido hidroxibenzoico y (B) ácido hidroxicinámico. Ambos presentes en las setas.**

### 1.8.2. Otros compuestos antioxidantes presentes en las setas.

- **Flavonoides.**

En busca de nuevas sustancias antioxidantes de origen vegetal, se han desarrollado varios estudios clasificando los fenoles presentes en las setas (Oksana., 2012; Kalogeropoulos., 2013). En general, se supone que sólo las plantas poseen la capacidad para producir flavonoides excluyendo a los animales y los hongos, sin embargo, recientemente han sido encontrados sólo en algunos hongos como *Aspergillus candidus* y *Phallus impudicus* (Iwashina., 2000). Los flavonoides representan un gran grupo de composición fenólica con actividad antioxidante, se encuentran naturalmente en las plantas, frutas, verduras, granos, cortezas, raíces, tallos, flores, y productos derivados, como el té y el vino. Estos compuestos están implicados en la reducción del

riesgo de enfermedades crónicas (Liu., 2004). La estructura básica de estos compuestos consiste en dos anillos aromáticos (anillos A y B) unidos por una cadena de tres carbonos que es por lo general un anillo de heterociclo oxigenado.



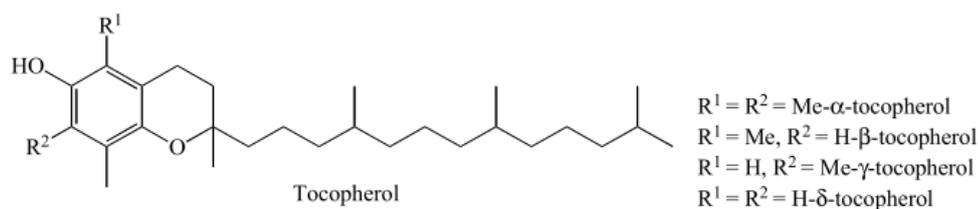
**Figura I17. Estructura química general de los flavonoides encontrados en algunas setas silvestres (Ferreira y cols., 2009).**

- **Tocoferoles.**

Bajo el término de vitamina E se agrupan dos familias de compuestos afines, los  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  tocoferoles y sus cuatro correspondientes tocotrienoles.

La vitamina E (Fig. I18) es un importante antioxidante natural en los alimentos, especialmente en aquellos que son ricos en ácidos grasos poliinsaturados. Debido a su papel como captador de radicales libres, la vitamina E también tiene una función protectora frente a enfermedades, principalmente el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Blokhina., 2003).

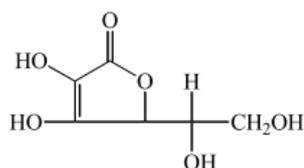
Aunque hay pocos estudios sobre el contenido en tocoferoles en setas silvestres, los datos disponibles indican que existen  $\gamma$ -tocoferoles en varias setas, mientras que los tocotrienoles no se detectaron en ninguno de los estudios (Ferreira y cols., 2009).



**Figura I18. Estructura química de la vitamina E.**

- **Ácido Ascórbico.**

El ácido ascórbico, también conocido como vitamina C (Fig. I19), ejerce un papel protector contra diversas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo tales como enfermedades cardíacas, enfermedades cerebrovasculares, cáncer, algunas enfermedades neurodegenerativas y cataratas (Halliwell., 2006)



**Figura I19. Estructura química de la vitamina C.**

La vitamina C protege del efecto de la oxidación mediante la eliminación de los radicales peroxilo en la fase acuosa antes de que se inicie la peroxidación de lípidos (Davey y cols., 2000). Como antioxidante lipofílica, la vitamina E puede interactuar con los componentes lipídicos en los sistemas vasculares, especialmente el LDL, y los protege de la modificación oxidativa que da lugar a la aterosclerosis (Burton y cols., 1986). Se ha encontrado ácido ascórbico en la mayoría de las setas silvestres (Ferreira y cols., 2009)

- **Carotenoides.**

Los carotenoides son pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides que se encuentran de forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias. Se caracterizan por su poder protector y antioxidante, siendo responsables de los colores amarillos, rojizos y anaranjados en la

---

naturaleza. Según los estudios realizados recientemente, se puede encontrar caroteno en varias especies de hongos (Ferreira y cols., 2009).

## **1.9. LOS B-GLUCANOS DE LAS SETAS Y SUS PROPIEDADES TERAPÉUTICAS.**

Los recientes avances tecnológicos han permitido el aislamiento y la purificación de algunos compuestos, especialmente polisacáridos, que poseen importantes propiedades inmunomoduladoras y anticancerígenas (Rout y cols., 2005).

Dentro del estudio de las propiedades medicinales de los hongos, se ha despertado un gran interés por éstas moléculas, ya que pueden actuar como modificadores de la respuesta biológica (Gonzaga y cols., 2006; Smith y cols., 2002).

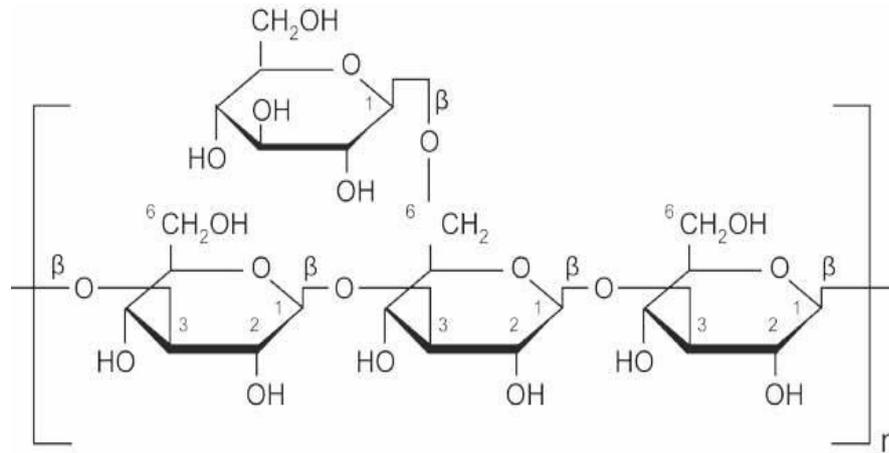
Los polisacáridos aislados de cuerpos fructíferos de hongos son en general glucanos y heteropolisacáridos solubles o insolubles en agua (Zhao., 2010).

De todos los polisacáridos extraídos en hongos, los más interesantes son los que están unidos por enlaces  $\beta$ -, por ejemplo el lentinano extraído de *Lentinus edodes* (Lo y cols., 2007; Zhang y cols., 2011), el pleurano extraído de *Pleurotus spp.* (Karácsonyi y Kuniak., 1994), ganoderano y ganopolyano extraídos de *Ganoderma lucidum* (Wang y Zhang., 2009), o esquizofilano extraído de *Schizophillium commune* (Numata y cols., 2006; Zhang., 2013).

Se han realizado investigaciones intensivas con  $\beta$ -glucanos de origen fúngico en los últimos 30 años, la mayor parte de la investigación ha sido en relación con el cáncer y el sistema inmunitario. Los polisacáridos pueden estimular a las células inmunes, tales como granulocitos, monocitos y macrófagos para desencadenar la secreción de citoquinas que estimulan el sistema inmunológico. En el mercado ya hay bastantes nutracéuticos compuestos por  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos extraídos de setas como *shiitake*.

### **1.9.1. Caracterización química.**

Las moléculas de glucosa en los  $\beta$ -glucanos están unidas entre sí por enlaces  $\beta$ . Las unidades de glucosa pueden conectarse de diversas maneras. Por ejemplo, el primer átomo de carbono en una molécula de glucosa se puede enlazar con el tercer átomo de carbono de la molécula de glucosa siguiente, lo que se denomina enlace  $\beta$ -1,3.

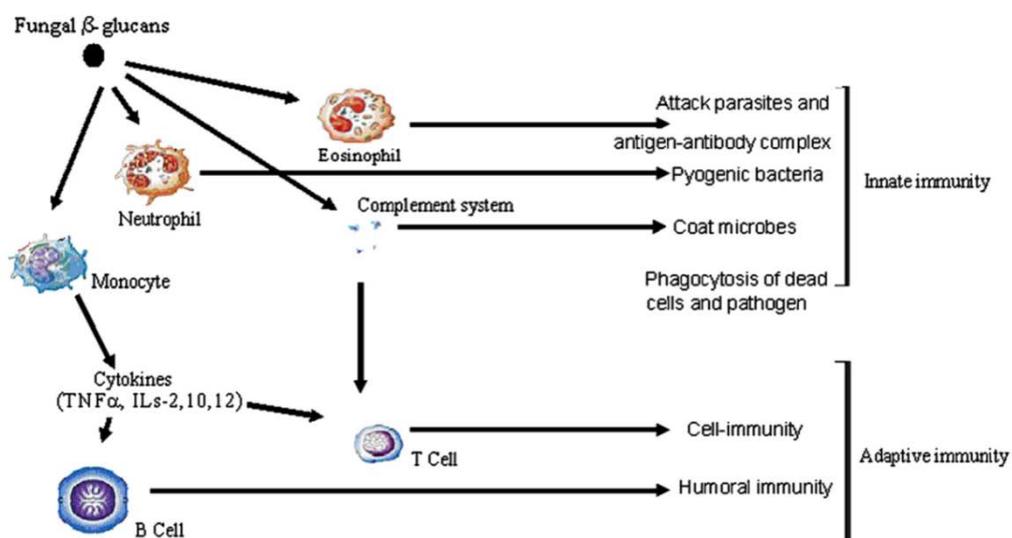


**Figura I20. Estructura química de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano**

Su único componente estructural es la glucosa (hexosa) monosacárido, que está anclado en la cadena por las posiciones 1 y 3. De la cadena principal derivan otras cadenas laterales de menor tamaño. Las formas más activas de  $\beta$  glucanos son las 1,3 / 1,6-D que contienen cadenas laterales ramificadas en las posiciones 1 y 6. (Fig. I20)

### 1.9.2. Características funcionales de $\beta$ -1,3/1,6-glucano. Efectos en el sistema inmune.

Se ha demostrado que algunos  $\beta$ -glucanos fúngicos tienen un importante efecto sobre el sistema inmune (Vetvicka y Yvin., 2004; Brown y Gordon., 2005).



**Figura I21. Mecanismo de inmunoestimulación de los  $\beta$ -glucanos (Brown y cols., 2005).**

---

Los  $\beta$ -glucanos no son sintetizados por nuestro sistema inmunológico, por lo que su presencia induce a respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas. (Brown y Gordon., 2005).

Ciertos  $\beta$ -glucanos, incluyendo zymosano, grifolano (GRN) y lentinano, son capaces de activar los fagocitos, lo que conduce a la eliminación de agentes patógenos por fagocitosis (Ladanyi y cols., 1993; Kurashige y cols., 1997; Brown y cols., 2002).

En cuanto a la investigación de las propiedades antitumorales de los hongos (Chihara y cols., 1970), los primeros glucanos inmunoestimulantes que fueron descritos son el esquizofilano (polisacárido extraído del filtrado de cultivos de *Schizophyllum commune*) y el lentinano (un glucano obtenido de la pared celular de *Lentinus edodes*).

Estos primeros estudios comenzaron con la aplicación de lentinano observando casi una regresión por completo de los tumores sólidos de tipo sarcoma en ratones CD-1 / ICD. En la actualidad son numerosos los trabajos de investigación acerca de la capacidad antitumoral de las setas silvestres (Ukawa y cols., 2000; Moradali y cols., 2007; Chen y cols., 2011)

La funcionalidad de los  $\beta$ -glucanos depende de su peso molecular y de sus tipos de enlace, los más activos desde el punto de vista funcional son los  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos, en relación con su efecto en la modificación de la respuesta inmune (Moradali y cols., 2007) ejercen una estimulación del sistema inmune (Fig. I21) por unirse específicamente al receptor de complemento 3 (CR3) a través de un tipo de lectina (LLD) y por la activación de CR3 para promover la citotoxicidad celular de las células cancerosas con recubrimiento de iC3b (Chen y cols., 2011).

Los  $\beta$ -glucanos actúan como agentes inmunomoduladores a través de la activación de las células inmunes innatas tales como macrófagos, células dendríticas, granulocitos y células asesinas naturales, desencadenan las respuestas de las células inmunitarias adaptativas tales como las células B CD4 + o células T CD8 + , dando como resultado la inhibición del crecimiento tumoral y la metástasis (Mizuno y cols., 2002).

### **1.9.3. Importancia de los $\beta$ -1,3/1,6-glucanos en el tratamiento del cáncer.**

El cáncer es una proliferación celular incontrolada que puede ser inducida por diferentes factores: ambientales, virus, bacterias, hormonas, y la inflamación crónica (Nam y cols., 2005). Se reconocen tres etapas de desarrollo (Borchers y cols., 2004;

---

Nam y cols., 2005). La primera es la iniciación, en la que un mutágeno se une al ADN de la célula y provoca daños, la segunda etapa es la activación de un promotor tumoral que conduce a la formación de pequeños tumores benignos. Finalmente, en la tercera etapa se pierde el control de la proliferación celular (Borchers y cols., 2004). Los estudios de ADN en carcinoma hepatocelular han revelado que las mutaciones genéticas están involucradas en el desarrollo tumoral (Nam y cols., 2005). Los  $\beta$ -glucanos tienen efectos sinérgicos con los anticuerpos monoclonales utilizados en el tratamiento del cáncer.

Ciertos  $\beta$ -glucanos también pueden mejorar la quimioterapia y el tratamiento de radiación mediante el aumento de la tolerancia del paciente, y acelerar la recuperación de los efectos tóxicos (Harada y cols., 2002; Guy cols., 2005)

Se han usado con éxito en el tratamiento postoperatorio de cáncer, consiguiendo el aumento de las tasas de supervivencia (Munemoto y cols., 2002; Ito y cols., 2004).

Una revisión bibliográfica, reveló 48 ensayos clínicos publicados que utilizan  $\beta$ -glucanos (Sakamoto y cols., 2006) en un total de 1.094 pacientes, los resultados mostraron que la inmunoquimioterapia reforzada con  $\beta$ -glucanos aumentó cinco años las tasas de supervivencia general de 72,2% a 79% (Nakazato y cols., 1994; Ito y cols., 2004).

#### **1.9.4. Importancia de los beta-1,3/1,6-glucanos en el tratamiento de otras enfermedades.**

Como se ha mencionado anteriormente, son numerosas las aplicaciones de las setas en cuanto a los efectos beneficiosos que producen en el tratamiento o prevención de algunas enfermedades. Una gran parte de las sustancias responsables de esta acción son los  $\beta$ -glucanos a los cuales se les atribuyen las siguientes acciones:

- **Antivirales:** El Lentinano y el Zymosano han sido utilizados con éxito como agentes antivirales en pacientes con VIH, los datos disponibles sobre esta propiedad son casi todos descriptivos. Frente a los virus, refuerza la respuesta celular y humoral (Mayell., 2001).
- **Bactericida:** Algunos  $\beta$ -glucanos, incluido el Lentinano son efectivos contra las infecciones bacterianas. Se han realizado estudios in vivo con *mycobacterium*

---

tuberculosis, y se ha observado el aumento del número de macrófagos, con habilidades específicas para fagocitar a esta bacteria (Markova y cols., 2003 y 2005).

- **Acción antifúngica:** los  $\beta$ -glucanos son también el mayor componente de las paredes celulares de los hongos patógenos y probablemente sean los responsables de inducir la respuesta inmune. Los  $\beta$ -glucanos pueden activar a las células fagocitadoras que incluyen a macrófagos y neutrófilos, aumentando la respuesta innata del huésped. (Taylor y cols., 2007).
- **Hipercolesterolemia:** Según estudios realizados (Strong y cols., 2005) los glucanos son efectivos ayudando a disminuir el contenido en colesterol en la sangre, aunque los mecanismos no son del todo claros (Nicolosi y cols., 2009) Hay pocos estudios al respecto.
- **Diabetes:** Algunos  $\beta$ -glucanos son capaces de disminuir las concentraciones de azúcar en la sangre (Da Silva y cols., 2012).
- **Obesidad:** Estudios realizados in vivo determinan que una dieta rica en  $\beta$ -glucanos puede ayudar a controlar el peso (Kanagasabapathy., 2013).
- **Presión sanguínea:** algunos  $\beta$ -glucanos son capaces de controlar la tensión sanguínea (Chen J. y cols., 2007).

#### 1.9.5. Factores que influyen en la eficiencia de los tratamientos con $\beta$ - glucanos.

Algunos estudios muestran que los  $\beta$ -glucanos más populares, a pesar de tener estructuras similares en su composición, difieren entre sí por su efectividad como moduladores del sistema inmunológico.

Entre los factores que se han estudiado y que pueden influir significativamente en la actividad biológica de los  $\beta$ -glucanos se encuentran:

- 
- La estructura molecular y el tamaño: Se incrementa la capacidad antitumoral en presencia de enlaces  $\beta$ -1-6 en las cadenas. Los estudios realizados sobre las estructuras de  $\beta$ -glucanos no son muy extensos, pero las estructuras que se repiten en todos ellos son  $\beta$ -1,3-1,6, que son las que realmente presentan actividad biológica (Falch y cols., 2000).
  - La solubilidad de los  $\beta$ -glucanos es otro factor a tener en cuenta y ésta dependerá del grado de polimerización y en consecuencia, de su estructura (Hong y cols., 2000).
  - La frecuencia de los enlaces  $\beta$ -1-6 y la estructura de la hélice. Se ha demostrado que los  $\beta$ -glucanos con estructura de triple hélice, son más eficaces en su acción moduladora del sistema inmunológico (Falch y cols., 2000).

La investigación en este campo es importante en la actualidad. Se han identificado y extraído  $\beta$ -glucanos de diferentes hongos (Villares A. y cols., 2012) pero se siguen depurando las técnicas analíticas. Cuantificar el contenido en  $\beta$ -glucanos de las setas, determinar sus estructuras y estudiar su efectividad inmunomoduladora, debieran ser objetivos de futuras investigaciones.

---

## **2. OBJETIVOS DE LA TESIS.**

---

## 2.1. Objetivos.

En base a los antecedentes presentados y dada la escasa información científica existente sobre las setas en general y sobre las contempladas en el presente trabajo en particular, se proponen los siguientes objetivos:

1. Determinación de la humedad y el contenido en cenizas de los sombreros y pies de *Hydnum rufescens*, *Hydnum repandum*, *Cantharellus tubaeformis*, *Cantharellus lutescens*, *Craterellus cornucopioides* y *Cantharellus tubaeformis*.
2. Determinación del contenido en fenoles totales, la capacidad antioxidante y antirradicalaria de las setas y de las harinas de setas mediante los métodos Folin–Ciocalteu, CUPRAC y DPPH y correlación entre ellos.
3. Estudio del efecto de la cocción en medio acuoso de los extractos de las setas sobre el contenido de fenoles totales, capacidad antioxidante y capacidad antirradicalaria.
4. Determinación del contenido en  $\beta$ -glucanos de las setas y de las harinas de setas utilizando el Método del Rojo Congo y *Pleurotus eryngii* como patrón.

---

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

---

### **3.1. MATERIAL DE LABORATORIO.**

#### **3.1.1. Equipos.**

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).

Batidora: Moulinex.

Centrifuga: Digen-R ORTO ALRESA.

Congelador -24°C: Fagor.

Disgregador MICCRA D-9 /RT.

Equipo de agua Hellix. Millipore.

Espectrofotómetro: HELIOS αThermo.

Estufa: P.SELECTA 150 litros.

Mufla CARBOLITE: J. Jimeno. S.A.

pHmetro: pH-meter basic 20 + CRISON.

Pipetas automáticas: Proline Plus de Biohit.

Desecador.

#### **3.1.2. Material fungible.**

Botellas de vidrio de diversos volúmenes, desde 5 ml hasta 2 litros.

Cápsulas de porcelana.

Cápsulas de acero inoxidable.

Cubetas de poliestireno para espectrofotometría visible de 3ml.

Embudos.

Espátulas.

Frascos Erlenmeyers de vidrio de diferentes volúmenes.

Gradillas para tubos Falcon y para microtubos.

Guantes de látex.

Imanes agitadores.

---

Microtubos de plástico de 1,5 y 2 ml.  
Papel de filtro convencional (Afora).  
Parafilm M.  
Pinzas 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.  
Tijeras.  
Tubos Falcon de 15 y 50 ml.  
Tubos eppendorf.  
Vasos de precipitados de vidrio y plástico de diferentes volúmenes.

### 3.1.3. Reactivos químicos.

Todos los reactivos empleados en la realización de este trabajo quedan incluidos en la siguiente tabla, siendo todos ellos de una alta pureza (Tabla M1).

**Tabla M1. Reactivos utilizados.**

---

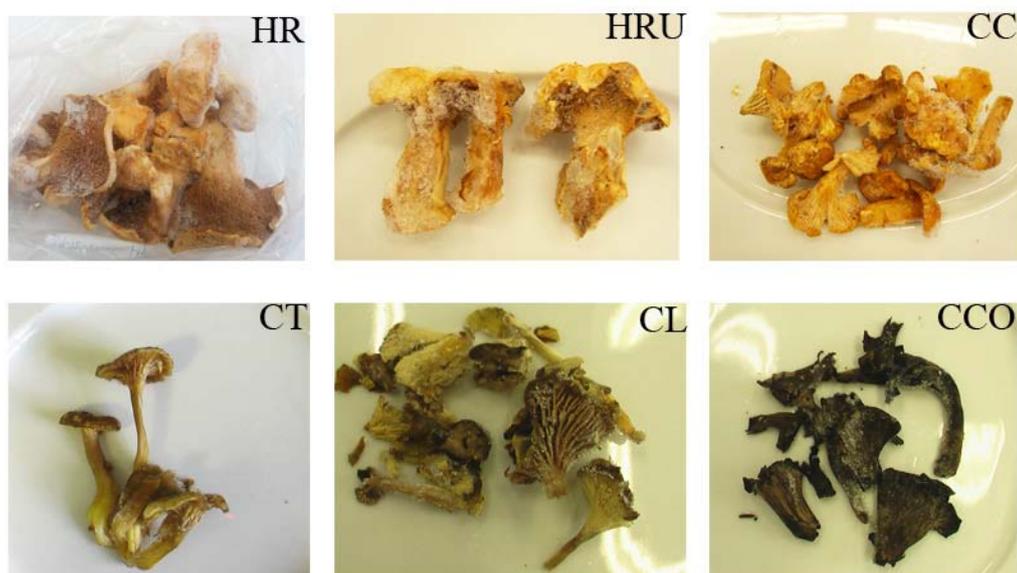
<b>Reactivos</b>	<b>Marca</b>
Ácido clorhídrico	Merck
Ácido gálico	Sigma
Ácido cítrico	Panreac
Amonio acetato	Sigma
Carbonato sódico	Merck
Cloruro de cobre II	Sigma
Di-potasio hidrógeno fosfato	Merck
DPPH	Aldrich
Etanol	Merck
Hidróxido de sodio	Carlo Erba
Metanol	Merck
Neocuproína	Sigma
Potasio hidróxido	Panreac

Potasio hidróxido 85 %	Panreac
Reactivo de Folin-Ciocalteu	Sigma
Rojo Congo	Fisher
Sodio carbonato	Panreac
Sodio cloruro	Panreac
Sodio hidróxido	Panreac
Trolox	Aldrich

Todas las soluciones se preparan con agua tipo Elix y se esterilizan.

### 3.1.4. Materiales biológicos.

Las setas silvestres utilizadas para la realización de la fase experimental de este trabajo fueron recolectadas e identificadas por el experto D. Santiago de Castro Alfageme, en diferentes zonas de la comunidad de Castilla y León (Fig. M1).



**Figura M1. Setas frescas recolectadas. HR *Hydnum repandum*, HRU *Hydnum rufescens*, CC *Cantharellus cibarius*, CT *Cantharellus tubaeformis*, CL *Craterellus lutescens*, CCO *Craterellus cornucopioides*.**

Las muestras de *Hydnum rufescens*, *Hydnum repandum* y *Cantharellus tubaeformis*, fueron recogidas en la localidad de Sejas de Aliste (Zamora). Altitud: 804 m Latitud: 41° 41' 54" N - Longitud: 6° 20' 57" O.

---

*Cantharellus cibarius*, *Cantharellus lutescens* y *Craterellus cornucopioides* fueron recogidas en la localidad de Navaleno (Soria). Altitud: 1107 m Latitud: 41° 50' 16" N - Longitud: 3° 0' 14" O. Se utilizaron también las siguientes harinas de setas deshidratadas *Hydnum repandum*, *Cantharellus cibarius*, *Cantharellus lutescens*, *Craterellus cornucopioides* y *Cantharellus tubaeformis*. La seta *Pleurotus eryngii* se empleó como patrón para el análisis de  $\beta$ -glucanos.

## **3.2. MÉTODOS.**

### **3.2.1. Determinación de la humedad de las setas.**

La humedad, o el contenido de agua, de un alimento es la pérdida de masa que experimenta dicho alimento después de someterlo a un proceso de desecación. La desecación se realizó sobre muestras de 5g de seta en una estufa termorregulada a 130°C durante 90 minutos.

### **3.2.2. Determinación del contenido de cenizas en los hongos.**

Las cenizas son el residuo que queda tras la incineración completa de los componentes orgánicos de las setas. Una vez eliminadas las posibles impurezas y partículas de carbono procedentes de una combustión incompleta, el residuo restante se corresponde con el contenido en minerales.

Las cenizas, se obtuvieron a partir de muestras de 10g de seta. La calcinación se realiza en una mufla a una temperatura de 535 °C y durante 14 horas (Fig. M3).

La incineración es completa cuando el resultado es un residuo blanco o grisáceo. En los casos en los que después de transcurrir las 14 horas no se consigue este residuo sino un residuo negro, se añade 1 ml de agua destilada y se coloca en la mufla hasta obtener un residuo blanco.

---

### 3.2.3. Obtención de extractos.

Para la obtención de los extractos partimos de muestras de *Hydnum repnadam* (HR), *Hydnum rufescens* (HRU), *Cantharellus cibarius* (CC), *Cantharellus lutescens* (CL), *Craterellus cornucopioides* (CCO) y *Cantharellus tubaeformis* (CT). Las setas, se cortaron en trozos pequeños diferenciando pie y sombrero, posteriormente se trituraron en una batidora con 50 ml de agua cada una. Todo el procedimiento de extracción se realizó a 4°C, durante 30 minutos con agitación constante y manteniendo en todo momento la cadena de frío.

El extracto se filtró con doble gasa de nylon y el filtrado obtenido se sometió a una primera centrifugación durante 45 min a 3.500 r.p.m en una centrífuga Digicen-R de rotor basculante RT142 en tubos de 50 ml a una temperatura de 4° C. Se recuperó el sobrenadante, y se sometió a una segunda centrifugación de 30 min en las condiciones anteriormente citadas.

El sobrenadante se recogió y filtró a través de un filtro de papel de doble capa con pliegues (Anoia de 73 g/m<sup>2</sup>). El volumen recuperado en este proceso es la base para la posterior purificación o análisis y se denomina extracto crudo.

Para la obtención de los extractos de harinas de setas se partió de muestras secas y en polvo de *Hydnum repnadam* (HRUH), *Cantharellus cibarius* (CCH), *Cantharellus lutescens* (CLH), *Craterellus cornucopioides* (CCOH) y *Cantharellus tubaeformis* (CTH), que previamente se deshidrataron en estufa a 130°C durante 90 minutos. La cantidad de harina utilizada, se calculó teniendo en cuenta la humedad de cada muestra. El proceso de obtención de los extractos fue similar al de las setas frescas.

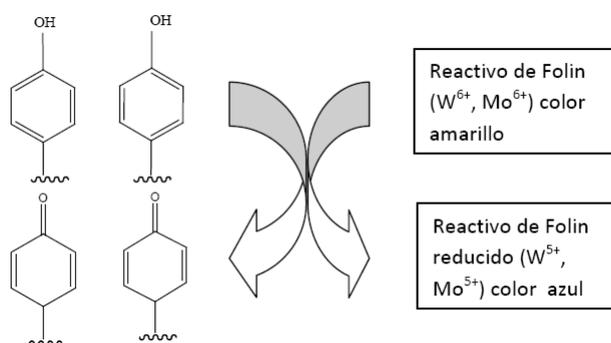
### 3.2.4. Método de Folin – Ciocalteu.

Los fenoles reaccionan con el reactivo de Folin - Ciocalteu dando un color azul característico. El reactivo de Folin - Ciocalteu está disponible comercialmente. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con restos fenólicos presentes en las proteínas (tiroquinas) y en compuestos como ácido gálico y sus derivados, flavonoides, etc.

El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de

color azul intenso (Fig. M5), que se mide a una longitud de 760 nm (Singleton y Rossi., 1965).

Este reactivo no solo mide los fenoles totales sino que reacciona con cualquier sustancia reductora, por lo que mide la capacidad reductora total de una muestra. Para realizar la recta patrón se añadieron 20, 40, 60 y 80  $\mu$ l de ácido gálico 2,5 mM y 600  $\mu$ l de carbonato sódico al 7,5 % (p/v) y la cantidad de agua correspondiente para alcanzar un volumen total de 1,5 ml. Posteriormente se añadieron 200  $\mu$ l de reactivo de Folin-Ciocalteu a cada tubo.



**Figura M5. Reacción de Folin – Ciocalteu. Tomado de Girbés y Jiménez. Cuaderno de Prácticas de Fundamentos de Alimentación y Nutrición (2010).**

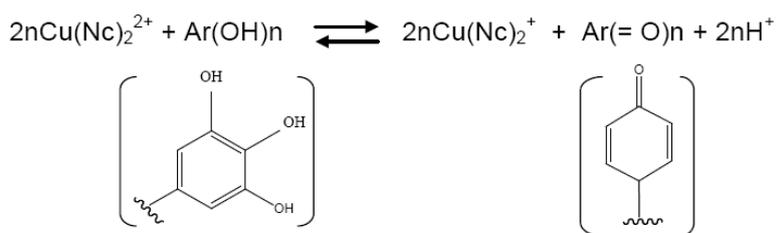
Se incubaron las muestras en un baño de agua a 50°C durante 10 minutos. A continuación se midió la absorbancia de las disoluciones a 760 nm. La medida de los diferentes extractos se realiza sustituyendo en el método, el patrón de ácido gálico, por un volumen de extracto. Para los cálculos debemos tener en cuenta el volumen de extracto utilizado y el volumen de extracto de partida (extracto crudo).

Los resultados se interpolan en la curva de calibrado de 2,5mM de ácido gálico y se expresan en  $\mu$ g equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco. Para los ensayos de degradación de los fenoles totales se incuban las muestras a temperatura constante de 90°C y diferentes intervalos de tiempo que oscilan desde los 0 a los 120 minutos, repitiendo el proceso con oscilaciones de temperatura de 20°C, 50°C, 70°C, 90°C y tiempo constante de 30 minutos y los resultados se expresan en tanto por ciento (%) de degradación.

### 3.2.5. Método de CUPRAC.

Este ensayo mide la capacidad antioxidante y se basa en una reducción cúprica de Cu (II) a Cu (I) por la acción reductora de los antioxidantes de la muestra. Se utiliza la Neocuproína como agente oxidante cromogénico. El máximo de absorción se produce a 450 nm. Para realizar la recta patrón utilizamos 1mM de ácido gálico en etanol como patrón. Se añade a cada tubo 1ml de 10 mM de Cloruro de Cobre (II), y la misma cantidad de 7,5 mM de Neocuproína en etanol.

Los protones liberados pueden neutralizarse con la solución de acetato amónico. En esta reacción los polifenoles (-OH) se oxidan a las correspondientes formas quinónicas (= O) y el Cu (II) - Nc es reducido a Cu (I) - Nc que es muy coloreado y muestra un máximo de absorción a 450 nm (Fig. M7).



**Figura M7. Reacción del método CUPRAC. Tomado de Girbés y Jiménez. Cuaderno de Prácticas de Fundamentos de Alimentación y Nutrición (2010).**

Posteriormente añadimos a cada tubo 1ml de acetato de amonio a pH = 7, los diferentes volúmenes del patrón de ácido gálico y la cantidad correspondiente de agua para alcanzar un volumen final de 4 ml. Después de 1 hora se mide la absorbancia a 450 nm.

La medida de los diferentes extractos se realiza sustituyendo en el método, el patrón de ácido gálico, por el volumen de extracto de muestra. Para los cálculos debemos tener en cuenta el volumen de extracto utilizado y el volumen de extracto de partida (extracto crudo). Los resultados se interpolan en la curva de calibrado de 1mM de ácido gálico y se expresan en µg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco. Para los ensayos de degradación de los fenoles totales se incuban las muestras durante 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos a 90°C repitiendo el proceso a tiempo constante

---

de 30 minutos y a temperaturas variables de 20°C, 50°C, 70°C y 90°C expresando los resultados en tanto por ciento (%) de degradación.

### **3.2.6. Método del radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).**

El 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) es un radical orgánico nitrogenado y estable que sirve para medir la capacidad antioxidante. En presencia de sustancias antioxidantes se produce un descenso de la absorbancia del radical DPPH a 515 nm (Brand-Williams y cols., 1995). El radical tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente. Por lo tanto el ensayo DPPH es un método rápido y sencillo.

La reacción se mide a los 10 minutos del inicio, ya que en este intervalo, la mayoría de sustancias completan la reacción con el DPPH. El radical DPPH tiene un electrón desapareado lo que le otorga una coloración violeta y cuando entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno u otra especie de radical, se reduce a DPPH-H con la consiguiente pérdida de color. Para la recta patrón la solución que dona los electrones, el agente reductor, es el Trolox, que posteriormente sustituiremos por las muestras de setas.

El DPPH sólo puede disolverse en medio orgánico, en este caso utilizamos metanol a una concentración de 1 mM. La cuantificación se realizó empleando una solución patrón de Trolox. Para realizar la recta patrón añadimos la cantidad de metanol al 80 % correspondiente para obtener un volumen final de 3 ml, así como 2.900µl de DPPH 0,1 mM en metanol. Se añade a cada tubo 25, 50, 75 y 100 µl de solución de Trolox 1 mM en metanol. Medimos la reacción a los 10 minutos del inicio, ya que en este intervalo, la mayoría de sustancias completan la reacción con el DPPH.

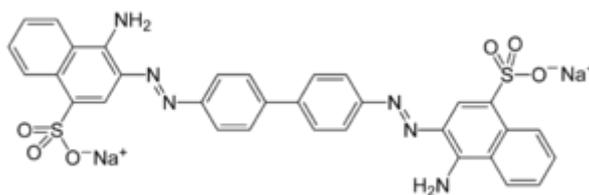
Representamos la recta patrón de degradación del radical DPPH con respecto a los volúmenes de Trolox 1 mM añadidos. Para los cálculos se tiene en cuenta el volumen de extracto utilizado y el volumen de extracto de partida.

Los resultados se interpolan en la curva de calibrado de Trolox 1 mM y se expresan en µg equivalentes de Trolox por gramo de peso fresco. Para los ensayos de degradación las muestras se incuban a 90°C a diferentes tiempos y posteriormente a diferentes temperaturas, 20°C, 50°C, 70°C y 90°C durante 30 minutos. Los resultados se expresan en tanto por ciento (%) de degradación.

### 3.2.7. Detección de $\beta$ -glucanos mediante el método del Rojo Congo.

Los  $\beta$ -glucanos son polisacáridos localizados en las paredes celulares de los hongos, formados por cadenas de unidades de D-glucosa con enlaces glucosídicos tipo  $\beta$  (Ruiz-Herrera y cols., 2006).

El reactivo Rojo Congo (Fig. M8) es una sal de sodio  $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$  cuyo peso molecular es de 696.66 g/mol.



**Figura M8. Rojo Congo: 3,3'-([1,1'-bifenil]-4,4'-diyl)bis(4-aminonaftalen-1-ácido sulfónico).**

El método se basa en la reacción colorimétrica del Rojo Congo con las estructuras terciarias de glucano, debido a sus interacciones con  $\beta$ -1,3-1,6-glucanos en soluciones ácidas y alcalinas (Nitschke y cols., 2011).

Este método es específico para  $\beta$ -glucanos con una estructura terciaria de triple hélice. El colorante utilizado, rojo congo, forma un complejo con la triple hélice, lo que provoca un desplazamiento batocrómico específico o desplazamiento hacia el rojo.

Para poder realizar las mediciones es necesario acondicionar previamente las muestras. Las setas y harinas de setas se reducen a polvo eliminando previamente la humedad. Para el análisis de  $\beta$ -glucanos utilizamos las siguientes fracciones:

- **Fracción KOH.**
  - Se calientan 7 g de la seta seca en polvo en 120 ml de KOH 1 M a 60°C durante 20 minutos en agitación constante.
  - La suspensión se centrifuga a temperatura ambiente durante 15 minutos a 3.500 r.p.m y se recoge el sobrenadante. Posteriormente se lava con 50 ml de agua

---

Elix-Millipore y se vuelve a centrifugar dos veces. El filtrado (fracción KOH) se neutraliza con HCl 6 N.

- El filtrado a pH neutro se lleva a un volumen final de 250 ml con agua Elix para su posterior análisis.

#### **Fracción HCl.**

- El residuo sólido que se ha obtenido anteriormente se calienta con 140 ml de HCl 0,5 M en un baño de agua a 100°C durante 60 minutos.
- La suspensión se centrifuga a temperatura ambiente durante 15 minutos a 3.500 r.p.m y se recoge el sobrenadante. Posteriormente se lava con 50 ml de agua Elix-Millipore y se vuelve a centrifugar dos veces. El filtrado (fracción HCl) se neutraliza con NaOH 6 N.
- El filtrado a pH neutro se lleva a un volumen final de 250 ml con agua Elix-Millipore para su posterior análisis.

#### **Fracción NaOH.**

- El residuo sólido que se ha obtenido de la fase anterior se calienta a 60°C con 120 ml de NaOH 1 M durante 20 min.
- La suspensión se centrifuga a temperatura ambiente durante 15 minutos a 3.500 r.p.m y se recoge el sobrenadante. Posteriormente se lava con 50 ml de agua Elix-Millipore y se vuelve a centrifugar dos veces. El filtrado (fracción NaOH) se neutraliza con HCl 6 N.
- El filtrado a pH neutro se lleva a un volumen final de 250 ml con agua Elix-Millipore para su posterior análisis.

Se realiza un barrido para conocer la longitud de onda óptima, que resultó ser 531 nm. Las condiciones de reacción seleccionadas después de los ensayos son 20

---

minutos de reacción a temperatura ambiente con una concentración de Rojo Congo de 0,08%.

En el método descrito por Nitschke (Nitschke y cols., 2011), se utiliza un patrón comercial de esquizofilano, obteniéndose diferentes concentraciones de  $\beta$ -glucanos encada una de las fracciones de *Pleurotus eryngii*. Dado que el esquizofillano es muy caro y que prácticamente todo el glucano de *Pleurotus eryngii* es  $\beta$ -1,3-1,6-glucano, se utilizó el glucano de esta seta como patrón.

### **3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Para analizar los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico utilizando los programas de software Microsoft Office Excel 2007. El software Microsoft Office Excel 2007 se utilizó para la realización de las diferentes gráficas, así como para la obtención de la desviación estándar de las diferentes medidas con respecto a la media y las gráficas de correlación entre los métodos de Folin – Ciocalteau, CUPRAC y DPPH.

---

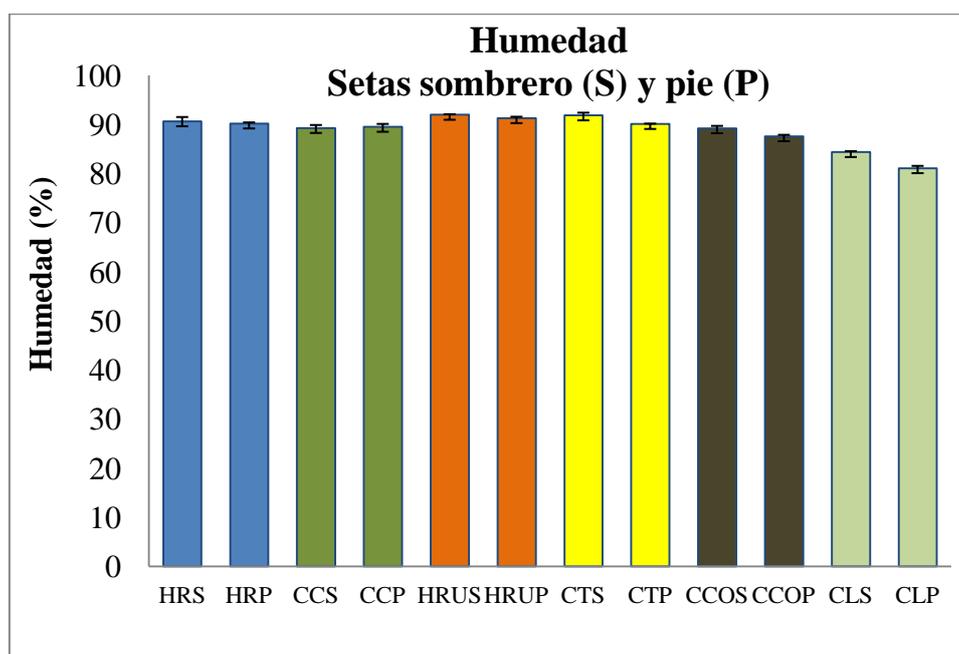
## **4. RESULTADOS.**

#### 4.1. CONTENIDO EN HUMEDAD DE LAS SETAS.

En la tabla siguiente (Tabla R1) se detalla el porcentaje de humedad de sombrero y pie de las muestras de *Hydnum repandum* (HR), *Cantharellus cibarius* (CC), *Hydnum rufescens* (HRU), *Cantharellus tubaeformis* (CT), *Craterellus cornucopioides* (CCO), *Cratarellus lutescens* (CL), referidas al peso fresco de las setas.

**Tabla R1. Humedad (%) de cada seta (sombrero y pie).**

Seta	Humedad Sombrero (%)	Humedad Pie (%)
<i>Hydnum repandum</i> (HR)	90,65 ± 0,89	90,21 ± 0,23
<i>Cantharellus cibarius</i> (CC)	89,29 ± 0,62	89,53 ± 0,60
<i>Hydnum rufescens</i> (HRU)	91,98 ± 0,13	91,30 ± 0,30
<i>Cantharellus tubaeformis</i> (CT)	91,86 ± 0,56	90,11 ± 0,09
<i>Craterellus cornucopioides</i> (CCO)	89,23 ± 0,50	87,61 ± 0,30
<i>Cratarellus lutescens</i> (CL)	84,39 ± 0,21	81,11 ± 0,48



**Figura R1. Relación del contenido en humedad (%) de cada seta en sombrero y pie.**

Destacan los datos de los sombreros de *Hydnum rufescens* y *Cantharellus tubaeformis* con una humedad en torno al 91.8 % (Fig. R1).

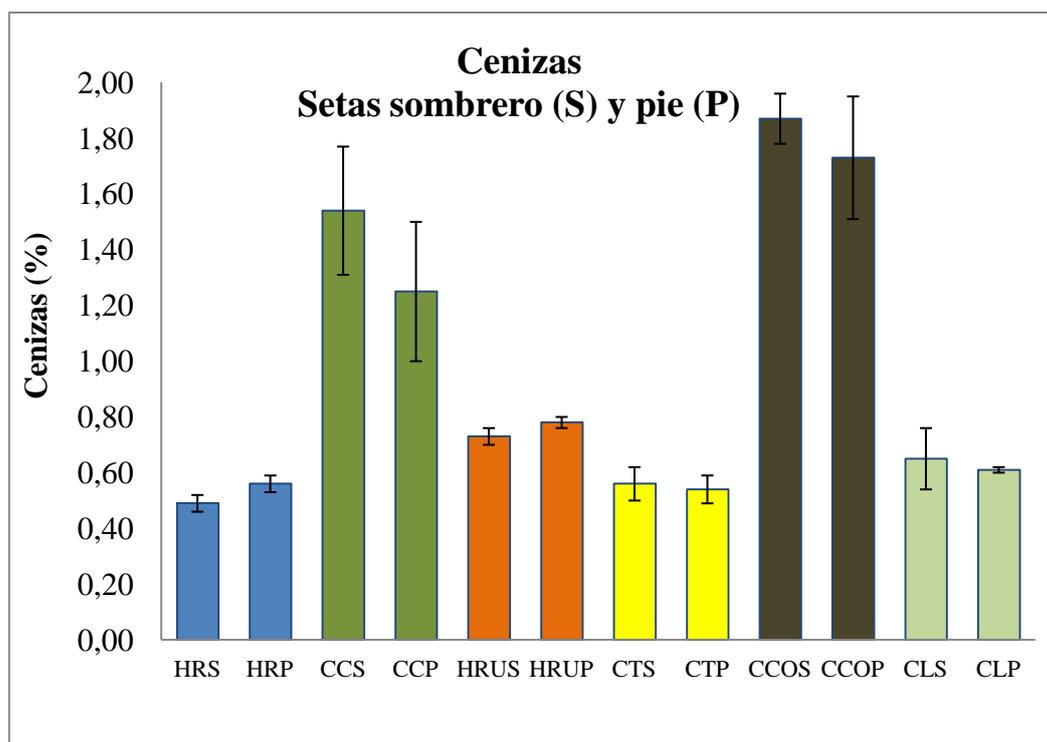
Se observa que el pie tiene ligeramente menor porcentaje de humedad que el sombrero siendo la diferencia más notable en *Cantharellus lutescens*.

#### 4.2. CONTENIDO DE CENIZAS EN LAS SETAS.

Las cenizas resultantes de la incineración de las muestras están relacionadas con el contenido en minerales de cada seta. Los resultados (Tabla R2) determinan que el contenido mineral es más elevado en *Cantharellus cibarius* y *Craterellus cornucopioides*.

**Tabla R2. Cenizas de las muestras, expresadas en porcentaje  $\pm$  DE.**

Seta	Cenizas Sombrero (%)	Cenizas Pie (%)
<i>Hydnum repandum</i> (HR)	0,49 $\pm$ 0,03	0,56 $\pm$ 0,03
<i>Cantharellus cibarius</i> (CC)	1,54 $\pm$ 0,23	1,25 $\pm$ 0,25
<i>Hydnum rufescens</i> (HRU)	0,73 $\pm$ 0,03	0,78 $\pm$ 0,02
<i>Cantharellus tubaeformis</i> (CT)	0,56 $\pm$ 0,06	0,54 $\pm$ 0,05
<i>Craterellus cornucopioides</i> (CCO)	1,87 $\pm$ 0,09	1,73 $\pm$ 0,22
<i>Cratarellus lutescens</i> (CL)	0,65 $\pm$ 0,11	0,61 $\pm$ 0,01



**Figura R2. Relación del contenido en porcentaje en cenizas de cada seta.**

#### 4.3. VOLÚMENES MEDIOS DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS.

A continuación se detallan los volúmenes de extracto crudo obtenido de setas frescas y harina de setas (Tablas R3 y R4), que se utilizarán para los cálculos en los diferentes métodos espectrofotométricos: Folin-Ciocalteu, CUPRAC y radical DPPH.

**Tabla R3. Volúmenes medios de los extractos de sombrero y pie de seta.**

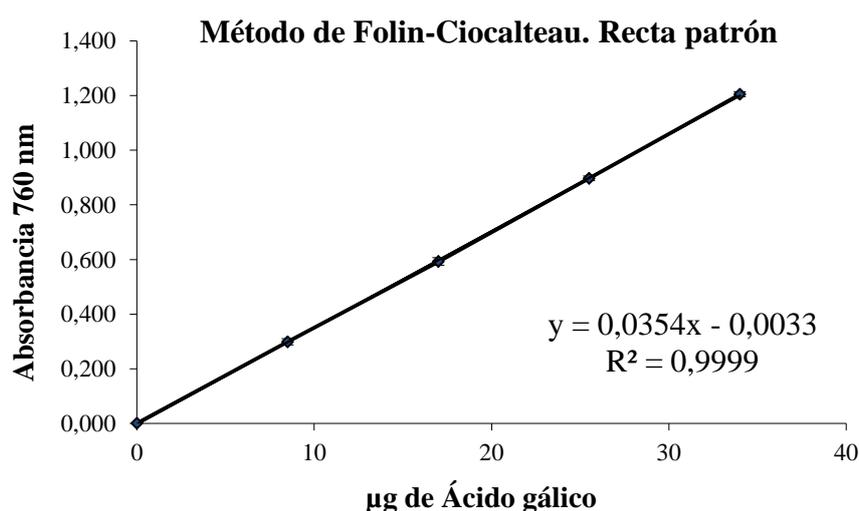
Seta	Sombrero	Pie
<i>Hydnum repandum</i> (HR)	34,5ml	36,2ml
<i>Cantharellus cibarius</i> (CC)	21,9ml	28,7ml
<i>Hydnum rufescens</i> (HRU)	34,5ml	34,6ml
<i>Cantharellus tubaeformis</i> (CT)	33,3ml	32,8ml
<i>Craterellus cornucopioides</i> (CCO)	28,2ml	30,3ml
<i>Cratarellus lutescens</i> (CL)	33,3ml	33,3ml

**Tabla R4. Volúmenes medios de los extractos de harina de setas.**

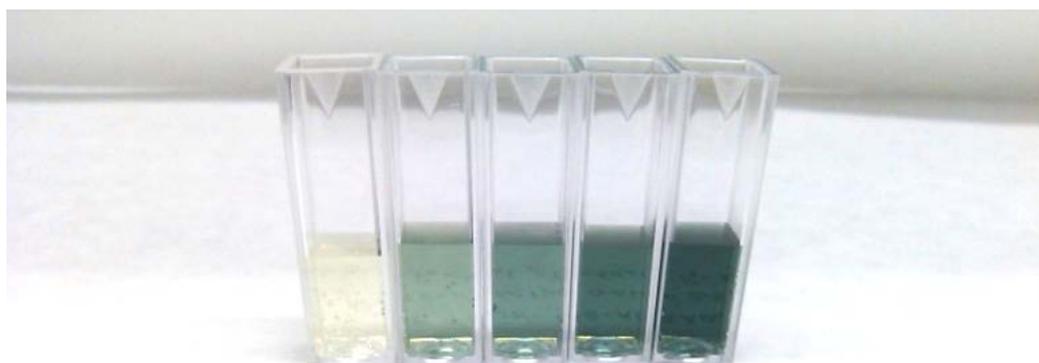
Seta	Volumen Extracto
<i>Hydnum repandum</i> (HR)	38,1ml
<i>Cantharellus cibarius</i> (CC)	40,2ml
<i>Cantharellus tubaeformis</i> (CT)	41,7ml
<i>Craterellus cornucopioides</i> (CCO)	40,5ml
<i>Cratarellus lutescens</i> (CL)	37,1ml

#### 4.4. MEDIDA DE LOS FENOLES TOTALES. MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU.

En primer lugar se realizan rectas patrón con ácido gálico. Los experimentos se realizan por triplicado y se calcula el valor medio de las diferentes absorbancias. Se representa la recta patrón (Fig. R3) de absorbancias a 760 nm frente a diferentes volúmenes de ácido gálico 2,5 mM.



**Figura R3. Recta patrón de la reacción de ácido gálico con el reactivo de Folin – Ciocalteu.**



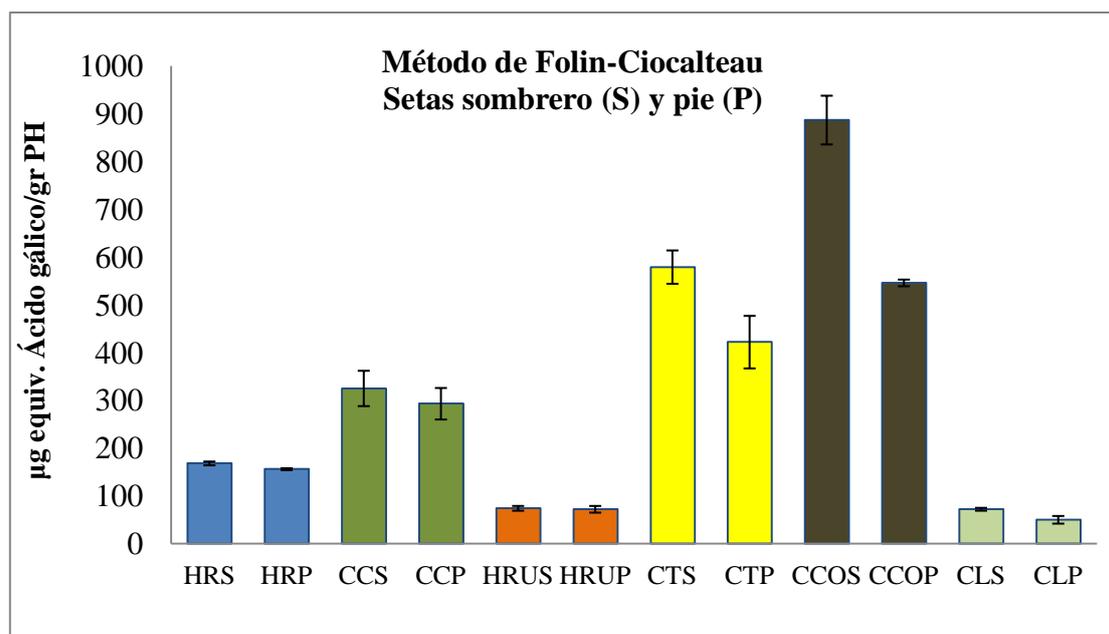
**METODO DE FOLIN-CIOCALTEAU**  
**RECTA PATRON DE ACIDO GALICO 2,5 mM**  
 **$B = 0 \mu\text{l}$ ,  $P_1 = 20 \mu\text{l}$ ,  $P_2 = 40 \mu\text{l}$ ,  $P_3 = 60 \mu\text{l}$ ,  $P_4 = 80 \mu\text{l}$**

**Figura R4. Método de Folin-Ciocalteu. Recta patrón.**

Para realizar el método de Folin-Ciocalteu medimos las muestras de extractos de cada seta y sustituimos el patrón por 100  $\mu\text{l}$  de extracto crudo de cada parte, tanto sombreros como pies. Los resultados se expresan en  $\mu\text{g}$  equivalentes de ac. gálico/g de peso húmedo (Tabla R5) y se realiza el histograma correspondiente (Fig. R5)

**Tabla R5. Método de Folin – Ciocalteu. Fenoles Totales de las diferentes setas (sombrero y pie).**

Seta	$\mu\text{g}$ equiv. de ac. gálico/g de peso húmedo Media $\pm$ Desv Estándar Sombrero	$\mu\text{g}$ equiv. de ac. gálico/g de peso húmedo Media $\pm$ Desv Estándar Pie
<i>Hydnum repandum</i> (HR)	168 $\pm$ 4	157 $\pm$ 2
<i>Cantharellus cibarius</i> (CC)	325 $\pm$ 37	293 $\pm$ 33
<i>Hydnum rufescens</i> (HRU)	74 $\pm$ 5	72 $\pm$ 7
<i>Craterellus tubaeformis</i> (CT)	579 $\pm$ 35	422 $\pm$ 55
<i>Craterellus cornucopioides</i> (CCO)	887 $\pm$ 51	546 $\pm$ 7
<i>Cratarellus lutescens</i> (CL)	72 $\pm$ 3	50 $\pm$ 8

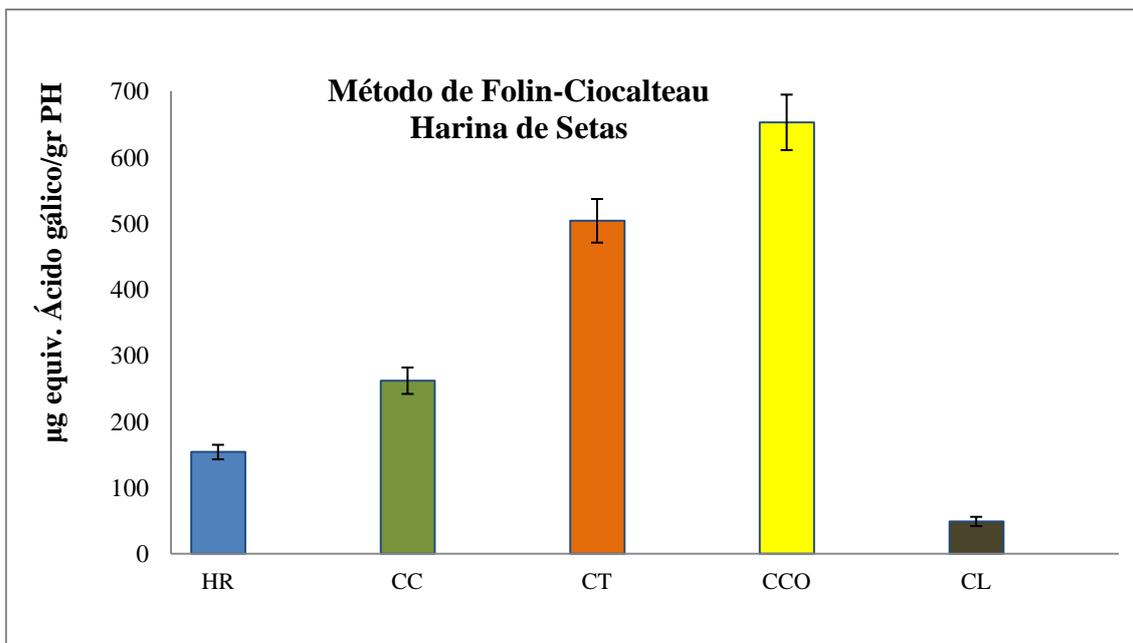


**Figura R5. Histograma con valores absolutos de Fenoles totales presentes en cada seta (sombrero y pie). Método de Folin-Ciocalteu.**

Los resultados de este mismo método realizado en harinas de setas se expresan en la Tabla R6 y en la Fig. R6. Como se puede apreciar los mayores valores corresponden a *Cantharellus tubaeformis* y *Craterellus cornucopioides*, siendo muy superiores a los demás.

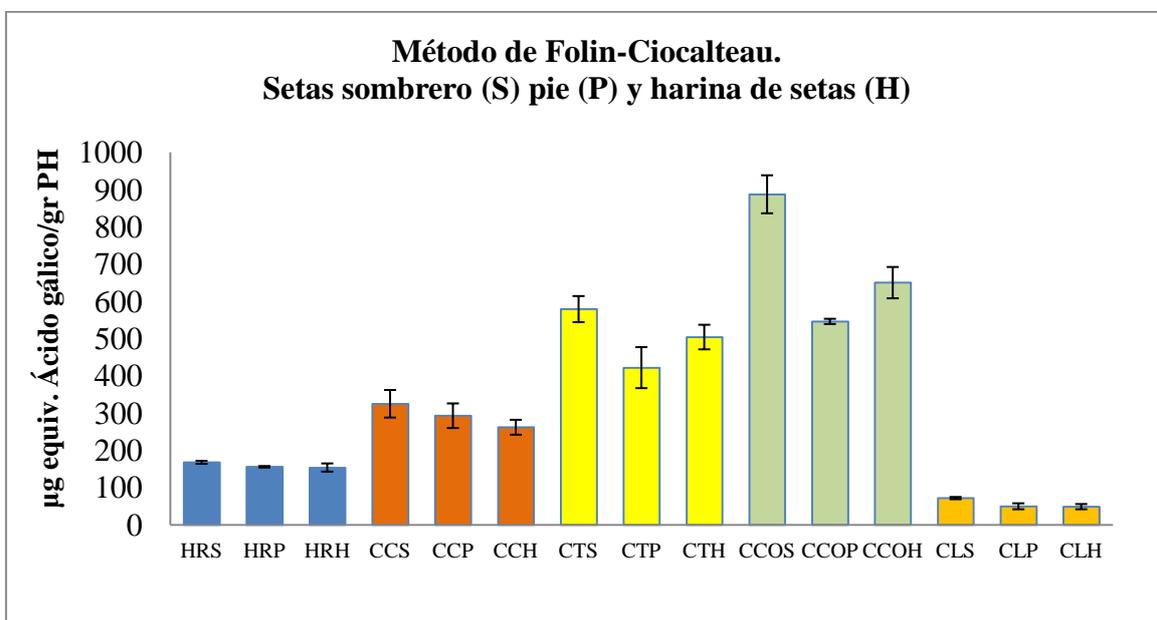
**Tabla R6. Método de Folin – Ciocalteu. Fenoles Totales en la harina de setas.**

Harina de Setas	µg equiv. de ac. gálico/g de peso húmedo Media ± Desv Estándar
<i>Hydnum repandum</i> (HR)	154 ± 11
<i>Cantharellus cibarius</i> (CC)	262 ± 20
<i>Hydnum rufescens</i> (HRU)	68 ± 10
<i>Cantharellus tubaeformis</i> (CT)	504 ± 33
<i>Craterellus cornucopioides</i> (CCO)	653 ± 42
<i>Cratarellus lutescens</i> (CL)	49 ± 7



**Figura R6. Histograma de los Fenoles totales presentes en las distintas harinas de setas.**

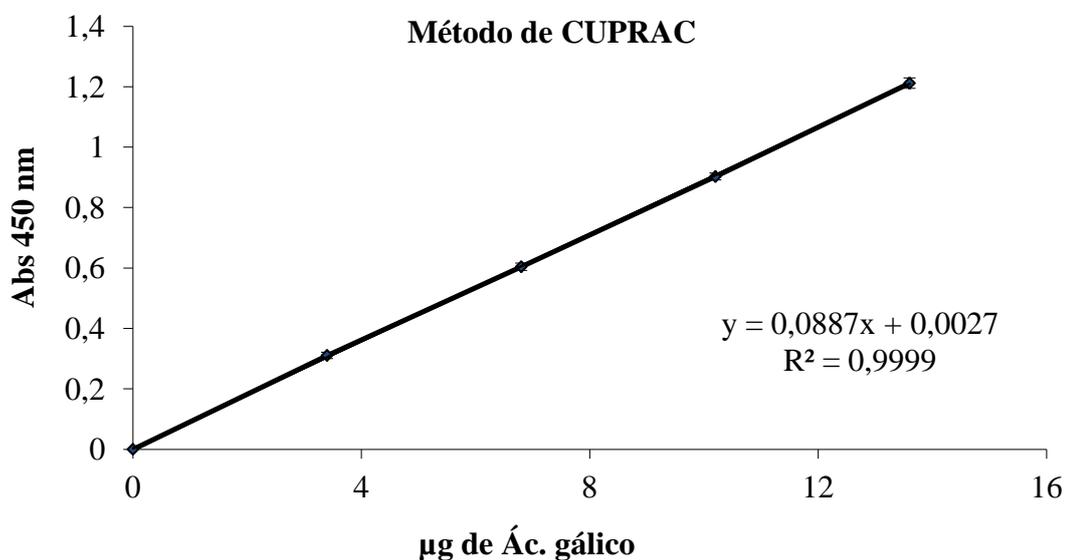
En la figura R7 se observa la variación entre los valores obtenidos en las setas frescas en sombrero (S), pie (P) y en las harinas deshidratadas (H).



**Figura R7. Histograma con los valores absolutos de los fenoles totales presentes en las setas (sombrero y pie) y en las distintas harinas de setas.**

#### 4.5. MEDIDA DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE. MÉTODO DE CUPRAC.

Representamos la recta patrón de absorbancias a 450 nm frente a los volúmenes de ácido gálico 1 mM. (Fig. R8) y el histograma correspondiente (Fig. R9).



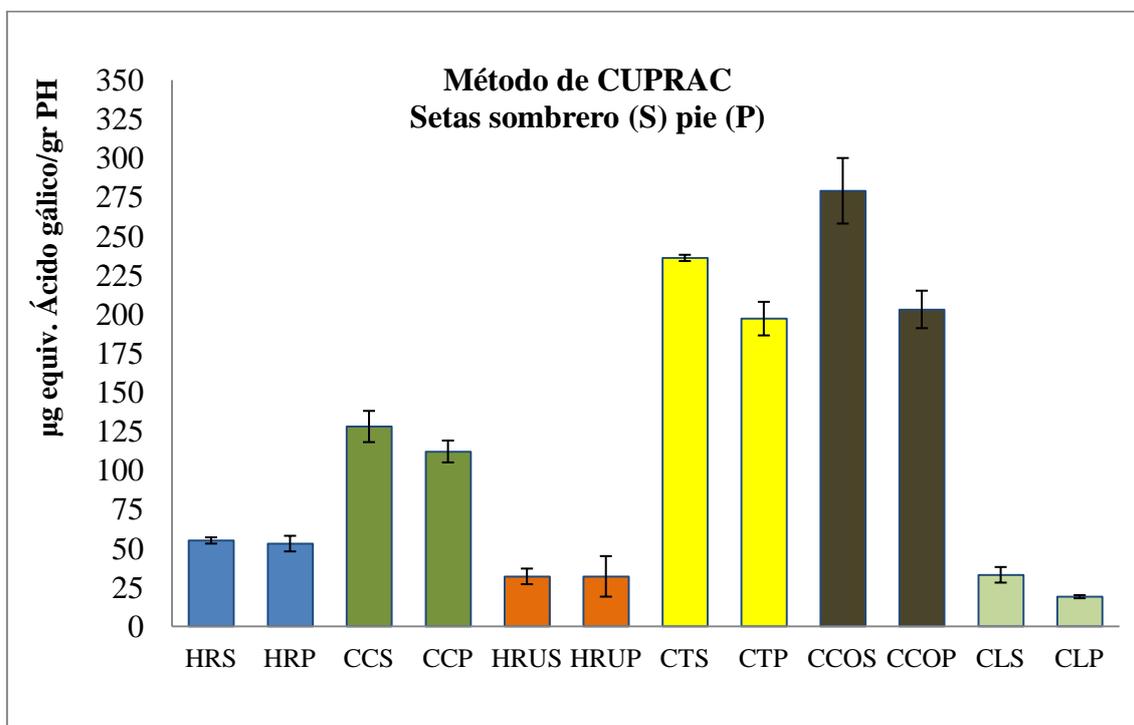
**Figura R8. Recta patrón de la capacidad antioxidante de ácido gálico por el método CUPRAC.**

Para medir las muestras de extracto se substituyó el patrón por 100µl de extracto crudo de cada parte, sombreros y pies. Medimos las absorbancias de las muestras obteniéndolos resultados expresados en µg equivalentes de ac. gálico/g de peso húmedo indicados en la tabla R7.

**Tabla R7. Método de CUPRAC. Capacidad antioxidante de las diferentes setas.**

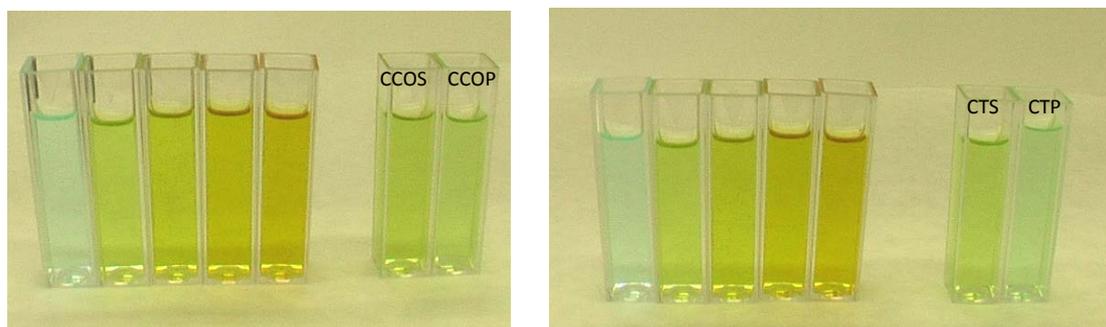
Seta	µg equiv. de ac. gálico/g de peso húmedo	µg equiv. de ac. gálico/g de peso húmedo
	Media ± Desv Estándar Sombrero	Media ± Desv Estándar Pie
<i>Hydnum repandum</i> (HR)	55 ± 2	53 ± 5
<i>Cantharellus cibarius</i> (CC)	128 ± 10	112 ± 17
<i>Hydnum rufescens</i> (HRU)	32 ± 5	32 ± 13

<i>Cantharellus tubaeformis</i> (CT)	236 ± 2	197 ± 11
<i>Craterellus cornucopioides</i> (CCO)	279 ± 21	203 ± 12
<i>Cratarellus lutescens</i> (CL)	33 ± 5	19 ± 1



**Figura R9. Histograma de la capacidad antioxidante de cada seta (sombrero y pie).**

Se observa mayor capacidad antioxidante en los sombreros de cada especie, siendo los más destacados *Craterellus cornucopioides* (CCOS), *Cantharellus tubaeformis* (CTS) y *Cantharellus cibarius* (CCS). En la figura R10 y R11 se aprecia el resultado colorimétrico de estas dos setas.

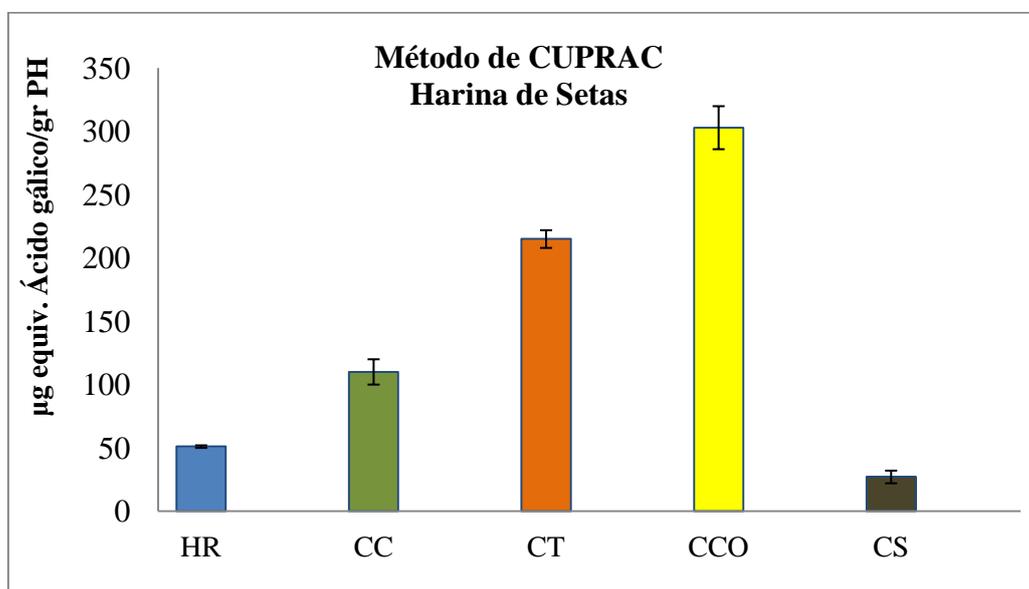


**Figura R10 y R11: Recta patrón de CUPRAC y muestras sombrero (s) y pie (p) de *Craterellus Cornucopioides* (izquierda) y *Cantharellus tubaeformis* (derecha).**

Repetimos el procedimiento con los extractos de harina de setas, obteniendo los resultados indicados en la tabla R8 y se realiza el histograma correspondiente (Fig. R12).

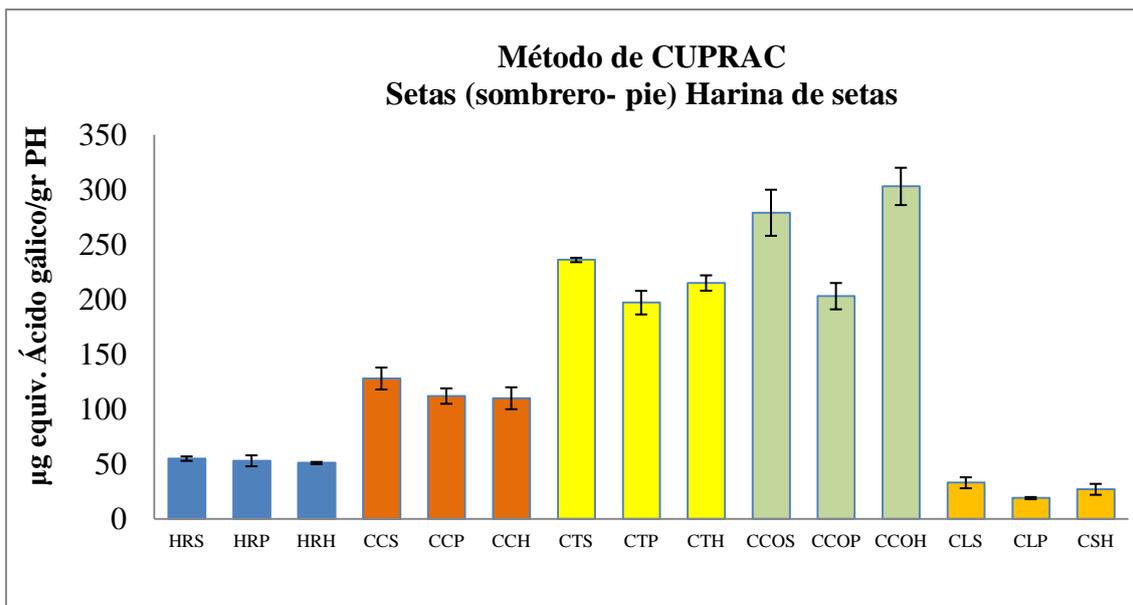
**Tabla R8. Capacidad antioxidante de las harinas de setas. Método de CUPRAC.**

Harina de Setas	$\mu\text{g equiv. de ac. gálico/g de peso húmedo}$ Media $\pm$ Desv Estándar
<i>Hydnum repandum</i> (HR)	51 $\pm$ 1
<i>Cantharellus cibarius</i> (CC)	110 $\pm$ 10
<i>Cantharellus tubaeformis</i> (CT)	215 $\pm$ 7
<i>Craterellus cornucopioides</i> (CCO)	303 $\pm$ 17
<i>Cratarellus lutescens</i> (CL)	27 $\pm$ 5



**Figura R12. Histograma de la capacidad antioxidante en las distintas harinas de setas.**

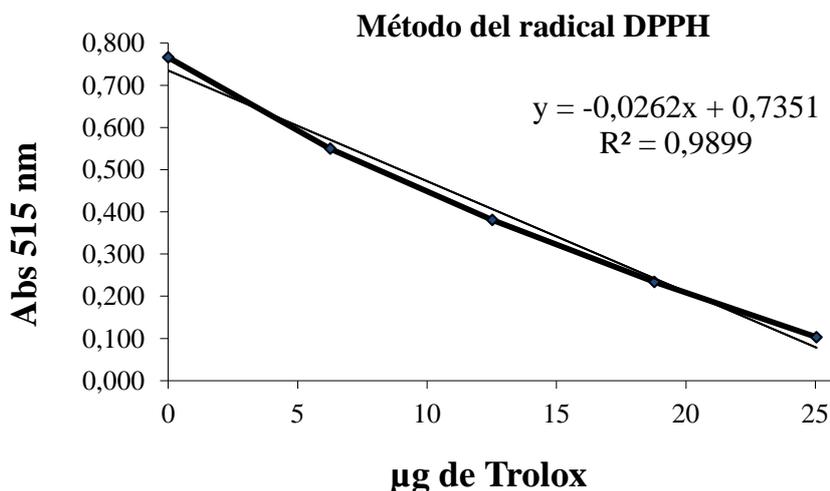
En el siguiente histograma se muestran los valores obtenidos en las setas frescas y las harinas de setas (Fig. R13).



**Figura R13. Histograma de la capacidad antioxidante de las setas sombrero (s) y pie (p) y de las harinas de setas. Peso húmedo (PH).**

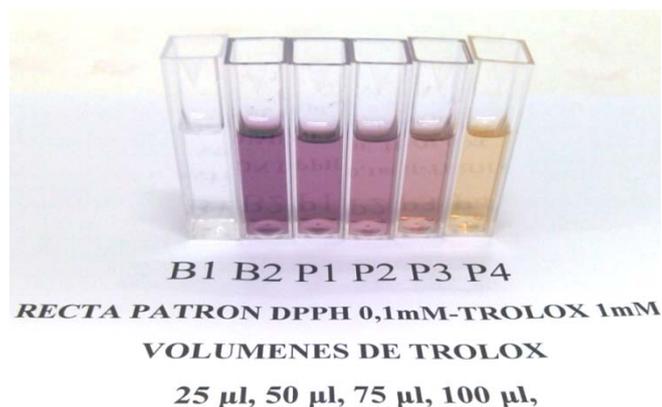
#### 4.6. MEDIDA DE LA CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA. MÉTODO DEL RADICAL DPPH.

La determinación de la capacidad antirradicalaria se realizó utilizando Trolox 1mM como patrón (Fig. R14).



**Figura R14. Recta patrón DPPH 0,1 mM – Trolox 1 mM.**

La presencia de sustancias antioxidantes produce un descenso de la absorbancia del radical DPPH a 515 nm (Brand-Williams y cols., 1995). El radical tiene una coloración púrpura que se degrada progresivamente hacia el color salmón (Fig. R15).



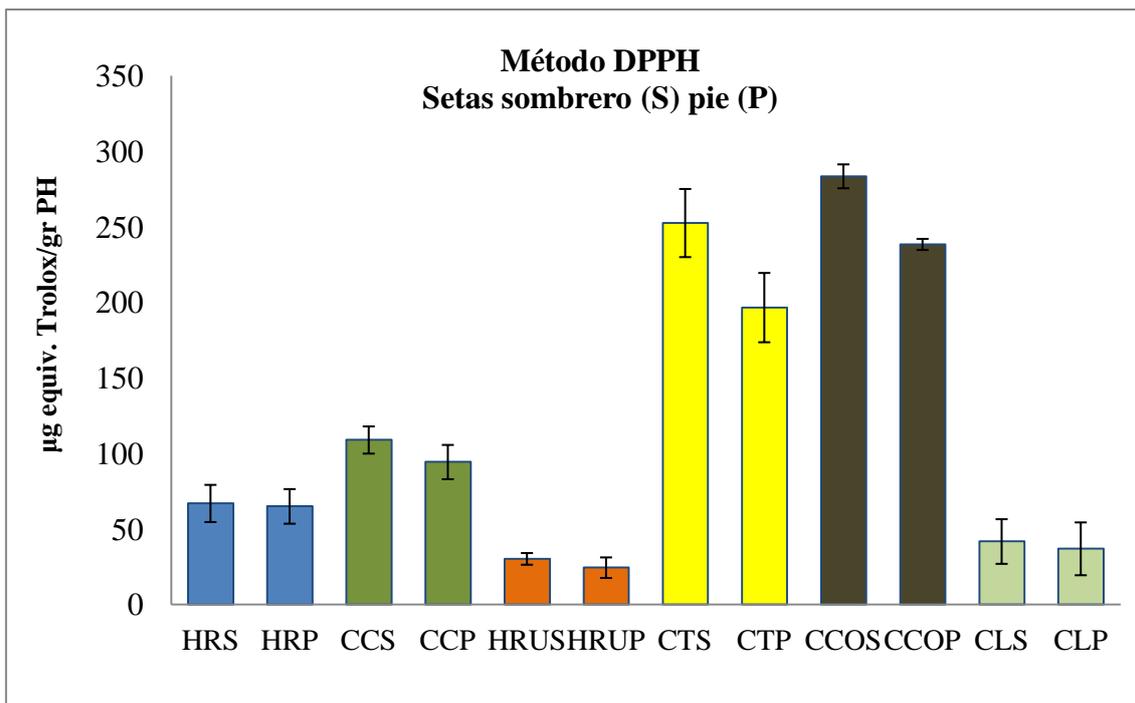
**Figura R15. Método del radical DPPH. Recta patrón.**

Una vez obtenidas las absorbancias calculamos los  $\mu\text{g}$  equivalentes de Trolox por gr de peso húmedo de sombreros y pies de las setas (Tabla R9).

Para medir las muestras de extracto sustituimos el patrón por 100 $\mu\text{l}$  de extracto crudo de cada parte (sombrero y pie). Posteriormente realizamos el histograma correspondiente (Fig. R16).

**Tabla R9. Método de DPPH-Trolox. Capacidad antirradicalaria de las setas.**

Seta	$\mu\text{g}$ equiv. de Trolox/g de peso húmedo	$\mu\text{g}$ equiv. de Trolox/g de peso húmedo
	Media $\pm$ Desv Estándar Sombrero	Media $\pm$ Desv Estándar Pie
<i>Hydnum repandum</i> (HR)	67 $\pm$ 12	65 $\pm$ 11
<i>Cantharellus cibarius</i> (CC)	109 $\pm$ 9	94 $\pm$ 11
<i>Hydnum rufescens</i> (HRU)	30 $\pm$ 4	24 $\pm$ 7
<i>Cantharellus tubaeformis</i> (CT)	253 $\pm$ 33	197 $\pm$ 23
<i>Craterellus cornucopioides</i> (cco)	284 $\pm$ 8	238 $\pm$ 4
<i>Cratarellus lutescens</i> (CL)	47 $\pm$ 15	37 $\pm$ 17

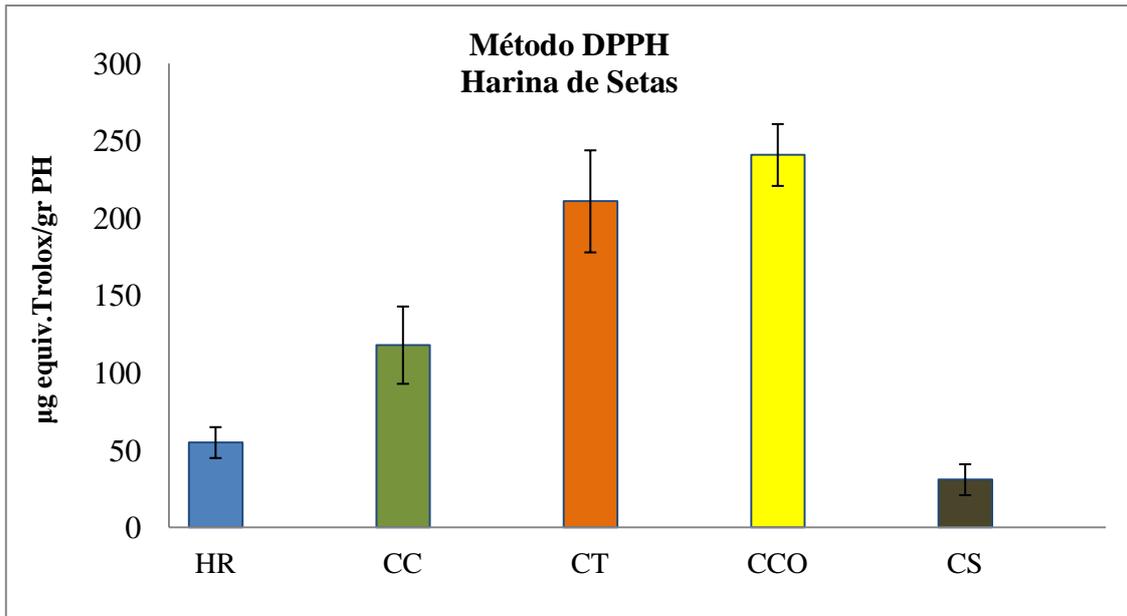


**Figura R16. Valores absolutos de las muestras de sombrero (S) y pie (P). Método del radical DPPH-Trolox.**

El mismo procedimiento se aplica para la determinación de la capacidad antirradicalaria de las harinas de setas (Tabla R10) y realizamos el histograma correspondiente (Fig. R17).

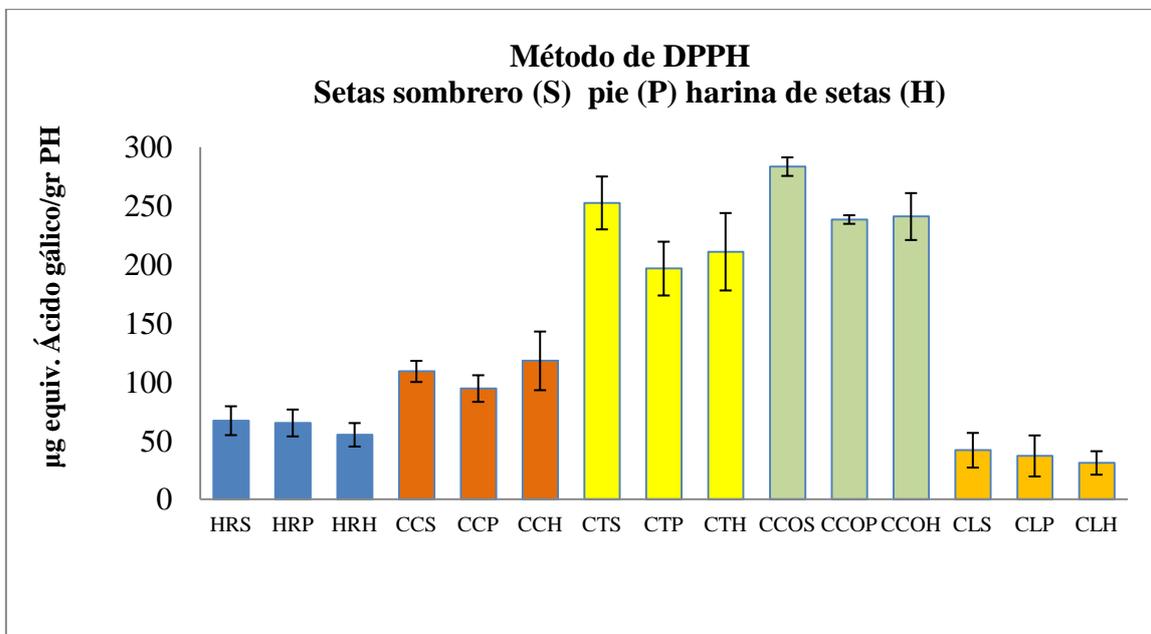
**Tabla R10. Método del radical DPPH. Capacidad antirradicalaria de las diferentes harinas de setas.**

Harina de Setas	µg equiv. de Trolox/g de peso húmedo Media ± Desv Estándar
<i>Hydnum repandum</i> (HR)	55 ± 10
<i>Cantharellus cibarius</i> (CC)	118 ± 25
<i>Hydnum rufescens</i> (HRU)	28 ± 15
<i>Cantharellus tubaeformis</i> (CT)	211 ± 33
<i>Craterellus cornucopioides</i> (CCO)	241 ± 20
<i>Cratarellus lutescens</i> (CL)	31 ± 10



**Figura R17. Histograma de la medida de la capacidad antirradicalaria en las distintas harinas de setas.**

La variación de los valores obtenidos entre las setas frescas y las harinas deshidratadas es poco representativa (Fig. R18) presentando éstas una menor capacidad antirradicalaria con respecto a la muestra fresca.



**Figura R18. Histograma con los valores absolutos de la capacidad antirradicalaria de las setas sombrero (S) pie (P) y de las distintas harinas de setas (H).**

#### 4.7. CORRELACIÓN ENTRE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE ANÁLISIS

A continuación, analizamos la correlación entre los diferentes métodos empleados (Fig. R19-R24).

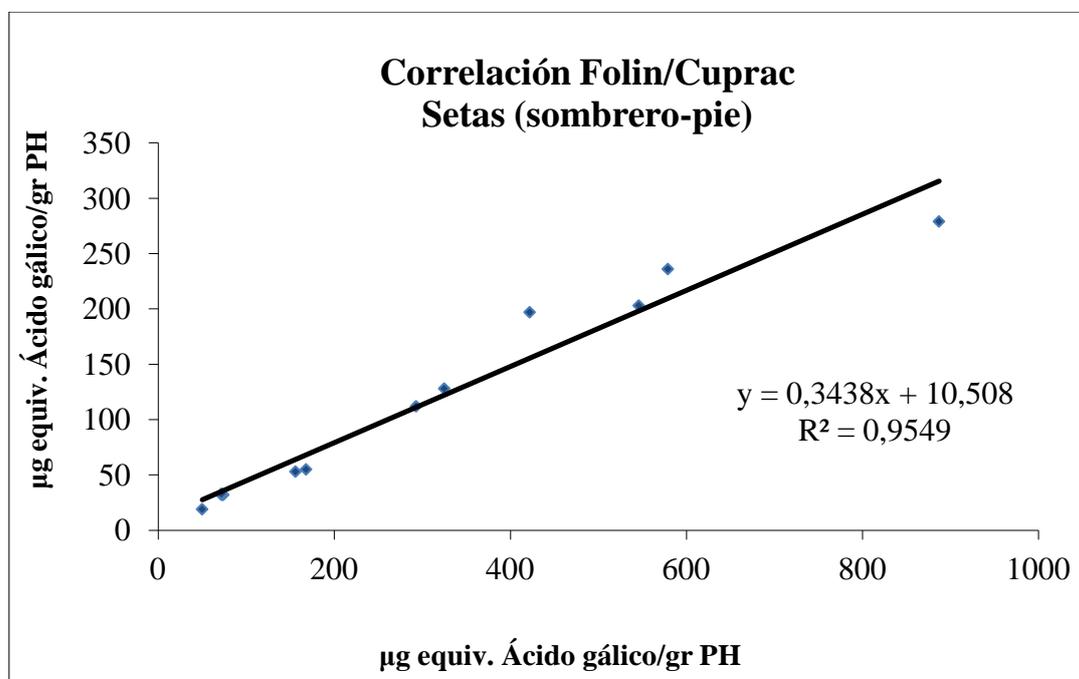


Figura R19. Correlación entre los métodos de Folin-Ciocalteau y CUPRAC.

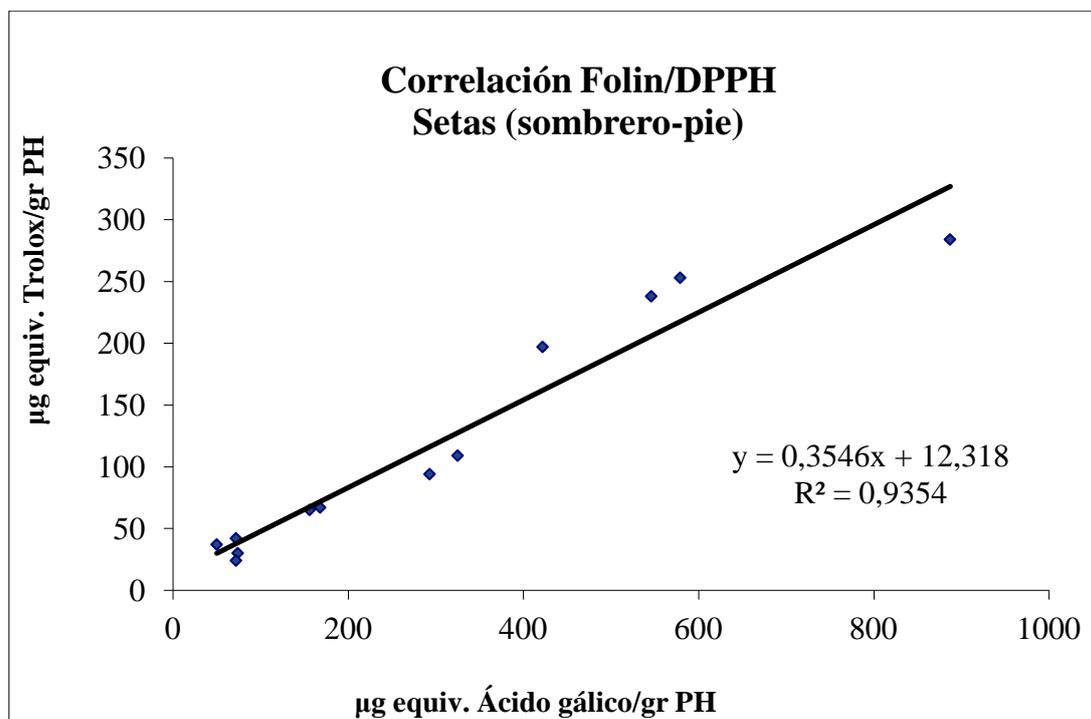
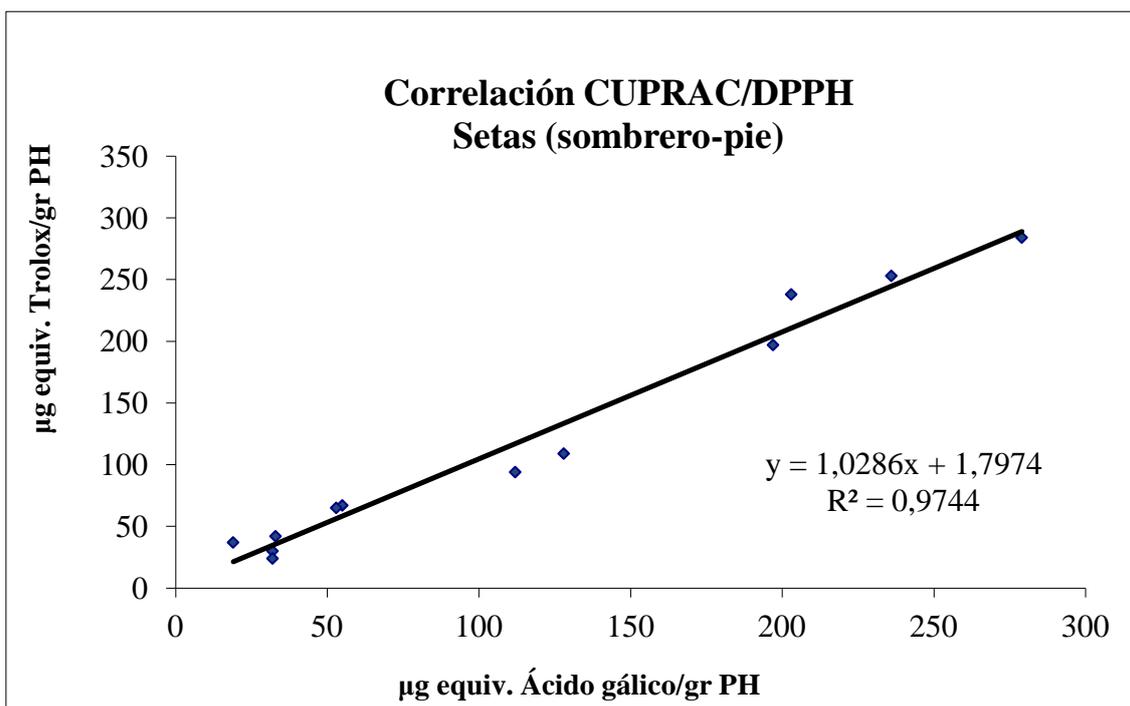
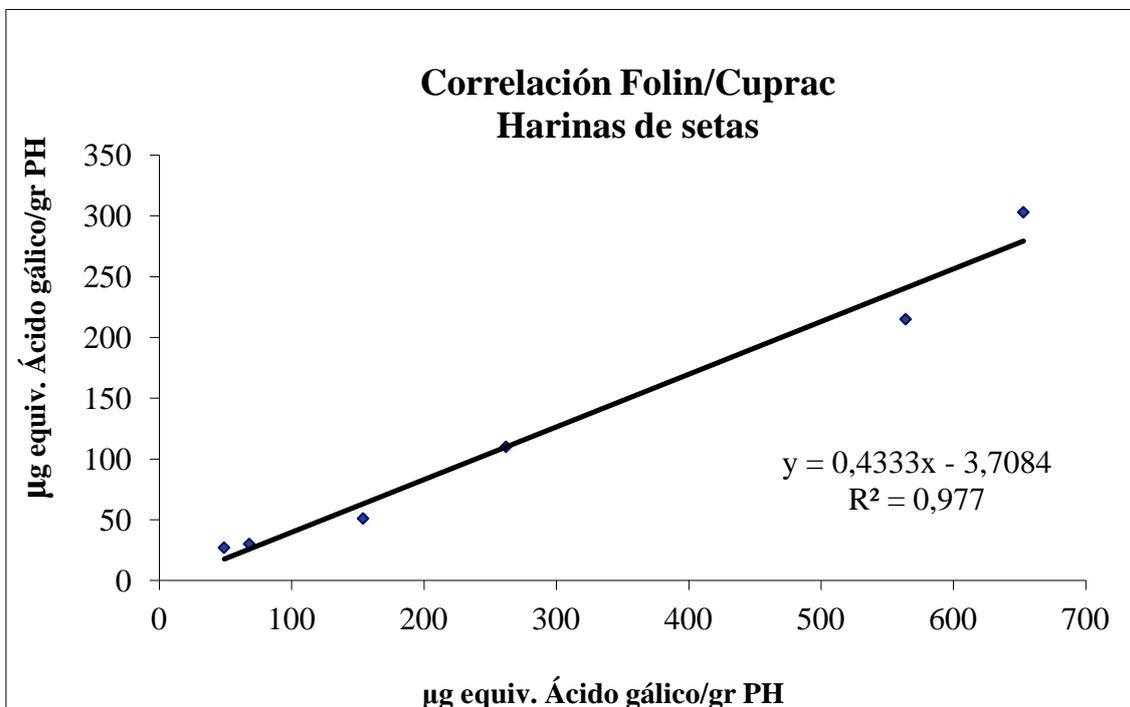


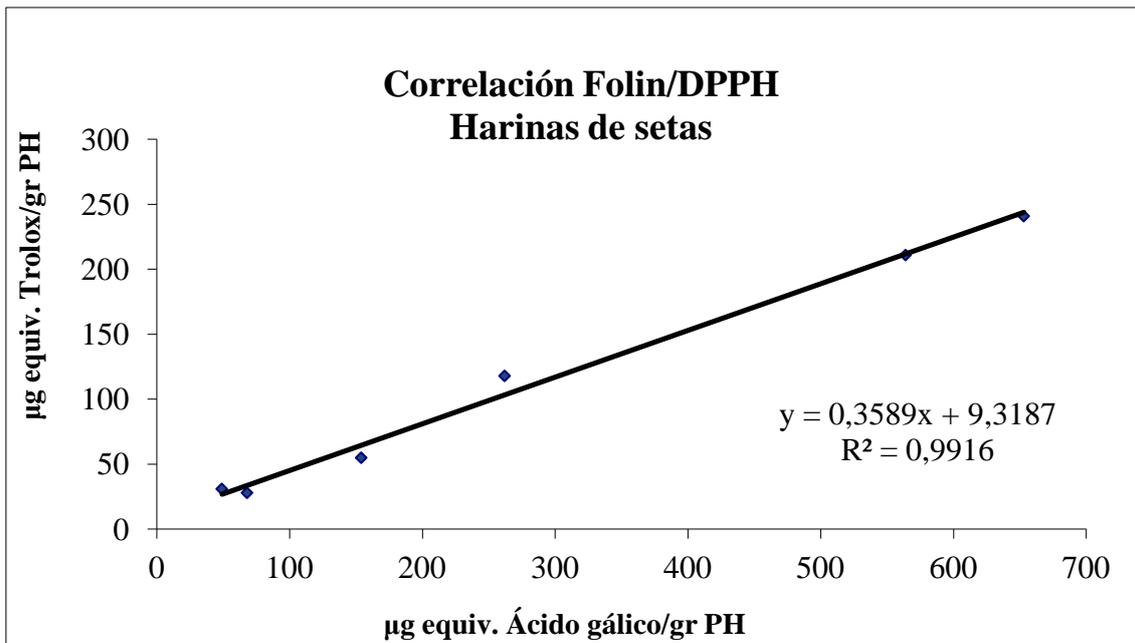
Figura R20. Correlación entre los métodos de Folin-Ciocalteau y DPPH.



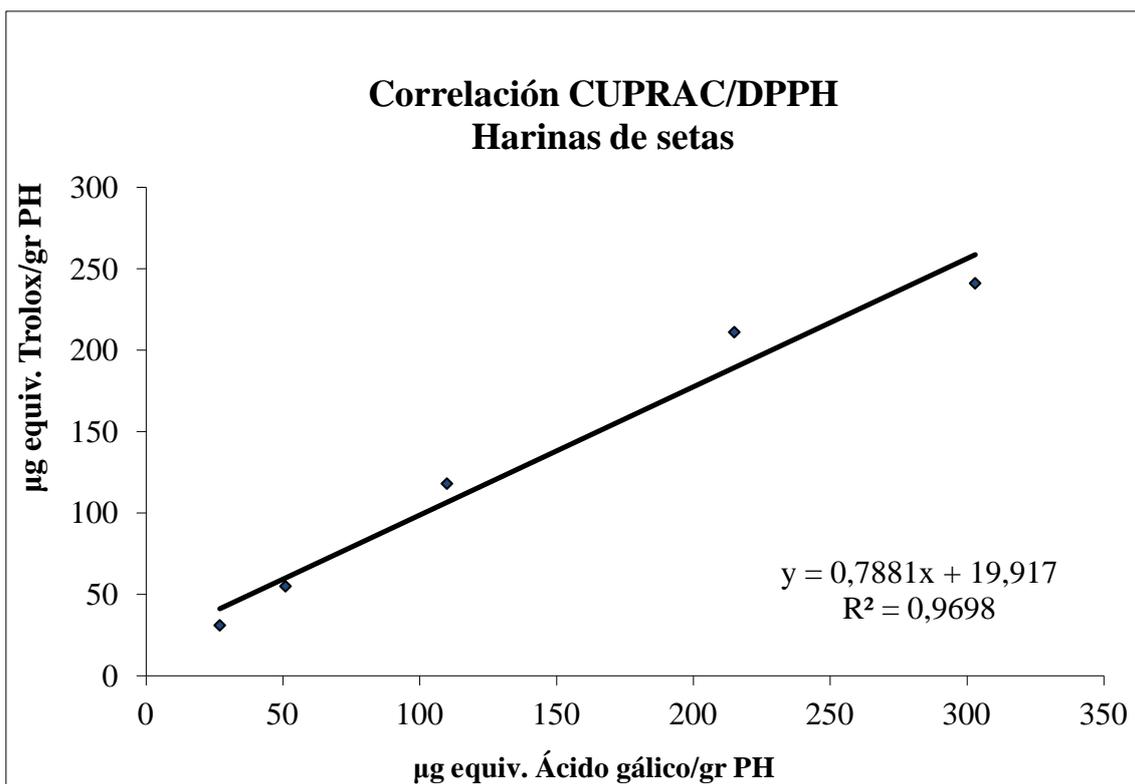
**Figura R21. Correlación entre los métodos de CUPRAC y DPPH.**



**Figura R22. Correlación entre los métodos de Folin-Ciocalteu y CUPRAC de harinas de setas.**



**Figura R23. Correlación entre los métodos de Folin-Ciocalteu y DPPH de harinas de setas.**



**Figura R24. Correlación entre los métodos de CUPRAC y DPPH de harinas de setas.**

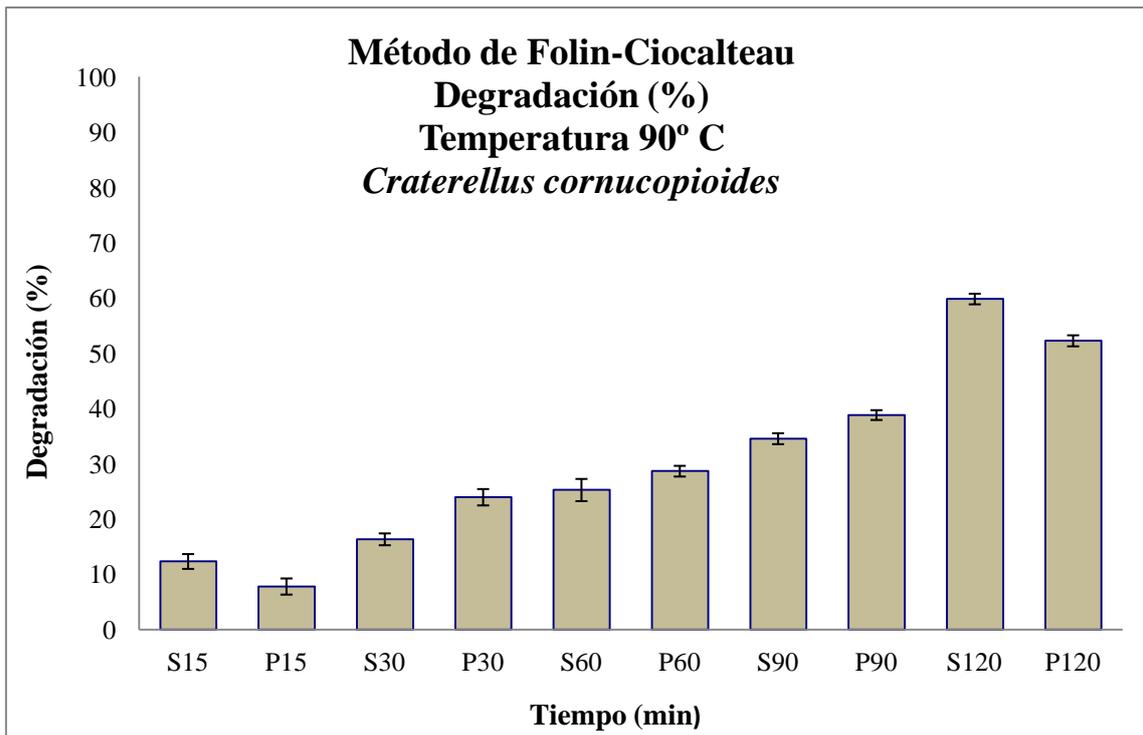
#### 4.8. MEDIDA DE LA DEGRADACIÓN A TEMPERATURA CONSTANTE Y DIFERENTES TIEMPOS EN *CRATERELLUS CORNUCOPIOIDES*.

##### 4.8.1. Medida de la degradación de los fenoles totales.

En primer lugar incubamos los diferentes extractos crudos a temperatura constante de 90° C. Posteriormente medimos la degradación de los fenoles totales a 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos por el método de Folin – Ciocalteu. La recta patrón utilizada es la misma que en el apartado anterior. Los fenoles totales se expresaron en µg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco. Obtuvimos los valores de porcentaje de degradación respecto del tiempo (Tabla R11) que se presentan a continuación en forma de histograma. (Figura R25).

**Tabla R11. Determinación de fenoles totales en la seta *Craterellus cornucopioides* a 90° C y diferentes tiempos de incubación. Peso húmedo (PH) y desviación estándar (DE).**

<b>Fenoles totales.</b> <b>Tiempo (min)</b> T = 90° C	<b>µg equiv. de gálico/g de PH</b> Media ± DE Sombrero	<b>Degradación (%)</b> Media ± DE Sombrero	<b>µg equiv. de gálico/g de PH</b> Media ± DE Pie	<b>Degradación (%)</b> Media ± DE Pie
0	887 ± 51	0 ± 0	546 ± 7	0 ± 0
15	777 ± 34	12,36 ± 1,34	503 ± 7	7,83 ± 1,46
30	741 ± 34	16,37 ± 1,07	415 ± 13	23,98 ± 1,48
60	662 ± 21	25,28 ± 2,01	390 ± 9	28,69 ± 0,97
90	580 ± 28	34,57 ± 0,99	334 ± 9	38,84 ± 0,89
120	356 ± 19	59,83 ± 0,96	258 ± 8	52,77 ± 1,00



**Figura R25. Determinación de los fenoles totales en la seta *Craterellus cornucopioides* a 90° C y diferentes tiempos de incubación.**

#### 4.8.2. Medida de la pérdida de la capacidad antioxidante

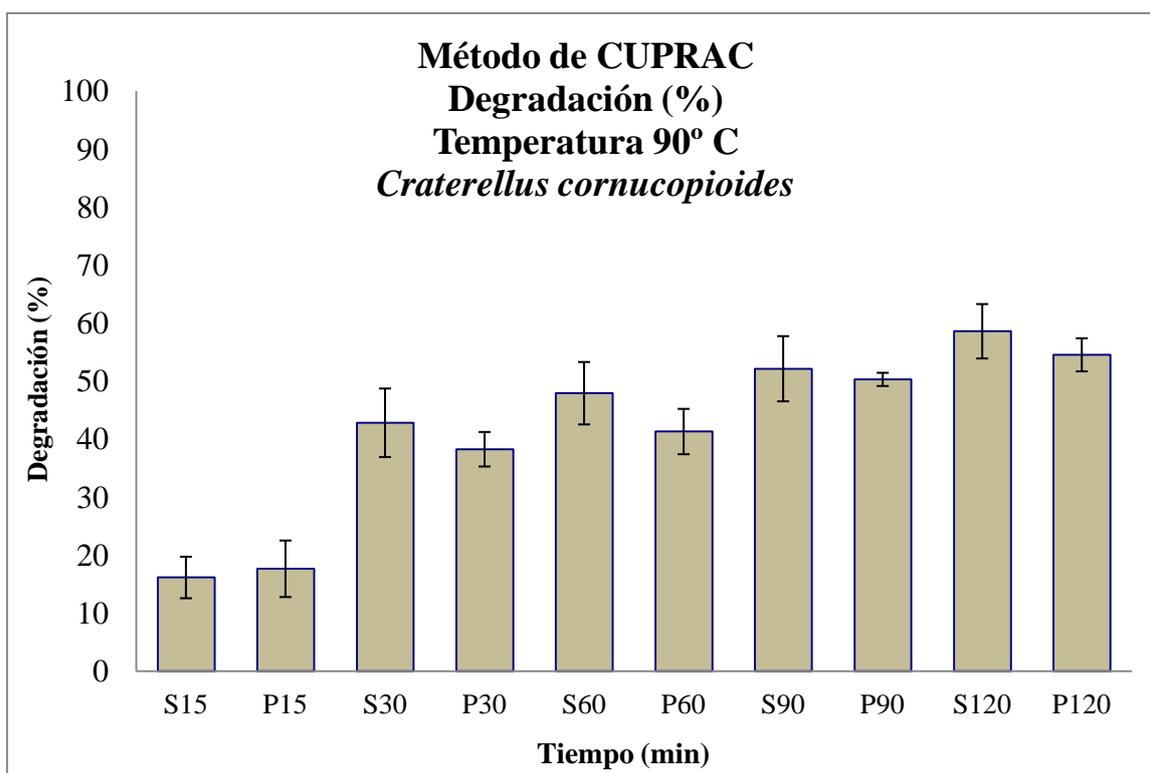
Realizamos este mismo análisis en la determinación de la capacidad antioxidante por el método de CUPRAC. La recta patrón utilizada es la misma que en el apartado anterior. La capacidad antioxidante se expresó en  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco.

A partir de ahí se obtuvieron los valores en porcentaje de degradación respecto al tiempo (Tabla R12) y para una mejor visualización de los datos se han representado en forma de histograma (Figura R26).

Se observa que la degradación de la capacidad antioxidante de los sombreros disminuye de forma progresiva y considerable al prolongar el efecto de la temperatura.

**Tabla R12. Determinación de la capacidad antioxidante en la seta *Craterellus cornucopioides* a temperatura de 90° C y diferentes tiempos de incubación. Peso Húmedo (PH) Desviación Estándar (DE).**

Capacidad antioxidante. Tiempo (min) T = 90° C	µg equiv. de gálico/g de PH Media ± DE Sombrero	Degradación (%) Media ± DE Sombrero	µg equiv. de gálico/g de PH Media ± DE Pie	Degradación (%) Media ± DE Pie
0	279 ± 21	0 ± 0	203 ± 12	0 ± 0
15	233 ± 8	16,14 ± 3,58	167 ± 3	17,64 ± 4,87
30	159 ± 5	42,81 ± 5,91	125 ± 3	38,25 ± 2,98
60	145 ± 5	47,91 ± 5,38	119 ± 2	41,30 ± 3,91
90	137 ± 7	52,13 ± 5,62	101 ± 4	50,29 ± 1,14
120	115 ± 5	58,59 ± 4,69	92 ± 3	54,53 ± 2,85



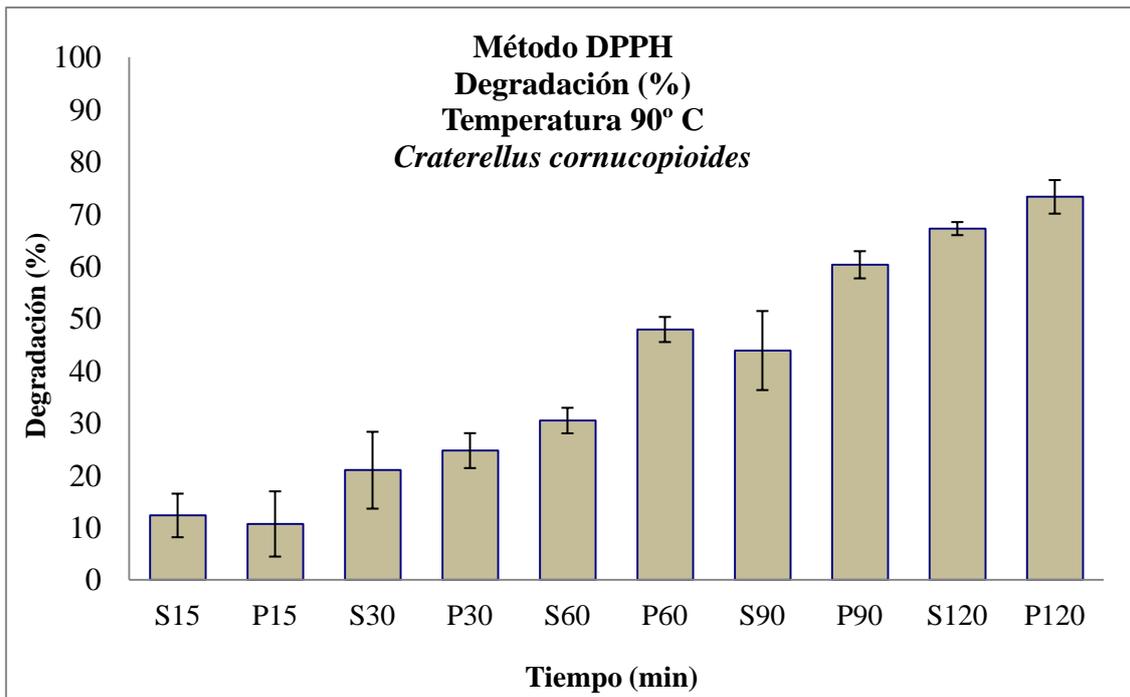
**Figura R26. Determinación de la capacidad antioxidante en la seta *Craterellus cornucopioides* a temperatura constante 90° C y a 15, 30, 60, 90 y 120 minutos de incubación.**

### 4.8.3. Medida de la pérdida de la capacidad antirradicalaria.

Medimos también la pérdida de la capacidad antioxidante a diferentes tiempos por el método del radical DPPH. La recta patrón utilizada es la misma que en el apartado anterior. La capacidad antioxidante se expresó en  $\mu\text{g}$  equivalentes de Trolox por gramo de peso fresco. A partir de ahí se obtuvieron los valores en porcentaje de degradación respecto del tiempo (Tabla R13). Los datos se representan en forma de histograma (Figura R27).

**Tabla R13. Determinación de la capacidad antirradicalaria en la seta *Craterellus cornucopioides* a temperatura constante 90° C y diferentes tiempos. Peso húmedo (PH) y desviación estándar (DE).**

Capacidad antirradicalaria . Tiempo (min) T = 90° C	$\mu\text{g}$ equiv. de Trolox/g de PH Media $\pm$ DE Sombrero	Degradación (%) Media $\pm$ DE Sombrero	$\mu\text{g}$ equiv. de Trolox/g de PH Media $\pm$ DE Pie	Degradación (%) Media $\pm$ DE Pie
0	284 $\pm$ 8	0 $\pm$ 0	238 $\pm$ 4	0 $\pm$ 0
15	248 $\pm$ 12	12,34 $\pm$ 4,17	213 $\pm$ 13	10,71 $\pm$ 6,24
30	224 $\pm$ 20	20,99 $\pm$ 7,35	180 $\pm$ 10	24,74 $\pm$ 3,34
60	197 $\pm$ 4	30,49 $\pm$ 2,44	124 $\pm$ 7	47,91 $\pm$ 2,40
90	159 $\pm$ 18	43,88 $\pm$ 7,56	95 $\pm$ 7	60,29 $\pm$ 2,60
120	93 $\pm$ 4	67,21 $\pm$ 1,25	64 $\pm$ 9	73,28 $\pm$ 3,21



**Figura R27. Determinación de la capacidad antirradicalaria en la seta *Craterellus cornucopioides* a temperatura constante 90° C y diferentes intervalos de tiempo.**

El efecto de la temperatura prolongada es mas notable en el extracto del pie de las muestras que en de los sombreros, la pérdida de capacidad antirradicalaria destaca a 90°C y a 120 minutos.

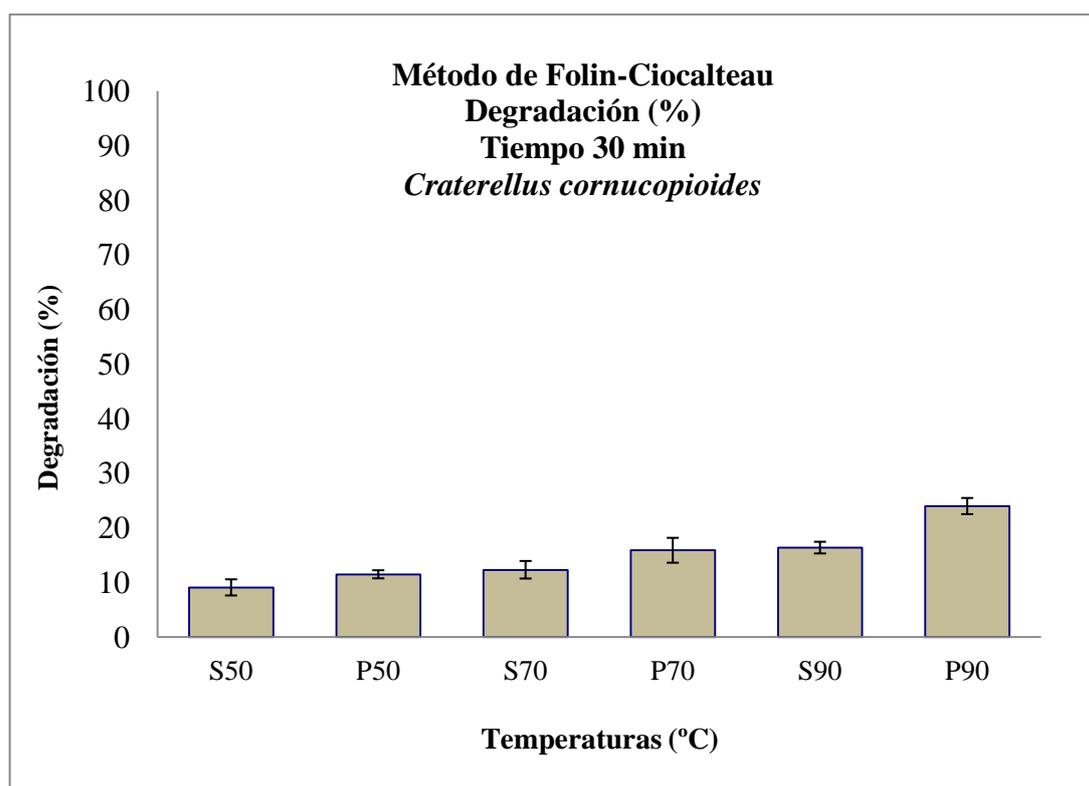
#### **4.9. MEDIDA DE LA DEGRADACIÓN A TIEMPO CONSTANTE Y DIFERENTES TEMPERATURAS DE *CANTHARELLUS CORNUCOPIOIDES*.**

##### **4.9.1. Medida de la degradación de los compuestos fenólicos.**

En primer lugar calentamos el extracto crudo a diferentes temperaturas durante 30 minutos, posteriormente determinamos los fenoles totales en la seta *Craterellus cornucopioides* a tiempo constante por el método de Folin-Ciocalteau (Tabla R14) y realizamos el correspondiente histograma (Fig. R28).

**Tabla R14. Determinación de fenoles totales en la seta *Craterellus cornucopioides* a tiempo constante 30 minutos y diferentes temperaturas. Peso húmedo (PH) y desviación estándar (DE).**

Fenoles totales. Temperatura (°C) t = 30 min	µg equiv. de gálico/g de PH	Degradación (%)	µg equiv. de gálico/g de PH	Degradación (%)
	Media ± DE Sombrero	Media ± DE Sombrero	Media ± DE Pie	Media ± DE Pie
20	887 ± 51	0 ± 0	546 ± 7	0 ± 0
50	806 ± 34	9,08 ± 1,48	484 ± 10	11,48 ± 0,74
70	777 ± 31	12,31 ± 1,61	460 ± 12	15,88 ± 2,28
90	741 ± 34	16,37 ± 1,07	415 ± 13	23,98 ± 1,48



**Figura R28. Determinación de fenoles totales en la seta *Craterellus cornucopioides* a 50, 70 y 90°C durante 30 minutos.**

---

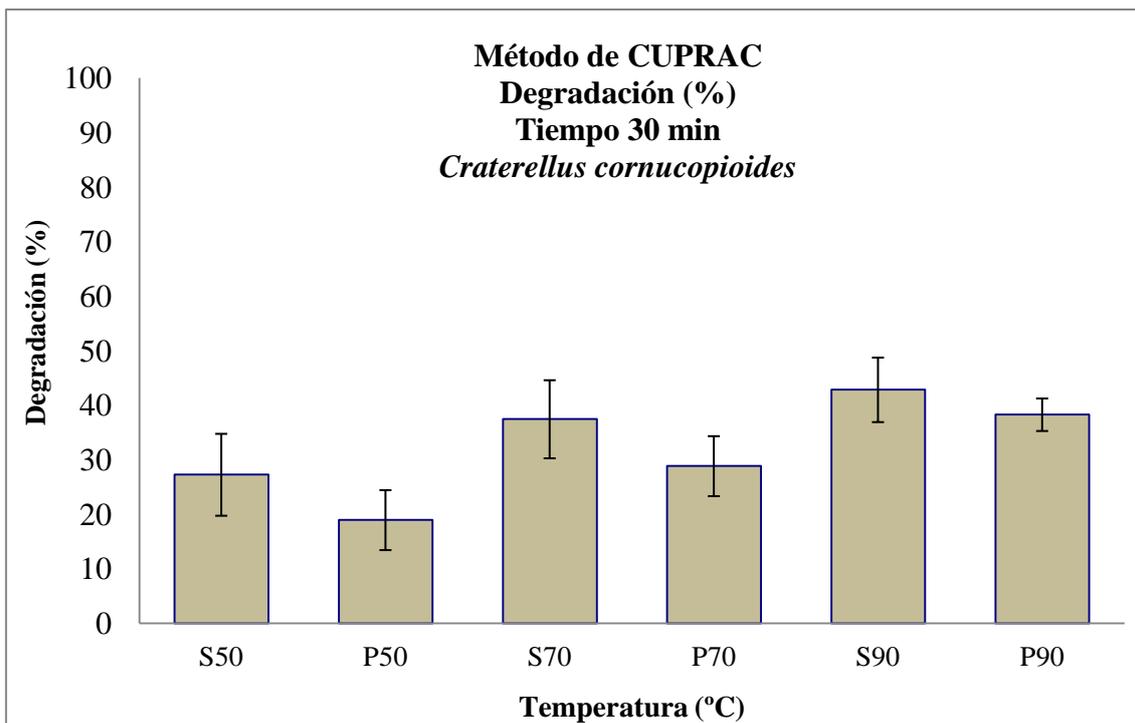
#### 4.9.2. Medida de la degradación de la capacidad antioxidante.

El procedimiento que seguimos es el mismo que en el apartado anterior y observamos el efecto de la temperatura a tiempo constante en la capacidad antioxidante de las muestras obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla R15 a continuación elaboramos el correspondiente histograma (Fig. R29).

El efecto del incremento de la temperatura afecta notablemente a los extractos de los sombreros de la muestra disminuyendo su capacidad antioxidante de forma proporcional.

**Tabla R15. Determinación de la capacidad antioxidante en la seta *Craterellus cornucopioides* a tiempo constante 30 minutos y diferentes temperaturas. Peso húmedo (PH) y desviación estándar (DE).**

<b>Capacidad antioxidante.</b> <b>Temperatura</b> (°C) t = 30 min	<b>µg equiv. de gálico/g de PH</b> Media ± DE Sombrero	<b>Degradación (%)</b> Media ± DE Sombrero	<b>µg equiv. de gálico/g de PH</b> Media ± DE Pie	<b>Degradación (%)</b> Media ± DE Pie
20	279 ± 21	0 ± 0	203 ± 12	0 ± 0
50	202 ± 7	27,24 ± 7,51	164 ± 2	18,93 ± 5,50
70	176 ± 7	37,42 ± 7,16	144 ± 4	28,82 ± 5,55
90	159 ± 5	42,81 ± 5,91	125 ± 3	38,25 ± 2,98



**Figura R29.** Determinación de la capacidad antioxidante en la seta *Craterellus cornucopioides* a tiempo constante de 30 minutos y diferentes temperaturas.

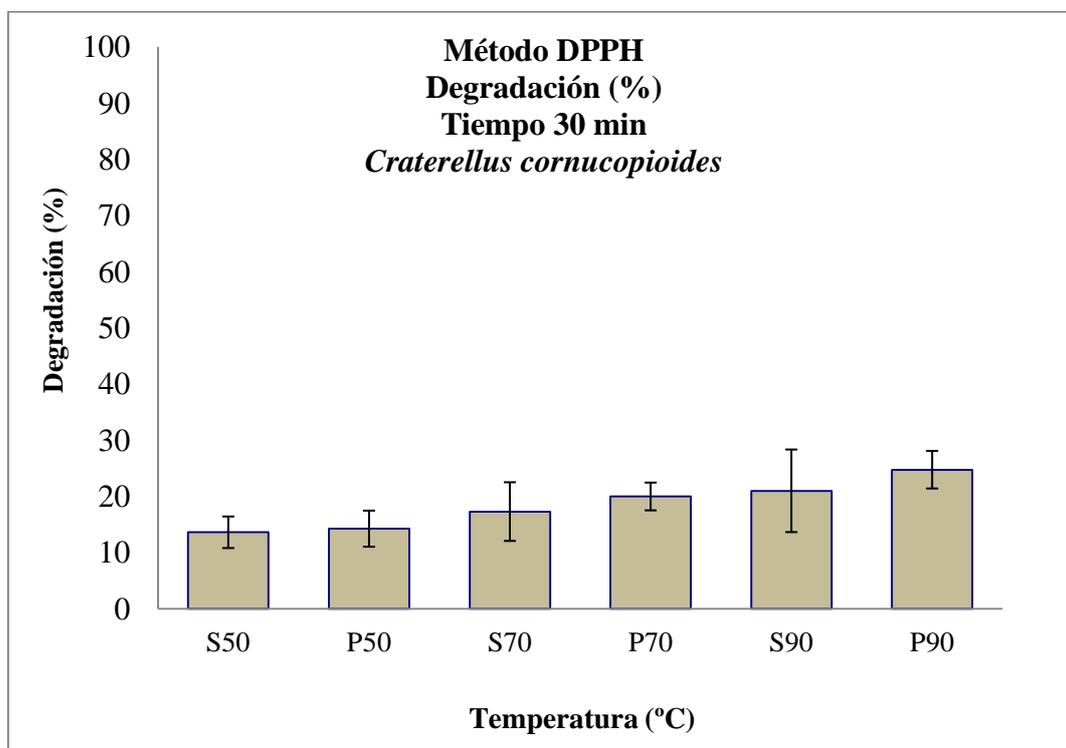
#### 4.9.3. Medida de la pérdida de la capacidad antirradicalaria.

Se determina la capacidad antirradicalaria en la seta *Craterellus cornucopioides* a tiempo constante 30 minutos y diferentes temperaturas (Tabla R16) y se realiza el correspondiente histograma (Fig. R 31).

**Tabla R16.** Determinación de la capacidad antirradicalaria en la seta *Craterellus cornucopioides* a tiempo constante 30 minutos y diferentes temperaturas.

Capacidad antirradicalaria Temperatura (°C) t = 30 min	µg equiv. de Trolox/g de PH Media ± DE Sombrero	Degradación (%) Media ± DE Sombrero	µg equiv. de Trolox/g de PH Media ± DE Pie	Degradación (%) Media ± DE Pie
20	284 ± 8	0 ± 0	238 ± 4	0 ± 0
50	245 ± 8	13,61 ± 2,81	204 ± 8	14,25 ± 3,21
70	234 ± 15	17,29 ± 5,22	191 ± 8	19,98 ± 2,47
90	224 ± 20	20,99 ± 7,35	180 ± 10	24,74 ± 3,34

Se aprecia una degradación progresiva de la capacidad antirradicalaria en la muestra, siendo más sensible el pie de la seta al incremento de la temperatura.



**Figura R30. Determinación de la capacidad antirradicalaria en la seta *Craterellus cornucopioides* a 50, 70 y 90°C durante 30 minutos.**

#### **4.10. MEDIDA DE LA DEGRADACIÓN A TEMPERATURA CONSTANTE Y DIFERENTES TIEMPOS DE *CANTHARELLUS TUBAEFORMIS*.**

Los procesos son los mismos que los detallados en el apartado anterior 4.8. En estos ensayos utilizamos como muestra el extracto crudo de *Cantharellus tubaeformis*.

Para realizar esta prueba, incubamos el extracto crudo a 90° C a diferentes intervalos de tiempo (0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos) antes de proceder a aplicar los protocolos descritos.

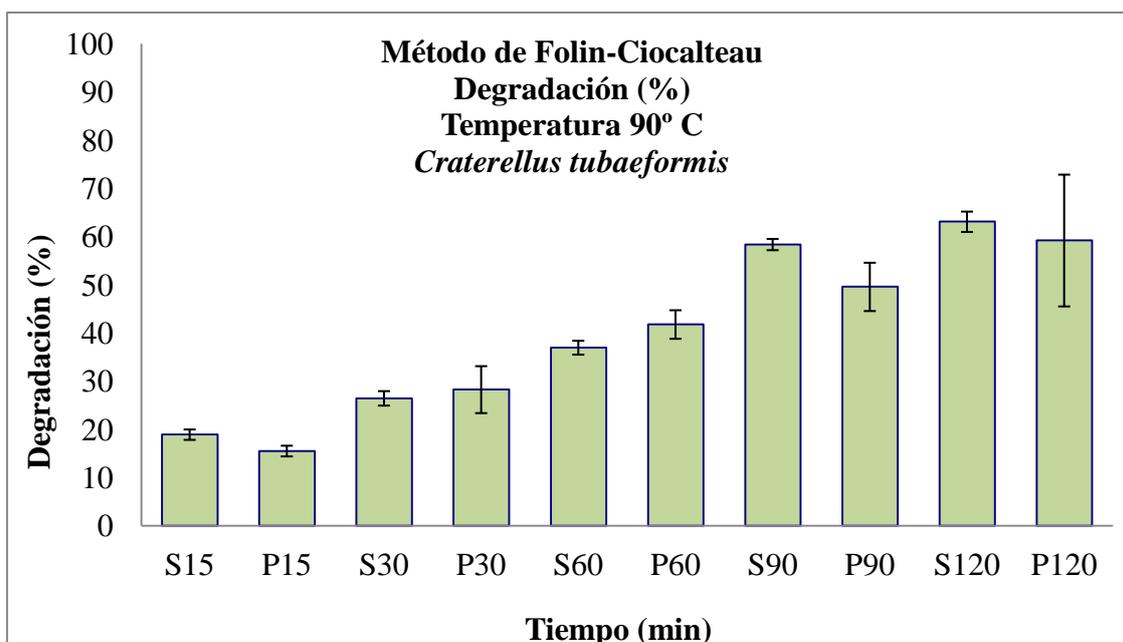
En las tablas R17-R22 y en las Figuras R31-36 se recogen los valores correspondientes a las diferentes degradaciones y los correspondientes histogramas.

#### 4.10.1. Medida de la degradación de los compuestos fenólicos.

**Tabla R17. Determinación de fenoles totales en la seta *Cantharellus tubaeformis* a temperatura constante 90° C y diferentes tiempos. Peso húmedo (PH) y desviación estándar (DE).**

Fenoles totales. Tiempo (min) T = 90° C	µg equiv. de gálico/g de PH	Degradación (%)	µg equiv. de gálico/g de PH	Degradación (%)
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
	Sombrero	Sombrero	Pie	Pie
0	579 ± 35	0 ± 0	422 ± 55	0 ± 0
15	469 ± 28	18,93 ± 1,08	356 ± 48	15,53 ± 1,11
30	425 ± 17	26,46 ± 1,50	301 ± 31	28,27 ± 4,87
60	365 ± 31	36,97 ± 1,44	245 ± 21	41,78 ± 2,96
90	299 ± 19	48,39 ± 1,16	261 ± 22	49,58 ± 5,01
120	213 ± 12	63,09 ± 2,11	171 ± 12	59,20 ± 13,67

Observamos el efecto de la temperatura y el tiempo en la determinación de fenoles totales. El efecto de la temperatura de 90°C durante 120 minutos produce una degradación muy considerable de los fenoles presentes en la muestra, sobre todo en los sombreros.



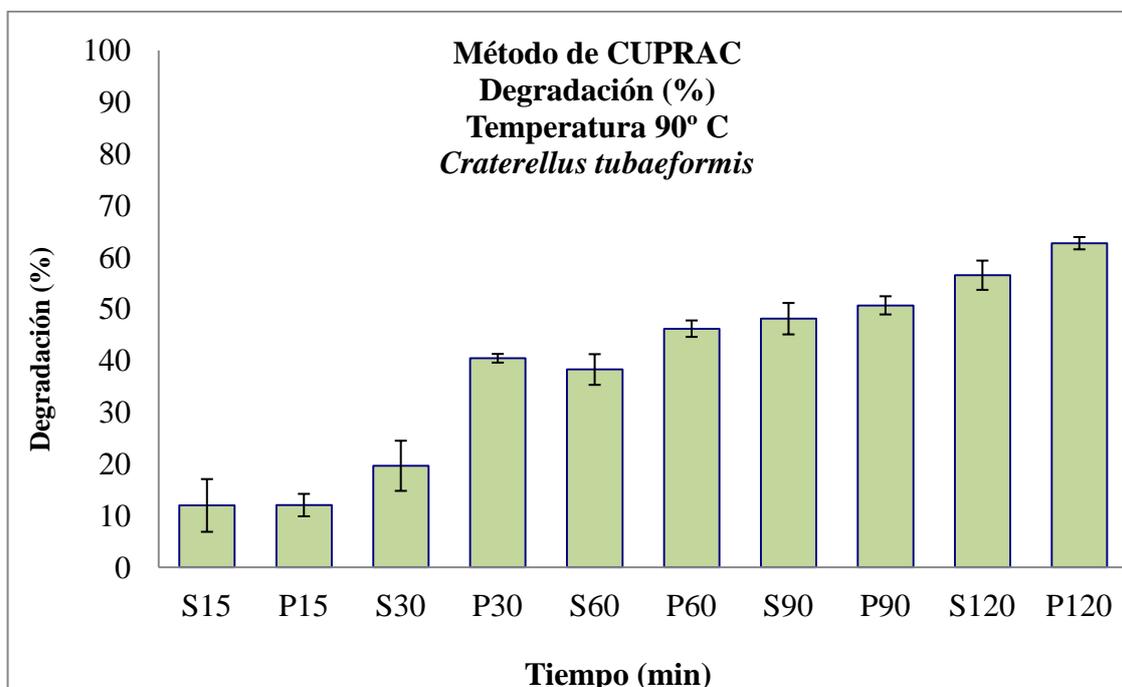
**Figura R31. Determinación de fenoles totales en la seta *Cantharellus tubaeformis*. Temperatura constante 90° C.**

#### 4.10.2. Medida de la pérdida de la capacidad antioxidante.

Se realiza este mismo análisis en la determinación de la capacidad antioxidante por el método de CUPRAC.

**Tabla R18. Determinación de la capacidad antioxidante en la seta *Cantharellus tubaeformis*. Temperatura constante 90° C. Peso húmedo (PH) y desviación estándar (DE).**

Capacidad antioxidante. Tiempo (min) T = 90° C	µg equiv. de gálico/g de PH Media ± DE Sombrero	Degradación (%) Media ± DE Sombrero	µg equiv. de gálico/g de PH Media ± DE Pie	Degradación (%) Media ± DE Pie
0	236 ± 2	0 ± 0	197 ± 11	0 ± 0
15	208 ± 13	11,96 ± 5,10	174 ± 13	12,03 ± 2,17
30	190 ± 13	19,63 ± 4,85	117 ± 8	40,43 ± 0,84
60	146 ± 8	38,26 ± 2,97	106 ± 5	46,16 ± 1,59
90	122 ± 8	48,09 ± 3,04	97 ± 5	50,67 ± 1,76
120	103 ± 7	56,50 ± 2,83	74 ± 6	62,70 ± 1,19

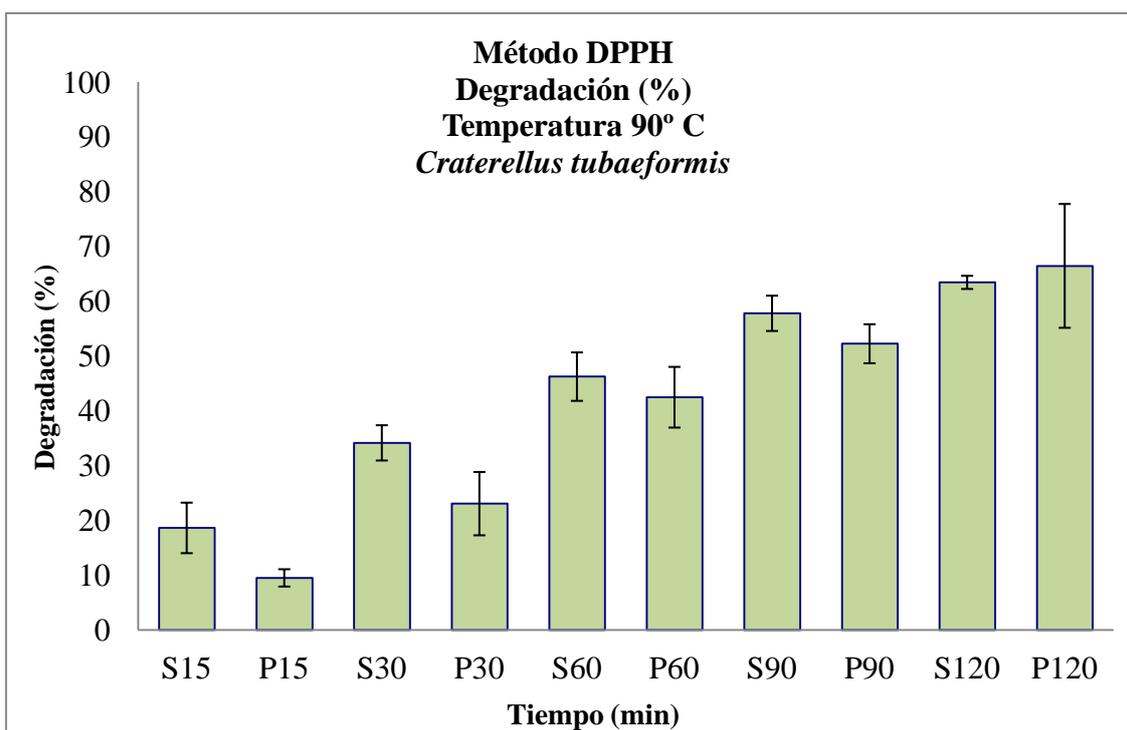


**Figura R32. Determinación de la capacidad antioxidante en la seta *Cantharellus tubaeformis*. Temperatura constante 90° C.**

#### 4.10.3. Medida de la pérdida de la capacidad antirradicalaria.

**Tabla R19. Determinación de la capacidad antirradicalaria en la seta *Cantharellus tubaeformis*.**

Capacidad antirradicalaria Tiempo (min) T = 90° C	µg equiv. de Trolox/g de PH Media ± DE Sombrero	Degradación n (%) Media ± DE Sombrero	µg equiv. de Trolox/g de PH Media ± DE Pie	Degradación (%) Media ± DE Pie
0	253 ± 23	0 ± 0	197 ± 23	0 ± 0
15	205 ± 8	18,62 ± 4,61	178 ± 21	9,50 ± 1,58
30	166 ± 17	34,14 ± 3,22	151 ± 18	23,05 ± 5,78
60	135 ± 8	46,23 ± 4,42	112 ± 9	42,47 ± 5,54
90	106 ± 4	57,78 ± 3,22	94 ± 15	52,23 ± 3,56
120	90 ± 8	63,43 ± 1,20	66 ± 22	66,44 ± 11,30



**Figura R33. Determinación de la capacidad antirradicalaria en la seta *Cantharellus tubaeformis*.**

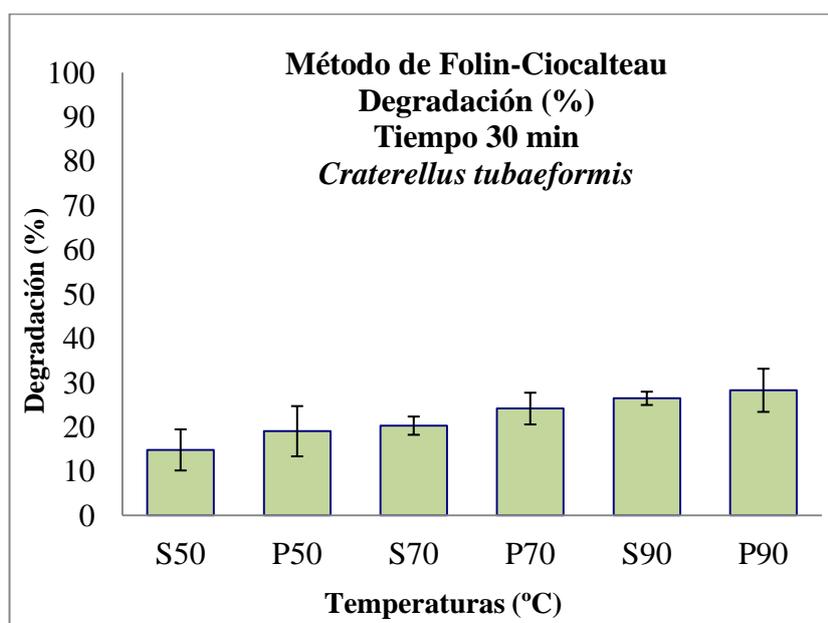
#### 4.11. MEDIDA DE LA DEGRADACIÓN A TIEMPO CONSTANTE Y DIFERENTES TEMPERATURAS DE *CANTHARELLUS TUBAEFORMIS*

##### 4.11.1. Medida de la degradación de los compuestos fenólicos.

El aumento de la temperatura produce una degradación progresiva de los fenoles totales de la muestra.

**Tabla R20. Determinación de fenoles totales en la seta *Cantharellus tubaeformis* a tiempo constante de 30 minutos y a diferentes temperaturas.**

Fenoles totales. Temperatura (°C) t = 30 min	µg equiv. de gálico/g de PH Media ± DE Sombrero	Degradación (%) Media ± DE Sombrero	µg equiv. de gálico/g de PH Media ± DE Pie	Degradación (%) Media ± DE Pie
20	579 ± 35	0 ± 0	422 ± 55	0 ± 0
50	493 ± 28	14,82 ± 4,64	340 ± 28	19,04 ± 5,67
70	462 ± 30	20,29 ± 2,06	319 ± 28	24,15 ± 3,58
90	425 ± 17	26,46 ± 1,50	301 ± 31	28,27 ± 4,87



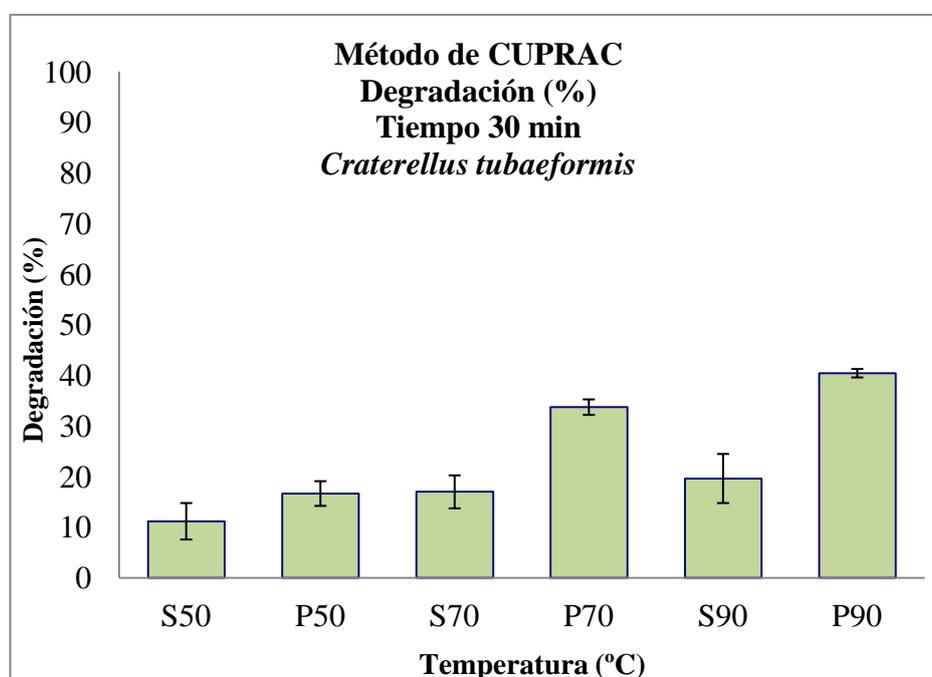
**Figura R34. Determinación de fenoles totales en la seta *Cantharellus tubaeformis* a tiempo constante 30 minutos y a diferentes temperaturas.**

#### 4.11.2. Medida de la pérdida de la capacidad antioxidante.

Se determinó la capacidad antioxidante al incubar a diferentes temperaturas y un tiempo constante de 30 min. Los resultados se indican en la tabla R21 y la Figura R35.

**Tabla R21. Determinación de la capacidad antioxidante en la seta *Cantharellus tubaeformis* a tiempo constante 30 minutos y diferentes temperaturas.**

Capacidad antioxidante. Temperatura (°C) t = 30 min	µg equiv. de gálico/g de PH Media ± DE Sombrero	Degradación (%) Media ± DE Sombrero	µg equiv. de gálico/g de PH Media ± DE Pie	Degradación (%) Media ± DE Pie
20	236 ± 2	0 ± 0	197 ± 11	0 ± 0
50	210 ± 10	11,18 ± 3,60	164 ± 11	16,66 ± 2,44
70	196 ± 9	16,99 ± 3,26	131 ± 17	33,73 ± 1,53
90	190 ± 13	19,63 ± 4,85	117 ± 8	40,43 ± 0,84



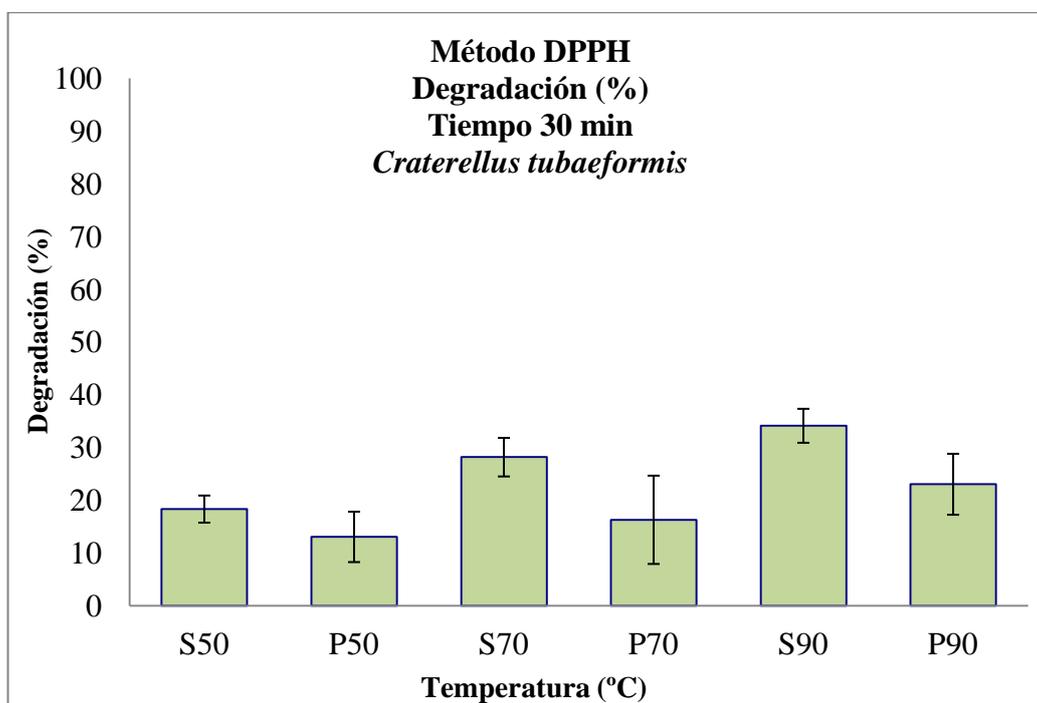
**Figura R35. Determinación de la capacidad antioxidante en la seta *Cantharellus tubaeformis* a tiempo constante de 30 minutos y diferentes temperaturas.**

#### 4.11.3. Medida de la pérdida de la capacidad antirradicalaria.

A partir de los 70°C se produce una rápida degradación de la capacidad antirradicalaria.

**Tabla R22. Determinación de la capacidad antirradicalaria en la seta *Cantharellus tubaeformis* a tiempo constante 30 minutos y diferentes temperaturas.**

Capacidad antirradicalaria Temperatura (°C) t = 30 min	µg equiv. de Trolox/g de PH Media ± DE Sombrero	Degradación (%) Media ± DE Sombrero	µg equiv. de Trolox/g de PH Media ± DE Pie	Degradación (%) Media ± DE Pie
20	253 ± 23	0 ± 0	197 ± 23	0 ± 0
50	206 ± 15	18,34 ± 2,57	170 ± 13	13,07 ± 4,78
70	181 ± 15	28,19 ± 3,66	164 ± 19	16,31 ± 8,37
90	166 ± 17	34,14 ± 3,22	151 ± 18	23,05 ± 5,78



**Figura R36. Determinación de la capacidad antirradicalaria en la seta *Cantharellus tubaeformis* a tiempo constante 30 minutos y diferentes temperaturas.**

## 4.12. MEDIDA DE $\beta$ -GLUCANOS EN SETAS Y HARINA DE SETAS.

### 4.12.1. Determinación de la longitud de onda y la concentración de Rojo Congo.

Realizamos un barrido a las longitudes de onda de 280nm y 800nm, utilizándose Rojo Congo a 0,04%, 0,08%, 0,1% y 0,3% hasta obtener el resultado óptimo.

El cambio batocrómico de la reacción de  $\beta$ -1,3-1,6 -glucanos con Rojo Congo se efectúa por la concentración de  $\beta$  -glucano y 1,3-1,6-colorante. El intervalo mayor de longitudes de onda es 520-540 nm y la concentración óptima de Rojo Congo es 0,08% (Fig. R37)

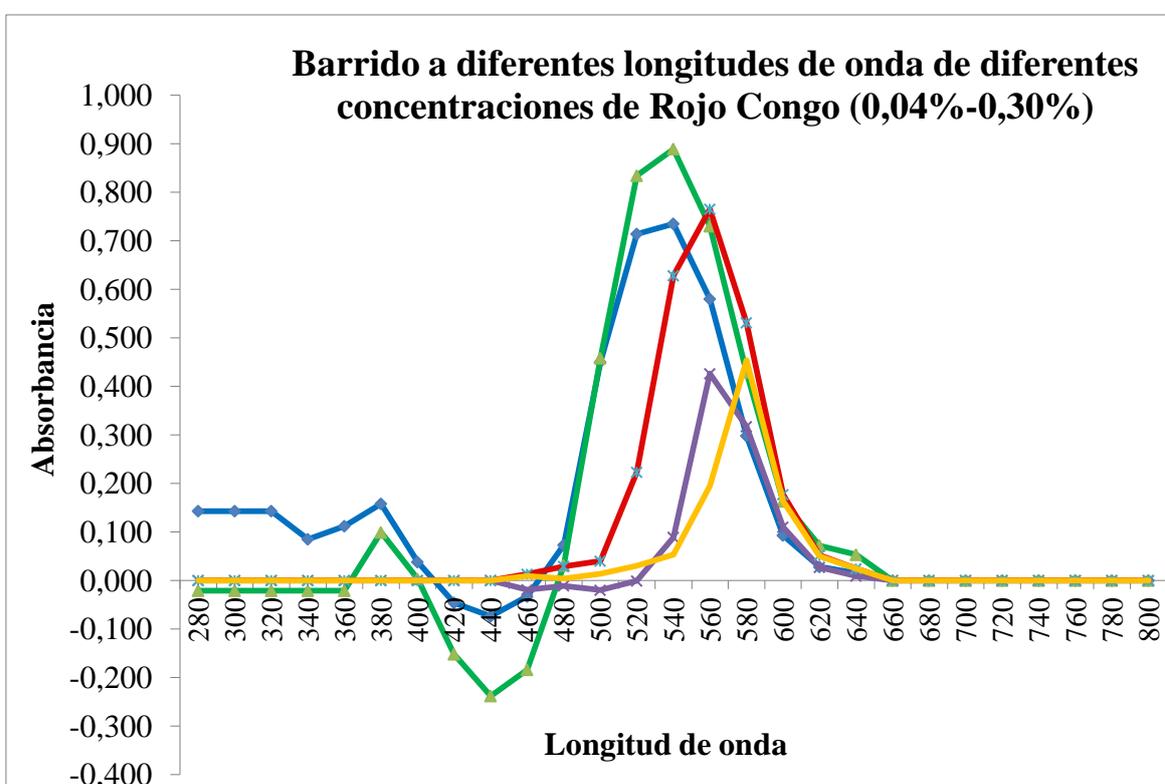
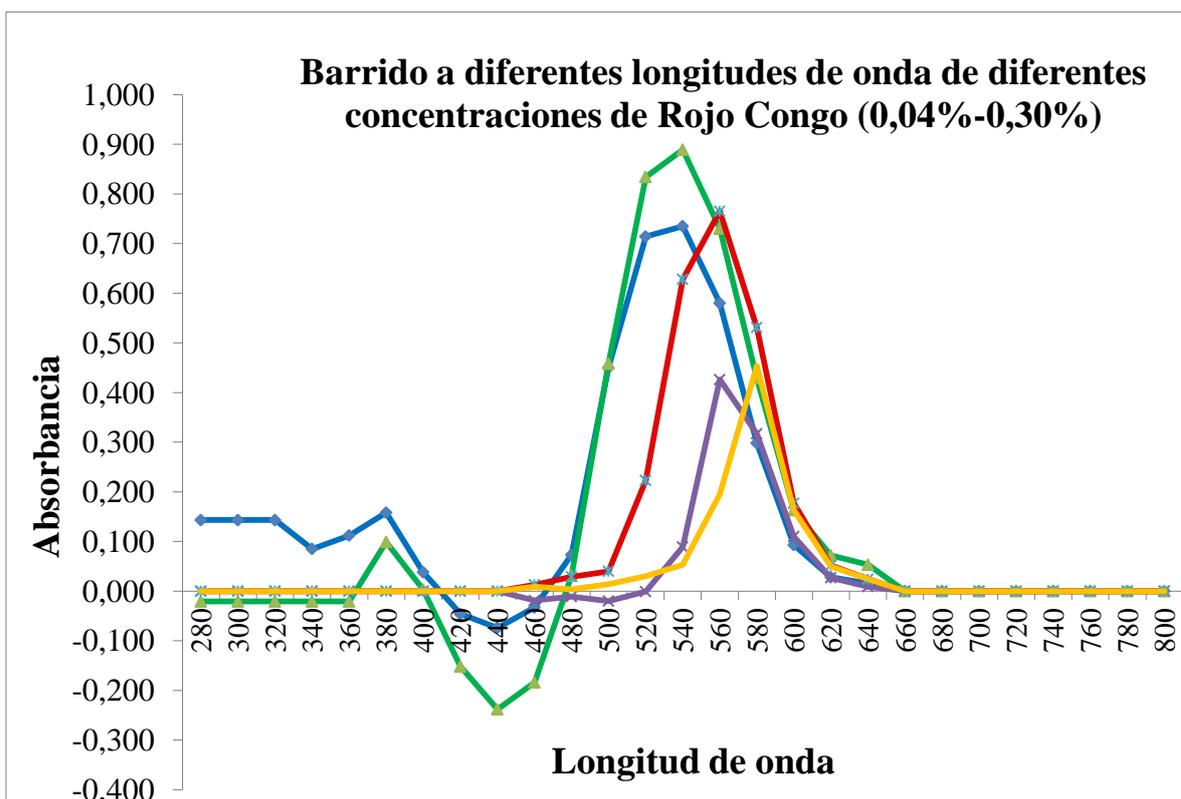


Figura R37. Espectros de absorción que muestran el desplazamiento batocrómico.

Barrido a diferentes longitudes de onda a diferentes concentraciones de Rojo Congo (línea verde 0,08%, línea azul 0,04%, línea roja 0,015%, línea naranja 0,030% y línea violeta 0,010%), y concentración constante de *Pleurotus eryngii* (432,32  $\mu$ g).

Se realizó un barrido desde los 280nm a 800nm de muestras con diferentes concentraciones de *Pleurotus eryngii* (20µl, 40µl, 80µl y 160µl) de la fracción NaOH utilizando rojo congo 0,08% (Fig. R38).

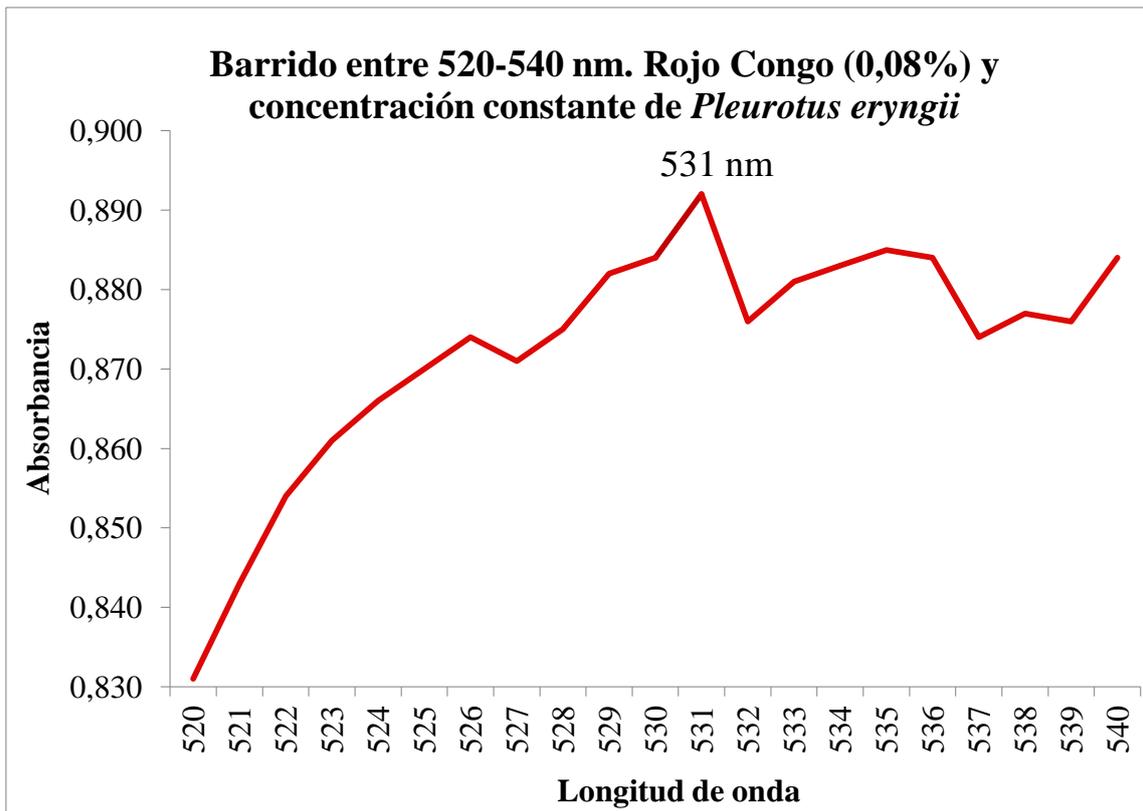
El intervalo mayor de longitudes de onda es 520-540 nm y se observa relación entre las concentraciones y las absorbancias.



**Figura R38. Barrido a diferentes longitudes de onda. Concentración de Rojo Congo (0,08%) y distintas concentraciones de *Pleurotus eryngii*. Línea azul (54,04 µg), línea verde (108,08 µg), línea morada (216,16 µg), línea roja (432,32 µg).**

El rango óptimo de medida de absorbancias queda acotado entre los 520 nm y 540 nm. Haciendo un barrido en detalle desde 520 nm a 540 nm se observa un pico de absorbancia máxima a 531 nm.

Todas las medidas que se realicen posteriormente, se llevarán a cabo seleccionando esta longitud de onda (Fig. R39).

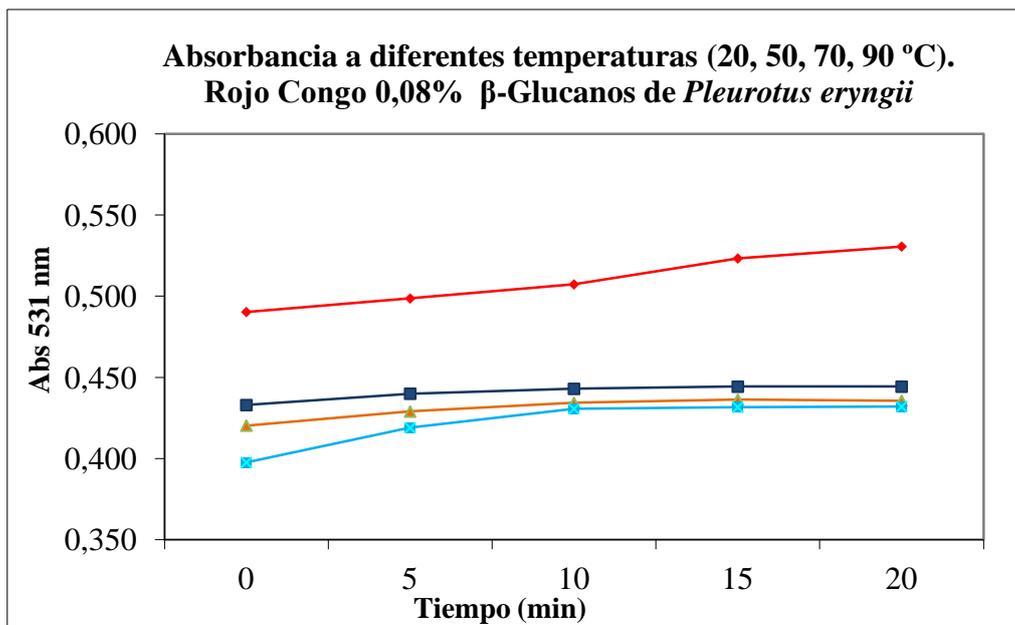


**Figura R39. Barrido entre 520nm y 540nm *Pleurotus eryngii* con Rojo Congo a 0,08%.**

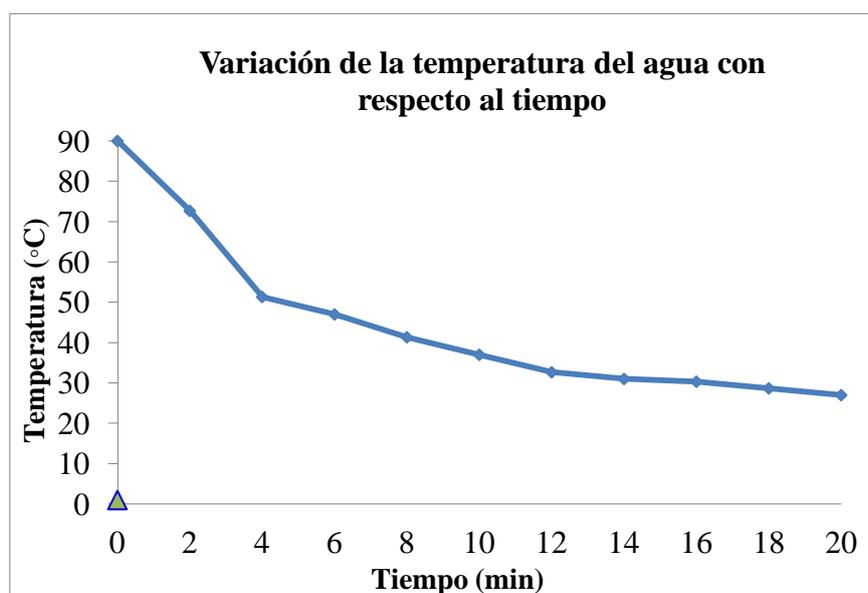
#### 4.12.2. Temperatura de reacción.

Estudiamos el efecto de la temperatura, para ello incubamos la muestra y la fracción NaOH a 50, 70 y 90°C en baño de agua con agitación durante 10 minutos. Realizamos la medida espectrofotométrica 20 minutos después de haber alcanzado la temperatura correspondiente.

Realizamos medidas cada 5 minutos, observándose que a pesar de que el contenido en  $\beta$ -glucanos disminuye con la temperatura, según transcurre el tiempo y la muestra se va enfriando las absorbancias vuelven a aumentar hasta un valor constante (Fig. R40).



**Figura R40. Absorbancia a diferentes temperaturas. Línea azul (90° C), línea verde (70° C), línea morada (50° C), línea roja (20° C).**



**Figura R41. Variación de la temperatura del agua con respecto al tiempo.**

Paralelamente se realiza un ensayo midiendo la temperatura de un volumen de agua de 4 ml a 90°C por triplicado cada 2 minutos y se determina la temperatura para cada intervalo de tiempo (Figura R41).

#### 4.12.3. Recta Patrón de la seta *Pleurotus eryngii*.

Definidos los parámetros del método, rojo congo al 0,08%, tiempo de reacción de 20', temperatura ambiente y longitud de onda 531nm, se procede a la preparación de las rectas patrón de cada una de las fracciones obtenidas: KOH, HCl, NaOH (Fig. R42-R44).

Partimos de los datos de  $\beta$ -glucanos obtenidos por Nitschke para cada fracción (Nitschke y cols., 2011) en *Pleurotus eryngii*.

Para realizar la recta patrón se utiliza un medio de ácido cítrico 0,2 M y rojo congo de concentración 0,008%. Para determinar cada punto de la recta patrón se añaden concentraciones de la fracción KOH de *Pleurotus eryngii* de 30 $\mu$ l, 60 $\mu$ l, 90 $\mu$ l y 120 $\mu$ l.

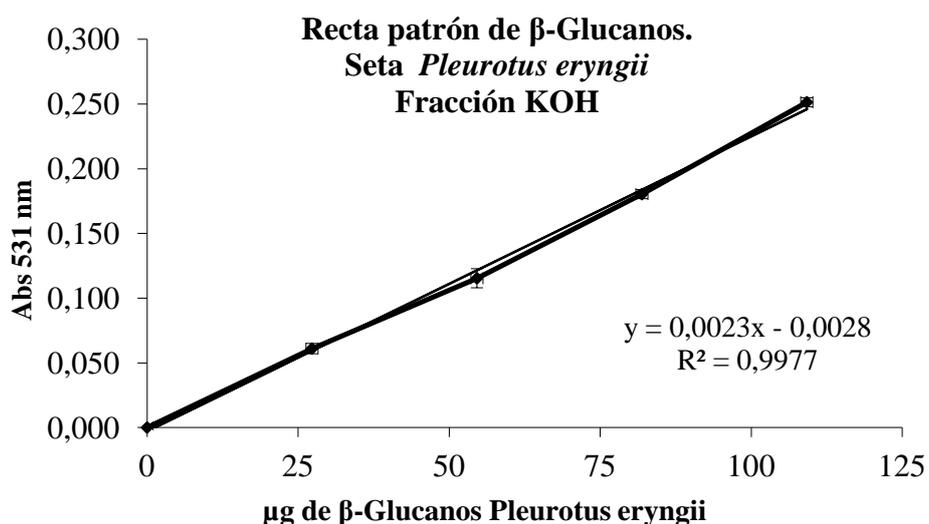
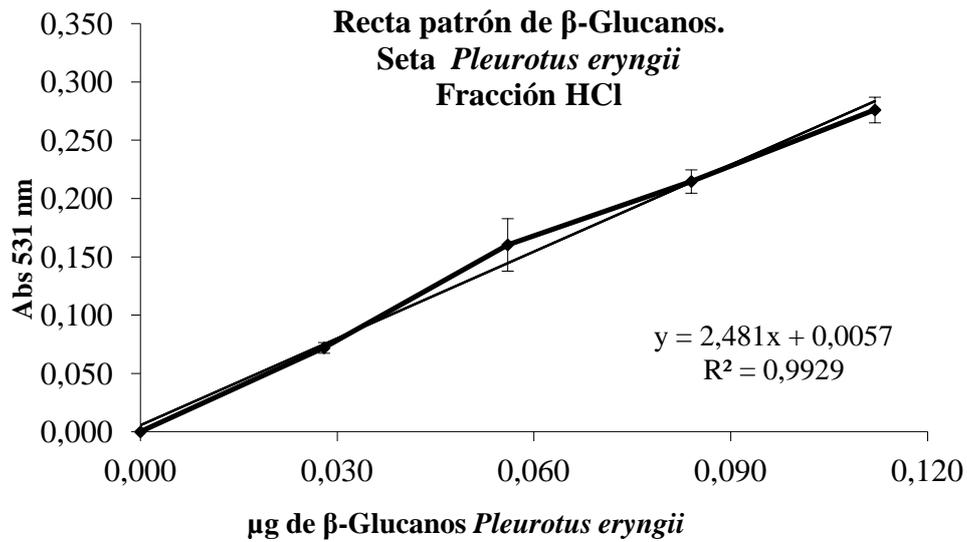


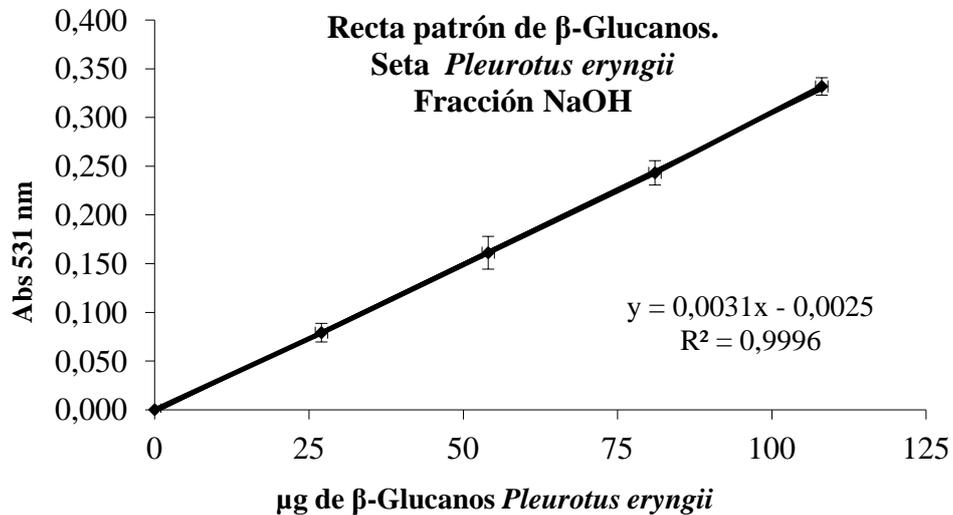
Figura R42. Recta patrón Fracción KOH de la seta *Pleurotus eryngii*.

Para preparar la recta patrón de HCl se emplean las siguientes concentraciones de la fracción HCl de *Pleurotus eryngii*: 100 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 300 $\mu$ l y 400 $\mu$ l.



**Figura R43. Recta patrón Fracción HCl de la seta *Pleurotus eryngii*.**

Para preparar la recta patrón de NaOH se emplean las siguientes concentraciones de la fracción NaOH de *Pleurotus eryngii*: 10µl, 20µl, 30µl y 40µl.



**Figura R44. Recta patrón Fracción NaOH de la seta *Pleurotus eryngii*.**

#### 4.12.4. Determinación del contenido de $\beta$ -glucanos en setas frescas.

Para determinar el contenido en  $\beta$ -glucanos se toman los extractos de KOH, HCl y NaOH preparados para tal fin. Los volúmenes de muestra de cada fracción empleados fueron Fracción KOH (50  $\mu$ l), Fracción HCl (50  $\mu$ l), Fracción NaOH (20  $\mu$ l).

Utilizando las rectas patrón de *Pleurotus eryngii* de cada fracción y haciendo los cálculos pertinentes, se obtiene el porcentaje en  $\beta$ -glucanos de cada fracción KOH, HCl y NaOH respectivamente.

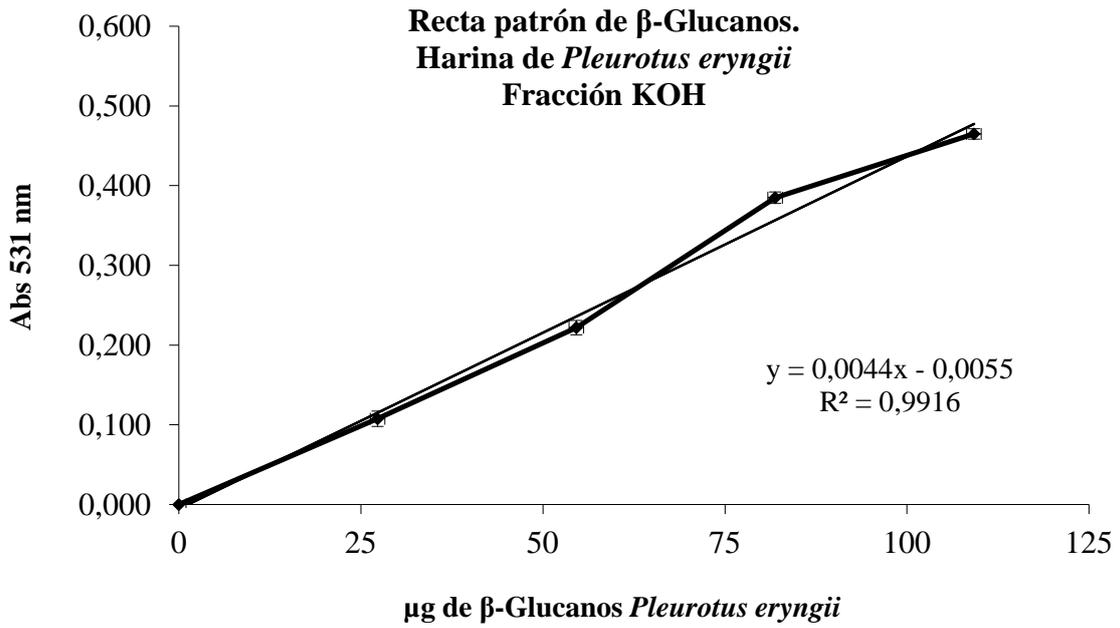
La suma de estos valores es el valor total de  $\beta$ -glucanos referidos a *Pleurotus eryngii* expresados en tanto por ciento (%) para cada una de las muestras de setas (Tabla R23).

**Tabla R23. Determinación de la cantidad de  $\beta$ -Glucanos en las diferentes setas utilizando como patrón las diferentes fracciones (KOH, HCl, NaOH) expresadas en porcentaje de *Pleurotus eryngii* (P.E.).**

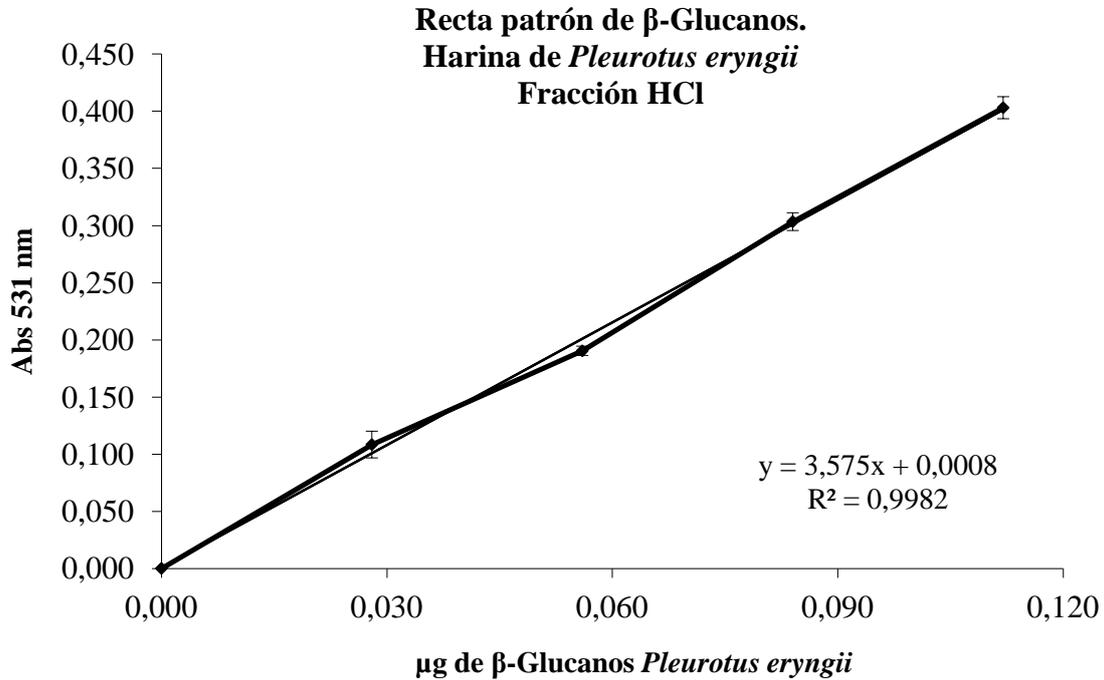
Seta fresca	$\beta$ -Glucanos (%)P.E. Fracción KOH	$\beta$ -Glucanos (%)P.E. Fracción HCl	$\beta$ -Glucanos (%)P.E. Fracción NaOH	$\beta$ -Glucanos (%)P.E. Total
<i>Hydnum repandum</i> (HR)	2,63 $\pm$ 0,30	0,003 $\pm$ 0,0001	3,89 $\pm$ 0,66	<b>6,56</b>
<i>Cantharellus cibarius</i> (CC)	2,39 $\pm$ 0,46	0,001 $\pm$ 0,0001	3,66 $\pm$ 1,64	<b>6,04</b>
<i>Hydnum rufescens</i> (HRU)	1,86 $\pm$ 0,27	0,004 $\pm$ 0,0002	6,42 $\pm$ 0,43	<b>8,28</b>
<i>Cantharellus tubaeformis</i> (CT)	2,17 $\pm$ 0,34	0,011 $\pm$ 0,0003	2,79 $\pm$ 0,60	<b>4,96</b>
<i>Craterellus cornucopioides</i> (CCO)	1,70 $\pm$ 1,21	0,005 $\pm$ 0,0001	3,66 $\pm$ 0,43	<b>5,36</b>
<i>Cratarellus lutescens</i> (CL)	5,58 $\pm$ 0,77	0,005 $\pm$ 0,0002	6,13 $\pm$ 1,07	<b>11,72</b>

#### 4.12.5. Recta Patrón de harina de *Pleurotus eryngii*.

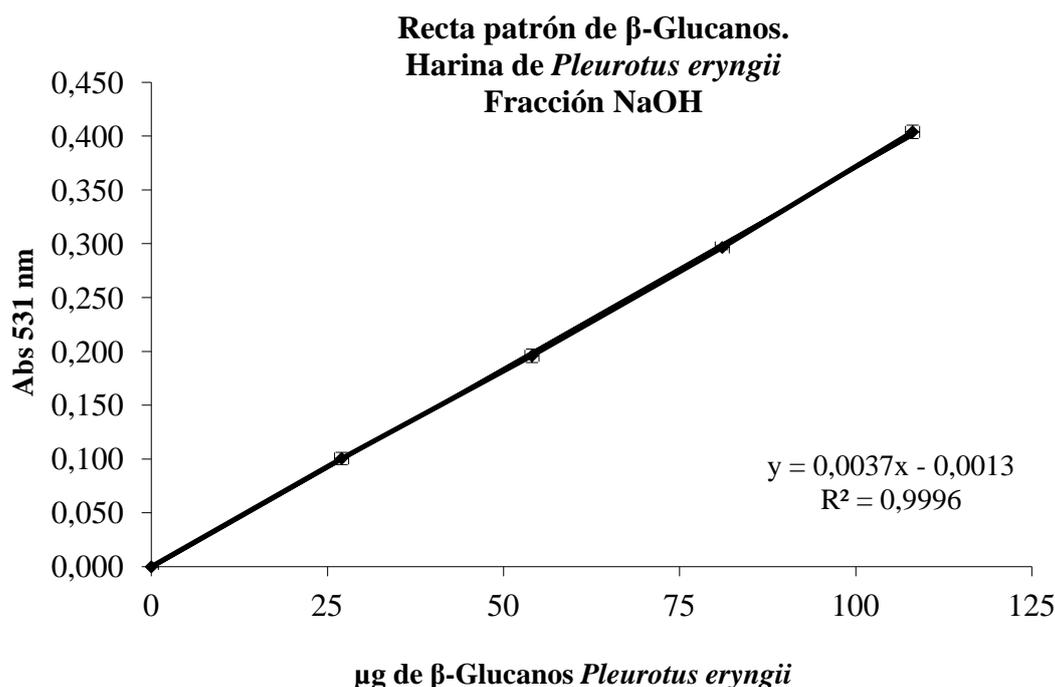
Se prepara la recta patrón de harina de *Pleurotus eryngii* utilizando la misma reacción que en el apartado anterior (Fig. R45-47).



**Figura R45. Recta patrón Fracción KOH de la harina de la seta *Pleurotus eryngii*.**



**Figura R46. Recta patrón Fracción HCl de la harina de la seta *Pleurotus eryngii*.**



**Figura R47. Recta patrón Fracción NaOH de la harina de la seta *Pleurotus eryngii*.**

#### 4.12.6. Contenido de $\beta$ -glucanos en harina de setas.

Los volúmenes de muestra de cada fracción empleados fueron Fr. KOH (50  $\mu$ l), Fr.HCl (50  $\mu$ l), Fr. NaOH (20  $\mu$ l). Se mide la absorbancia de cada muestra de harina de seta (Tabla. R24) con este valor y la recta patrón correspondiente se puede calcular la cantidad de  $\beta$ -Glucanos expresada en tanto por ciento (%) de *Pleurotus eryngii* de cada fracción (KOH, HCl y NaOH) de harina respectivamente.

**Tabla R24. Contenido de  $\beta$ -Glucanos en las diferentes harinas de setas utilizando como patrón las fracciones KOH, HCl y NaOH de harina de *Pleurotus eryngii*.**

Harina de seta	$\beta$ -Glucanos (%)P.E. Fracción KOH	$\beta$ -Glucanos (%)P.E. Fracción HCl	$\beta$ -Glucanos (%)P.E. Fracción NaOH	$\beta$ -Glucanos (%)P.E. Total
<i>Hydnum repandum</i> (HR)	2,88 $\pm$ 0,77	0,003 $\pm$ 0,0001	5,32 $\pm$ 0,83	<b>8,21</b>
<i>Cantharellus cibarius</i> (CC)	5,87 $\pm$ 0,79	0,002 $\pm$ 0,0002	2,77 $\pm$ 0,40	<b>8,64</b>
<i>Cantharellus tubaeformis</i> (CT)	1,88 $\pm$ 0,46	0,001 $\pm$ 0,0001	4,12 $\pm$ 0,45	<b>5,99</b>
<i>Craterellus cornucopioides</i> (CCO)	3,27 $\pm$ 0,17	0,001 $\pm$ 0,0001	5,18 $\pm$ 0,64	<b>8,45</b>
<i>Cratarellus lutescens</i> (CL)	7,18 $\pm$ 0,53	0,003 $\pm$ 0,0001	11,16 $\pm$ 1,32	<b>18,35</b>

---

## **5. DISCUSIÓN.**

---

Las setas contienen distintas sustancias bioactivas (Roupas y cols., 2012). Entre los compuestos metabólicamente activos, los polifenoles poseen gran capacidad antioxidante y antirradicalaria, y por ello el estudio de su presencia en las setas comestibles es muy interesante.

En este trabajo, se ha determinado en primer lugar el contenido en fenoles totales, la capacidad antioxidante y antirradicalaria de un grupo de setas comestibles muy apreciadas, del orden de las *Cantharellaceas*. Los resultados indican que las seis setas contienen gran cantidad de fenoles y un valor antioxidante comparable al de algunas verduras (Kalac y cols., 2012). Entre las setas estudiadas destaca *Craterellus cornucopioides* seguida muy de cerca por *Cantharellus tubaeformis*, cuyos valores medios duplican al resto de las otras setas estudiadas.

Los experimentos se han realizado analizando tanto el sombrero como el pie de cada seta, obteniéndose valores que indican un contenido en fenoles superior en el sombrero que en el pie.

Las actividades antioxidante y antirradicalaria determinadas en *Craterellus cornucopioides* y *Cantharellus tubaeformis* son mayores que en el resto. Además, son superiores en los sombreros que en los pies.

El consumo de setas frescas está marcado por la estacionalidad y la disponibilidad, durante el resto del año existen productos comerciales como las harinas de setas secas que pueden ser igualmente interesantes desde este punto de vista nutricional, por eso, se analizaron cinco harinas de setas de este grupo disponibles en el mercado. Los resultados indican que la variación entre el contenido de fenoles totales en las setas y la harina de setas no es muy notable, siendo alrededor del 10% menor en el caso de las harinas de setas.

Otro factor importante a considerar es que las setas comestibles suelen consumirse cocinadas por procedimientos que conllevan temperaturas cercanas a los 100°C. Aunque la tendencia actual es preservar el sabor y la textura aplicando cortos golpes de calor, son muchos los procesos gastronómicos en los que las setas se someten a altas temperaturas para su conservación o como complemento de platos muy elaborados o que requieren una larga cocción. Por ello se consideró someter los extractos acuosos de setas al efecto de la temperatura a tiempos variables, tratando de simular con estas condiciones las que se utilizan en el consumo cotidiano.

Hay que tener en cuenta que el proceso de cocción puede destruir las estructuras de los polifenoles y causar una disminución en su actividad antioxidante (Barros y cols.,

---

2007). Por otro lado, aplicando bajas temperaturas como en los procesos de deshidratación a 40-50°C, también se puede producir un aumento en la concentración de compuestos fenólicos (Ferreira y cols., 2009; Valentão., 2005; Yen y cols., 2000). Incluso algunos procesos de conservación como la deshidratación, también pueden incrementar el contenido en estas sustancias.

A la hora de considerar los resultados obtenidos, en el ámbito de la nutrición y las aportaciones con las que las setas pueden contribuir a mejorar el contenido en sustancias funcionales de la dieta, son importantes los hábitos de consumo ya que por lo general se ingieren estacionalmente, en pequeñas cantidades, normalmente como guarnición o como acompañamiento de otros alimentos por sus aromas y sabores que potencian y mejoran guisos y salsas.

Hay que resaltar que los valores obtenidos pueden variar en función de las zonas de recogida. Estos ejemplares pertenecen a Castilla y León que tiene unas características bioclimáticas específicas. La edad de los ejemplares es también otro factor a tener en cuenta. Estudios realizados indican que los ejemplares maduros tienen menor poder antioxidante (Barros y cols., 2007).

Otros compuestos importantes desde el punto de vista funcional son los  $\beta$ -glucanos, en particular los  $\beta$ -1,3-1,6-glucanos que son los responsables fundamentales de las actividades biológicas de los  $\beta$ -glucanos. Su determinación ha sido el objeto de la segunda parte de este estudio. Existen en la actualidad varios métodos para cuantificar el contenido total de  $\beta$ -1,3-1,6-glucanos (Rhee y cols., 2008; Manzi y cols., 2000).

Dada la importancia de estos polisacáridos de estructura terciaria ( $\beta$ -1,3-1,6-glucanos) por su contrastada acción inmuno-estimulante y antitumoral es importante establecer un método fiable, eficaz y económico para determinar el contenido en  $\beta$ -glucanos de las setas.

El método de Jörg Nitschke es un método directo, rápido y cuantitativo, ya que el Rojo Congo, sólo interactúa con la triple hélice de  $\beta$ -1,3-1,6-glucanos (Ogawa y cols., 1972; Ching-Feng y cols., 2007). Las condiciones de medida de este método han sido ajustadas en nuestro laboratorio utilizando como patrón una seta de cultivo *Pleurotus eryngii* que posee la peculiaridad de que prácticamente todo el  $\beta$ -glucano que contiene es  $\beta$ -1,3-1,6-glucano. Las condiciones de la reacción (Rojo Congo a 0,08%, tiempo de reacción 20 minutos, temperatura ambiente, medida a longitud de onda de 531nm) se han determinado para establecer tres rectas patrón, una por cada fracción extraída (KOH, HCL y NaOH).

---

La variación introducida en este método es el uso de *Pleurotus eryngii* como patrón para las medidas en lugar de esquizofilano puro (Nitschke y cols., 2011), que es un glucano muy caro y difícil de obtener con pureza suficiente. El resultado ha sido satisfactorio obteniéndose valores de contenidos en  $\beta$ -glucanos dentro de los rangos habituales (Manzi y cols., 2001; Pizzoferrato y cols., 2000).

El contenido en  $\beta$ -glucanos de triple hélice disminuye con el aumento de la temperatura por desnaturalización de las estructuras terciarias, este fenómeno parece ser en parte reversible, observándose un ligero aumento de las absorbancias sin llegar a producirse una recuperación del 100%, lo cual, podría estar relacionado con fenómenos de histéresis presentes en los complejos de tres hélices de los  $\beta$ -glucanos.

En cuanto al contenido de  $\beta$ -glucanos en las muestras de setas, destaca *Cantharellus lutescens* con un total del 11,72%, superior a otras setas como *Lentinus edodes* (9,57%) (Nitschke y cols., 2011). La alta cantidad de  $\beta$ -1,3-1,6-glucanos puede estar relacionado con una pared celular más sólida, dando lugar a cuerpos fructíferos compactos.

En las muestras de harina hay mayor contenido en  $\beta$ -glucanos que en las setas frescas, alrededor de un 20-36% más. El precio de las harinas de setas suele ser más económico comparado con el precio de la seta fresca equivalente. En base a los resultados que hemos obtenido, suponemos que se produce la mezcla de estas harinas de seta con harinas ricas en  $\beta$ -glucanos. Los cereales, y en concreto la avena, presentan un alto contenido en  $\beta$ -1,3-1,6-glucanos, por lo que nuestra hipótesis es muy plausible.

---

## **6. CONCLUSIONES.**

- 
1. De las especies estudiadas, el mayor contenido en humedad corresponde a *Hydnum rufescens* y a *Craterellus tubaeformis*. En cuanto al contenido en cenizas los mayores porcentajes corresponden a *Cantharellus cibarius* y *Craterellus cornucopioides*. Ello permite concluir que existe una relación inversa entre el contenido de agua y de minerales, al menos en las setas estudiadas.
  2. Las setas *Craterellus cornucopioides* y *Cantharellus tubaeformis* analizadas por el método de Folin – Ciocalteu, presentan un considerable contenido en fenoles totales, más del doble del contenido medio del resto de setas analizadas. El contenido en fenoles totales es ligeramente mayor en los extractos de sombrero.
  3. En cuanto a la capacidad antioxidante de las setas determinada por el método de CUPRAC, los resultados obtenidos evidencian la mayor capacidad (casi cinco veces más que la media) de las setas *Craterellus cornucopioides* y *Cantharellus tubaeformis*.
  4. La capacidad antirradicalaria de las setas determinada por el método DPPH, manifiesta similares resultados a los obtenidos por el método CUPRAC, con *Craterellus cornucopioides* y *Cantharellus tubaeformis* siempre por encima de la media.
  5. Existe correlación clara entre el contenido fenólico del extracto de hongos y sus actividades antioxidantes y antirradicalarias observadas en setas y harinas de setas.
  6. Las harinas de setas estudiadas presentan valores menores en cuanto a contenido de fenoles totales, capacidad antioxidante y capacidad antirradicalaria en un rango del diez por ciento a los de las setas para cada uno de éstos parámetros. Destacan igualmente las variedades *Craterellus cornucopioides* y *Cantharellus tubaeformis*.
  7. Todas las setas estudiadas muestran sensibilidad a la temperatura en cuanto al contenido en fenoles y actividades antioxidante y antirradicalaria. La temperatura

---

y tiempo de cocción son determinantes en el contenido de fenoles y la expresión de las actividades.

8. La aplicación de temperatura constante a 90°C durante un tiempo prolongado de 120 minutos afecta a las propiedades nutricionales de la muestra disminuyendo los fenoles totales y la capacidad antioxidante y antirradicalaria hasta casi un 60%.
9. El contenido de  $\beta$ -1,3-1,6-glucanos es destacable en la muestra de *Cantharellus lutescens* con un porcentaje total del 11,72%, siendo superior al de otras setas como *Lentinus edodes* con un 9,57%
10. El contenido en  $\beta$ -1,3-1,6-glucanos de las harinas de setas, es un 25% superior al de las setas frescas. Creemos que pudiera ser debido a la presencia de harinas de cereales, como por ejemplo la avena.
11. La temperatura afecta a la estructura tridimensional de los  $\beta$ -1,3-1,6-glucanos provocando un efecto de histéresis que daría cuenta de la pérdida de un 20% de la estructura tripe-helicoidal.

---

## **7. BIBLIOGRAFÍA.**

---

Aida, F., Shuhaimi, M., Yazid, M., Maaruf, G. (2009) Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20 (11-12), 567–5.

Aruoma, O.I. (2003) Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in food plants. *Mutation Research* 523–524, 9–20.

Alexopoulos, C.J., Mims C.W., Blackwell, M. (1996) *Introductory Mycology*. New York: John Wiley and Sons.

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Ozyürek, M., Celik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* (Basel, Switzerland), 12(7), 1496–1547.

Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., Santos-Buelga, C. (2009) Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 47(6), 1076–9.

Barros, L., Baptista, P., Correia, D.M., Morais, J.S., Ferreira, I.C.F.R., (2007) Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *J Agric Food Chem.*, 55, 4781–4788.

Bano, Z., Rajarathnam, S. (1998) Pleurotus mushrooms: Part II. Chemical composition, preservation and role on human food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 27, 87-158.

Girbés, T., Jiménez, P., Córdoba, D., Basterrechea, J., (2013) Capacidad antioxidante y antirradicalaria y nuevas lectinas SELblo y ebulina blo presentes en las inflorescencias del saúco enano (*Sambucus ebulus* L.), Universidad de Valladolid.

Bohn, J., Be Miller, J. (1995) (1,3)- $\beta$ -D-Glucans as Biological Response Modifiers: A Review of Structure -Functional Activity Relationships. *Polymer*, 28, 3-14.

Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K.V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91, 179–194.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 25–30.

Borchers, A.T., Keen, C.L., Gershwin, M.E., (2004). Mushrooms, tumors, and immunity: an update. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood), 229: 393–406.

Brown, G.D., Gordon, S., (2005). Immune recognition of fungal  $\beta$ -glucans. *Cellular Microbiology*, 7: 471–479.

Burton, G. W., Ingold, K. U. (1986). Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc. Chem. Res. American Chemical Society*, 19 (7), 194–201.

- 
- Calonge, F.D. (2011). *Hongos medicinales*. Madrid: Editorial Mundi-Prensa.
- Campos, J. Arregui, A. (2010). *Manual de buenas prácticas y Guía de Setas de Guadalajara*. Editorial: Diputación de Guadalajara.
- Capasso, Luigi. (1999) *Laxatives and the Ice Man*. *Lancet*, 353 (9156), 926.
- Carbonero, E. R., Gracher, A. H. P., Smiderle, F. R., Rosado, F. R., Sasaki, G. L., Gorin, P. a. J., Iacomini, M. (2006). A  $\beta$ -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus*. *Carbohydrate Polymers*, 66(2), 252–257.
- Cha, Y. J., Alam, N., Lee, J. S., Lee, K. R., Shim, M. J., Lee, M. W., Lee, T. S. (2012). Anticancer and Immunopotentiating Activities of Crude Polysaccharides from *Pleurotus nebrodensis* on Mouse Sarcoma 180. *Mycobiology*, 40(4), 236–43.
- Chang, S.T., Wasser, S.P. (2012) The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *International Journal Medical Mushrooms*, 14(2), 95-134.
- Chatterjee<sup>1</sup>, S., Biswas<sup>1</sup>, G., Kumar, S., Acharya<sup>1</sup>, K. (2011). Antineoplastic effect of mushrooms: a review. *AJCS Australian Journal of Crop Sciences* 5(7), 904-911.
- Chen, G., Ma, X., Liu, S., Liao, Y., Zhao, G. (2012). Isolation, purification and antioxidant activities of polysaccharides from *Grifola frondosa*. *Carbohydrate Polymers*, 89(1), 61–6.
- Chen, J., & Seviour, R. (2007). Medicinal importance of fungal beta-(1--3), (1-->6)-glucans. *Mycological Research*, 111, 635–52.
- Cheung, L. M., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 81(2), 249–255.
- Ching-Feng, M. (2007). Chemical Analysis of the Hyphal Wall of *Schizophyllum Commune*. *Carbohydrate Polymer*, 68(3), 502-510.
- Chihara, G., Hamuro, J., Yukiko Y. (1970). Fractionation and Purification of the Polysaccharides with Marked Antitumor Activity, especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, (an edible mushroom). *Cancer Research*, 30, 2776-2781.
- Chirinang, P., Intarapichet, K. (2009). Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*, *Science Asia*, 35, 326–331.
- Cho, E.J., Oh, J.Y., Chang, H.Y. and Yun, J.W. (2006) Production of exopolysaccharides by submerged mycelia culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. *Journal of Biotechnology*, 127, 129–140.

---

Clifford, A.J., Heid, M.K., Peerson, J.M., and Bills, N.D. (1991). Bioavailability of food folates and evaluation of food matrix effects with a rat bioassay. *Journal of Nutrition*, 121, 445-453.

Dabbour, I.R., Takruri, H.R. (2002). Protein Digestibility using Corrected Amino Acid Score method (PDCAAS) of four types of mushrooms grown in Jordan. *Plant Foods for Human Nutrition*, 57, 13-24.

Davey, M.W., Van Montagu, M., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I.J.J., Strain, J.J., Favell, D., Fletcher, J., 2000. Plant L-ascorbic: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 825-860.

De Diego Calonge, F. (1992) *Guía de hongos de la península Ibérica* (2ª. ed). León: Ed.Celaryan.

De Diego Calonge, F. (1990) *Setas (hongos) Guía Ilustrada*, Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

Deacon, J.W. (1990) *Introducción a la micología moderna*. México, D.F.: Ed. Limusa, p.350.

Da Silva, D.D., Rapior, S., Hyde, K.D., Bahkali, A.H. (2012) Medicinal mushrooms in prevention and control of diabetes mellitus. *Fungal Divers*, 56(1), 1-29.

Del Barrio Sanz, E., García Arribas, I., Moure Casas, A. M<sup>a</sup>., Hernández Miguel, L. A., Arribas Hernández, M<sup>a</sup>. L. (1995) *Plinio el Viejo, Historia Natural-Tomo XII-XVI*. Madrid: Biblioteca clásica Gredos.

Dikemann, Ch. (2005). Effects of Stage of Maturity and Cooking on the Chemical Composition of Select Mushroom Varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53 (4), 1130- 1138.

Diplock, T., Charleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *The British journal of nutrition*, 80, 77–112.

Edwards, J., (1984) *The Roman cookery of Apicius*. Vancouver: Hartley & Marks.

Evans, R., Hofmann, A., (2012) *Plantas de los dioses*. Editorial: Fondo de Cultura Económica.

Falch, B.H., Espevik, T., Ryan, L., Stokke, B.T., (2000). The cytokinestimulating activity of (1/3)-b-D-glucans is dependent on the triple helix conformation. *Carbohydrate Research*, 329, 587–596.

Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., & Abreu, R. M. V. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16(12), 1543–60.

---

Font Quer (1962); *Plantas Medicinales. El Dioscórides renovado*. Barcelona: Ediciones península 1999.

Gao, Y., Zhou, S., Chen, G. L., Dai, X., Ye, J. X., (2002) A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curr.: Fr.) P. Karst. Extract (Ganopoly) in patients with advanced cancer. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4, 207–14.

García, A., y Sánchez, J.A., (2009). *Setas de la Península Ibérica y de Europa*. Ed. Everest.

Gu, Y.H., Takagi, Y., Nakamura, T., Hasegawa, T., Suzuki, I., Oshima, M., Tawaraya, H., Niwano, Y., (2005). Enhancement of radioprotection and anti-tumor immunity by yeast-derived  $\beta$ -glucan in mice. *Journal of Medical Food*, 8, 154–158.

Guillamón, E., García-Lafuente, A., Lozano, M., D'arrigo, M., Rostagno, M., Villares, A., Martínez, J. (2010) Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, 81, 715-723.

González, J.A. (2002). *Hombres, dioses y hongos*. Editorial Edaf.

Gonzaga, N.M.P.S., Ricardo, F., (2005) Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei*. *Carbohydrate Polymers*, 60, 43–49.

Gómez Urrutia, J. (2009). *Boletín Micológico FAMCAL* N°4. Editorial: Federación de Asociaciones Micológicas de Castilla y León.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry Journal*, 219, 1-14.

Harada, T., Miura, N.N., Adachi, Y., Nakajima, M., Yadomae, T., Ohno, N., (2002) IFN-gamma induction by SCG, 1,3- $\beta$ -D-glucan from *Sparassis crispa*, in DBA/2 mice in vitro. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 22, 1227–1239.

Hawksworth, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 109, 1422-1432.

He, J., Zhang, A., Ru, Q., Dong, D., Sun, P., (2014). Structural Characterization of a Water-Soluble Polysaccharide from the Fruiting Bodies of *Agaricus bisporus*. *International Journal of Molecular Science*, 15(1), 787-797.

Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., (2007) A higher level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111 (5), 509–547.

Hossain, A., Radwan, F.F.Y., Doonan, B.P. (2012) A possible cross-talk between autophagy and apoptosis in generating an immune response in melanoma. *Apoptosis*, 17(10), 1066-78.

Hoffmann, J.M<sup>a</sup>, Fericgla, G., Samorini, A., Escotado, J., Ott, J., (1999) *Los Enteógenos y la Ciencia*. Barcelona: Editorial La liebre de Marzo.

---

Hong, F., Yan, J., Baran, J.T., Allendorf, D.J., Hansen, R.D., Ostroff G.R., Xing, .PX., Cheung, N.K., Ross, G.D., (2004) Mechanism by which orally administered b-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *Journal of Immunology*, 173, 797–806.

Iwashina T (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant Res.*, 113: 287-299.

Ishikawa, Y., Marimoto, K., Hamasaki, T. (1984) Flavoglucin, a metabolite of *Eurotium chavalieri*, its oxidation and synergism with tocopherol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61, 1864-1868.

Ito, K., Nakazato, H., Koike, A., Takagi, H., Saji, S., Baba, S., Mai, M., Sakamoto, J., Ohashi, Y., (2004). Long-term effect of 5-fluorouracil enhanced by intermittent administration of polysaccharide K after curative resection of colon cancer. A randomized controlled trial for 7-year follow-up. *International Journal of Colorectal Diseases*, 19, 157–164.

Jeff, I.B., Yuan, X., Sun, L., Kassim, R.M., Foday, A.D., Zhou, Y. (2012) Purification and in vitro anti-proliferative effect of novel neutral polysaccharides from *Lentinus edodes*. *International Journal of Biol. Macromolecules*, 52, 99–106.

Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, 113(1), 9–16.

Kalač, P. (2013). A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), 209–18.

Kalogeropoulos, N., Yanni, A. E., Koutrotsios, G., Aloupi, M. (2013). Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesbos, Greece. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 55, 378–85.

Kanagasabapathy, G., Kuppusamy, U. R., Abd Malek, S. N., Abdulla, M. A., Chua, K.-H., Sabaratnam, V. (2012). Glucan-rich polysaccharides from *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer prevents glucose intolerance, insulin resistance and inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 261.

Kanagasabapathy, G., Malek, S. N., Chua, K. H., Vikineswary, S., Kuppusamy, U. R. (2013). Beta-Glucan-Rich Extract from *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer Prevents Obesity and Oxidative Stress in C57BL/6J Mice Fed on a High-Fat Diet. *Complementary and Alternative Medicine*, Article ID: 185259.

Karacsonyi, S., Kuniak, L. (1994) Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: Isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble Beta-D Glucan. *Carbohydrate Polymers*, 24, 107-111

- 
- Kavishree, S., Hemavathy, J., Lokesh, B. R., Shashirekha, M. N., Rajarathnam, S. (2008) Fat and fatty acids of Indian edible mushrooms. *Food Chemistry*, 106 (2), 597-602.
- Ko, Y., Lin, Y. (2004). 1, 3-b-Glucan quantification by a fluorescence microassay and analysis of its distribution in foods. *Journal of agriculture and Food Chemistry*, 52, 3313–3318.
- Koyama, K., Imaizumi, T., Akiba, M., Kinoshita, K., Takahashi, L., Suzuki, A. (1997) Antinociceptive components of *Ganoderma lucidum*. *Planta Med.*, 63, 224-227.
- Kuo, M., (2007) *100 Edible Mushrooms*. University of Michigan Press.
- Kurashige, S., Akuzawa, Y., Endo, F. (1997). Effects of *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* administration on cancer outbreak, and activities of macrophages and lymphocytes in mice treated with a carcinogen, N-butyl-N butanol nitrosoamine. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 19, 175–183.
- Ladanyi, A., Timar, J., Lapis, K., (1993) Effect of lentinan on macrophage cytotoxicity against metastatic tumor cells. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 36, 123–126.
- La Roche, C., Michaud, P. (2007). New Developments and Prospective for  $\beta$  (1,3)-Glucans. *Rec. Patents Biotech.*, 1, 59-73.
- Lavi, I., Friesem, D., Geresh, S., Hadar, Y., Schwartz, B. (2006) An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. *Cancer Letters*, 244(1), 61–70.
- Leal, A. R., Barros, L., Barreira, J. C. M., Sousa, M. J., Martins, A., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Portuguese wild mushrooms at the “pharma–nutrition” interface: Nutritional characterization and antioxidant properties. *Food Research International*, 50(1), 1–9.
- Lelley, J.I. (1999) From edible to useful mushrooms, an attempt for the new economical assessment of large fungi. *Acta Microbiology Immunology Hungary* 46(2-3), 205-213.
- Li, J.-W., Ding, S.-D., Ding, X.-L. (2007) Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujube*. *Journal of Food Engineering*, 80, 176–183.
- Liu, Y.-T., Sun, J., Luo, Z.-Y., Rao, S.-Q., Su, Y.-J., Xu, R.-R., Yang, Y.-J. (2012). Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(5), 1238–44.
- Liu, R.H., (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 134, 3479–3485.

---

Lo, T.C., Jiang, Y.H., Chao, A.L., Chang, C.A. (2007). Use of statistical methods to find the polysaccharide structural characteristics and the relationships between monosaccharide composition ratio and macrophage stimulatory activity of regionally different strains of *Lentinula edodes*. *Anal Chim Acta*, 584(1), 50-56.

Longvah, T., Deosthale, Y.G. (1998) Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food Chemistry*, 63, 331-334.

Lucas, E.H., Byerrum, R.U., Clarke, D.A., Reilly, H.C., Stevens, J.A., Stock, C.C. (1959) Production of oncostatic principles in vivo and in vitro by species of genus *Calvatia*. *Antibiotic Annual*, 19, 493-496

Luo, Q., Sun, Q., Wu, L.S., Yang, Z.R. (2012) Structural characterization of an immunoregulatory polysaccharide from the fruiting bodies of *Lepista sordida*. *Carbohydrate Polymers*, 88, 820–824.

Maga, J.A. (1981). Mushroom flavor. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 29, 1-4.

Mayell, M., (2001). Maitake extracts and their therapeutic potential. *Alternative Medicine Review*, 6, 48–60.

Mandal, E.K., Maity, K., Maity, S., Gantait, S.K., Behera, B., Maiti, T.K., Sikdar, S.R., Islam, S.S. (2012). Chemical analysis of an immunostimulating (1→4)-(1→6)-branched glucan from an edible mushroom, *Calocybe indica*. *Carbohydrates Research*, 347, 172–177.

Manzi, P., Gambelli, L., Marcani, S., Vivanti, V., Pizzoferrato, L. (1999) Nutrients in edible mushrooms: An inter-species comparative study. *Food Chemistry*, 65, 477-482.

Manzi, P., Pizzoferrato, L. (2000). Beta-Glucans in Edible Mushrooms. *Food Chem.*, 68, 315-318.

Manzi, P. (2001). Nutritional Value of Mushrooms Widely consumed in Italy. *Food Chem.*, 78, 321-325.

Markova, N., Kussovski, V., Drandarska, I., Nikolaeva, S., Georgieva, N., Radoucheva, T., (2003) Protective activity of Lentinan in experimental tuberculosis. *International Immunopharmacology*, 3, 1557–1562.

Marcotullio, M. C. (2008). Sarcodon Mushroom Biologically Active Metabolites. University of Perugia Italy.

Mattila, P., Konko, K., Eurola, M., Pihlava, J. M., Astola, J., Vahteristo, L., (2001) Contents of vitamins, mineral elements, and phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2343–2348.

Mau, J. L., Chao, G. R., Wu, K. T. (2001). Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5461-5467.

---

Mehrotra, R.S., Aneja, K.R. (1990). *An introduction to mycology*. New age international publishers.

Mizuno, T. (1986). Fractionation and Characterization of Antitumor Polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*. *Agriculture Biology and Chemistry*, 50, 1679-1688.

Mizuno, T. (2001). Contents of Anti-tumor Polysaccharides in Certain Mushrooms and their Immunomodulating Activities. *Food Science. Tech. Research*, 7(1), 31-34.

Mondal, T., Some, R., Dutta, S., (2013). Studies on antioxidant and antimicrobial properties of some common mushrooms. *Journal of Today's Biological Sciences: Research y Review (JTBSRR)*, 2, 60-67

Moradali, M.-F., Mostafavi, H., Ghods, S., Hedjaroude, G.-A. (2007). Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *International Immunopharmacology*, 7(6), 701–24.

Müller-Karpe (1959). *Beiträge zur Chronologie der Urmenfelderzeit nördlich und südlich der Alpen*. Berlin: Römisch-Germanische Forschungen.

Munemoto, Y., Iida, Y., Abe, J., Saito, H., Fujisawa, K., Kasahara, Y., Mitsui, T., Asada, Y., Miura, S., (2002) Significance of postoperative adjuvant immunochemotherapy after curative resection of colorectal cancers: association between host or tumor factors and survival. *International Journal of Oncology*, 20, 403–411.

Grüter, A., Friederich, U., Würzler, F.E. (1990). Antimutagenic effects of mushrooms, *Mutation Research / Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 232, 243–249.

Nicandro C.; Touwaide, A. (1997), *Theriaka y Alexipharmaka*. Barcelona: M. Moleiro Editor.

Nicolosi, R., Bell, S.J., Bistran, B.R., Greenberg, I., Forse, R.A., Blackburn, G.L., (1999) Plasma lipid changes after supplementation with  $\beta$ -glucan fiber from yeast. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 208–212.

Nie, S.-P., Xie, M.-Y. (2011) A review on the isolation and structure of tea polysaccharides and their bioactivities. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 144–149.

Nitschke, J.; Modick, H.; Busch, E.; Rekowski, R.; Altenbach, H.-J.; Mölleken, H. (2011) A new colorimetric method to quantify B-1,3-1,6-glucans in comparison with total B-1,3-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 127, 791-796

Novak, M., Vervicai, V. (2008) Beta-Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. *J. Immunotox.*, 51(1), 47-57.

Oksana, S., Marian, B., Mahendra, R., Bo, S.H. (2012) Plant phenolic compounds for food, pharmaceutical and cosmetics production. *J Med Plants Res.*, 6(13), 2526-2539.

---

Ogawa, K. (1972) Complex of gel-forming  $\beta$ -1,3-d-glucan with congored in alkaline solution. *Chemistry Letters*, 1(8), 689-692.

Ogawa, K., Tsurugi, J., Watanabe, (2012) T. Complex of gel-forming  $\beta$ -1,3-d-glucan with congored in alkaline solution. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 58, 438-441.

Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'Arrigo, M., Rostagno, M., Martínez, J., Villares, A. (2011) Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128(3), 674–678.

Park, Y. (2003). Determination of  $\beta$ -Glucan Concentration in *Agaricus blazei* Murill mushroom by an enzymic method. *Food Science and Technology (Campinas)*, 23(3), 312-316.

Pizzoferrato, L. (2000). Betaglucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 68, 315-318.

Poinar, G., Buckley, R. (2007) Evidence of mycoparasitism and hypermycoparasitism in Early Cretaceous amber. *Mycological Research*, 111, 503 – 506.

Puharich, A. (1959) *The Sacred Mushroom: Key to the Door of eternity*. Editorial: Gollancz.

Puttaraju, N. G., Venkateshaiah, S. U., Dharmesh, S. M., Urs, S. M. N., Somasundaram, R. (2006). Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9764–72.

Ramkumar, L., Ramanathan, T., Thirunavukkarasu, P., Arivuselvan, N. (2010) Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Nine Edible Mushrooms Extract. *International Journal of Pharmacology*, 6, 950-953.

Reis, F.S., Martins, A., Barros, L., Ferreira, I. (2012) Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between in vivo and in vitro samples. *Food and Chemical Toxicology*, 50,1201-1207.

Ren, L., Perera, C., Hemar, Y. (2012) Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. *Glycoconj J.*, 29(5-6), 365-77.

Reshetnikov, S.V., Wasser, S.P., Tan, K.K. (2001) Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. *International Journal of Medical Mushrooms*, 3, 361–394.

Ribeiroa, B., Lopesa, R., Andradea, P. B. (2008) Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. *Food Chemistry*, 110, 47–56.

---

Rhee, S. (2008) A Comparative Study of Analytical Methods for Alkali-soluble  $\beta$ -Glucan in Medicinal Mushroom, Chaga (*Inonotus obliquus*). *Food Sci. Tech.*, 41(3), 545-549.

Robaszkiewicz, A., Bartosz, G., Lawrynowicz, M., Soszyński, M. (2010). The Role of polyphenols,  $\beta$ -carotene, and lycopene in the antioxidative action of the extracts of dried, edible mushrooms. *Journal of nutrition and metabolism*, 173274.

Roupas, P., Keogh, J., Noakes, M., Margetts, C., Taylor, P. (2012). The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 687–709.

Rout, D., Mondal, S., Chakraborty, I., Pramanik, M., Islam, S., (2005). Chemical analysis of a new (1 $\rightarrow$ 3)-, (1 $\rightarrow$ 6)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida*. *Carbohydrate research*, 340 (16), 2533-2539.

Sakamoto, J., Morita, S., Oba, K., Matsui, T., Kobayashi, M., Nakazato, H., Ohashi, Y., (2006). Efficacy of adjuvant immunochemotherapy with polysaccharide K for patients with curatively resected colorectal cancer: a meta-analysis of centrally randomized controlled clinical trials. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 55, 404–411.

Samorini, G. (2001) *Los alucinogenos en el mito. Relatos sobre el origen de las plantas psicoactivas*. Barcelona: La Liebre de Marzo.

Satitmanwiwat, S., Ratanakhanokchai, K., Laohakunjit, N., Chao, L.K., Chen, S.T., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Kyu, K.L. (2011) Improved purity and immunostimulatory activity of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-glucan from *Pleurotus sajor-caju* using cell wall-degrading enzymes. *Int J Med Mushrooms*, 13(4), 319-26.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Révész, C., Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287–306.

Shamtsyan, M., Konusova, V., Maksimova, Y., Goloshchev, A., Panchenko, A., Simbirtsev, A., Denisova, N. (2004). Immunomodulating and anti-tumor action of extracts of several mushrooms. *Journal of Biotechnology*, 113(1-3), 77–83.

Singdevsachan, S. K., Patra, J. K., & Thatoi, H. (2013). Nutritional and bioactive potential of two wild edible mushrooms (*Lentinus sajor-caju* and *Lentinus torulosus*) from Similipal Biosphere Reserve, India. *Food Science and Biotechnology*, 22(1), 137–145.

Singleton, V.L; Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16 (3), 144-158.

Soares, A.A., Sá-Nakanishi, A.B., Bracht, A., Costa, S.M.G., Koehnlein, E.A., Souza, C.G.M., Peralta, R.M. (2013) Hepatoprotective effects of mushrooms. *Molecules*, 18, 7609–7630.

---

Smiderle, F.R., Carbonero, E.R., Mellinger, C.G., Sasaki, G.L., Gorin, P.A., Iacomini, M. (2003). Structural characterization of a polysaccharide and a  $\beta$ -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Phytochemistry*, 67, 2189–2196.

Smith, J.E., Rowan, Sullivan, (2002). Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. University of Strathclyde, Glasgow.

Sugahara, T., Arai, S., Aoyagi, Y., Kunisaki, N. (1975) Contents of 5'- nucleotides and free amino acids in different varieties of dried shiitake mushroom (*Lentinus edodes* Sing.) *J. JPN. Soc. Food. Sci.*, 28, 477-483.

Strong, K., Mathers, C., Leeder, S., Beaglehole, R., (2005) Preventing chronic diseases: how many lives can we save? *Lancet*, 366, 1578–1582.

Synytsya, A. (2008) Mushrooms of Genus *Pleurotus* as a Source of Dietary Fibres and Glucans for Food Supplements. *Czech. J. Food Sci.*, 26(6), 441-446.

Takazawa, H., Tajima, F., Miyashita, C. (1982) An antifungal compound from shiitake (*Lentinus edodes*). *Yakugaku Zasshi*, 102, 489-491.

Taylor, P.R., Tsoni, S.V., Willment, J.A., Dennehy, K.M., Rosas, M., Findon, H., Haynes, K., Steele, C., Botto, M., Gordon, S., Brown, G.D., (2007) Dectin-1 is required for b-glucan recognition and control of fungal infection. *Nature Immunology*, 8, 31–38.

Tudela, J. (1952) Fray Bernardino de Sahagún, *Diccionario de Historia de España. Revista de Occidente: Madrid*, 1952; Tomo II, p. 1091-2.

Ukawa, Y., It, H., Hisamatsu, M. (2000). Antitumor effects of (1→3) - $\beta$ -D-glucan and (1→6)- $\beta$ -D-glucan purified from newly cultivated mushroom, Hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.) *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(1), 98–104.

Vamanu, E., Nita, S. (2013). Antioxidant capacity and the correlation with major phenolic compounds, anthocyanin, and tocopherol content in various extracts from the wild edible *Boletus edulis* mushroom. *BioMed Research International*. Article ID 313905.

Vetvicka, V.; Yvin, J.-C. (2004) Effects of marine  $\beta$ -1,3 glucan on immune reactions. *Int. Immunopharmacol*, 4, 721–730.

Villares, A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., Mateo-Vivaracho, L. (2013) Separation and characterization of the structural features of macromolecular carbohydrates from wild edible mushrooms. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2(1), 15–21.

Wang, S. Y., Zheng, W. (2001). Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4977–4982.

Wasson, R.G. (1957). *En busca de los hongos mágicos*. Revista Life en Español. 3 de Junio de 1957.

---

Wasser, S.P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, 258–274.

Yang, L., Zhang, L.-M. (2009). Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers*, 76(3), 349–361.

Yang, J.H., Lin, H.C., Mau, J.L. (2002) Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chem.*, 77, 229-235.

Yen, G.-C., Hung, C.-Y. (2000) Effects of alkaline and heat treatment on antioxidative activity and total phenolics of extracts from Hsian-tsoa (*Mesona procumbens* Hemsl.). *Food Res. Int.*, 33, 487-492.

Zeng, X., Suwandi, J., Fuller, J., Doronila, A. (2012). Antioxidant capacity and mineral contents of edible wild Australian mushrooms. *Food Science and Technology International*, 18(4), 367–79.

Zhao, L., Dong, Y., Chen, G., Hu, H. (2010). Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydr Polym.*, 80(3), 783–9.

Zhang, M., Cui, S. W., Cheung, P. C. K., Wang, Q. (2007) Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, 18(1), 4–19.

Zhang, Y., Gu, M., Wang, K.P., Chen, Z.X., Dai, L.Q., Liu, J.Y., Zeng, F. (2010) Structure, chain conformation and antitumor activity of a novel polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Fitoterapia*, 81, 1163–1170.

Zhang, Y., Li, S., Wang, X., Zhang, L., Cheung, P. C. K. (2013). Advances in lentinan: isolation, structure, chain conformation and bioactivities, *Food Hydrocolloids*, 25(2), 196–206.

Zhang, Y., Kong, H., Fang, Y., Nishinari, K., Phillips, G.O. (2013) Schizophyllan: A review on its structure, properties, bioactivities and recent developments. *Bioact Carbohydrates Diet Fibre*, 1(1), 53-71.