
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA
SEC. DEPARTAMENTAL DE CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN



**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BIOACTIVAS
DE HONGOS COMESTIBLES PARA EL DISEÑO
DE PRODUCTOS CÁRNICOS FUNCIONALES**

ANA CRISTINA RAMÍREZ ANGUIANO

TESIS DOCTORAL

Madrid, Mayo 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA
SEC. DEPARTAMENTAL DE CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BIOACTIVAS
DE HONGOS COMESTIBLES PARA EL DISEÑO
DE PRODUCTOS CÁRNICOS FUNCIONALES**

Memoria presentada por:

ANA CRISTINA RAMÍREZ ANGUIANO

Para optar al grado de:

DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dra. Cristina Soler Rivas

Dra. Susana Santoyo Díez

(Universidad Autónoma de Madrid)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría dar las gracias a la Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación por haberme brindado la oportunidad de realizar los estudios de doctorado y sobre todo a su Director Guillermo Reglero Rada por su atención y disponibilidad en todo momento.

Quiero agradecerles de manera muy especial a mis directoras Dra. Cristina Soler Rivas y la Dra. Susana Santoyo Díez por su gran esfuerzo, apoyo y dedicación en la dirección y elaboración de esta tesis. Pero sobre todo por la gran paciencia que me han tenido y por todo lo que me han enseñado.

De manera muy especial quiero agradecer también al Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías de la Universidad de Guadalajara por todo el apoyo que me han brindado otorgándome la beca, ayudándome a alcanzar una más de mis metas.

También quiero expresar mi agradecimiento a mis compañeros de laboratorio que aun siguen ahí o que ya se han ido Sergio, Luz, Bea, Dany, Guzmán, Juan Antonio, José Mendiola, José Macías, Ana Toré por su ayuda y amistad que me han brindado y por hacer un ambiente agradable de trabajo en el laboratorio, ha sido un verdadero placer el haber convivido con ustedes.

Quiero darles las gracias a mis más grandes amigas Faby, Carmen y Fátima por su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos durante esta etapa de mi vida como en todas las anteriores a pesar de la distancia. Pero especialmente a ti Faby por tanto apoyo que me has dado para la realización de esta tesis y por haberme enseñado a ver la vida de otra manera, siempre con una sonrisa y también por hacerme ver que “la vida es una canción” y recuerda “eres malo no. 9”.

Y por supuesto esta tesis se la dedico a mis padres, a mi hermana y a mamá por todo su apoyo incondicional, su cariño y ánimos para seguir adelante.

*La vida no es una carrera, sino un viaje que debe ser disfrutado a cada paso.
Nada termina hasta que uno deja de intentarlo.*

Anónimo.

*Porque veo al final de mi rudo camino que yo fui el
arquitecto de mi propio destino.*

Amado Nervo.

Índice

Abreviaturas	9
Resumen	13
Summary	14
1. Introducción	15
1.1. Los hongos comestibles	20
1.1.1. Interés económico.....	21
1.1.2. Hongos cultivados y silvestres	24
1.1.3. Interés nutricional.....	26
1.1.3.2. <i>Proteínas</i>	28
1.1.3.3. <i>Lípidos</i>	30
1.1.3.5. <i>Componentes minoritarios</i>	35
1.1.3.6. <i>Flavonoides?</i>	37
1.1.4. Enzimas oxidativas de los hongos.....	38
1.2. Los hongos como alimentos funcionales	44
1.2.1. Propiedades antioxidantes	50
1.2.2. Propiedades antimicrobianas	59
1.2.3. Propiedades antivirales.....	61
1.2.4. Propiedades inmunomodulatorias y antitumorales.....	63
1.2.5. Propiedades reductoras del nivel de colesterol.....	65
1.3. Ingredientes con capacidad antioxidante para la formulación de alimentos funcionales.....	66
1.3.1. Radicales libres, oxidación y antioxidantes.....	67
1.3.2. Métodos para la determinación de la actividad antioxidante	69
1.3.2.1. <i>Método del Oxígeno Activo (AOM)</i>	69
1.3.2.2. <i>Ensayo FRAP (poder antioxidante reductor de hierro)</i>	69
1.3.2.3. <i>Métodos basados en sustrato oxidable β-ficoeritrina (β-PE)</i>	70
1.3.2.4. <i>Método del blanqueamiento del β-caroteno</i>	71
1.3.2.5. <i>Método de inhibición de la formación de hidroperóxidos lipídicos</i>	72
1.3.2.6. <i>Método detiobarbitúrico (TBARS)</i>	74
1.3.2.7. <i>TEAC (Actividad antioxidante en equivalentes de trolox)</i>	74
1.3.2.8. <i>Capacidad secuestradora de radicales (ensayo del DPPH)</i>	75
1.3.3. Efecto de la dieta en el estado antioxidante.....	76

2. Objetivos.....	87
3. Materiales y métodos.....	91
3.1 Hongos comestibles.....	93
3.2 Medida de la actividad antioxidante.....	94
3.2.1. Obtención de los extractos.....	94
3.2.2. Método del ABTS ^{•+}	95
3.2.3. Método del DPPH [•]	97
3.2.4. Método para la determinación de la capacidad inhibitoria de la peroxidación lipídica.....	98
3.3 Análisis de compuestos con capacidad antioxidante.....	99
3.3.1. Cromatografía en capa fina (TLC).....	99
3.3.2. Ergosterol.....	100
3.3.3. Tocoferoles.....	101
3.3.4. Proteínas y péptidos.....	101
3.3.5. Fenoles totales.....	102
3.3.6. Ergotioneína.....	103
3.4. Medida de las actividades de las enzimas oxidativas.....	103
3.4.1. Medida de la actividad enzimática de las polifenol oxidasas.....	104
3.4.2. Medida de la actividad enzimática de las peroxidasas.....	107
3.5. Determinación de la actividad antimicrobiana.....	109
3.5.1. Preparación de muestras para análisis.....	109
3.5.2. Microorganismos y medios de cultivo.....	109
3.5.3. Cálculo del número de unidades formadoras de colonias.....	109
3.5.4. Cálculo de las concentraciones inhibitorias mínimas y de las concentraciones bactericidas y fungicidas mínimas.....	110
3.6. Medida de la actividad antiviral.....	111
3.6.1. Ensayos de toxicidad.....	111
3.6.2. Evaluación de la actividad antiviral.....	112
3.6.3. Determinación de polisacáridos.....	114
3.7. Tratamiento culinario de hongos.....	115
3.7.1. Determinación de la capacidad antioxidante.....	116
3.8. Medida de la biodisponibilidad de los compuestos antioxidantes presentes en los hongos.....	116
3.8.1. Digestión <i>in vitro</i>	116

3.8.2. Medida de la absorción intestinal <i>in vitro</i>	118
3.8.3. Medida de la capacidad antioxidante de las fracciones resultantes de la digestión y del ensayo de absorción	123
3.8.4. Determinación de los compuestos responsables de la capacidad antioxidante después de la digestión	124
3.9. Diseño de un alimento funcional a base de hongos I: paté de hígado	124
3.9.1. Elaboración de los patés	124
3.9.2. Determinación de la capacidad antioxidante	125
3.9.3. Determinación de los niveles de oxidación lipídica	126
3.10. Diseño de un alimento funcional a base de hongos II: croquetas de pollo	126
3.10.1. Elaboración y fritura de las croquetas	126
3.10.2. Digestión y absorción <i>in vitro</i>	127
3.10.3. Determinación de la actividad antioxidante	128
4. Resultados y discusión	129
4.1. Los hongos como alimentos funcionales	131
4.1.1 Actividad antioxidante.....	131
4.1.1.1 Preparación de muestras.....	131
4.1.1.2 Medida de la actividad antioxidante	135
4.1.1.3. Análisis químico de los extractos metanólicos y acuosos	146
4.1.1.4. Actividad de enzimas oxidativas.....	162
4.1.2 Actividad antimicrobiana	164
4.1.2.1. Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos.....	165
4.1.2.2. Actividad antimicrobiana de los extractos acuosos	166
4.1.2.3. Actividad antimicrobiana de los extractos acuosos en presencia de compuestos inhibidores de las enzimas oxidativas	167
4.1.2.4. Influencia de las enzimas oxidativas: peroxidasas y polifenol oxidasas	170
4.1.3. Actividad antiviral	174
4.1.3.1. Ensayos de toxicidad	174
4.1.3.2. Evaluación de la actividad antiviral	177
4.1.3.3. Actividad antiviral de la fracción rica en polisacáridos.....	183
4.2. Procesado culinario, digestión y biodisponibilidad de los compuestos antioxidantes presentes en hongos	187
4.2.1 Procesado culinario	188
4.2.2 Digestión <i>in vitro</i> de hongos sometidos a cocción en seco	194

4.2.3 Biodisponibilidad in vitro de compuestos con capacidad antioxidante.....	199
4.3. Alimentos funcionales elaborados con Boletus edulis como ingrediente antioxidante.....	203
4.3.1 Paté de hígado de cerdo.....	203
4.3.1.1. Efecto del procesado en la capacidad antioxidante.....	204
4.3.1.2. Elaboración de un paté funcional con B. edulis.....	206
4.3.1.3. Adición de extractos antioxidantes obtenidos de B. edulis al paté.....	208
4.3.1.4. Efecto del almacenamiento en la oxidación lipídica y en la capacidad antioxidante de los patés.....	210
4.3.2 Croquetas de pollo.....	213
4.3.2.1. Efecto sobre la capacidad antioxidante de la fritura de las croquetas con diferentes aceites.....	214
4.3.2.2. Efecto de la digestión in vitro.....	216
4.3.2.3. Biodisponibilidad in vitro en células Caco2.....	220
5. Conclusiones.....	223
6. Bibliografía.....	229
Anexo I. Publicaciones a las que ha dado lugar esta tesis.....	243

Abreviaturas

AB: *Agaricus bisporus*.

Abs: Absorbancia.

ABTS: 2,2'-azinobis(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato).

AC: *Amanita caesarea*

ALP: Actividad de la fosfatasa alcalina

AOAC: Asociación Oficial de Químicos Analíticos

AOM: Método del Oxígeno Activo.

ASC: Ácido ascórbico.

ATCC: Colección Americana de cultivos tipo.

AUC: Área por debajo de la curva de disminución de la fluorescencia.

BC: Polvo de *B. edulis* completo.

BE: *Boletus edulis*.

BHA: Butil-hidroxianisol.

BHT: butil-hidroxitolueno.

BMF: Fracción de extracto seco de compuestos solubles en metanol obtenidos de *B. edulis*.

β-PE: β-ficoeritrina.

BSA: Albúmina de suero bovino.

BWF: Fracción de extracto liofilizado que contiene compuestos hidrosolubles obtenido por deshidratación de una extracción acuosa procedente del *B. edulis*.

Caco-2: Células procedentes de adenocarcinoma de colon humano.

CC: *Cantharellus cibarius*

CC₅₀: Concentración necesaria para reducir al 50% el número de células viables.

DAA: Ácido 6-deoxiascórbito glucosilado.

DHR-123: Dihidrorodamina.

DHT: Dihidrotestosterona.

DMAB: 3-(dimetilamino) ácido benzoico.

DMEM: Medio Dubelcco's Modified Eagle's.

DMF: N,N-Dimetilformamida.

DNA: Ácido desoxiribonucleico.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo hidrato.

EAA: Ácido eritroascórbico glucosilado.

EC₂₅: Cantidad de antioxidante necesario para reducir una cuarta parte de la concentración inicial de DPPH• o bien como el porcentaje de DPPH• captado por el antioxidante.

EC₅₀: Cantidad de antioxidante necesario para reducir la concentración inicial de DPPH• a la mitad o bien como el porcentaje de DPPH• captado por el antioxidante.

EDTA: Etilendiamina ácido tetracético.

ERG: Ergosterol.

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno.

ERT: Ergotioneína.

FB: Fracción potencialmente bioaccesible.

FBS: Suero bovino fetal.

FRAP: Poder antioxidante reductor de hierro.

FUFOSE: Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa.

GC: Cromatografía de gases.

GDHB: γ -L(+)-glutaminil-3,4-dihidroxibenceno.

GHB: γ -L(+)-glutaminil-4-hidroxibenceno.

GRD: Glutación reductasa

GSH-PX: Glutación peroxidasa.

GST: Glutación s-transferasa

HIV: Virus de inmunodeficiencia humana.

HMG-CoA reductasa: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa.

HMW: Alto peso molecular.

HORAC: Capacidad de evitar la formación de radicales hidróxilo (Hydroxyl radical averting capacity).

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

HSV-1: Virus del herpes simplex tipo 1.

IC₅₀: Concentración necesaria del extracto para reducir el número de placas formadas en un 50% frente a un control.

IFCC: Federación Internacional de Química Clínica (International Federation of Clinical Chemistry).

IP: Tiempo de inducción.

Lac: Lacasas.

LD: *L. deliciosus*.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad.

L-Dopa: L-3,4-dihidroxifenilalanina.

LE: *Lentinus edodes*.

LEM: Complejo polisacárido-proteína del micelio de *L. edodes*.

LiP: Peroxidasas independientes de manganeso o peroxidasas de lignina.

LMW: Bajo peso molecular.

MBC: Concentración bactericida mínima.

MBTH: 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona.

MDA: Malondialdehído.

MEM: Medio mínimo esencial con sales de Earl.

MFC: Concentración fungicida mínima.

MIC: Concentración inhibitoria mínima.

MnP: Peroxidasas dependientes de manganeso.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide.

NK células: Células natural killer.

NORAC: Capacidad de evitar la formación de radicales peroxinitrito (Peroxynitrite radical averting capacity).

NPS: Polisacárido no derivado del almidón del *Pleurotus tuber-regium*.

ORAC: Capacidad de absorción de radicales oxígeno.

PBS: Tampón salino fosfato pH 7,2.

Pf: Factor de protección.

pf: peso fresco.

PL: *Pleurotus ostreatus*.

p-NPP: p-nitrofenil fosfato.

POD: Peroxidasas.

PPO: Polifenol oxidasas.

ps: peso seco.

PSK: Polisacárido-K, un complejo polisacárido-proteína soluble en agua del micelio de *Trametes versicolor*.

PSP: Polisacárido-péptido del micelio de *Trametes versicolor*.

Rf: Factor de retención.

scFOS: Fructooligosacáridos.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

SFE: Extracción con fluidos supercríticos.

SI: Índice de selectividad.

SIN-1: Hidrocloruro de 3-morfolinosidnonimina.

SOD: Superóxido dismutasa.

SORAC: Capacidad de evitar la formación de radicales superóxido (Superoxide radical averting capacity).

TBA: Ácido tiobarbitúrico.

TBARS: Ensayo del tiobarbitúrico.

TBHQ: *terc*-butil-hidroquinona.

TCA: Ácido tricloroacético

TEAC: Actividad antioxidante en equivalentes de trolox.

TEER: Potencial transmembrana.

TEP: 1,1,3,3, tetraethoxypropano.

TLC: Cromatografía en capa fina.

TOC: Tocoferol.

TP: Peroxidasa total.

TPTZ: Tripiridiltriazina.

TRAP: Parámetro de captura total de radicales.

Tyr^{asa}: Tirosinasa.

ufc: Unidad formadora de colonias.

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United States Department of Agriculture).

UV-vis: Ultravioleta/visible.

WSPG: Complejo proteína-(1→6)-β-D-glucano hidrosoluble.

Resumen

En esta Memoria se presentan los resultados más relevantes obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral, en la que se ha estudiado la obtención y la caracterización de compuestos bioactivos a partir de diversos hongos comestibles para el diseño de productos cárnicos funcionales. El trabajo llevado a cabo se ha centrado en siete especies de hongos comestibles silvestres y cultivados, *Cantharellus cibarius* (cantarelas), *Lactarius deliciosus* (níscalos), *Lentinus edodes* (shiitakes), *Pleurotus ostreatus* (setas pleurotas), *Boletus edulis* (boletos), *Agaricus bisporus* (champiñones) y *Amanita caesarea* (amanitas). Se resumen a continuación los aspectos más destacados de este trabajo.

Se llevó a cabo el desarrollo de metodologías de preparación de extractos para la obtención de las fracciones bioactivas mediante la utilización de disolventes de distinta naturaleza. Para la caracterización funcional, se realizó una evaluación de la actividad antioxidante empleándose los métodos de captación de radicales DPPH[•] y ABTS^{•+} y la medida de la capacidad inhibitoria de la oxidación lipídica, así como la medida de su potencial actividad antimicrobiana frente a varios tipos de microorganismos y la actividad antiviral de los hongos seleccionados frente al virus del herpes simple tipo 1, estudiándose también el efecto de las enzimas oxidativas (peroxidasas y polifenol oxidasas) presentes en estos hongos sobre dichas actividades dando como resultado que en los extractos acuosos son las responsables de la reducción de su actividad antioxidante.

Para la caracterización química de los extractos bioactivos de los hongos, se ha llevado a cabo un análisis cuantitativo de los compuestos más relevantes por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases (CG), cromatografía en capa fina (TLC) y métodos espectrofotométricos.

Por último, se realizó el estudio del efecto del procesado culinario, digestión y absorción *in vitro* en la capacidad antioxidante de los hongos comestibles. Así como también, en los alimentos cárnicos funcionales elaborados (paté de hígado de cerdo y croquetas de pollo) con *Boletus edulis* como ingrediente con capacidad antioxidante.

Summary

This memory includes the most relevant results obtained after carrying out the experimental works designed for this PhD Thesis. It describes the extraction and characterization of bioactive compounds obtained from several edible mushrooms to design meat-based functional foods. The work was focused on seven wild and cultivated mushrooms: *Cantharellus cibarius* (cantharelle), *Lactarius deliciosus* (red pine mushroom), *Lentinus edodes* (shiitake), *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom), *Boletus edulis* (king bolete), *Agaricus bisporus* (button mushroom) and *Amanita caesarea* (caesar's mushroom). The main highlines of this work are summarized below.

Specific methods were developed to prepare extracts containing the major bioactive fractions using solvents of different nature. Several functional properties were evaluated such as their antioxidant activities, particularly their DPPH[•] and ABTS^{•+} scavenging capacities and their ability to inhibit lipid oxidation, as well as their antimicrobial activities against several microorganisms' types and their antiviral activity against herpes simplex type 1. The influence of the mushroom oxidative enzymes (peroxidases and polyphenol oxidases) on the above mentioned activities was studied since they induced a significant reduction of the antioxidant and antimicrobial activities observed in the water extracts of several mushroom species.

The type of compounds mainly responsible for the observed activities were identified and quantified using high-performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC), thin layer chromatography (TLC) and spectrophotometric methods.

The effect of culinary processing, *in vitro* digestion and absorption was studied on the antioxidant capacities of three edible mushrooms. The antioxidant properties of meat-based functional foods (pork liver pâté and chicken croquettes) including *Boletus edulis* as bioactive supplement were also investigated.

1. Introducción

Los hongos son organismos unicelulares o pluricelulares que presentan características intermedias entre los animales y vegetales. Su nutrición es heterótrofa, es decir, no realizan la fotosíntesis. Al igual que en los animales, su reserva energética es el glucógeno. Sus células, salvo en los grupos inferiores, no suelen estar desnudas, sino recubiertas por una membrana que frecuentemente está constituida por un polisacárido, la quitina (N-acetil-D-glucosamina). Estas células se agrupan en talos filamentosos llamados hifas (figura 1), cuyo conjunto constituye el micelio, que penetra en el sustrato.

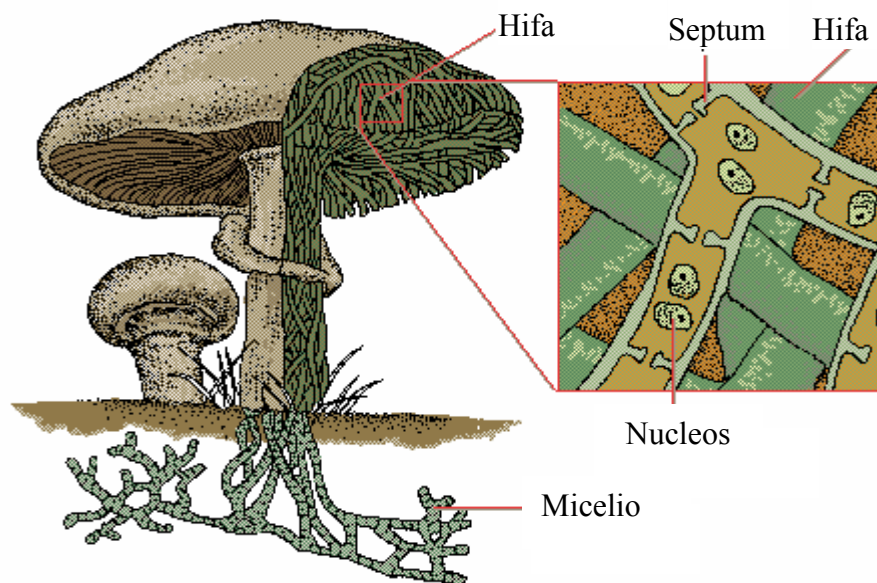


Figura 1. Esquema de la agrupación de las hifas fúngicas para formar el micelio que crece dentro de la tierra o del sustrato y del cuerpo fructífero de tamaño macroscópico.

La reproducción puede ser sexual (por conjugación de hifas de sexos opuestos) o asexual (por medio de esporas). También pueden multiplicarse por descomposición del micelio en células aisladas denominadas conidios.

Los hongos se clasifican en las divisiones *Oomicetes*, *Quitridiomycetes*, *Zigomicetes*, *Ascomycetes* y *Basidiomycetes*, de las cuales los basidiomycetes son los hongos más evolucionados. La denominación basidiomycetes se refiere a que poseen unos basidios en el extremo de las hifas, donde se forman las esporas de origen sexual, siendo ésta la forma usual de reproducción, la reproducción asexual se da en basidiomycetes menos evolucionados (figura 2). Su forma de desarrollarse varía según se trate de hongos

parásitos o saprófitos, en general los basidiomicetes comestibles suelen ser saprófitos y crecen sobre materias orgánicas o suelos ricos en humus (Strasburger y col., 1986).

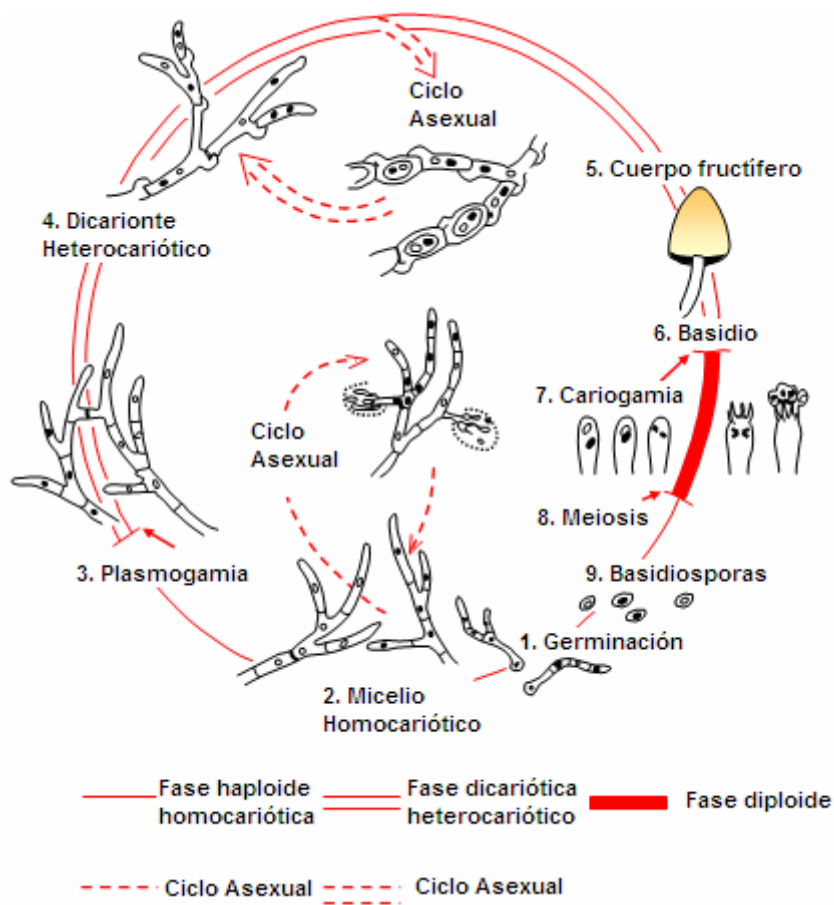


Figura 2. Ciclo reproductivo de los hongos basidiomicetes.

Existen aproximadamente 12.000 especies de hongos que producen cuerpos fructíferos, de los cuales solamente unos pocos han sido parcialmente estudiados y muchos menos son consumidos habitualmente o utilizados en la industria alimentaria o farmacéutica. La mayoría de los hongos comestibles pertenecen a esta clase *Basidiomicetes*, y en realidad, la parte que se recolecta y se come es el cuerpo fructífero, de tamaño macroscópico, al que se suele denominar comúnmente como “seta”.

El cuerpo fructífero de los basidiomicetes tiene una forma muy característica (figura 3) y consta de lo que se denomina como sombrero y pie. La parte exterior superior del sombrero está recubierta por la cutícula y la parte más interna abierta hacia abajo, hacia la tierra, contiene las laminillas formadas por millones de basidios microscópicos donde se producen las basidiosporas. En algunas especies como en los Boletales, el himenio o

conjunto de laminillas, no se encuentra formado por láminas sino que presenta una estructura porosa que recuerda a una esponja o panal de abejas. En el pie del cuerpo fructífero se puede distinguir lo que se llama anillo o velo y que en realidad son los restos de la cutícula que mantenía al himenio cerrado y protegido durante su desarrollo y que se rompe cuando las esporas están maduras y listas para su dispersión (estados 6 y 7) (figura 4). En la base del pie de algunas especies se puede distinguir la volva que se forma sólo en algunas especies y que, en realidad, es una estructura de protección temporal durante el desarrollo del cuerpo fructífero (estados inmaduros 1-3) de donde surge éste y que comunica directamente con el micelio (figura 4).

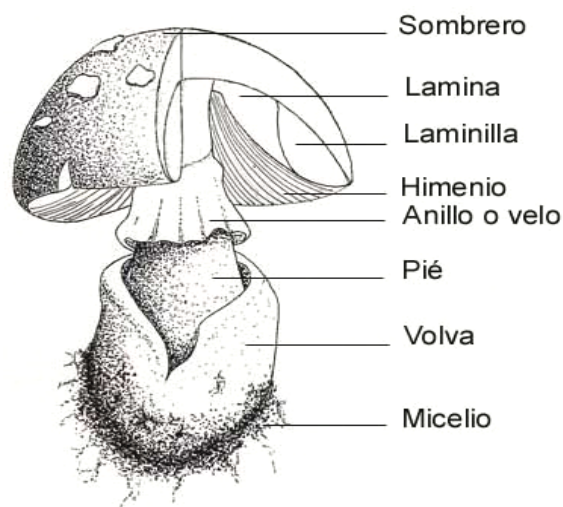


Figura 3. Principales partes del cuerpo fructífero de un basidiomicete común en estado avanzado de su madurez.

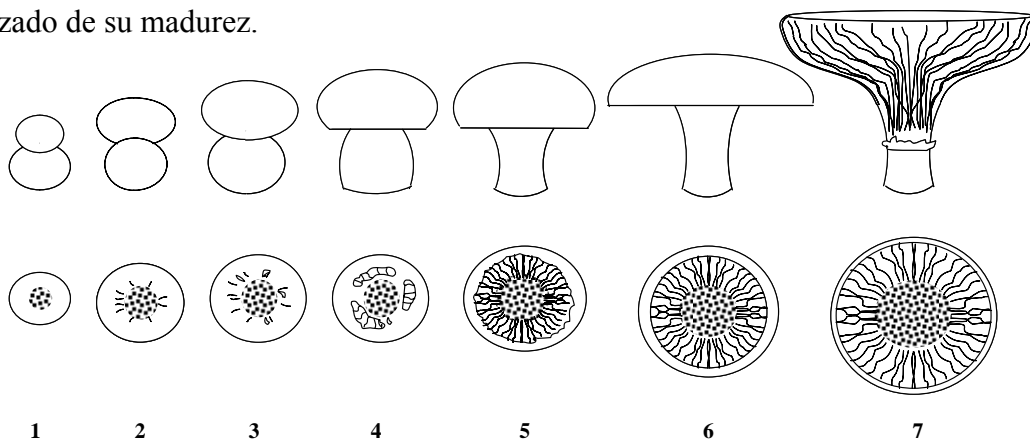


Figura 4: Diferentes estados del desarrollo y formación de un cuerpo fructífero de un basidiomicete (*Agaricus bisporus*) según los establecieron Hammond y Nichols en 1975.

1.1. Los hongos comestibles

Los hongos comestibles se pueden adquirir, normalmente, en establecimientos dedicados a la venta de frutas, verduras y hortalizas, y el consumidor las considera como tal. Según datos estadísticos (figura 5) el consumo de champiñón en España es aproximadamente de 1,628 kg/año/capita, de los que 1,077 kilos corresponden a champiñón fresco, 0,500 a transformado y 0,051 a congelado. En setas, el consumo nacional se sitúa en los 0,276 kilos por habitante y año (Larumbe, 2007).

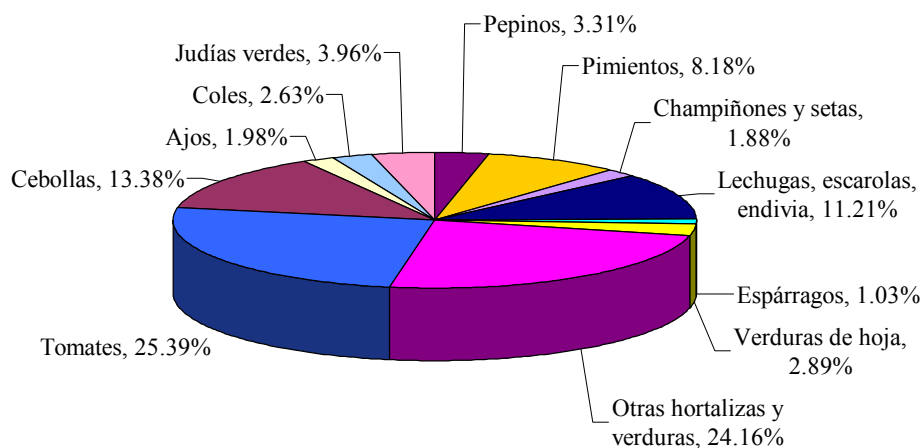


Figura 5. Porcentaje del consumo de hortalizas (incluyendo las setas) según los últimos estudios estadísticos realizados por la FAO para España (Faostat Database Results, 2005).

De todos los tipos de setas que se consumen en España (figura 6), el champiñón (*Agaricus bisporus*) ocupa un lugar destacado (con aproximadamente un 70% del consumo total), seguido por las pleurotas o setas de cardo (*Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonarius*) y otras setas de temporada o silvestres, como las setas de pie azul o lepistas (*Lepista nuda*), los perretxikos o setas de primavera (*Calocybe gambosa*), los boletos (*Boletus edulis*), las colmenillas (*Morchella esculenta*), los níscalos (*Lactarius deliciosus*) y cantarelas (*Cantharellus cibarius*). Últimamente, también está aumentando el consumo de hongos exóticos, que ya se pueden encontrar en algunas tiendas, como el shiitake (*Lentinus edodes*), la colibia de pie aterciopelado llamada en Asia enokitake (*Flammulina velutipes*), la seta de la paja (*Volvarellia volvacea*), las setas “oreja” (*Auricularia auricula* y *A. polytrica*) por la forma peculiar de sus cuerpos fructíferos, etc.

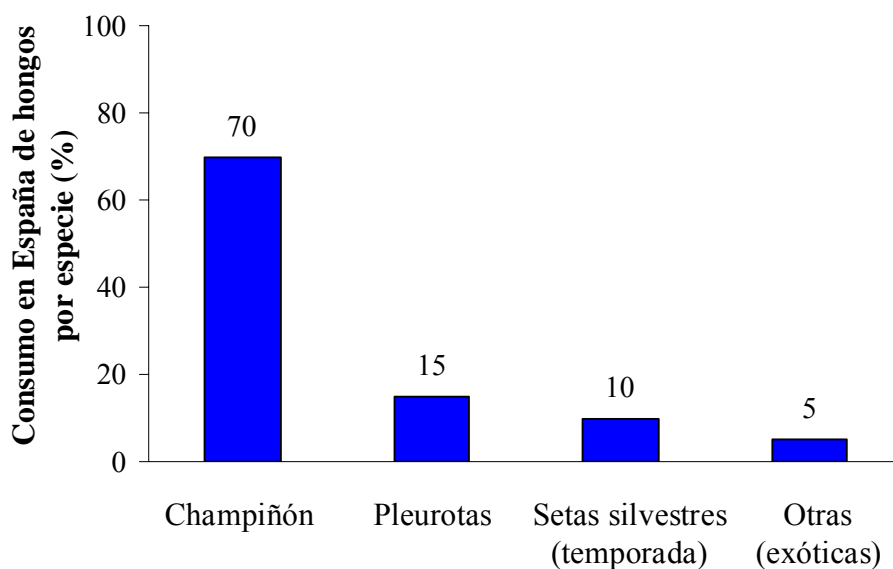


Figura 6. Proporción de los diferentes tipos de especies comestibles de hongos del total de setas consumidas en España (Larumbe, 2007).

1.1.1. Interés económico

El volumen de mercado que ocupa el sector de los hongos comestibles es actualmente bastante importante y se observa una tendencia a aumentar en los próximos años. En 1990, la Unión Europea era el líder mundial en producción de hongos comestibles, representando el 47,32% del total, seguida por China y Estados Unidos, pero después de un período más o menos estable, la producción europea tuvo que enfrentarse a una enorme competencia por parte de los países asiáticos, en particular China que a partir del 2003 es líder mundial en la producción de hongos comestibles y, actualmente representa el 46,84% de la producción total (figura 7).

Dentro de los Países de la Unión Europea, desde los años 60, y hasta prácticamente los años 90, Francia ha sido el mayor productor de Europa, sin embargo actualmente el líder en producción es Holanda seguido por España, que representa el 18,6 % de la producción europea (160.000 toneladas en 2007) (figura 8).

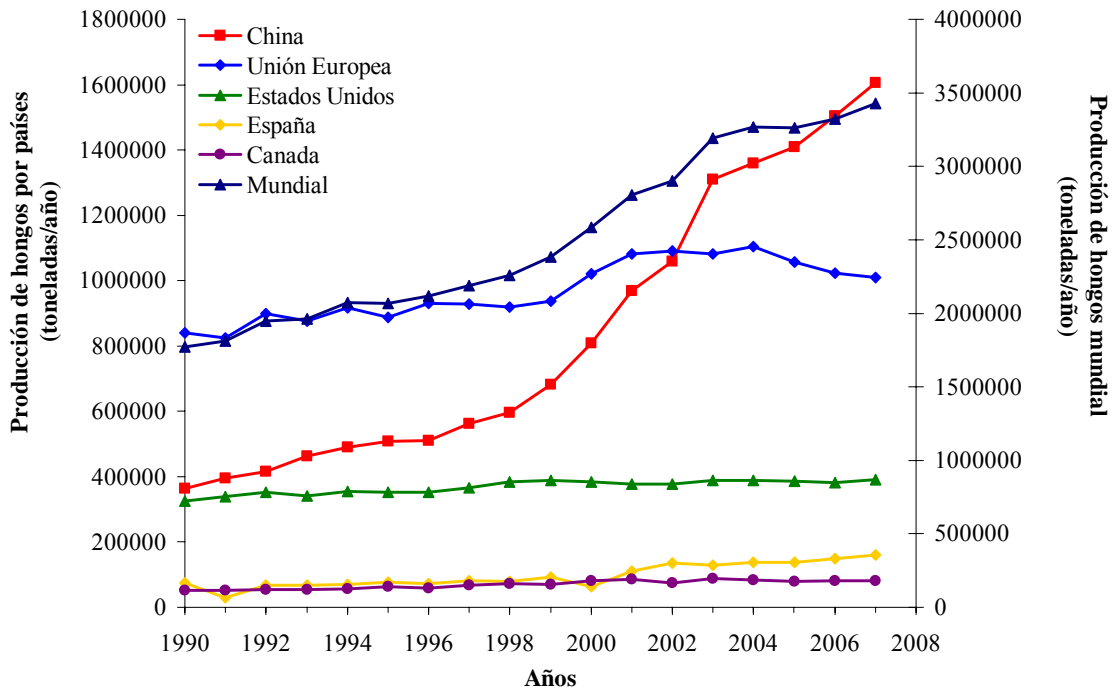


Figura 7. Producción mundial de hongos comestibles (toneladas/año) (Faostat Database Results, 2007).

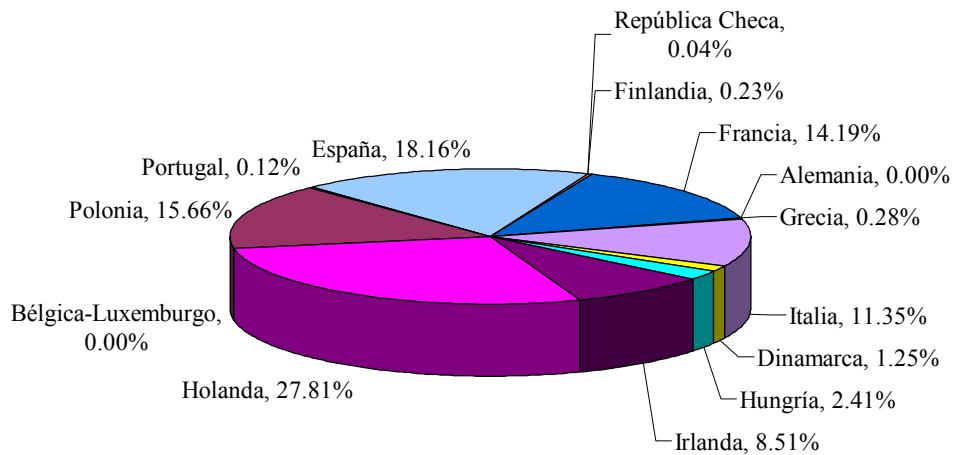


Figura 8. Porcentaje de la producción de hongos comestibles (toneladas en 2007) de los diferentes países de la UE respecto al total de la producción europea (Faostat Database, 2007).

En España, existen dos zonas de producción bien diferenciadas, la zona de la Rioja que incluye parte de Navarra y Aragón y la de la Manchuela, que incluye zonas de Cuenca y Albacete (figura 8).

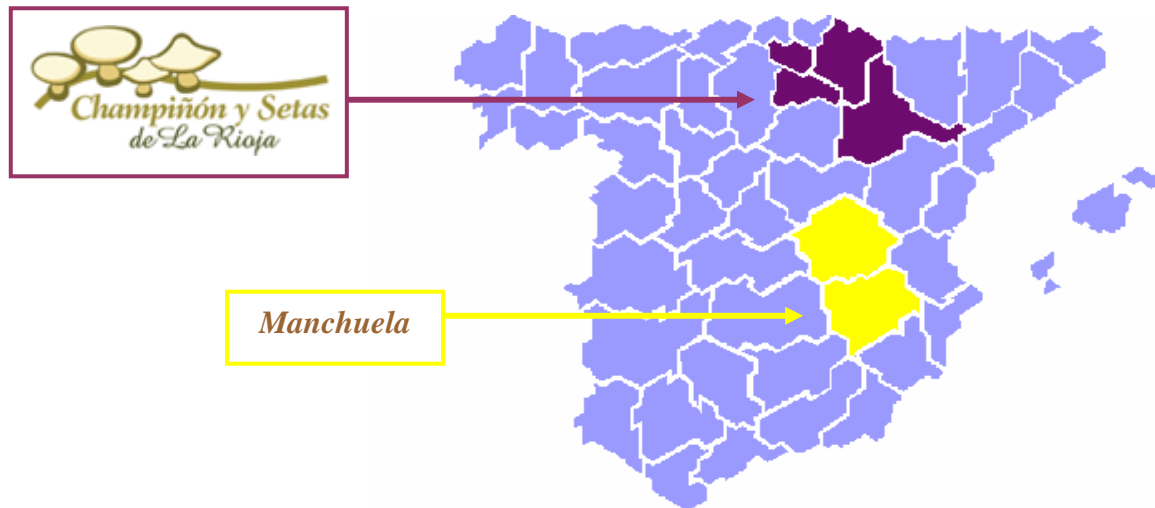


Figura 8. Principales zonas productoras de hongos comestibles: la Rioja (morado) y la Manchuela (amarillo).

En la zona de la Rioja hay menos cultivos pero se obtienen mayores rendimientos, constituye el 60% de la producción nacional y una facturación estimada de 90 millones de euros. Entre 2007- 2008 se produjeron 120.647 toneladas de champiñón de las que 72.497 toneladas se produjeron en La Rioja y 48.150 t en La Manchuela. El 59,65% de la producción nacional (71.961 t), se destinaron a conserva y el 40,35% (48.686 t) al consumo en fresco. De otras especies de hongos (la seta de cardo, de chopo, shiitake y seta de pie azul) se alcanzaron las 15.600 toneladas, de ellas 4.000 se cultivaron en la Rioja y 11.500 en la Manchuela (Larumbe, 2007). La Rioja cuenta desde Noviembre del 2006 con un nuevo distintivo de calidad para los productos agroalimentarios riojanos, la Marca de Garantía "Champiñón y Setas de La Rioja", con el objetivo de certificar un producto de calidad y, en especial, aumentar las ventas de champiñón y setas frescas (El País, 11 Noviembre 2006). En la Manchuela la producción de alrededor de 51.000 toneladas de champiñón en 2006, se suele dedicar, casi por completo, al consumo en fresco.

1.1.2. Hongos cultivados y silvestres

Actualmente sólo se puede cultivar cierto tipo de hongos, aquéllos que para la producción de sus cuerpos fructíferos no necesitan la presencia de otros seres vivos (en particular árboles) con los que conviven saprofiticamente formando micorrizas. Este es el caso de géneros como *Boletus*, *Amanita*, *Lactarius*, *Cantharellus*, etc. Estos hongos reciben con regularidad hidratos de carbono del hospedante y otros compuestos orgánicos necesarios en grandes cantidades para la formación de sus cuerpos fructíferos. Por eso, la fructificación suele realizarse sólo cuando ha terminado el crecimiento de los vástagos, en la fase en que el árbol acumula reservas (agosto-octubre) (figura 9) (Strasburger y col., 1986).

Los cuerpos fructíferos se disponen formando lo que se conoce con el nombre de “corro de brujas o círculo de brujas” (figura 10) y se debe a que los esporóforos se forman principalmente en las extremidades de las hifas más jóvenes del micelio que se van expandiendo de forma circular.



Figura 9. Hongos comestibles silvestres característicos de los bosques europeos. a) *Lactarius deliciosus* (niscalos), b) *Amanita caesarea*, c) *Boletus edulis*, d) *Cantharellus cibarius* (cantarelas).



Figura 10: “Corro de brujas”, disposición en círculo de los cuerpos fructíferos en las extremidades de un micelio subterráneo central.

Entre las especies de hongos que se cultivan se encuentran las setas más conocidas como el champiñón, las pleurotas, el shiitake, las flammulinas, etc., (figura 11).



Figura 11. Hongos comestibles que se cultivan en Europa: a) *Lentinus edodes* (shiitake), b) *Pleurotus ostreatus* (setas Pleurotas), c) *Agaricus bisporus* (champiñón).

El proceso del cultivo de las setas es complicado y los requerimientos exactos dependen de la especie de hongo seleccionado, pero en general se pueden distinguir varias etapas (figura 12). Primero, se cultiva el micelio en condiciones estériles en laboratorios especializados, sembrándose posteriormente en granos de trigo o de cebada estériles que actúan como material portador del micelio, es lo que se conoce como la *semilla de hongo*. Después, esta semilla se vende a los cultivadores y ellos la mezclan con el compost u otro tipo de sustrato según la especie, para que el micelio lo colonice bajo condiciones de luz, temperatura y humedad más o menos controladas. En el cultivo del

champiñón, una vez que el compost está completamente colonizado se añade sobre la superficie del sustrato una tierra de cobertura, que es la responsable de la iniciación de los cuerpos fructíferos, a los pocos días se podrán recoger varias floradas de champiñones. El cultivo de otras setas, tiene la ventaja, respecto al champiñón, que no es necesario añadir la tierra de cobertura sino que un simple cambio de iluminación, o de humedad o temperatura es suficiente para iniciar la fructificación.

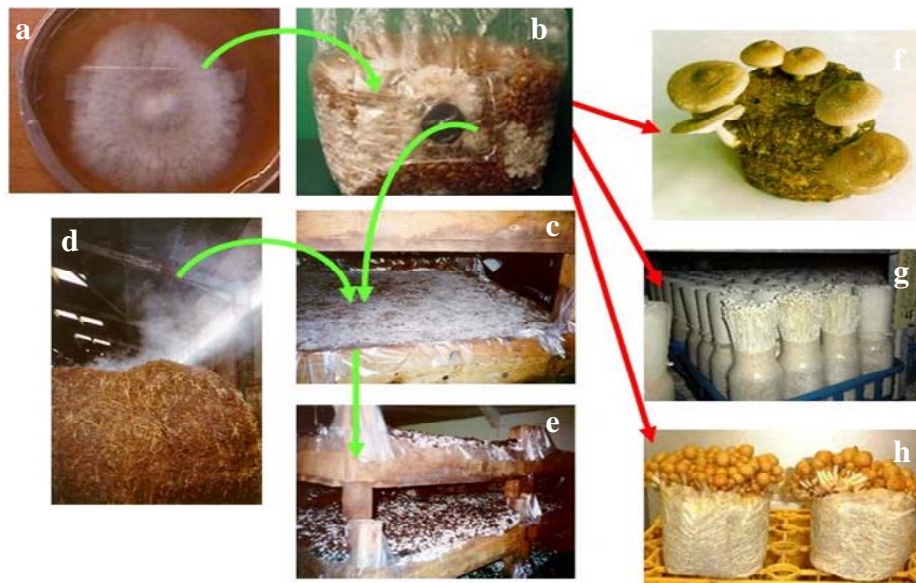


Figura 12. Procedimiento de cultivo de setas. (a) micelio, (b) semillas, (c) compost colonizado por champiñón, (d) compost sin colonizar, (e) tierra de cobertura con inicio de florada de champiñón, (f) sustrato de cañamones con setas shiitake, (g) cultivo de flammulinas en botella y (h) cultivo de foliotas en sacos.

1.1.3. Interés nutricional

La composición nutricional de los hongos puede variar dentro de la misma especie debido a las diferencias en la variedad, sustrato, técnicas de cultivo, madurez de la cosecha, etapas de desarrollo del hongo y frescura de la muestra (Barros *y col.*, 2008c).

La cantidad de agua de los cuerpos fructíferos es muy elevada y también varía afectando a la concentración de sus nutrientes, cuando los resultados son calculados en base al peso fresco (pf). Este contenido en humedad varía según factores ambientales como la temperatura y la humedad relativa del aire durante su crecimiento y almacenamiento, y también por la cantidad relativa de agua metabólica que puede producirse. En los

hongos estudiados hasta hoy se pueden encontrar valores del contenido en humedad desde 67,2 a 93,77 g/100g pf (Kalac, 2009).

Tabla 1. Composición nutricional básica de hongos (en base peso fresco) (Manzi y col., 2001; García-Mendoza, 2002; Mattila y col., 2002b; Barros y col., 2007a; 2008a y c).

Hongo	Humedad g/100g	Grasa g/100g	Carbohidratos g/100g	Proteína cruda g/100g	Cenizas g/100g	Energía kJ/100g
<i>Lactarius deliciosus</i>	90,05	0,22	6,26	2,96	0,51	164,88
<i>Agaricus bisporus</i>	92,81	0,09	0,83	8,09	0,99	155,05
<i>Pleurotus ostreatus</i>	91,34	0,36	6,69	1,61	0,89	154,00
<i>Cantharellus cibarius</i>	92,38	0,45	1,43	6,91	1,21	157,29
<i>Boletus edulis</i>	88,00	0,46	7,12	1,72	0,71	167,18
<i>Lentinus edodes</i>	90,00	0,80	6,75	1,75	0,70	177,00

En general y salvo algunas excepciones, los hongos tienen altas concentraciones de proteínas, que rondan los 17 – 81 g/100 g ps. El contenido en grasa varía desde 0,22 g/100 g pf en *L. deliciosus* hasta 0,8 g en *L. edodes*. En general, los hongos silvestres muestran menor contenido en grasa que los cultivados y mayor cantidad de proteínas, exceptuando *A. bisporus* (Barros y col., 2008a). Los carbohidratos también son abundantes, sobre todo en hongos silvestres. El contenido en cenizas varía entre 0,51 g/100 g pf en *L. deliciosus* hasta 1,21 g/100 g pf en *C. cibarius*.

Por otro lado, los hongos son alimentos hipocalóricos, cuyos valores energéticos varían desde 154,00 a 177,00 kJ/100g (pf) (tabla 1) y sus valores son similares, independientemente de si son cultivados o silvestres (Mattila y col., 2002b; Barros y col., 2007a; Barros y col., 2008a).

1.1.3.1. Hidratos de carbono

Los hongos contienen grandes cantidades de carbohidratos que constituyen la mayor parte de sus nutrientes (tabla 1). La mayoría de sus hidratos de carbono son polisacáridos, tales como glucanos, glucógeno y quitina, muchos de los cuales se consideran fibra dietética. Así, *Agaricus bisporus* contiene entre el 46-60% de carbohidratos en peso seco (ps). En *L. edodes* estos valores varían del 67,5 al 78% y en *P. ostreatus* del 46,6 al 81,8% (Mattila y col., 2002b).

L. edodes es considerado como una buena fuente de fibra dietética (39,3% en ps) ya que casi todos sus polisacáridos se consideran como tal, seguido por *P. ostreatus* (30%) y por último *Agaricus bisporus* cuyos niveles en fibra dietética son más bajos 19% (Mattila y col., 2002b). Los niveles de betaglucanos en *Boletus spp.*, *Agrocybe aegerita* y *Pleurotus eryngii* representan del 4 al 13% de la fibra dietética total y los de quitina llegan a representar hasta el 25% (Manzi y col., 2004).

Tabla 2. Composición de carbohidratos en base peso fresco (Barros y col., 2007a; Barros y col., 2008a).

Hongo	Manitol g/100g	Trealosa g/100g	Maltosa g/100g	Melezitosa g/100g	Azúcares reductores g/100g	Azúcares totales g/100g	Fibra dietética g/100g
<i>B. edulis</i>	0,35	0,97	nd	0,03	0,34	1,35	0,87
<i>A. bisporus</i>	1,96	0,08	nd	0,05	0,14	2,09	0,15
<i>P. ostreatus</i>	2,30	0,84					2,40
<i>C. cibarius</i>	0,83	0,61	nd	nd	0,25	1,45	
<i>L. deliciosus</i>	1,36	0,27	nd	nd		1,63	

nd = no detectado.

Los hongos comestibles tienen como principales carbohidratos el manitol y la trealosa (tabla 2) aunque también se ha descrito la presencia de maltosa (disacárido) y melezitosa (un trisacárido no reductor) en algunas especies (Barros y col., 2008a). *A. bisporus* contiene gran cantidad de azúcares y *L. deliciosus* muy poca.

1.1.3.2. Proteínas

En los hongos comestibles, los compuestos nitrogenados tales como aminoácidos, péptidos y proteínas, representan la segunda fracción mayor después de los carbohidratos.

El contenido en proteínas, como porcentaje en base al peso seco, varía desde el 4% al 53,7% según la especie (Barros y col., 2007a; Ouzouni y Riganakos, 2007; Barros y col., 2008c). En otros estudios, Bauer-Petrovska, 2001 también determina un contenido promedio en proteína del 32,6% en peso seco para 47 especies de hongos comestibles de Macedonia, donde el contenido más alto en proteína se ha observado en *Calocybe gambosa* y *Macrolepiota mastoidea* con un 48,8% y 51,2% respectivamente, mientras que el valor más bajo se observó en *C. cibarius* con un 16,2%.

La distribución de proteínas dentro del cuerpo fructífero y los cambios en el contenido proteico durante el desarrollo del cuerpo fructífero todavía no están claros. (Vetter y Rimóczi, 1993) indicaron que el *P. ostreatus* en la fase de desarrollo de su cuerpo fructífero en que presenta un diámetro en sombrero de 5-8 cm, posee un alto contenido en proteína cruda, y que la mayor parte de este contenido proteico es digerible y corresponde a un 92% en promedio. En esta etapa de desarrollo, el contenido en proteína fue del 36,4% y 11,8% en el sombrero y en el pie, respectivamente. A partir de entonces, tanto las proteínas como su digestibilidad decrecen. Por ello son necesarios estudios sobre los cambios en el contenido nutricional biodisponible durante el desarrollo de hongos cultivados y silvestres.

En este sentido, solamente en un artículo se han analizado las fracciones proteicas de 24 especies de hongos, donde el promedio de los niveles de albúminas, globulinas, glutelinas y prolaminas fue 24,8%, 11,5%, 11,5% y 5,7%, respectivamente (Bauer-Petrovska, 2001).

Además, los hongos poseen grandes cantidades de nitrógeno en forma no proteica presentes, tanto en la quitina de las paredes celulares como en forma de aminoácidos libres y ácidos nucleicos. Únicamente el 60-77% del nitrógeno en los hongos se encuentra en las proteínas (Danell y Eaker, 1992; Fujihara y col., 1995; Miles y Chang, 1997; Mattila y col., 2002b). La cantidad de nitrógeno no proteico de *Agaricus bisporus* varía de 0,43 a 0,79 g/100g pf, en *P. ostreatus* y *L. edodes* sus niveles rondan los 0,25-0,34 g/100 g pf y 0,49-0,52 g/100 g pf, respectivamente (Kurzman, 1997; Mattila y col., 2002b). Bauer-Petrovska, 2001 observó una proporción de aproximadamente del 33,4% en ps de nitrógeno no proteico.

Los hongos poseen casi todos los aminoácidos esenciales, donde los aminoácidos detectados en mayor proporción en las especies *A. bisporus*, *P. ostreatus* y *L. edodes* son la tirosina (219-292 mg/100g pf), la leucina (133-153 mg/100g pf), la lisina (122-143 mg/100g pf) y la valina (112-124 mg/100 pf) (Mattila y col., 2002b).

Boletus sp. contienen predominantemente ácido glutámico seguido de alanina y glutamina aunque no contienen el aminoácido esencial fenilalanina. Otras especies como *C. cibarius* carecen además de lisina y leucina pero es una buena fuente de ácido glutámico (Mdachi y col., 2004).

1.1.3.3. Lípidos

La fracción grasa, en los hongos, varía desde del 2% al 6% de su peso seco y está formada por toda clase de compuestos lipídicos, incluyendo ácidos grasos libres, mono-, di- y triglicéridos, esteroides, ésteres de esteroles, tocoferoles y fosfolípidos (Mattila y col., 2002b; Kalac, 2009).

Los ácidos grasos encontrados en mayor proporción fueron el ácido linoleico (C18:2 n-6) seguido del ácido oleico (C18:1 n-9) y ácido palmítico (C16:0) (Barros y col., 2008a). El ácido linoleico es el precursor del 1-octen-3-ol, más conocido como el alcohol de los hongos, que es el principal compuesto aromático en muchos hongos y el responsable de su sabor característico. Además de estos ácidos grasos mayoritarios se han identificado y cuantificado 12 más (Barros y col., 2007a).

El grupo de ácidos grasos predominantes, en casi todas las especies de hongos estudiados, son los insaturados. En algunas variedades, predominan los monoinsaturados sobre los poliinsaturados, pero siempre el número de ácidos insaturados sobrepasa a los saturados (Barros y col., 2008a) (tabla 3).

Aunque no se sintetiza en grandes cantidades, los hongos contienen el ácido 10-oxo-trans-8-decanoico (ODA), que es esencial para su desarrollo ya que actúa como una hormona fúngica que estimula el crecimiento de las hifas (Tressl y col., 1982).

Dentro de los lípidos insaponificables, el esteroles que se encuentra en mayor concentración en los hongos es el ergosterol ya que es uno de los compuestos constitutivos de las membranas de las hifas. Existen además muchas otras estructuras esteroideas derivadas de este compuesto como el fungisterol, ergosta-5,7-dienol, ergosta-7,22-dienol, etc., (Mattila y col., 2002a). El ergosterol se encuentra a niveles de entre 5,49-4,89 mg/g ps en *B. edulis*, *C. cibarius* contiene entre 2,78 y 3,04, en *Suillus granulatus* el ergosterol ronda los 7,02 y fungisterol los 0,8 mg/g ps y en otras especies como *Russula cyanoxantha* y *Clitocybe nebularis* se han descrito contenidos entre 6,32-6,38 y 1,28-1,04 mg/g ps de ergosterol y fungisterol respectivamente (Mattila y col., 2002a; Kalac, 2009). Aunque estos valores pueden variar mucho ya que dependen del estado de crecimiento de las hifas, este compuesto se sintetiza activamente durante la fase de extensión del micelio, así la reducción en los niveles de este compuesto se

utiliza como marcador que indica que al micelio le faltan nutrientes y ha comenzado una etapa de crecimiento estacionario que podría conllevar a la muerte de las hifas.

Tabla 3: Composición en ácidos grasos (%) de hongos comestibles silvestres y cultivados (media + SD; $n = 3$) (Barros y col., 2007a; Barros y col., 2008a).

	<i>A. bisporus</i>	<i>B. edulis</i>	<i>C. cibarius</i>	<i>L. deliciosus</i>
SFA	22,08 ± 0,19	14,52 ± 0,33	22,63 ± 0,24	40,14 ± 0,13
MUFA	1,52 ± 0,06	40,91 ± 1,67	23,29 ± 0,25	42,28 ± 0,01
PUFA	76,41 ± 0,13	44,56 ± 2,01	54,08 ± 0,01	17,59 ± 0,12

nd= no detectado; c= átomos de carbono; SFA= ácidos grasos saturados; MUFA = ácidos grasos monoinsaturados; PUFA= ácidos grasos poliinsaturados.

El ergosterol es también el compuesto precursor de la vitamina D₂ (ergocalciferol) porque cuando se produce la exposición de los hongos a la luz, los rayos UV producen la fotólisis de este compuesto dando lugar a una amplia variedad de productos de fotoirradiación y principalmente a la provitamina D₂, taquisterol y lumisterol. Después, la provitamina D₂ sufre reorganizaciones térmicas espontáneas que originan vitamina D₂ (Teichmann y col., 2007) (figura 13).

Por ello, los cuerpos fructíferos de los hongos cultivados que normalmente se cultivan en oscuridad, como el caso de *Agaricus bisporus*, prácticamente carecen de vitamina D₂, mientras que en los hongos cultivados que incluyen ciclos de luz (ejm. *Pleurotus sp.*) y en los silvestres se encuentra en mayor concentración, por ejm. *C. cibarius* y *Cantharellus tubaeformis* contienen valores de entre 0,84 y 1,94 µg/g ps (Mattila y col., 2002a; Teichmann y col., 2007).

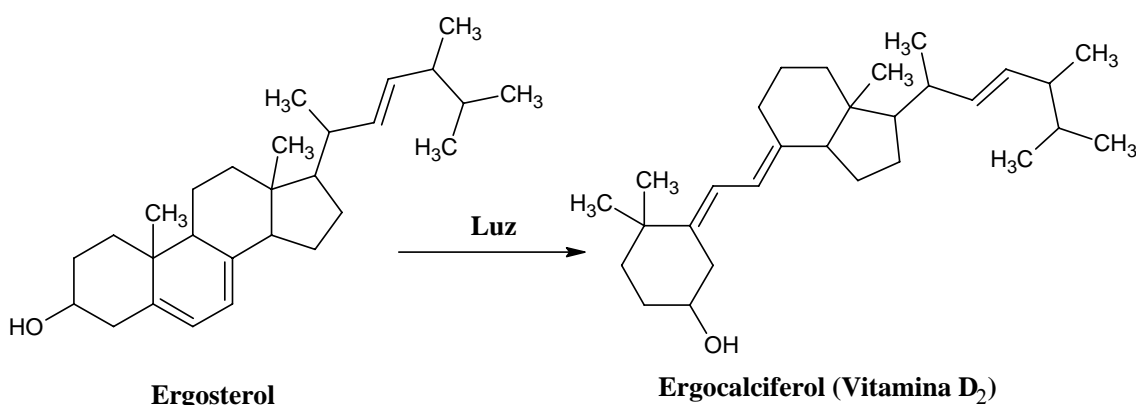


Figura 13: Transformación del ergosterol en ergocalciferol.

La mayoría de las especies de hongos analizados contienen α - γ - y δ - tocoferoles. Sus concentraciones varían entre los 29,54 mg/g ps de α -tocoferol en *Auricularia fuscusuccinea* hasta los 2 mg/g ps de *Agaricus blazei* y *A. cylindracea*. Esta última especie también posee niveles elevados de γ - y δ -tocoferol, entre 1,6 y 0,7 mg/g ps (Mau y col., 2001; Tsai y col., 2007). Sin embargo, algunos autores describen la presencia de β -tocoferol en especies de hongos como *Agaricus sp.*, *B. edulis*, *Calocybe gambosa*, *Cantharellus cibarius*, *Craterellus cornucopioides* y *Marasmius oreades* 0,03 – 8,9 μ g/g ps (Barros y col., 2008a). La concentración de tocoferoles totales en *Clitocybe maxima*, *Pleurotus ferulae*, *P. ostreatus* (suma de α - γ - y δ -tocoferoles), *L. edodes* y *Pleurotus cystidiosus* ronda los 0,7 a 0,11 mg/g ps (Yang y col., 2002) aunque algunas especies como *Flammulina velutipes* no presenta este tipo de compuestos. La distribución de tocoferoles parece ser diferente según la parte del cuerpo fructífero que se considere ya que (Tsai y col., 2009) encontró que los sombreros de *C. maxima* contienen concentraciones más elevadas de γ -tocoferol mientras que en los pies la forma dominante es la de δ -tocoferol.

Algunas especies de hongos, sobre todos aquéllos cuyos cuerpos fructíferos son de color anaranjado, como por ejemplo, *Cantharellus cibarius* contienen grandes cantidades de β -caroteno y licopeno 13,56 y 5,06 μ g/g ps (Barros y col., 2008a). A veces, si el color del sombrero difiere del de el pie, la concentración puede variar como ocurre en *Clitocybe maxima* que contiene más β -caroteno en el sombrero (50 μ g/g ps) que el pie (40 μ g/g ps) (Tsai y col., 2009). Otras especies de hongos como *L. giganteus*, *S. imbricatus*, *A. silvaticus* y *A. arvensis* contienen carotenoides pero en menor proporción, incluyen concentraciones del orden de 1,88, 2,53, 5,42 y 8,52 μ g/g ps de β -caroteno y 0,69, 1,3, 2,63 y 4,7 μ g/g ps de licopeno (Barros y col., 2007f; Barros y col., 2008a; Barros y col., 2008b).

1.1.3.4. Compuestos fenólicos y ácidos orgánicos

Los hongos contienen cantidades importantes de compuestos fenólicos y ácidos orgánicos. Los ácidos oxálico, cítrico, málico, quínico y fumárico son muy frecuentes en muchas especies de hongos como *Suillus bellini*, *Tricholomopsis rutilans*, *Hygrophorus agathosmus*, *Amanita rubescens*, *Russula cyanoxantha*, *Boletus edulis*, *Tricholoma equestre*, *Suillus luteus* y *Suillus granulatu*. En algunas de ellas también se

detectan otros ácidos característicos como los ácidos aconítico, cetoglutárico, ascórbico, succínico y siquímico. Cuando se procede a la cuantificación de estos compuestos se observa que los ácidos málico y quínico son los más abundantes en todas las especies, constituyendo el 35-84% de los ácidos no aromáticos, seguidos frecuentemente por el ácido cítrico (9-10% de los ácidos no aromáticos) (Ribeiro *y col.*, 2006).

En cuanto a los compuestos fenólicos, sólo se han podido identificar algunos de ellos, por ejemplo, *A. rubescens*, *R. cyanoxantha* y *T. equestre* contienen ácido *p*-hidroxibenzoico. Otros compuestos como los ácidos tánico, gálico, protocatechuico, gentísico, vanílico, siríngico, cafeico, coumárico, ferúlico y cinámico se han detectado en extractos acuosos y metanólicos obtenidos de muchas especies de hongos, incluyendo algunas tan conocidas como *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Cantharellus cibarius*, etc. Los extractos acuosos de *Termitomyces heimii* contienen concentraciones muy elevadas de ácido tánico (15,54 mg/g ps) en comparación con otras especies, mientras que *Morchella conica* posee los niveles más altos de ácido gálico (12,85 mg/g ps), los extractos acuosos de *Helvella crispa* muestran sin embargo valores elevados de ácidos protocatechuico (18,48 mg/g) y gentísico (4.89 mg/g) (Puttaraju *y col.*, 2006; Ribeiro *y col.*, 2006).

Agaricus bisporus contiene importantes cantidades de aminoácidos fenólicos (tirosina, γ -L(+)-glutaminil-4-hidroxibenceno (GHB), 3,4-dihidroxifenilalanina y γ -L(+)-glutaminil-3,4-dihidroxibenceno (GDHB), (Soler Rivas *y col.*, 1998) y ácidos fenólicos como cinámico, *p*-hidroxibenzoico, protocatechuico y cafeico en concentraciones de 2,69, 0,51, 0,3, y 0,82 μ g/g ps, respectivamente (Mattila *y col.*, 2001) (figura 14). La agaritina (γ -L(+)-glutamil-4-hidroximetilfenilhidrazina) es el compuesto que se encuentra en mayor concentración (de media se encuentra en un 15,1 μ mol/g en la epidermis de los cuerpos fructíferos de *A. bisporus* siendo incluso mucho mayor en las laminillas según la variedad considerada) seguida por la tirosina libre (0,48 mg/g), GHB (0,70 mg/g) y su producto de degradación GDHB (0,47 mg/g). Sólo en algunas variedades de *A. bisporus* se encuentran catecol y *p*-aminofenol (0,32 mg/g), aunque este último sea un compuesto muy inestable. L-Dopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina), el producto de oxidación de la tirosina, nunca ha sido detectado en ninguna de las variedades estudiadas (Jolivet *y col.*, 1995). Todos estos compuestos derivan de la ruta

metabólica del ácido quimímico y son metabolitos secundarios (Soler-Rivas *y col.*, 1999).

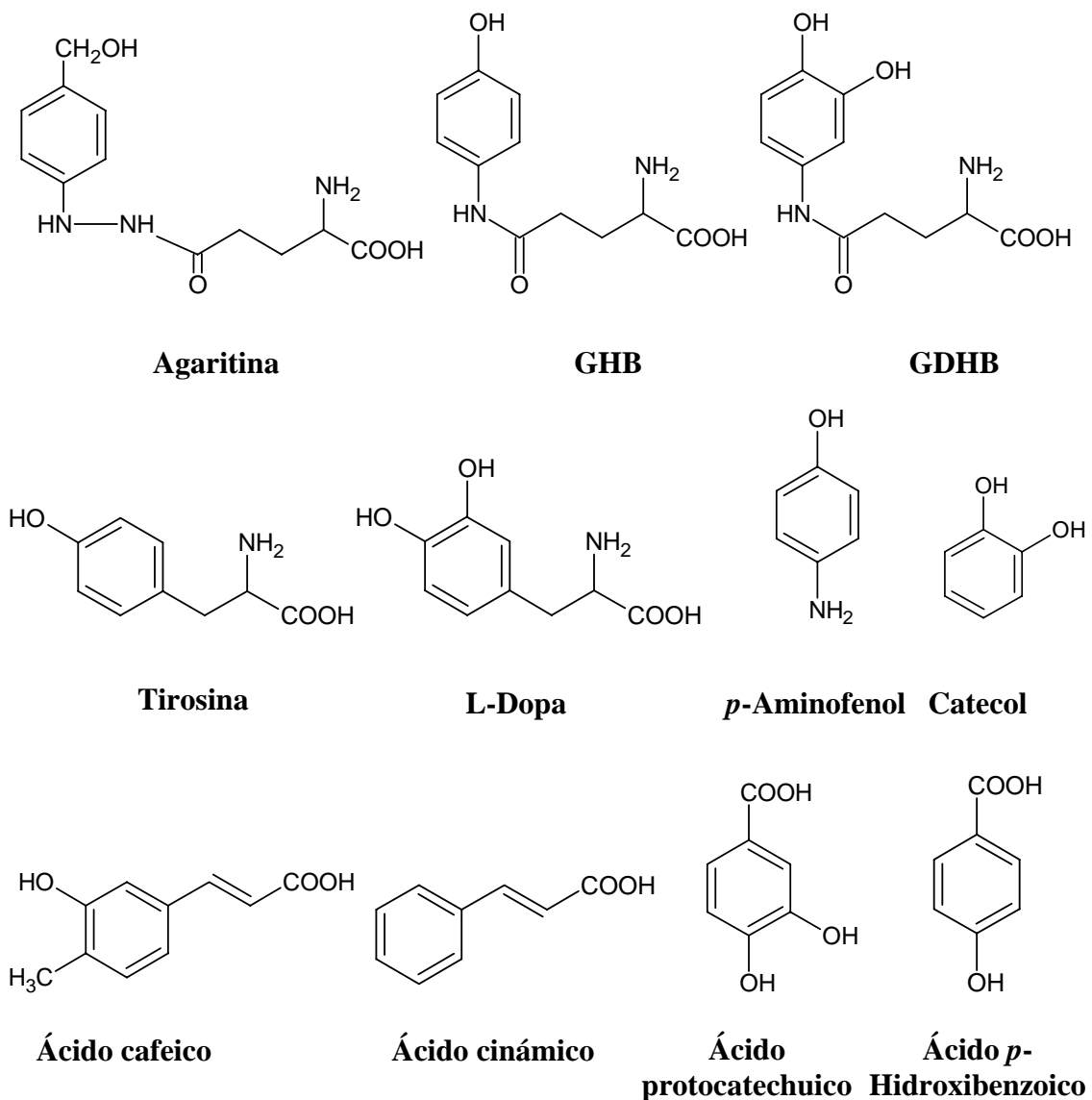


Figure 14: Estructura química de algunos compuestos fenólicos identificados en *Agaricus bisporus*.

A pesar de los numerosos y detallados estudios que se han realizado sobre los compuestos fenólicos de los hongos, prácticamente la totalidad se refieren a *Agaricus bisporus*, por lo que aun hoy en día se desconoce la identidad de los compuestos fenólicos de la mayoría de las otras especies de hongos. En muchas de ellas se suele cuantificar, no individualmente, sino como contenido de fenoles total. (Signore *y col.*, 1997) realiza una cuantificación de estos compuestos en los cuerpos fructíferos de muchas especies de basidiomicetes diferentes y observa que sus niveles varían entre

2,35–9,05 mg/g pf. Unos años más tarde, (Yang *y col.*, 2002) y (Elmastas *y col.*, 2007) encontraron niveles más elevados en otras especies como *Pleurotus ostreatus* y *Russula delica* (15,7–26 mg/g ps).

Además existen ciertas controversias, por ejemplo algunos autores indican que los extractos etanólicos de especies como *A. blazei*, *A. cylindracea* y *B. edulis* poseen niveles de compuestos fenólicos (5,8, 5,7, 5,73 mg/g ps, respectivamente) similares a los extractos realizados en agua caliente (5,67, 5,8 y 5,81 mg/g ps, respectivamente) (Tsai *y col.*, 2007). Sin embargo, otros trabajos encuentran diferencias muy significativas, de hasta 10 veces más, dependiendo de la especie en los extractos acuosos que en los metanólicos (Cheung *y col.*, 2003; Puttaraju *y col.*, 2006).

1.1.3.5. Componentes minoritarios

Los hongos cultivados son buenas fuentes de varias vitaminas y minerales, particularmente riboflavina (vitamina B₂), ácido pantoténico (vitamina B₅), niacina (vitamina B₃) y como minerales, son ricos en selenio, cobre, potasio y fósforo aunque sus niveles específicos dependen de la especie de hongo considerada. Por ejemplo, el contenido medio de algunas variedades de *A. bisporus* en Zn, Fe, P, Mg, K, Na, y Ca ronda los 8,15-7,07, 7,40-7,96, 1180,93-1038,69, 88,05-76,29, 213,29-238,82, 2652,0-2500,89 y 534,2-554,80 (mg/kg pf) respectivamente. Esta especie posee entre 6,75-3,97 mg/kg pf de vitamina C, 0,09-0,08 de ácido fólico, 0,085-0,09 de tiamina, 0,27-0,29 de riboflavina y 3,62-2,94 de niacina. Sin embargo, estos valores pueden variar dependiendo del estado de desarrollo del hongo (Çaglarirmak, 2009).

También en otros hongos el estado de desarrollo parece influir en el contenido en vitaminas, así, el contenido en vitamina C de *L. edodes* disminuye desde el estado 1 hasta aproximadamente el 4 (figura 4). El contenido medio es de 146,8 mg/kg pf, valores elevados si se considera que el requerimiento diario de esta vitamina (ingesta diaria recomendada) es de 60 mg. En especies de *Pleurotus*, los niveles de vitamina C varían entre 53,8 a 161 mg/kg pf (Çaglarirmak, 2007). Sin embargo hay gran variación en los datos dependiendo del estudio ya que algunos autores concluyen que los hongos no contienen o sólo presentan trazas de esta vitamina, mientras que otros indican valores muy altos como 404–599 mg/kg ps en *L. edodes* y 364–1440 mg/kg ps en *Pleurotus* sp. (Mattila *y col.*, 2001; Çaglarirmak, 2007). Estas variaciones se pueden atribuir a que en

muchos de estos trabajos, el ácido ascórbico se cuantifica utilizando un método colorimétrico que utiliza 2,6-dicloroindofenol como reactivo. Esta determinación es rápida pero no muy precisa, ya que dependiendo de la muestra pueden producirse interferencias con otros compuestos como taninos, compuestos sulfidrilos y metales como el cobre, el hierro y el cobalto que son capaces de oxidar el reactivo produciendo falsos positivos (Arya y col., 1998).

Okamura realizó en 1994 y 1998 unos estudios muy detallados usando un sistema específico de HPLC capaz de separar y distinguir entre las diversas formas del ácido ascórbico y así detectó vitamina C en forma de ácidos 6-deoxiascórbito (DAA) y eritroascórbito (EAA) glucosilados. Así, en especies de hongos tales como *Pleurotus ostreatus* se encontraron las formas mencionadas y otras análogas incluyendo formas complejas como el 5-O-(α -D-xilopiranosil)-EAA. En *Lentinus edodes*, predominan también las formas glucosiladas (97% del total de ácido ascórbico) y sólo contiene concentraciones pequeñas de EAA y DAA. *Hypsizygus marmoreus*, *Flammulina velutipes* y *Agaricus bisporus* también poseen formas glucosiladas simples (>80%) mientras que en *Agrocybe cylindracea* y *Pholiota nameko* predominan DAA y EAA. *Grifola frondosa* contiene 78% DAA en forma glucósido y 20% EAA (Okamura, 1994; Okamura, 1998).

Según algunos estudios, el contenido en riboflavina de algunos hongos como *A. bisporus*, *L. edodes* y *P. ostreatus* es más alto que en muchas verduras y vegetales (0,7-5,1 mg /100g en ps) y algunas variedades de *A. bisporus* contienen niveles similares a los de otros alimentos como huevos y quesos; y niveles más altos que en leche y sus derivados (Mattila y col., 2001; Furlani y Godoy, 2008)(United States Department of Agriculture, 2006).

El contenido en niacina de los hongos comestibles ronda los 31-65 mg/100g ps y el de folatos (300-640 μ g/100g ps). Además, su biodisponibilidad parecen ser tan buena como la del ácido fólico a diferencia de lo que ocurre con los folatos presentes en algunos vegetales (guisantes y espinacas) que son significativamente menos biodisponibles que el ácido fólico (Clifford y col., 1991; Mattila y col., 2001).

Las referencias que cuantifican la concentración de minerales en los diferentes hongos comestibles datan de los años 70 y no se han actualizado mucho (sólo para *A. bisporus*).

Según los datos de aquellos autores (recopilados en una revisión de (Kalac, 2009), la distribución de potasio, sodio, calcio y magnesio no es igual dependiendo de la parte del esporóforo que se considere siendo mayor en el sombrero, seguido de el pie y después las lamelas y la menor concentración se encuentra en las esporas de diversas variedades y sus concentraciones son de 20 a 40 veces mayores en el cuerpo fructífero que en el micelio. Los niveles de fósforo rondan 6.100 – 13.700 mg/kg ps pudiendo llegar a ser mayores en especies del género Boletales. Los hongos también acumulan en sus cuerpos fructíferos fósforo y azufre y multitud de elementos traza diferentes en bajas concentraciones, entre los que se incluye el selenio, que sólo en *Boletus sp.* se puede encontrar en grandes cantidades. Aunque el resto de especies sólo contengan concentraciones residuales de Se, en algunos hongos cultivables como *A. bisporus* se puede reforzar añadiendo selenito de sodio a su sustrato de cultivo. Los hongos fortificados con Se absorben y acumulan este compuesto y se ha demostrado que son capaces de aumentar la actividad glutatión s-transferasa (GST) de hígado y mama reduciendo la formación de aductos inducidos por 2,4-dihidrodiol-1,2-epóxido-deoxiguanosina, indicando que estos hongos enriquecidos mejoran el estado antioxidante de ratas y podrían utilizarse como un método efectivo para retrasar los tumores inducidos químicamente (Spolar y col., 1999; Falandysz, 2008).

1.1.3.6. Flavonoides?

Según algunos autores, los cuerpos fructíferos de hongos como *B. edulis*, *Lactarius deterrimus*, *Suillus collitinus*, *Xerocomus chrysenteron*, *Laetiporus sulphurous*, *L. edodes*, *Agaricus spp.*, *L. deliciosus*, *M. mastoidea*, *M. procera*, *Tricholoma matsutake* y *S. imbricatus* tienen niveles altos de flavonoides (Choi y col., 2006; Barros y col., 2007f; Barros y col., 2008a; Lim y col., 2007; Turkoglu y col., 2007; Sarikurkcu y col., 2008). Sin embargo, el contenido en flavonoides se cuantifica en estas publicaciones como flavonoides totales usando un método colorimétrico que utiliza cloruro de aluminio (AlCl_3) como agente que aparentemente reacciona con los flavonoides produciendo un color rosado que se mide a 510 nm. Los autores se refieren al trabajo de (Zhishen y col., 1999) para justificar la aplicación del método como protocolo de medida de flavonoides totales. De hecho, estos autores correlacionan los resultados obtenidos con el ensayo colorimétrico con el contenido en flavonoides individuales medidos por HPLC. Esta correlación es correcta para moreras, donde los flavonoides

constituyen la mayor parte de los compuestos fenólicos, sin embargo, el AlCl_3 forma complejos con grupos hidróxilos que estén localizados próximos a grupos cetónicos y con hidróxilos dispuestos en posición *orto* (Nikolovska-Coleska y col., 1995). Así que, además de unirse a flavonoides, el AlCl_3 puede reaccionar con muchos de los compuestos fenólicos endógenos de los hongos cuyas moléculas incluyen esos grupos indicados como radicales. Sólo existe un trabajo donde se detecta la presencia de quercetina por HPLC en una única muestra de *S. luteus* (Ribeiro y col., 2006). Probablemente este flavonoide fue absorbido de plantas o árboles situados cerca de su micelio, con las que formaría micorrizas ya que ningún espécimen que pertenezca al reino fúngico contiene la maquinaria enzimática necesaria para catalizar las rutas metabólicas de síntesis de flavonoides desde los compuestos fenólicos generados en la ruta del ácido siquímico. Además, según la USDA, los hongos no se consideran como fuentes de flavonoides (Iwalokun y col., 2007).

1.1.4. Enzimas oxidativas de los hongos

Cuando se corta el cuerpo fructífero de un hongo por el pie, se daña su sombrero por una rozadura o cuando los hongos se infectan por bacterias debido a su cultivo inadecuado (si son hongos cultivados) se pueden observar coloraciones pardas en las zonas afectadas (Soler-Rivas y col., 1999). Este pardeado se debe a que los hongos poseen grandes cantidades de enzimas oxidativas que, en condiciones de compartimentalización celular adecuadas, se encuentran de forma inactiva o separadas de sus sustratos y del oxígeno exterior por membranas. Si se producen daños o rupturas celulares, el oxígeno penetra en las capas internas donde se encuentran estas enzimas y actúa como catalizador, promoviendo la oxidación de compuestos (principalmente de origen fenólico) a melaninas u otros polímeros coloreados. Las enzimas oxidativas mayoritarias en los basidiomicetes son las polifenol oxidasas y las peroxidasas, su concentración y actividad dependerá de la especie de hongo que se considere.

1.1.4.1. Polifenol oxidasas (PPO)

Aunque las polifenol oxidasas de los hongos cultivados están ampliamente estudiadas, se desconoce su ocurrencia y actividad en casi todos los hongos silvestres. En los hongos como el champiñón o las portabelas (*Agaricus bisporus*) pueden encontrarse dos tipos de polifenol oxidasas: las tirosinasas y las lacasas. Otros, como el *Pleurotus sp.*,

carece de tirosinasas y algunas especies pueden expresar diferentes tipos de lacasas dependiendo del medio donde se cultivan.

Tirosinasas

La Tirosinasa (monofenol, *o*-difenol oxígeno oxido-reductasa, EC 1.14.18.1) cataliza dos reacciones consecutivas: la *orto*-hidroxilación de monofenoles (actividad cresolasa) y la oxidación de *orto*-difenoles en *orto*-diquinonas (actividad catecolasa) siendo la etapa limitante la primera (figura 15).

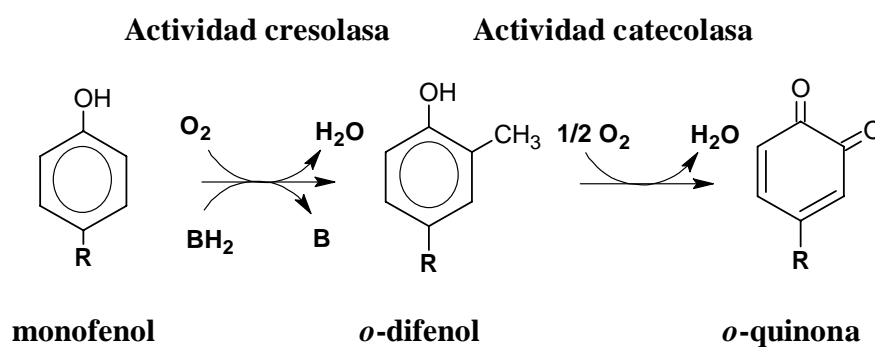


Figura 15. Reacciones catalizadas por la tirosinasa.

La mayoría de los híbridos y variedades de *A. bisporus* poseen grandes cantidades de tirosinasa siendo su actividad lacasa reducida a veces hasta mínimos. La tirosinasa, se encuentra en el citosol de las hifas prácticamente en un 99% en forma latente y sólo cuando ocurre algún daño en la membrana o alguna infección, se activa y produce la oxidación de compuestos fenólicos. En el champiñón se han identificado dos genes que codifican dos tirosinasas, ambas incluyen cobre como grupo prostético y son los dominios más conservados, AbPPO1 y AbPPO2, este último gen se activa cuando existe alguna lesión o estrés en el hongo (Wichers *y col.*, 2003). La tirosinasa del champiñón se expresa como una pre-tirosinasa de 64 kD que se modifica dando lugar a una forma inactiva o latente, una proteína de 65 kD, que cuando se activa o bien se modifica su estructura (se activa por detergentes iónicos) o pierde algún fragmento, se transforma en una enzima de 45 kD completamente activa. Se cree por tanto que su activación en condiciones naturales podría debese a la actuación de proteasas endógenas también presentes en grandes concentraciones en los hongos. Algunos autores mencionan que este enzima se encuentra en forma tetramérica o dimérica, la forma

dimérica podría ser la pre-tirosinasa, pero otros autores afirman que la dimerización podría deberse al proceso de extracción (Wichers *y col.*, 2003).

Algunas variedades de amanitas, como la *Amanita muscaria*, también poseen tirosinasas que son parte esencial en la síntesis de betalainas, los pigmentos que le dan a este hongo el característico color de su sombrero (Mueller *y col.*, 1996). Las tirosinasas de *L. edodes* (hasta 6 isoformas), presentes en grandes cantidades en las laminillas del cuerpo fructífero son las responsables de la depreciación de los cuerpos fructíferos produciendo colores pardos y olores indeseables (Kanda *y col.*, 1996).

Lacasas

La lacasa (benzendiol: oxígeno oxido-reductasa, *p*-difenol oxidasa, EC 1.10.3.2) es un enzima oxidativo que cataliza la oxidación de *orto*- y *para*-difenoles y aminas aromáticas para formar *o*- y *p*-quinonas (figuras 16 y 17).

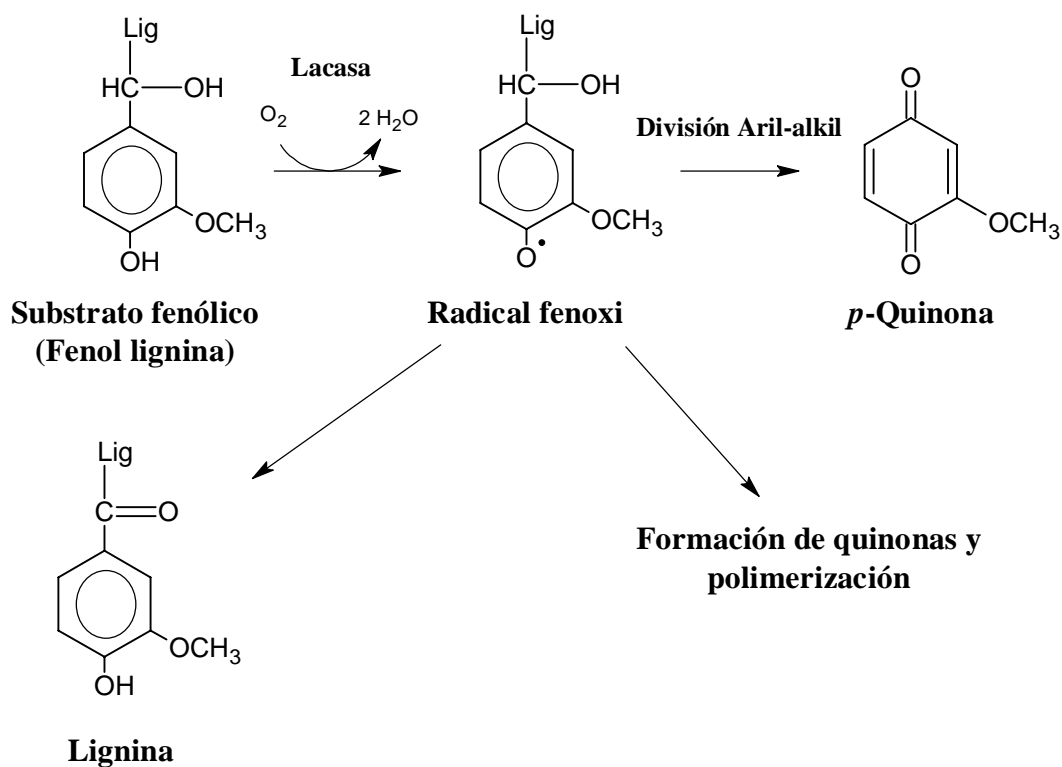


Figura 16: Oxidación de grupos fenólicos de lignina catalizados por la lacasa (Archibald *y col.*, 1997).

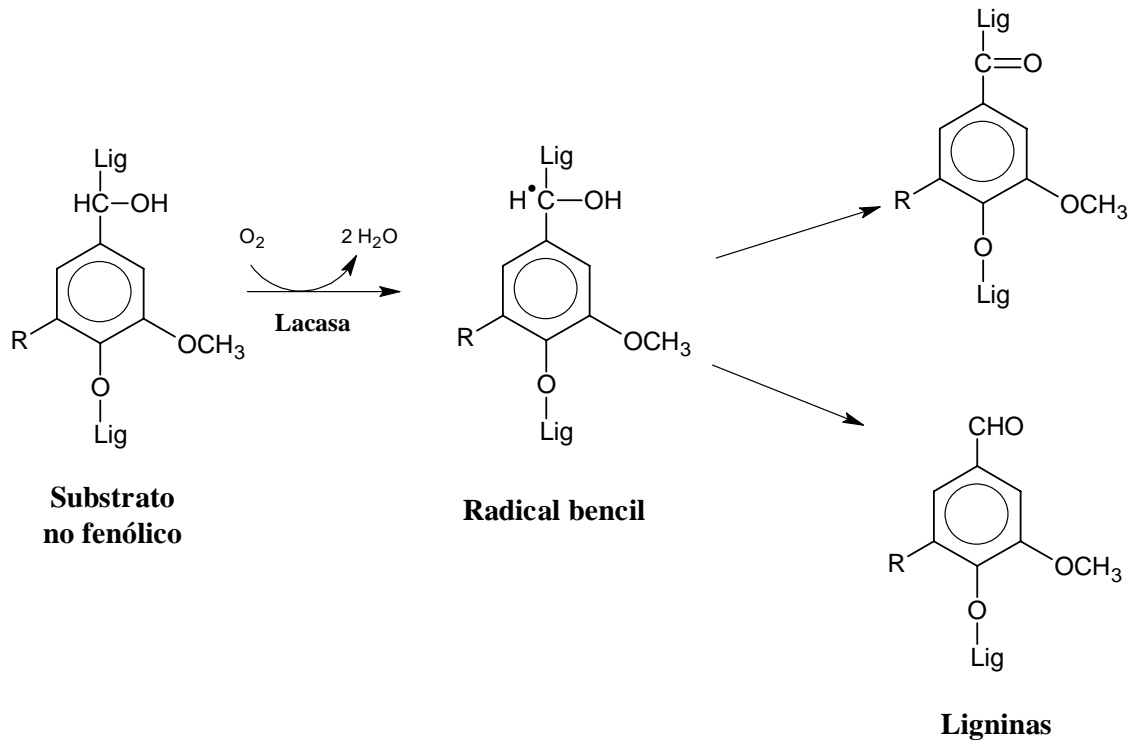


Figura 17: Oxidación de sustratos no fenólicos catalizados por la lacasa (Archibald y col., 1997).

La reacción de la lacasa no es específica de sustratos orgánicos y no oxida únicamente compuestos fenólicos. Este enzima, junto con la peroxidasa y la aril alcohol oxidasa, está involucrada en el mecanismo, aun sin dilucidar y característico de los hongos, de la degradación de la lignina. También puede catalizar oxidaciones de compuestos como el alcohol coniferil, ácido vanílico, *p*-cresol, ácido ascórbico, *p*-fenilenodiamino, fenilenediamina e incluso el radical ampliamente utilizado para medir la actividad antioxidante, el ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) en su forma reducida. En presencia de los mediadores redox adecuados, la lacasa también puede oxidar sustratos no fenólicos.

Las lacasas mejor estudiadas son las de *Pleurotus sp.*, *Lentinus sp.* y otra serie de hongos menos conocidos, incluso algunos no comestibles, ya que además de ser hongos que se cultivan para ser consumidos como alimento (los dos primeros mencionados), sus micelios se cultivan en biofermentadores para, por ejemplo, la transformación de ciertos compuestos en otros de aplicación industrial, la destrucción de tintes específicos

o la bio-descontaminación de diferentes residuos orgánicos entre algunas de sus múltiples aplicaciones.

Las lacasas de *Lentinus sp.* y *Pleurotus sp.* también son enzimas que utilizan cobre como cofactor lo que les da color azulado cuando son aisladas y purificadas. Algunas pueden ser secretadas al medio exterior junto con otras enzimas oxidativas como peroxidasas, glucosidasas, amilasas, etc., para una mejor degradación de los sustratos que les sirven de alimento. Así pues, la actividad de estas enzimas varía durante el ciclo de crecimiento de estos hongos, tanto durante el periodo de expansión del micelio como durante el desarrollo de los cuerpos fructíferos (Ratcliffe y col., 1994). La presencia de algunos compuestos en los sustratos que colonizan, como el aceite de girasol o un compuesto específico como el ácido ferúlico, etc., inducen el aumento de la actividad lacasa. Las lacasas de *P. ostreatus*, tanto la que secreta como la que retiene en el micelio, son proteínas monoméricas de unos 59 kD (Rajaratnam y col., 1998) aunque se conocen 4 genes que codifican 4 isoformas, POXA 1b, POXA 1w, POXA A2 y POXC, este último gen es el que se expresa más activamente (Dias-Ferreira-Polónia, 2003).

Algo menos estudiadas son las lacasas de otros hongos como las de *Cantharellus cibarius*, esta lacasa homodimérica de 46 kD cada unidad, es particularmente interesante porque su actividad es máxima a pH 4 y 50°C, condiciones bastante diferentes a las de su ambiente natural (Ng y Wang, 2004).

1.1.4.2. Peroxidasas (POD)

Las peroxidasas (POD) son enzimas que catalizan la oxidación de sustratos no específicos, pero relacionados con compuestos fenólicos, en presencia de peróxido de hidrógeno aparentemente obtenido por la acción de otras enzimas denominadas Aril-alcohol oxidasas (figura 18). En los hongos, se han descrito diferentes tipos de peroxidasas y se agrupan como peroxidasas dependientes de manganeso (MnP) y peroxidasas que no requieren de la presencia de manganeso en el medio para catalizar su reacción, estas enzimas se suelen llamar peroxidasas independientes de manganeso o peroxidasas de lignina (LiP) según diferentes autores.

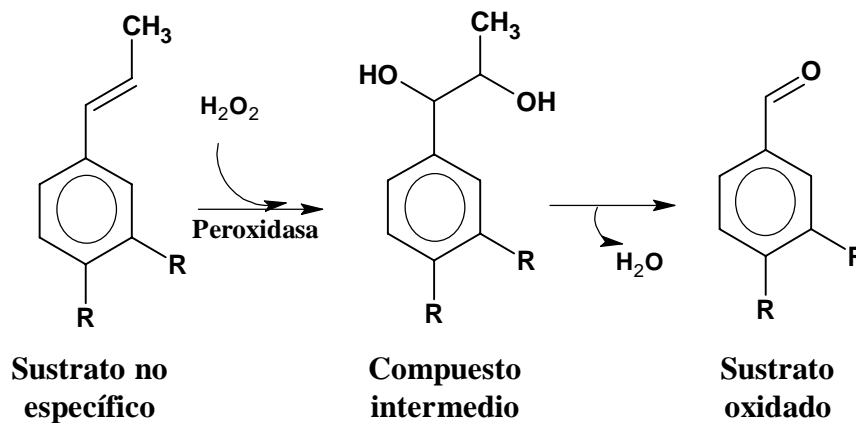


Figura 18: Reacción de oxidación catalizada por las peroxidasas.

También existe una tendencia a clasificar los hongos dependiendo de su perfil de producción de peroxidasas ya que siempre suelen producir más de un tipo. Así, los tres grupos principales serían:

- 1- Hongos productores de peroxidasas de lignina y dependientes de manganeso donde estarían incluidos hongos no comestibles, como modelos se encuentran *Phanerochaete chrysosporium* y *Phlebia radiata*.
- 2- Hongos productores de peroxidasas dependientes de manganeso y lacasas, este grupo incluye a la mayor parte de hongos comestibles y a otros como *Dichotimus squalens*.
- 3- Hongos productores de peroxidasas de lignina y lacasas, donde se incluyen otros hongos como *Phlebia ochraceofulva* y *Junghuhnia separabilima* (Dias-Ferreira-Polónia, 2003).

Las MnP de *Pleurotus sp.*, *Lentinus sp.* y otros hongos del mismo grupo son hemoproteínas de 46 kD con una porfirina como grupo prostético. Al igual que ocurría con las lacasas, estas enzimas se producen según el medio en el que se encuentran tanto el micelio como el cuerpo fructífero y responden a inhibidores o promotores presentes según el tipo de sustrato donde se cultivan. Estas enzimas están siempre activas y, al igual que las lacasas, también se pueden encontrar dentro de las hifas que forman el micelio (sexuales y asexuales) y el cuerpo fructífero (sexuales) o ser secretadas al exterior. Normalmente, un aumento en la actividad peroxidasa supone al mismo tiempo, un poco antes o un poco después (dependiendo de la especie de hongo) un aumento en la actividad lacasa ya que aparentemente trabajan juntas en la degradación del medio

donde crecen. Ésto se ha comprobado también en otras especies como en *Agaricus* (*A. bisporus*, *A. arvensis* y *A. blazei*) que normalmente sólo presentan actividad tirosinasa y lacasa, pero en algunas condiciones, sobre todo si el medio lleva salvado, pueden expresar peroxidasas (MnP) (Lankinen *y col.*, 2004; Chun y Cui, 2002).

1.2. Los hongos como alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son una nueva categoría de alimentos que están generando un elevado interés entre los consumidores y en la industria alimentaria. Sin embargo, aunque el término “alimento funcional” está bastante extendido, la Unión Europea, por el momento, no reconoce a los alimentos funcionales como una categoría específica de alimentos (Coppens *y col.*, 2006). Ahora bien, debido a que la comercialización de este tipo de alimentos va en aumento, la Unión Europea ha desarrollado un reglamento específico (CE nº 1924/2006 del Parlamento Europeo del 20 de diciembre de 2006) relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables de los alimentos. Así, las alegaciones de propiedades saludables para un determinado alimento, deberán estar respaldadas por rigurosos estudios científicos.

Un alimento puede considerarse “funcional” si se demuestra satisfactoriamente que, además de su efecto nutritivo, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo de modo que mejora el estado de salud o bienestar o reduce el riesgo de enfermedad (Diplock *y col.*, 1999). Esta definición es la que propone el FUFOS (Functional Food Science in Europe), y en ella cabe destacar tres aspectos importantes: (1) el efecto funcional es distinto del nutritivo, (2) debe demostrarse satisfactoriamente y (3) puede consistir en una mejora de las funciones fisiológicas o en una reducción del riesgo de padecer alguna enfermedad. Esta definición, si bien es amplia debe ir acompañada de ciertas premisas, entre las que destacan: que el alimento funcional debe ejercer su función en el organismo cuando se ingiere en cantidades normales de consumo, y que debe mantener tanto la estructura como la forma de un alimento. En esta línea, se introdujo la denominación de “nutracéutico”, cuando se trata de preparados que también poseen una actividad funcional beneficiosa para el organismo, pero que no respetan la presentación y estructura de un alimento convencional. Son por tanto, preparados en polvo, comprimidos, cápsulas, y otras presentaciones no habituales en alimentos. Por ello, los nutracéuticos son empleados comúnmente como suplementos alimenticios, por ejemplo, para complementar determinados tipos de dietas.

Actualmente, y debido a la creciente preocupación de los consumidores por el binomio alimentación y salud, el mercado de los alimentos funcionales es un sector que se encuentra en continua expansión. Así, se pueden encontrar margarinas enriquecidas con ésteres de fitoesteroles o fitoestanoles que son sustancias vegetales que ayudan a reducir los niveles de colesterol en el organismo, aceites de girasol ricos en ácido oleico que es una grasa monoinsaturada que contribuye a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, yogures pre- o probióticos que contienen cultivos vivos beneficiosos añadidos como el *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.*, y/o oligosacáridos de cereales con el fin de mejorar el equilibrio microbiano intestinal, huevos enriquecidos en ácidos grasos esenciales omega-3 (provenientes de aceite de pescado) con el fin de controlar la hipertensión, las enfermedades vasculares, el metabolismo graso, etc., productos diseñados para mejorar la salud de la mujer a base de isoflavonas de la soja, etc.

En el caso de los hongos, los alimentos funcionales a base de hongos o de sus extractos no existen en España y son escasos en la UE, pero su volumen de mercado en Estados Unidos y Asia comienza a ser importante. Así, en 2003, la firma Mishima Foods Co. Ltd. patentó una bebida saludable que contiene un extracto antioxidante del hongo *Formes japonicus* (Patente japonesa JP-A-60-156614 [0005]). Al año siguiente, la empresa STN International patentó el uso de extractos de *Lentinus sp.* ricos en eritadenina para la producción de alimentos que reducen el nivel de colesterol en sangre (Patente USA 6814975 B1 Nov.9, 2004). Y desde entonces numerosas compañías han solicitado nuevas patentes (tabla 4).

Tabla 4: Algunas patentes que incluyen hongos en su composición y alegan propiedades saludables para ser vendidos como alimentos funcionales.

Número de patente	Año	Título	Ingredientes funcionales
10/235829	2002	Bebidas con extracto de <i>Fomes japonicus</i> extraído con miel y vinagre	Extracto de <i>Fomes japonicus</i> , miel y vinagre
11/257128	2005	Extractos de hongos con actividad anticancerígena	Extracto del micelio de <i>Ganoderma adspersum</i> , <i>Hypsizygyus ulmarium</i> , <i>Kuehneromyces mutabilis</i> , <i>Omphalotus olearius</i> , <i>Panus conchatus</i> , <i>Piptoporus betulinus</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> y <i>Trametes zonata</i>
WO/2006/071085	2006	Formulación de una tableta de leche con actividad inmunomoduladora y un método de preparación de la misma.	Mezcla de extractos de <i>Acanthopanax senticosus</i> , <i>Radix Adenophorae</i> , <i>Agaricus bisporus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i>
WIPO - WO/2007/063158	2007	Alimento funcional con efectos positivos en la prevención de enfermedades cardiovasculares.	Mezcla de hongos incluyendo extractos de <i>Ganoderma</i>
USPTO - 20070166320	2007	Agente para la prevención/mejora de la diabetes y alimento funcional para la prevención/mejora de la diabetes.	<i>Agrocybe aegerita</i> (Brig.) Sing
WO/2007/118368	2007	Té para la reducción de azúcar en la sangre y del proceso de éste.	Mezcla de <i>Ganoderma</i> , <i>Rhizoma Dioscoreae</i> , <i>Folium Camelliae sinensis</i> y <i>Semen Fagopyri Esculenti</i>
USPTO - 20080171103	2008	Alimentos saludables y funcionales para pacientes con obesidad usando patata morada.	Variedad específica de patata y glucanos de hongos
US 20080254168	2008	Formulación de alimentos deshidratados	Extracto de <i>L. edodes</i>
WO/2008/143365	2008	Composiciones que contienen chlorella y extractos de hierbas	Mezcla de extracto de chlorella con plantas y hongos como <i>Panax ginseng</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Valeriana frauriei birq</i> , <i>Poria cocus</i> , <i>Zerumbet Bupleurum scorzoneraefolium</i> , <i>Glycyrrhiza</i> junto con malta y miel.

También existen algunas compañías que ofrecen extractos o preparaciones que contienen hongos para el diseño de nuevos alimentos funcionales (tabla 5).

Tabla 5: Compañías que comercializan ingredientes funcionales obtenidos a partir de los hongos.

Compañía	País	Ingrediente funcional
Hangzhou New Nutraceutical Co., Ltd	China	Extracto de una mezcla de hongos
Leili Natural Products Co., Ltd .	Japon	Fucoidan (Polisacárido obtenido de ciertas algas y <i>Agaricus sp.</i>)
High-Tech Victory Biology Engineering (zhuhai) Co., Ltd	India	Fructooligosacáridos (scFOS) (polisacáridos de hongos)
Shanghai Nicechem Co.,Ltd .	China	Quitosán (oligosacárido modificado de la quinina de los hongos) D-glucosamina HCl,N-acetil-glucosamina (polisacáridos extraídos de hongos)
Garuda International INC.	USA	Extractos de hongos como <i>Agaricus blazei</i> , <i>Inonotus obliquus</i> , <i>Coriolus versicolor</i> , <i>Grifola frondosa</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Lentinus edodes</i> , entre otros.

Dentro de los productos que podemos encontrar en el mercado y que incluyen hongos destacan los nutracéuticos que se presentan en forma de cápsulas, tabletas o gotas que se comercializan especialmente en EEUU y Alemania (figura 19). Los más vendidos son aquéllos que contienen extractos de *Ganoderma lucidum* y que alegan múltiples propiedades bioactivas como potentes antioxidantes, antitumorales, antivirales, inmunomoduladoras y reguladoras del metabolismo graso como reductor del colesterol, etc., aunque últimamente se ha ampliado mucho la oferta de estas preparaciones incluyendo otras especies de hongos debido a nuevos estudios científicos realizados con resultados prometedores e incluso estudios clínicos (Wachtel-Galor y col., 2004).

También en los últimos años han aparecido varios productos alimenticios que alegan propiedades funcionales similares a las descritas para los productos nutracéuticos debido a la presencia de un hongo bioactivo (figura 20). Así, se pueden encontrar varias marcas de café que incluyen *Ganoderma lucidum*, *Agaricus blazeii* o una mezcla de *Ganoderma* y *Corcicordyceps*. También *Ganoderma* se incluye en preparados para elaborar chocolates, tés y barritas energéticas. *L. edodes* y algunas especies de *Pleurotus* se incluyen en panadería sustituyendo parte de la harina que se utiliza para su producción.



Figura 19: Productos nutracéuticos elaborados a base de hongos: cápsulas de *Ganoderma lucidum*, pastillas de *Agaricus blazei*, píldoras de shiitake y gotas de *Trametes versicolor*.



Figura 20: Alimentos funcionales comercializados que incluyen hongos como ingrediente bioactivo a) café con *Agaricus blazei*, b) chocolate con *Ganoderma lucidum*, c) extrusionados (chips) con *Lentinus edodes*, d) barras de *Pleurotus eryngii*.

Como se ha mencionado anteriormente, las propiedades beneficiosas para la salud que alegan estos productos funcionales son muy diversas, ya que son muchas las propiedades bioactivas que se han descrito en muchos de los hongos comestibles. De hecho las setas se han considerado desde hace milenios como remedios medicinales muy utilizados en la medicina popular asiática contra diversas enfermedades y desajustes de la salud. Estudios más recientes, con una mayor base científica, han confirmado la presencia de determinados compuestos, fracciones, etc., con interesantes propiedades bioactivas, que serían los responsables de los efectos beneficiosos para la salud derivados de la ingesta de determinadas setas (tabla 6). La mayoría de estos estudios y su posible utilización como alimentos funcionales se han visto recopilados en un libro presentado a finales del 2008 titulado “Los Hongos como alimentos funcionales” editado por Peter C. Cheung.

Tabla 6. Propiedades bioactivas de algunos hongos (Rajaratnam *y col.*, 1998).

<i>Especies</i>	<i>Componente</i>	<i>Función biológica</i>	<i>Referencia</i>
<i>Agaricus</i>	Extractos neutros/ácidos de agua caliente	Aumento de la velocidad de supervivencia de ratones con Sarcoma-180. Mejora el funcionamiento del hígado.	Mizuno <i>y col.</i> (1989a; 1989b) Ito <i>y col.</i> (1990)
<i>Agaricus bisporus</i>	Lectina	Aglutinación equitativa de todos los tipos de eritrocitos humanos (11%) examinados	Kawagishi <i>y col.</i> (1988)
<i>Agaricus blazei</i>	Derivados del ergosterol	Antitumoral	Mizuno <i>y col.</i> (1989)
<i>Agaricus blazei</i>	Glucoproteína	Actividad antitumoral contra Sarcoma-180	Kawagishi <i>y col.</i> (1990d) Mizuno <i>y co.</i> (1990; 1990a)
<i>Agaricus blazei</i>	β -D-glucano+proteína	Antitumoral	Kawagishi <i>y col.</i> (1990d)
<i>Agrocybe cylindracea</i>	β -D glucano	Antitumoral contra Sarcoma-180	Kino <i>y col.</i> (1989)
<i>Coriolus versicolor</i>	Polisacárido-proteína	Inhibición de la anormal proliferación de vasos sanguíneos	Kanon <i>y col.</i> (1990)
<i>Coriolus versicolor</i>	Proteína ligada a un polisacárido	Mejoramiento inmune 50,2% en ratones	Li <i>y col.</i> (1990)
<i>Flammulina velutipes</i>		Inhibe crecimiento Sarcoma-180; aumento de vida de ratón por 29%	Zhao <i>y col.</i> (1988)
<i>Flammulina velutipes</i>	PA5DE	Inhibe el crecimiento de tumor Sarcoma-180 implantado en ratón.	Cao <i>y col.</i> (1990)
<i>Ganoderma lucidum</i> <i>Lentinus edodes</i> <i>Cordyceps sp.</i> <i>Agaricus campestris</i>	Polisacáridos de extractos	Actividad anticomplementaria	Jeong <i>y col.</i> (1990)
<i>Ganoderma lucidum</i> <i>Grifola frondosa</i> <i>Agaricus blazei</i>	Polisacáridos; β -D glucanos	Antitumoral contra Sarcoma-180	Mizuno <i>y col.</i> (1988)
<i>Grifola frondosa</i>	Extracto agua caliente	Antitumoral	Nishida <i>y col.</i> (1988)
<i>Grifola frondosa</i>	Alcali soluble, β -D-glucano		Kato <i>y col.</i>
<i>Grifola frondosa</i>	Lectina de hongos	Aglutinación de todo tipo de eritrocitos equitativos; citotóxico contra células Hela	Kawagishi <i>y col.</i> (1990)
<i>Grifola frondosa</i>	Cobre ligado a un péptido	Con propiedades para enlazar en o para mantener el Cu en el estado soluble a pH fisiológico; aumento de absorción del Cu	Shimaoka <i>y col.</i> (1993)
<i>Lampteromyces japonicus</i>	Lamptero-flavin	Antioxidante	Uyakul <i>y col.</i> (1989)
<i>Lentinus adhaerens</i>	Antibiótico	Un receptor antagonista tromboxano A ₂	Laver <i>y col.</i> (1991)
<i>Lentinus edodes</i>		Acción protectora contra el daño al hígado experimental	Lin <i>y Haung</i> (1987)
<i>Lentinus edodes</i>	Extracto del medio de cultivo	Actividad inmunoestimulante y un efecto anti-HIV <i>in vitro</i>	Susuki <i>y col.</i> (1989) Lizuka <i>y Maeda</i> , (1988)
<i>Lentinus edodes</i>	Extracto del medio de	Actividad antiviral (contra HIV)	Lizuka <i>y col.</i>

	cultivo		(1990)
<i>Lentinus edodes</i>	Extracto de cultivo	Inhibición de la proliferación del virus herpes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Koga y col. (1991)
<i>Lentinus edodes</i>	Derivados de Lignina del medio de cultivo	Antiviral	Sorimachi y col. (1990)
<i>Lentinus edodes</i> <i>Polystictus versicolor</i>	Composición Theta de polisacáridos		Zheng y col. (1988)
<i>Lentinus edodes</i>	Polisacárido	Estimulación de la función inmune en ratones	Cao y col. (1989)
<i>Pleurotus ostreatus</i>			Mirjana y col. (1988)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Polisacárido	Reducción del colesterol en plasma e hígado en hámsters sirios	Bobek y col. (1991)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Lectina	Utilizado como factor coagulante sanguíneo	Hashimoto y col. (1990)
<i>Polyporus confluens</i>	Polisacárido	Actividad antitumoral	Ito y col. (1991)
<i>Polyporus confluens</i>	Extracto de cultivo	Antitumoral	Ito y col. (1991)
<i>Polyporus umbellatus</i>		Antitumoral	Zhu y col. (1988)
<i>Polyporus versicolor</i>	Polisacárido	Prevención del cáncer en hígado	Wang y col. (1996)
<i>Polystictus versicolor</i>	Polisacárido	Prevención de lepatoma	Xu y col. (1989)
<i>Tirmania pinoyl</i>		Mutágeno y antimutágeno según los distintos solventes	Hanran y col. (1989)

1.2.1. Propiedades antioxidantes

Las propiedades antioxidantes de los hongos que más se consumen (tanto cultivados como silvestres) se han evaluado utilizando la mayoría de los métodos *in vitro* estandarizados, tales como el TEAC, método del β -caroteno-ácido linoleico, método de los dienos conjugados, habilidad captadora de radicales hidróxilo o DPPH[•], habilidad quelante del ion hierro (poder reductor), inhibición de la oxidación lipídica, etc., y muestran valores intermedios si se comparan con los obtenidos por algunas frutas y verduras. Por ejemplo, algunos hongos cultivados como las setas portabella y los criminis (dos variedades de *A. bisporus*) muestran valores de capacidad captadora de radical (medidas mediante el método ORAC) de 9,7 y 9,5 μ moles trolox/g, respectivamente; mientras que la zanahoria y la judía verde muestran valores de ORAC de 5, el pimiento rojo 10 y el brócoli 12 μ moles trolox/g (Dubost y col., 2007; Zhou y Yu, 2006). Sin embargo, no existen muchos estudios de comparación entre los hongos y las plantas, productos animales u otros alimentos, ya que la mayoría de los trabajos se han centrado en la comparación entre sí de las diferentes especies de hongos.

El método para medir la capacidad captadora de DPPH• ha sido uno de los test *in vitro* más frecuentemente utilizado para evaluar la actividad antioxidante de muchas especies de hongos (tabla 7) y los resultados varían de un autor a otro, probablemente por las distintas condiciones medioambientales o de cultivos, o por el estado de desarrollo de los esporóforos cuando se recolectaron o por la variación genética existente entre las diferentes variedades. A pesar de todo, tanto los extractos metanólicos como los acuosos (realizados normalmente con agua caliente) obtenidos de los hongos estudiados muestran valores de EC₅₀ entre 0,01 y 34 mg/mL, que son valores similares a los de muchas plantas, y además, la mayoría de los hongos que más comúnmente se consumen como *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Boletus edulis* y *Lentinus edodes* siempre están clasificados dentro de los hongos con propiedades antioxidantes más elevadas en comparación con otras especies menos comunes.

El radical ABTS^{•+} es otro de los radicales frecuentemente utilizado para medir la capacidad antioxidante de los compuestos solubles en agua extraídos de los diferentes hongos. Pero, al igual que ocurría con el DPPH•, los resultados difieren según los diferentes trabajos. Por ejemplo, *A. bisporus* muestra la mayor capacidad de captación de ABTS^{•+} en la comparación que llevaron a cabo (Lee y Jang, 2004) con otras 5 especies, *Pleurotus eryngii* fue elegido como el mejor por (Choi y col., 2005) de entre otras 8 especies y *B. edulis* fue el mejor de entre otras 3 especies (Sarikurkcu y col., 2008). De forma similar si se mide, por ejemplo el poder reductor, *Termitomyces heimii* se el hongo que mejor valor presentaba de entre otras 23 especies estudiadas por (Puttaraju y col., 2006), pero de acuerdo con los resultados de (Elmastas y col., 2007) los extractos etanólicos de *Russula delica* y *Verpa conica* fueron mejores que otras 5 especies que no estaban incluidas en la comparación anterior. Además, en estos estudios no siempre se incluyen compuestos patrón y los resultados se suelen expresar de forma diferente, algunos autores calculan las actividades antioxidantes como sus EC₅₀ o EC₂₅, pero otros prefieren indicar sus resultados como porcentaje efectivo de reducción para una concentración fija, etc. Así pues, resulta prácticamente imposible organizar o clasificar todas las especies analizadas atendiendo a las propiedades antioxidantes evaluadas.

Tabla 7: Especies de hongos comestibles ordenados según sus propiedades de captación del radical DPPH*.

Tipo de extracto	EC ₅₀ o EC ₂₅ (mg/mL)	Orden de mayor a menor capacidad de captación de DPPH*	Referencia
Etanol	EC ₂₅ (1-25)	<i>Agaricus blazei</i> > <i>Agaricus cylindracea</i> > <i>Boletus edulis</i>	Tsai y col., 2007
Metanol	EC ₅₀ (0,01-0,02)	<i>BHA</i> > α -tocoferol> <i>Lepista nuda</i> > <i>Russula delica</i> > <i>Polyporus squamosus</i> > <i>Pleurotus ostreatus</i> > <i>Agaricus bisporus</i> > <i>Verpa conica</i> > <i>Boletus bodius</i>	Elmastas y col., 2007
Metanol	EC ₅₀ (1,44-3,50)	<i>Lycopaxillus giganteus</i> > <i>Sarcodon imbricatus</i> > <i>Agaricus arvensis</i>	Barros y col., 2007
Metanol	EC ₅₀ (2-45)	<i>Dictyophora indusiata</i> > <i>Grifola frondosa</i> = <i>Hericium erinaceus</i> = <i>Tricholoma giganteum</i>	Mau y col., 2002
Metanol	EC ₂₅ (<0,25->15)	<i>B. edulis</i> > <i>Xerocomus chrysenteron</i> > <i>Suillus collitinus</i>	Sarikurkcü y col., 2008
Metanol 80%	EC ₂₅ (<0,4->0,8)	<i>A. bisporus</i> > <i>Hypsizigus marmoreus</i> > <i>Volvariella volvacea</i> > <i>Flammulina velutipes</i> > <i>Pleurotus eryngii</i> > <i>P. ostreatus</i> > <i>Lentinus edodes</i> > <i>H. erinaceus</i>	Fu y Shieh 2002
Etanol 75%	EC ₅₀ (0,31->2,42)	<i>A. bisporus</i> > <i>V. volvacea</i> > <i>P. ostreatus</i> > <i>L. edodes</i> > <i>F. velutipes</i>	Lee y Jang 2004
Metanol	EC ₂₅ (2-6)	<i>V. volvacea</i> > <i>L. edodes</i>	Cheung y col., 2003
Metanol	EC ₅₀ (4-8)	<i>P. ostreatus</i> > <i>L. edodes</i> (1) > <i>P. cystidiosus</i> > <i>F. velutipes</i> (1) > <i>L. edodes</i> (2) > <i>F. velutipes</i> (2)	Yang y col., 2002
Metanol	EC ₅₀ (0,1-35)	<i>Auricularia fuscossuccinea</i> (white strain) > <i>Auricularia mesenterica</i> > <i>Auricularia polytricha</i> > <i>Auricularia fuscossuccinea</i> (brown strain) > <i>Tremella fuciformis</i>	Mau y col., 2001
Metanol	EC ₅₀ (8,52-22,9)	<i>Lactarius deliciosus</i> > <i>Tricholoma portentosum</i>	Ferreira y col., 2007
Metanol	EC ₅₀ (6,95-33,7)	<i>Macrolepiota procera</i> > <i>Macrolepiota mastoidea</i> > <i>S. imbricatus</i> > <i>L. deliciosus</i>	Barros y col., 2007
Metanol	EC ₅₀ (1,24-14,5)	<i>Termitomyces tylerance</i> > <i>B. edulis</i> > <i>Morchella conica</i> = <i>Russula brevipes</i> = <i>Termitomyces microcarpus</i> > <i>Termitomyces shimperi</i> > <i>Cantharellus clavatus</i> > <i>Lentinus sajor-caju</i> > <i>Pleurotus djamor</i> > <i>Morchella angusticeps</i> > <i>Pleurotus sajor-caju</i> > <i>Termitomyces mummiformis</i> = <i>Macrolepiota procera</i> > <i>Lentinus squamulosus</i> > <i>Sparassis crispa</i> > <i>L. deliciosus</i> > <i>Cantherellus cibarius</i> > <i>Auricularia polytricha</i> > <i>Hydnum repandum</i>	Puttaraju y col., 2006
Etanol	EC ₅₀ (0,81-558)	<i>Clitocybemaxima</i> > <i>Pleurotus ferulae</i> > <i>P. ostreatus</i>	Tsai y col., 2009
Agua (100°C)	EC ₅₀ (1,10-10,9)	<i>T. heimii</i> > <i>T. mummiformis</i> > <i>B. edulis</i> > <i>C. clavatus</i> > <i>M. angusticeps</i> > <i>L. squamulosus</i> > <i>H. crispa</i> = <i>P. sajor-caju</i> = <i>R. brevipes</i> > <i>H. repandum</i> > <i>S. crispa</i> > <i>T. shimperi</i> = <i>L. deliciosus</i> > <i>L. sanguifluus</i> > <i>T. tylerance</i> > <i>T.</i>	Puttaraju y col., 2006

		<i>microcampus</i> > <i>P. djamor</i> > <i>G. arinarus</i> > <i>M. procera</i> > <i>M. conica</i> > <i>C. cibarius</i> > <i>A. polytrica</i> > <i>L. sajor-caju</i>	
Agua (100°C)	EC ₂₅ (0,12-1,0)	<i>Tricholomopsis rutilans</i> > <i>Suillus bellini</i> > <i>B. edulis</i> > <i>Suillus granulatus</i> > <i>Amanita rubescens</i> > <i>Suillus luteus</i> > <i>Hygrophorus agathosmus</i> > <i>Tricholoma ecuestre</i> > <i>Russula cyanoxantha</i>	Ribeiro y col., 2006
Agua (100°C)	EC ₂₅ (1-6)	<i>A. blazei</i> > <i>Agrocybe cylindracea</i> > <i>B. Edulis</i>	Tsai y col., 2007
Agua (100°C)	EC ₂₅ (0,18-0,83)	<i>B. edulis</i> > <i>Suillus granulatus</i> > <i>Amanita rubescens</i> > <i>Russula cyanoxantha</i>	Ribeiro y col., 2008
Agua (80°C)	EC ₅₀ (0,88-35)	<i>A. bisporus</i> > <i>L. edodes</i> > <i>V. volvacea</i> > <i>P. ostreatus</i> > <i>F. velutipes</i>	Lee y Jang 2004
Agua (100°C)	EC ₅₀ (14,8-22,9)	<i>P. ostreatus</i> > <i>P. ferulae</i> > <i>C. maxima</i>	Tsai y col., 2009
Agua (100°C)	EC ₅₀ (2-12)	<i>L. edodes</i> > <i>V. volvacea</i>	Cheung y col., 2003

1.2.1.1. Compuestos antioxidantes presentes en los hongos

Ergotioneína

Uno de los compuestos antioxidantes más potentes que se ha aislado de varias especies de hongos es la ergotioneína (ERT). Este compuesto está presente en los hongos en una alta concentración si se compara con otras fuentes como el hígado (10,78–8,71), legumbres (13,49–4,52), ajo (3,11), yema de huevo (0,68), trucha (0,07 mg/kg pf), etc., siendo *B. edulis* el hongo que presenta con gran diferencia la concentración de ergotioneína más elevada de todos los alimentos, 528,14 mg/kg pf (Ey y col., 2007). Otros hongos más comunes como el *A. bisporus* presentan concentraciones que rondan 0,21-0,47 mg/g ps (Dubost y col., 2006; Dubost y col., 2007). Aunque *P. ostreatus* (2-2,59 mg/g ps) y *L. edodes* (1,98-2,09 mg/g ps) mostraron niveles más altos.

La ergotioneína (figura 21) es un compuesto tiol hidrosoluble (2-tioimidazol betaína) que recientemente ha despertado mucho interés por su habilidad *in vivo* para capturar el oxígeno singlete, radicales hidróxilos y peróxilos actuando como un agente protector contra el estrés oxidativo (Franzoni y col., 2006). Existen muchos estudios que señalan a este compuesto como un compuesto potencialmente interesante para tratar patologías inducidas por el estrés oxidativo (Aruoma y col., 1999; Deiana y col., 2004; Colognato y col., 2006).

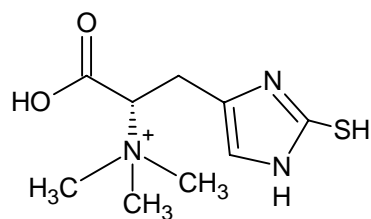


Figura 21. Estructura molecular de la ergotioneína de *A. bisporus*.

La actividad antioxidante de este compuesto se ha estudiado utilizando diversos métodos, así la ergotioneína tiene una actividad captadora del ácido hipocloroso (HClO) ($EC_{50} = 70,68 \mu\text{M}$) similar a algunos compuestos fenólicos importantes característicos de plantas como flavonoles (isoquercitrina $EC_{50} = 77,88 \mu\text{M}$), catequinas (epigallocatequina $EC_{50} = 67,44 \mu\text{M}$) y fenoles más simples (ácido rosmarínico $EC_{50} = 23,55 \mu\text{M}$). También posee valores de TEAC (0,87 mmol trolox/L) similares a miricitrina, mayores que genisteína pero menores que quercetina, ácido elágico, etc. Sus valores FRAP (0,89 mmol Fe (II)/L) son inferiores que muchos flavonoides y fenoles excepto para ramnetina e isoramnetina (Soobrattee *et al.*, 2005).

Este compuesto se puede extraer con agua y concentrar fácilmente, así (Bao *et al.*, 2008) han obtenido unos extractos procedentes de cuerpos fructíferos de *Flammulina velutipes* que contenían hasta 3,03 mg/mL ergotioneína. Sin embargo, estos autores observaron que la fracción concentrada tenía mayor capacidad de captación de DPPH• y mayor capacidad de suprimir la oxidación lipídica que un patrón de ergotioneína a la misma concentración, lo que sugiere que, aparte de ergotioneína, existen otros compuestos hidrosolubles que también contribuyen a las propiedades antioxidantes de los hongos.

Polisacáridos

Actualmente, los polisacáridos fúngicos son centro de atención para muchos investigadores por su composición especial en carbohidratos y sus estructuras, ya que éstas aparentemente les confieren importantes propiedades biológicas como agentes antitumorales e inmunomoduladores. Estas fracciones de polisacáridos están normalmente unidas a proteínas formando complejos específicos y también se ha puesto de manifiesto que poseen propiedades antioxidantes, aunque aun no está claro si todas estas actividades biológicas están o no relacionadas (Liu *et al.*, 1997).

Las fracciones de polisacáridos obtenidos de *Ganoderma lucidum*, *Grifola umbellata*, seguidos por *Tricholoma lobayense*, *Tremella fuciformis* y *Volvariella volvacea* poseen importantes actividades de captación de radicales superóxido e hidróxilo, mientras que otros polisacáridos como el lentinano (de *L. edodes*) y el esquizofilano (de *Schizophyllum commune*) casi no tienen actividad. PSK, un polisacárido unido a proteína extraído de *Coriolus versicolor* posee una capacidad de captación de radicales superóxidos muy rápida, si se estudia utilizando un sistema específico que no necesita células y que consiste en medir la actividad hipoxantina-xantina oxidasa. Aparentemente, la actividad de captación de radicales superóxidos de las fracciones de polisacáridos depende de la cantidad de proteína o péptido que tienen en sus complejos polisacárido-proteína. Por ejemplo, el lentinano y el esquizofilano, que sólo contienen trazas de proteína, prácticamente no tienen actividad antioxidante (Liu y col., 1997).

Además, los polisacáridos de los hongos pueden potenciar los sistemas de defensa *in vivo* contra el daño oxidativo. Los cuerpos fructíferos de *Pleurotus abalonus* producen un complejo polisacárido-péptido (F22) capaz de aumentar la actividad y expresión génica de enzimas antioxidantes y de reducir la peroxidación lipídica en ratones con senescencia acelerada (Li y col., 2007). El pleurano, otro β -1,3-D-glucano que se extrae de *Pleurotus ostreatus* mejora el estatus antioxidante de las ratas (aumenta las actividades superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-PX) y glutatión reductasa (GRD) en hígado) y disminuye el efecto que producen las lesiones precancerosas inducidas por dimetilhidrazina en colon de ratas (Bobek y Galbavy, 2001) y un extracto de polisacáridos de *Lentinus edodes* incrementa de forma significativa las actividades de las enzimas antioxidantes del suero y disminuye los niveles de interleucina-2 y factor tumoral de necrosis alfa en mucosas y suero de ratas con ulceración oral (Yu y col., 2009).

Selenio

El selenio juega un papel muy importante en los sistemas antioxidantes del cuerpo humano, actuando como cofactor de GSH-PX, potenciando las actividades del α -tocoferol y ayudando a los mecanismos de reparación del DNA. Como se mencionó anteriormente, los esporóforos de *Boletus sp.* poseen altas concentraciones de este compuesto, entre 1-5 mg/kg ps (*B. edulis*, *B. pinicola* y *B. aestivalis*) (Kalac, 2009). Pero, otras especies de hongos que tengan este mineral en concentraciones menores,

como *A. bisporus*, se pueden reforzar añadiendo selenito de sodio a sus sustratos de cultivo (Spolar y col., 1999).

Fenoles y otros compuestos antioxidantes

Los compuestos responsables de la actividad antioxidante descritos en los hongos aun no se han identificado totalmente. Hay muchas publicaciones que correlacionan esta actividad con el contenido de fenoles totales (Mau y col., 2002; Cheung y Cheung, 2005; Elmastas y col., 2007; Jayakumar y col., 2009) pero ésto no se ajusta para todas las especies, como en el caso de *Auricularia sp.* y *Tremella fuciformis* (Mau y col., 2001). Además, estas correlaciones se calculan normalmente comparando sólo unas pocas especies de hongos y algunas de ellas están localizadas filogenéticamente muy alejadas las unas de las otras, lo que indica que probablemente sus rutas metabólicas sean muy diferentes, así que deben de contener un gran número de metabolitos bioactivos totalmente distintos. Parece difícil creer que con tal variedad de especies de hongos distintas, que presentan una gama tan amplia de colores, texturas, sabores y formas de cuerpos fructíferos, sus propiedades antioxidantes se deban, en todos ellos, a uno o un par de grupos de compuestos comunes para todas las especies.

Por ello, se han medido otros tipos de compuestos con actividad antioxidante para poder establecer otras posibles relaciones. Por ejemplo, (Ribeiro y col., 2006) midieron y cuantificaron tanto los ácidos orgánicos como los compuestos fenólicos (mencionados anteriormente) en varias especies de hongos, los fenoles se encontraban en menor proporción que los ácidos orgánicos, sin embargo no encontraron ningún tipo de correlación entre el total de ácidos ni de fenoles y la actividad captadora de DPPH•.

El ergosterol y sus derivados (Vit. D₂, el 5a,8aepidioxi-22E-ergosta-6, 22-dien-3b-ol, etc.) son también compuestos biológicamente activos y entre otras funciones son capaces de disminuir la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos de rata (Kobori y col., 2007).

Como se indicó anteriormente, algunas especies de hongos contienen vitamina C, aunque no es uno de los compuestos más abundantes, así que en ningún trabajo se atribuye la alta capacidad antioxidante encontrada en algunas especies a su contenido en

ácido ascórbico. Tampoco se han encontrado correlaciones entre otros tipos de compuestos antioxidantes como el contenido en tocoferoles, carotenoides, etc.

1.2.1.2. Influencia del estado de desarrollo del cuerpo fructífero y de las condiciones de cultivo

Sólo unos pocos estudios describen de forma indirecta la influencia de los substratos de cultivo o las condiciones medioambientales en el contenido en antioxidantes de los hongos. Por ejemplo, si los hongos se cultivan en oscuridad o son hongos silvestres que reciben ciclos de luz de día/noche tienen diferentes contenidos en vitamina D₂ (Teichmann y col., 2007) siendo mayor en los hongos que reciben iluminación, ya que la vitamina D₂ se sintetiza por transformación del ergosterol en presencia de luz. Sin embargo, el ergosterol tiene 19 veces mayor actividad como inhibidor de peroxidación lipídica liposomal que la vitamina D₂ (Wiseman, 1993) así que un contenido mayor en vitamina D₂ supondrá una reducción en las propiedades antioxidantes.

Además, los extractos etanólicos de los cuerpos fructíferos de *A. bisporus* que se recolectan en estados de madurez 1, 4 y 5 muestran mayor actividad antioxidante (determinada por el método del dieno conjugado) que si se recolectan en los estados 2 y 3 (figura 4). Pero su poder reductor y sus propiedades como captadores de radicales son independientes de estado de desarrollo (Tsai y col., 2008).

Los cuerpos fructíferos de *A. blazei* en estado joven y maduro también mostraron las mismas propiedades antioxidantes, excepto en su capacidad para quelar iones hierro, que fue mayor en los cuerpos fructíferos maduros que en los jóvenes. Estas diferencias no se deben a su contenido en compuestos fenólicos sino probablemente a sus variaciones en los niveles de ácidos dicarboxílicos (Soares y col., 2009). También en *Lactarius piperatus*, la mayor capacidad antioxidante se obtenía cuando los cuerpos fructíferos se encontraban en estado maduro con esporas inmaduras (Barros y col., 2007d).

Los antioxidantes de los hongos se encuentran distribuidos de forma desigual entre los distintos tejidos del cuerpo fructífero (figura 3). Los extractos metanólicos que se obtienen de las laminillas tienen mayor capacidad de captación de DPPH• y ABTS^{•+} que los que se obtienen de los sombreros o los pies de *A. bisporus* (Savoie y col., 2008)

mientras que los sombreros tienen mayor poder reductor y capacidad de captación de radicales libres que sus pies en especies como *Lactarius deliciosus*, *Tricholoma portentosum*, *Russula cyanoxantha*, *B. edulis* y *Suillus granulatus* excepto *Amanita rubescens*, cuyos pies tienen mayor actividad que sus sombreros. Estas diferencias parecen que se deben a las variaciones en la distribución de ciertos constituyentes; por ejemplo, los compuestos fenólicos, ácidos orgánicos y alcaloides se localizan principalmente en el sombrero excepto en *B. edulis*, que muestra igual distribución de alcaloides, y *A. bisporus* que tiene más compuestos fenólicos en los pies (Ferreira y col., 2007; Ribeiro y col., 2008; Savoie y col., 2008).

1.2.1.3. Influencia de la diversidad entre variedades e híbridos

La variedad más cultivada de *Agaricus bisporus* es un híbrido llamado U1 pero hay muchas otras variedades con diferentes colores de sombrero que incluyen toda la gama desde el blanco hasta el marrón oscuro. Además, los cuerpos fructíferos normalmente se recolectan en estado de desarrollo 2 ó 3, cuando las laminillas no son visibles, pero hay algunas especies marrones que se recolectan cuando el sombrero está totalmente abierto, estas últimas se comercializan con el nombre de Portobella.

La capacidad antioxidante varía también dependiendo de las variedades de *A. bisporus* que se estudien, así, los Portobellas tienen capacidades antioxidantes más elevadas (medidos según los test de HORAC, NORAC y SORAC que utilizan HO^\bullet , ONOO^- y O_2^- como radicales) comparados con otras variedades blancas y marrones (setas crimini) y además también poseen mayor contenido en ergotioneína y compuestos fenólicos (Dubost y col., 2007). También se encuentran diferencias significativas entre especies de *A. bisporus* comercializadas y silvestres siendo normalmente mayores en las silvestres e independientemente del color de su sombrero (Savoie y col., 2008). Cuando la comparación se realiza entre varias especies del género *Agaricales*, *A. silvaticus* tiene mayor capacidad de captación de DPPH, mayor poder reductor y contenido en fenoles que *A. arvensis*, *A. bisporus*, *A. romagnesii* y *A. silvicola* (Barros y col., 2008b).

De forma similar en otras especies como *Pleurotus sp.*, *Lentinus sp.*, etc., se encuentran importantes diferencias según el tipo de variedad considerada (tabla 7).

1.2.2. Propiedades antimicrobianas

En la naturaleza, desde siempre se ha producido una lucha por la supervivencia de los hongos sobre otros microorganismos, por lo que no es de extrañar que los hongos comestibles, aunque sean basidiomicetos complejos y superiores produzcan antibióticos o compuestos tóxicos para otras especies, confiriéndoles propiedades antimicrobianas contra bacterias, levaduras y otro tipo de hongos.

El hongo más estudiado, en cuanto a sus propiedades antimicrobianas, es el *L. edodes*. Algunos autores describen la presencia, en este hongo, de al menos tres compuestos con capacidad antibacteriana que se extraen con cloroformo, acetato de etilo o agua de los cuerpos fructíferos secos. Estos extractos se muestran activos frente a algunas bacterias como *Streptococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Prevotella spp.*, y *Pophyromonas spp.*, mientras que *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Escherichia spp.*, *Bacillus spp.* y *Candida spp.* son menos sensibles a dichos extractos (Hirasawa y col., 1999). Estos autores también indican que los extractos realizados con cloroformo y acetato de etilo son mucho más activos que los acuosos, indicando que los compuestos responsables de dicha actividad antimicrobiana son, en el caso de los extractos obtenidos con cloroformo la lentionina, mientras que en los de acetato de etilo un derivado de dicho compuesto. En cuanto a los compuestos activos de la fracción acuosa señalan que son sensibles al calor pero sin determinar su naturaleza.

En este sentido, a partir de los cuerpos fructíferos de *L. edodes* (Ngai y Ng, 2003) aislaron una proteína denominada lentina con una importante actividad antifúngica. Esta proteína con un peso molecular de 27,5 kDa inhibe el crecimiento del micelio de una gran cantidad de hongos, incluyendo *Physalospora piricola*, *Botrytis cinerea* y *Hycosphaerella arachidicola*.

El micelio de *L. edodes* (cultivado en medios líquidos) también posee propiedades antibacterianas, al parecer debidas a un compuesto orgánico extraíble con cloroformo. Los análisis indicaron que su poder antifúngico frente a *Candida albicans* y antibacteriano frente a *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus megaterium* se debía probablemente a un compuesto azufrado llamado lentionina (1,2,3,5,6-pentatieno) y su derivado (bis [(metilsulfonil) metil] bisulfito) (Hatvani,

2001) que posee un fuerte efecto inhibidor del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* (Hatvani, 2001) (Takazawa y col., 1982; Vattem y col., 2004). Además, a partir del micelio de *L. edodes*, (Komemushi y col., 1996), aislaron e identificaron un compuesto llamado lentinamicina que presentaba actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas y según el medio de cultivo donde se creciera podría también producir otros compuestos antimicrobianos.

El compuesto antibacteriano más importante aislado del *Lentinus crinitus* y caracterizado es un triquinano lineal llamado 1-desoxihipnofilina que recientemente se ha podido sintetizar por métodos químicos (Harrowven y col., 2001).

En otros hongos, como el *Pleurotus ostreatus*, también se han observado actividades antimicrobianas. Así, estudios de (Beltran-Garcia y col., 1997) demostraron que compuestos volátiles extraídos del cuerpo fructífero como la 3-octanona, 3-octanol, 1-octen-3-ol, benzaldehído, 1-octanol, ácido benzoico y un componente sin identificar soluble en cloroformo, poseían una fuerte actividad antibacteriana frente a *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *S. typhimurium*. Además, a partir del cuerpo fructífero de este hongo también se ha extraído un péptido con capacidad antifúngica, denominado pleurostrin que inhibe el crecimiento del micelio de los hongos *Fusarium oxysporum*, *Mucosphaerella arachidicola* y *Phycalospora piricola* (Chu y col., 2005). En este sentido, a partir del cuerpo fructífero de *Pleurotus eryngii* también se ha aislado otro péptido antifúngico, denominado erygin, que inhibe el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Mucosphaerella arachidicola* (Wang y Ng, 2004).

Otros estudios ha demostrado que *Ganoderma lucidum* y otras especies de *Ganoderma* producen varios compuestos antimicrobianos, con distintas estructuras químicas, que son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias gram positivas y/o gram negativas. Así, extractos acuosos obtenidos de carpóforos de *G. lucidum* son capaces de inhibir el crecimiento de 15 tipos de bacterias gram + y gram -, especialmente el de *Micrococcus luteus* (Yoon et al., 1994). Además, dos farnesil hidroquinonas (ganomicina A y ganomicina B) aisladas de *G. Pfeifferi* exhiben actividad inhibitoria frente a una cepa resistente a la meticilina de *Staphylococcus aureus* y otra serie de bacterias gram + y gram - (Mothana et al., 2000). También esteroles como 5 α -ergosta-7,22-dien-3 β -ol o 5,8-epidioxi-5 α ,8 α -ergosta-6,22-dien-3 β -ol aislados del cuerpo fructífero de *G.*

applanatum inhiben el crecimiento de una gran cantidad de bacterias, destacando *Bacillus cereus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Streptococcus pyogenes* (Gao et al., 2005). *Flammulina velutipes* también sintetiza sesquiterpenoides contra *Cladosporium herbarum*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Saito y Kuwahara, 2005).

Sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre la actividad antimicrobiana y los compuestos bioactivos de hongos comestibles silvestres. Así, se han identificado algunos compuestos como la cliticibina, un antibiótico extraído del micelio de *Leucopaxillus giganteus* y un péptido producido por *Boletus sp.* ambos exhibiendo una actividad antimicrobiana frente a bacterias gram + (Lee y col., 1999; Barros y col., 2007c). Los ácidos cibárico y 10-hidroxi-8-decenoico obtenidos de *Cantharellus cibarius* también han demostrado actividad antimicrobiana, aunque menor que diversos sesquiterpenoides aislados de *Lactarius sp.* (Anke y col., 1996; Luo y col., 2005). Posteriormente, (Barros y col., 2007e) correlacionó la actividad antimicrobiana encontrada en los extractos metanólicos de *L. deliciosus* frente a *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* con su contenido en fenoles y flavonoides.

1.2.3. Propiedades antivirales

Las propiedades antivirales de determinados hongos son conocidas desde bastante tiempo, así el *L. edodes* se ha utilizado como remedio en la medicina tradicional china para curar el resfriado común durante cientos de años. Más recientemente, evidencias científicas han venido a corroborar este uso, demostrando que extractos acuosos de *L. edodes* eran capaces de inhibir el crecimiento del virus del resfriado común (Johl y col., 1995-96; Mattila y col., 2000).

Esta acción antiviral, en el caso de los hongos, puede producirse de forma directa mediante la inhibición de determinadas enzimas virales, de la síntesis de algunos ácidos nucleicos del virus, o de la absorción y replicación del virus en las células; y también de forma indirecta, mediante la estimulación del sistema inmune (Brandt y Piraino, 2000).

Dentro de las moléculas de pequeño tamaño, varios triterpenos aislados de *Ganoderma lucidum* (ganoderiol F, ganodermanontriol y ácido ganodérico) han demostrado tener una importante actividad antiviral frente al virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) (El-Mekkawy *y col.*, 1998). Del mismo modo, el ganodermediol, ligidadiol y ácido aplanoxídico, procedentes de *Ganoderma pfeifferi*, aunque también encontrados en otras especies de *Ganoderma*, poseen actividad antiviral frente al virus de la influenza tipo A. Además, el ganodermediol también inhibe la replicación del virus del herpes simplex tipo 1 (Mothana *y col.*, 2003). Extractos obtenidos a partir del micelio de *Kuehneromyces mutabilis*, extractos y dos compuestos fenólicos aislados de *Inonotus hispidus* y el peróxido de ergosterol, presente en muchos hongos, han mostrado *in vitro* una buena actividad antiviral frente al virus de la influenza tipo A y tipo B (Mentel *y col.*, 1994; Awadh Ali *y col.*, 2003). La acción antiviral de *Collybia maculata* frente a los virus causantes de la estomatitis vesicular, se ha atribuido a la presencia de derivados purínicos (Lindequist *y col.*, 2005). Triterpenos tetracíclicos de bajo peso molecular extraídos del hongo *Poria cocos* muestran actividad antiviral frente a la hepatitis (Hobbs, 1995).

Referente a la actividad antiviral de moléculas de mayor complejidad, se ha demostrado que ligninas solubles en agua, aisladas de *Fuscoporia obliqua* son activas frente al HIV (Ichimura *y col.*, 1998). También, el medio procedente del cultivo de *Lentinus edodes*, así como ligninas solubles en agua aisladas de este hongo y un polisacárido sulfatado denominado lentinano son capaces de inhibir en cierta medida el desarrollo del HIV (Colins y Ng, 1997; Lindequist *y col.*, 2005). En este sentido, un polisacárido aislado de *Agaricus brasiliensis* ha demostrado ser capaz de inhibir la infección producida por un poliovirus tipo 1 (Faccin *y col.*, 2007) y polisacáridos sulfatados obtenidos de la esclerótica de *Pleurotus tuber-regium* presentan actividad antiviral frente al virus del herpes simple tipo 1 y tipo 2 (Zhang *y col.*, 2004). Proteínas unidas a polisacáridos aisladas a partir de extractos acuosos de *Ganoderma lucidum* también son capaces de frenar el desarrollo de los herpes virus, ya que inhiben la unión y posterior penetración del virus en las células (Eo *y col.*, 2000). Además, la vetulina, una proteína aislada de *Flammulina velutipes* y una glicoproteína obtenida a partir del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* causan la inhibición de la transcriptasa inversa en el HIV (Wang y Ng, 2000; Wang y Ng, 2001).

1.2.4. Propiedades inmunomoduladoras y antitumorales

Otras propiedades importantes descritas en hongos basidiomicetos comestibles son sus actividades inmunomoduladoras y antitumorales (Hajjaj *y col.*, 2005).

Los hongos representan una fuente ilimitada de polisacáridos, lectinas, complejos polisacárido-péptido o polisacárido-proteína con propiedades, antitumorales e inmunoestimulantes, ejerciendo sus efectos a través de la activación de varios tipos de células efectoras del sistema inmune. Estos polisacáridos biológicamente activos se pueden encontrar en los cuerpos fructíferos, en el micelio cultivado e incluso ser extraídos del medio donde se cultivan (Wong *y col.*, 1994a; Wong *y col.*, 1994b; Wong *y col.*, 1994c).

El estudio del hongo *Trametes versicolor* permitió descubrir dos compuestos muy interesantes, un complejo polisacárido-proteína soluble en agua, el Polisacárido-K (PSK), de nombre comercial krestino, y un polisacárido-péptido (PSP) ambos obtenidos de su micelio, y con una extraordinaria actividad inmunopotenciadora y anticancerígena (Rowan *y col.*, 2002). Posteriormente, otros polisacáridos han sido estudiados en detalle como el esquizofilano de *Schizophyllum commune*, que aumentaba la inmunidad celular. Estudios clínicos en humanos han demostrado su actividad beneficiosa en pacientes con un cáncer gástrico inoperable y recurrente. Otros estudios indicaron su actividad como inhibidor de la segunda etapa de cáncer cervical y en grados avanzados de carcinoma cervical (Hobbs, 1995; Borchers *y col.*, 1999). En *L. edodes* se han descrito también varios polisacáridos inmunomoduladores como el llamado lentinano, el LEM, el L-II (D-glucopiranosas) (Zheng *y col.*, 2005; Chihara, 1992; Rowan *y col.*, 2002).

Estudios epidemiológicos han demostrado que la ingesta habitual de algunos hongos como el *Agaricus blazei* y *Flammulina velutipes* como parte de una dieta normal reducía el riesgo de formación de tumores. Los niveles de mortalidad por cáncer en dos tipos diferentes de poblaciones: los cultivadores japoneses de *F. velutipes* y una zona brasileña donde el *A. blazei* forma tradicionalmente parte de su menú habitual, fueron significativamente menores que los del resto de la población mundial. En *Agaricus blazei* (*Agaricus brasiliensis*), el responsable de esta actividad fue un proteoglicano hidrosoluble (WSPG) (complejo proteína-(1→6)-β-D-glucano) del que se demostró posteriormente que tenía propiedades inmunomoduladoras (Gi-Young *y col.*, 2005);

también se han descrito polisacáridos con acción antitumoral (un exopolisacárido aislado del micelio) (Fan *y col.*, 2007). El efecto antitumoral de *Flammulina velutipes* está relacionado con varios polisacáridos, el β - (1 \rightarrow 3)-D-glucano), complejos proteína-polisacárido, aislados de su cuerpo fructífero y un polisacárido alcalino soluble aislado de sus paredes celulares cuya estructura principal está compuesta por β -(1 \rightarrow 3)-D-glucosa (Leung *y col.*, 1997). También se ha aislado de *F. velutipes* una proteína (Flammulina) y una glicoproteína (Proflamina) y de *G. lucidum* varios polisacáridos hidrosolubles (Jong y Birmingham, 1992; Liu, 1999; Rowan *y col.*, 2002) además de proteínas y triterpenoides (Wang *y col.*, 1997; Rowan *y col.*, 2002). Estudios realizados en *Pleurotus* de diversas variedades también han identificado proteoglucanos hidrosolubles neutros, un glucano carboximetilado y un α -glucano de bajo peso molecular (Sarangi *y col.*, 2006; Wasser y Weis, 1999b; Shamtsyan *y col.*, 2004; Wasser y Weis, 1999a; Lavi *y col.*, 2006). Sin embargo, en otras variedades, como en *Pleurotus florida*, no parecen ser los polisacáridos los responsables de la inhibición en el crecimiento de tumores sino algún componente presente en los extractos metanólicos (Nayana y Janardhanan, 2000).

Estudios clínicos en Japón y Estados Unidos han mostrado que la fracción purificada de polisacáridos obtenidos de *Grifola frondosa* es altamente efectiva contra el cáncer de mama, pulmón, hígado, próstata y cerebro. Otras fracciones de *G. frondosa* exhiben mejoras inmunológicas junto con propiedades de anti-HIV, antihipertensión, anti diabetes y antiobesidad (Zhuang y Mizuno, 1999).

Aparte de los polisacáridos mencionados, los hongos contienen compuestos, aun no muy bien caracterizados, que pueden suprimir la acción de dos enzimas, la aromatasa y la esteroide 5-alfa-reductasa. La aromatasa transforma los andrógenos en estrógenos. Se sabe que los estrógenos impulsan el desarrollo del cáncer de mama, especialmente en mujeres post-menopáusicas. La enzima esteroide 5-alfa-reductasa transforma la testosterona en dihidrotestosterona (DHT) y se ha notado que ésta tiene un papel fundamental en el desarrollo del cáncer de próstata, así como en la hiperplasia benigna de próstata. Mediante experimentos en cultivos celulares, se ha demostrado que el extracto de *A. bisporus* tiene la capacidad de suprimir el crecimiento de las células cancerosas aromatasa-positivas de mama y de la próstata (Shiuan, 2007).

1.2.5. Propiedades reductoras del nivel de colesterol

Otra de las propiedades que presentan los hongos es que contienen compuestos capaces de reducir el nivel de colesterol en sangre y aparentemente lo disminuyen de un modo diferente a los fitoesteroles vegetales.

Así, extractos de *Pleurotus sp.* son capaces de reducir la incidencia de lesiones en la arteria coronaria y de fibrosis de miocardio, potencialmente por su efecto regulador del metabolismo del colesterol. Estos hongos sintetizan mevinolina, también llamada lovastatina (figura 22), una estatina altamente hipocolesterolémica porque inhibe el enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa), enzima clave en la regulación de la biosíntesis del colesterol en el hígado. La lovastatina también aumenta la actividad de los receptores del colesterol asociado a LDL. Además de las estatinas, los *Pleurotus sp.* poseen también otros compuestos, particularmente componentes hidrosolubles (β -1,3-D-glucano con bajo grado de polimerización y la pectina) que son capaces de unirse a los ácidos biliares, reduciendo la formación de las micelas y la absorción del colesterol (Fidge, 1993; Bobek y Galbavy, 1999). También se han realizado experimentos *in vivo* que han demostrado que los extractos de *P. ostreatus* son efectivos para reducir la incidencia y tamaño de placas arteroescleróticas en conejos, ya que las especies reactivas de oxígeno y el incremento de los niveles de lípidos en la sangre son elementos principales en la patogénesis de la arteroesclerosis (Lindequist y col., 2005). Otra especie del género *Pleurotus* llamada *Pleurotus citrinopileatus*, que es un hongo comestible muy popular en Taiwán, mostró mediante estudios *in vivo* realizados con sus extractos poseer una actividad antihiperlipidémica (Hu y col., 2006).

El efecto hipocolesterolémico observado en *Lentinus edodes* se debe a la eritadenina (2(R), 3(R)-dihidroxi-4-(9-adenil)-ácido butírico) (figura 22). Este compuesto ejerce su actividad mediante la reducción de secreción de la lipoproteína-colesterol desde el hígado a la circulación sanguínea y/o a través del aumento de la distribución del colesterol desde el plasma hacia los tejidos periféricos (Shimada y col., 2003). De *G. lucidum* se han obtenido ácidos ganodérmicos y triterpenos y de *Auricularia aurícula* se han aislado polisacáridos demostrando ambos poseer un efecto hipocolesterolémico (Hobbs, 1995; Ho y Chen, 1991; Rowan y col., 2002).

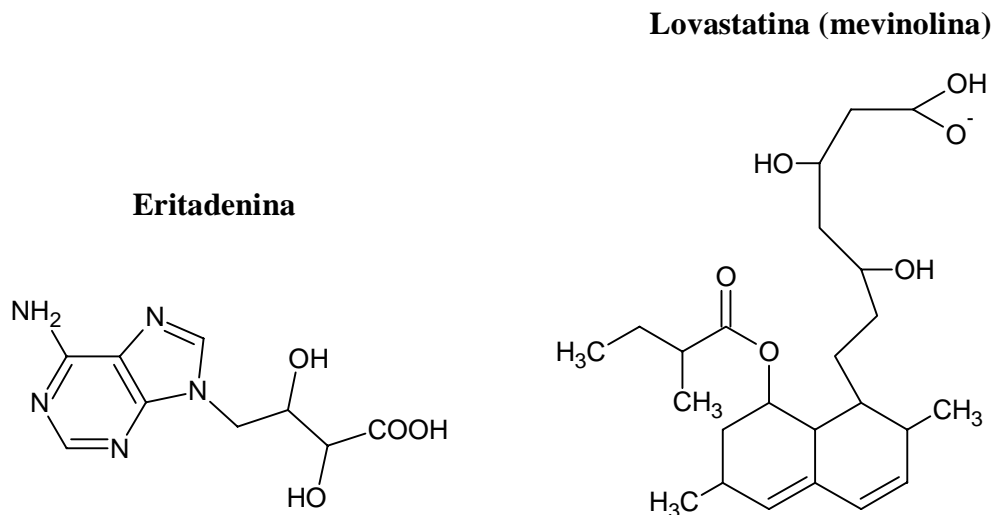


Figura 22. Estructura de la eritadenina y lovastatina (estatina reductora de los niveles de colesterol).

Otras propiedades biológicas importantes

En algunas especies de *Pleurotus*, se han aislado glicopéptidos (lectinas) que contienen aminoácidos ácidos con glucosa, arabinosa, galactosa, manosa, y xilosa con propiedades antiinflamatorias, destacando *Pleurotus japonicus* (Lindequist y col., 2005), *Pleurotus ostreatus* (Noda, 1998) y *P. Cornucopiae* (Yoshida y col., 1994). Algunos compuestos volátiles de estas mismas especies demostraron también tener una fuerte capacidad antiinflamatoria (Beltran-Garcia y col., 1997).

Otros estudios demuestran que dietas ricas en algunos hongos no sólo disminuyen del contenido de colesterol en el plasma sanguíneo sino que tienden a hacer que la presión arterial disminuya. En este sentido, se sabe también que una dieta rica en potasio puede ayudar a disminuir la hipertensión arterial y casi todos los hongos comestibles son ricos en este mineral. Además se ha demostrado que la ingesta de hongos comestibles permite una mejor absorción de minerales a nivel intestinal debido a la presencia de metaloproteínas (Hobbs C, 1995).

1.3. Ingredientes con capacidad antioxidante para la formulación de alimentos funcionales

En la actualidad, debido a la preocupación expresada por los consumidores sobre el contenido en aditivos químicos de su dieta, existe un interés creciente en la industria

alimentaria para sustituir los antioxidantes sintéticos por otros de origen natural. Este hecho ha potenciado la investigación y caracterización de compuestos antioxidantes procedentes de fuentes naturales como plantas, frutas, hortalizas, té, cereales, especias, semillas y algas, entre otros. Algunas plantas como el romero y la salvia, se ha indicado que poseen una gran actividad antioxidante y que es debida principalmente a la presencia de abietanos o diterpenos fenólicos como el carnosol y al ácido carnósico. Otras muchas plantas y frutas de colores anaranjados o rojos, como el tomate, la zanahoria, etc., son ricas en carotenoides (xantófilas, carotenos, licopenos etc.) que son excelentes antioxidantes lipídicos. Frutas del bosque como las moras, grosellas, etc., y otras frutas de colores azulados-rosáceos (granada) contienen antocianinas que muestran actividades antioxidantes muy elevadas y que ejercen según diversos mecanismos de acción. También, en el caso del vino tinto se ha asociado su contenido en resveratrol, flavonoides y antocianos con la disminución de enfermedades coronarias. Los compuestos fenólicos y oleósidos de la oliva y del aceite de oliva virgen extra actúan sinérgicamente con los tocoferoles protegiendo al aceite de la actuación del oxígeno y los radicales libres sobre los compuestos lipídicos y sobre muchas otras matrices alimenticias donde se adicionan. Los ácidos clorogénicos y algunos polifenoles del café y las catequinas y flavonoides del té reducen el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2, cáncer colorectal y de hígado y disminuyen el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. Estos compuestos parecen ejercer estas funciones tan beneficiosas para la salud humana debido principalmente a su capacidad para actuar como compuestos antioxidantes (Cuvelier *y col.*, 1994; Wong *y col.*, 1995; Devcich *y col.*, 2007; Moon y Shibamoto, 2009; Farooq *y col.*, 2006).

1.3.1. Radicales libres, oxidación y antioxidantes

Los radicales libres son especies químicas con electrones desapareados, y por tanto muy reactivas, que en general, atacan a otras moléculas, aunque algunos radicales libres pueden ser estables y tener una larga vida. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son especies muy activas que contienen oxígeno en su molécula, muchas de las cuales tienen electrones desapareados y son, por tanto radicales libres. En la tabla 8 se muestra un resumen de las especies reactivas con mayor relevancia en el estrés oxidativo *in vivo*.

Tabla 8. Principales especies reactivas relacionadas con el estrés oxidativo

<i>Radicales</i>		<i>No radicales</i>	
O ₂ ^{•-}	Superóxido	H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HO [•]	Hidróxilo	¹ O ₂	Oxígeno singlete
HO ₂ [•]	Hidroperóxilo	LOOH	Hidroperóxido lipídico
L [•]	Lipídico	Fe=O	Complejos hierro-oxígeno
LO ₂ [•]	Peroxil lipídico	HOCl	Hipoclorito
LO [•]	Alcoxil lipídico		
NO ₂ [•]	Dióxido nitrógeno		
NO [•]	Oxido nítrico		
RS [•]	Tiol		
P [•]	Proteico		

La oxidación y la producción de radicales libres y ERO son una parte fundamental de la vida y de nuestro metabolismo. Así, las ERO son especies esenciales para la producción de energía, la síntesis de compuestos biológicamente esenciales y la fagocitosis, proceso crítico de nuestro sistema inmune (Noguchi y Niki, 1999). Por otro lado, y debido a su gran reactividad, pueden ser sustancias muy perjudiciales capaces de producir daño oxidativo a biomoléculas como lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN, alterando, de esta manera sus funciones vitales. Así, cuando hay un exceso en la producción de radicales libres y ERO, aparece el denominado “estrés oxidativo”, el cual puede causar daños celulares, contribuyendo tanto al proceso de envejecimiento (Harman, 1994) como al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Parthasarathy y Rankin, 1992), cáncer (Cerutti y Trump, 1991), diabetes (Baynes, 1991), cataratas (Spector, 1995), fibrosis quística (Brown y Kelly, 1994) y enfermedades neurodegenerativas (Edabi y col., 1996; Lyras y col., 1997).

Con el fin de defender al organismo del daño oxidativo que producen los radicales libres y las ERO, los seres vivos cuentan con la ayuda de un potente y complejo sistema antioxidante (Sies, 1993; Halliwell y Gutteridge, 1995; Jacob, 1995; Gurr, 1996). Estos antioxidantes pueden estar generados por el propio organismo (antioxidantes endógenos) o provenir de la dieta (antioxidantes exógenos) y en función de su mecanismo de acción, pueden dividirse en varios grupos (Noguchi y Niki, 1999).

1.3.2. Métodos para la determinación de la actividad antioxidante

Debido al gran número de antioxidantes que se pueden encontrar en un alimento, así como a su diversa naturaleza, no existe un único método de medida de la actividad antioxidante. Además, las posibles interacciones entre los diferentes compuestos antioxidantes podrían hacer que la medida individual de cada antioxidante no fuera representativa del estado antioxidante global. Así, en los últimos años, se han desarrollado varios métodos para la determinación de la capacidad antioxidante total en muestras biológicas. Los métodos más utilizados se describen a continuación.

1.3.2.1. Método del Oxígeno Activo (AOM)

Este es el método oficial propuesto por la AOAC (Asociación Oficial de Químicos Analíticos) para medir la capacidad que presenta un determinado compuesto de inhibir la formación de hidroperóxidos. El método consiste en la exposición de una muestra a una corriente de aire seco a temperaturas entre 100-140°C, determinándose de manera periódica la formación de hidroperóxidos. Estos compuestos se determinan mediante espectroscopía de UV o por detección de compuestos volátiles generados en la degradación oxidativa, ya sea, por cromatografía de gases o por análisis sensorial (Cavero-Matías, 2003).

1.3.2.2. Ensayo FRAP (poder antioxidante reductor de hierro)

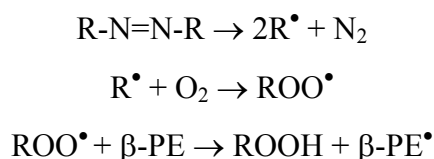
El método FRAP (*Ferric-reducing antioxidant power*) mide directamente la habilidad de los antioxidantes para reducir el complejo tripiridiltriazina férrico (Fe^{3+} -TPTZ) al complejo ferroso (Fe^{2+} -TPTZ) a pH ácido (Benzie y Strain, 1996; Benzie y Strain, 1999). El resultado es un cambio de color, ya que el producto de la reacción muestra un color azul que se puede cuantificar espectrofotométricamente a 593 nm, existiendo una relación lineal del cromóforo formado con la capacidad reductora total de los antioxidantes donadores de electrones.

La principal desventaja de este método es que no refleja necesariamente la actividad antioxidante, ya que como el método no incluye un sustrato oxidable no proporciona información sobre las propiedades de protección de los antioxidantes (Frankel y Meyer, 2000).

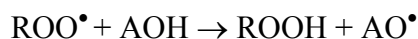
1.3.2.3. Métodos basados en sustrato oxidable β -ficoeritrina (β -PE)

Tanto el método TRAP (*total radical-trapping parameter*) (Ghiselli *y col.*, 1995), como el método ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*) (Cao *y col.*, 1993) tienen el mismo fundamento y se basan en el originalmente descrito por (Glazer, 1990).

Estos métodos miden el descenso de la intensidad de fluorescencia de la proteína β -PE provocado por la presencia de radicales peróxido, los cuales se han generado en el medio de reacción a través de un azo-iniciador:



La presencia de antioxidantes retrasa el descenso en la caída de fluorescencia debido a la captación de radicales peróxido:



La diferencia entre los dos ensayos radica en el cálculo de la capacidad antioxidante ya que el método TRAP emplea la medida de la fase de retardo en el descenso de fluorescencia, mientras que el ORAC emplea la técnica del cálculo del área bajo la curva.

El método ORAC ha sido recientemente mejorado mediante la sustitución de la proteína β -PE por otra molécula fluorescente, fluoresceína (Espín *y col.*, 2001; Ou *y col.*, 2001). De esta forma se evitan inconvenientes como la baja fotoestabilidad de β -PE o las interacciones entre esta proteína y compuestos polifenólicos (Frankel y Meyer, 2000).

1.3.2.4. Métodos que miden la capacidad de captar radicales hidrófilo (HORAC), radicales superóxido (SORAC) y radicales peroxinitrito (NORAC)

El ensayo HORAC (*Hydroxyl radical averting capacity*) está basado en la oxidación de la fluoresceína por los radicales hidróxilo via el mecanismo clásico de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT). Los radicales libres se generan mediante la adición de H_2O_2 . Los radicales hidróxilo generados provocan un descenso en la intensidad de

fluorescencia de la fluoresceína. La presencia de antioxidantes bloquea la oxidación de la fluoresceína producida por los radicales hidróxilos, hasta que se extingue toda la actividad de los antioxidantes presentes en la muestra y a partir de ese momento los radicales generados por el H_2O_2 reaccionan con la fluoresceína. El área debajo de la curva que mide la disminución de la fluorescencia (AUC) se usa para cuantificar la capacidad de la muestra de inhibir la formación de radicales hidróxilo y se compara con una curva patrón construida usando varias concentraciones de ácido gálico. Este ensayo proporciona una medida directa de la capacidad antioxidante frente a radicales hidróxilo destructores de cadenas hidrofílicas.

El ensayo SORAC (*Superoxide radical averting capacity*) está basado en estudios de (Beaulieu y col., 1999; Zhao y col., 1999). Se trata de medir la capacidad captadora de O_2^- usando hidroetidina como sonda. La hidroetidina no fluorescente se oxida por los O_2^- generados por una mezcla de xantina y xantina oxidasa para formar especies de estructura desconocida que presentan una fuerte señal fluorescente a 586 nm. La adición de antioxidantes inhibe la oxidación de hidroetidina.

El ensayo de NORAC (*Peroxynitrite radical averting capacity*) está basado en los estudios previamente descritos por (Chung y col., 2001). Este método consiste en medir la capacidad captadora de los radicales peroxinitrito ($ONOO^-$) utilizando la dihidrorodamina (DHR-123). La dihidrorodamina no fluorescente se usa como sonda, el cual es oxidada por la presencia de los radicales $ONOO^-$ generados por el hidrocloreuro de 3-morfolinosisidnonimina (SIN-1) para formar la rodamina-123 fluorescente con longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 530 nm, respectivamente. La oxidación de la DHR-123 es inhibida mediante la adición del antioxidante.

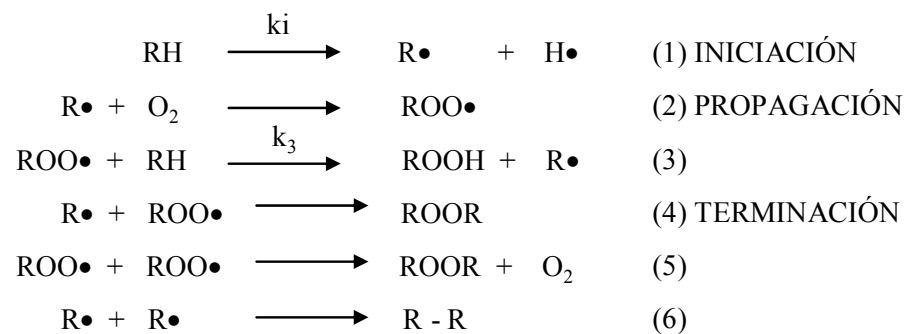
1.3.2.4. Método del blanqueamiento del β -caroteno

Este método se utiliza para cuantificar la capacidad que tiene un antioxidante (o una matriz que los contenga) de inhibir la oxidación del β -caroteno provocada en condiciones establecidas. Esta técnica usa como sustrato el ácido linoleico emulsionado con Tween 20 y con β -caroteno y se mide la disminución de la absorbancia del β -caroteno en el espectrofotómetro. La medición de los dienos conjugados a 234 nm se emplea, por ejemplo, como medida de la oxidación de sustratos como linoleico en

Tween 20, linoleico emulsionado en SDS y lipoproteínas de baja densidad (LDL) humanas (Marco, 1968; Miller, 1971).

1.3.2.5. Método de inhibición de la formación de hidroperóxidos lipídicos

La autoxidación de los lípidos ocurre fundamentalmente debido a los ácidos grasos insaturados a través de una serie de reacciones en cadena de radicales libres, que tiene las fases de iniciación, propagación y terminación (Rojano y *col.*, 2008).



En los alimentos con alto contenido de lípidos, la etapa más importante es la formación y descomposición de los hidroperóxidos (ROOH), que generan una serie de compuestos oxidados como cetonas, aldehídos, alcanos y alquenos de bajo peso molecular y de alta volatilidad. La formación de hidroperóxidos se medía hasta hace poco de forma oficial utilizando valoraciones volumétricas y estableciendo el llamado *Índice de Peróxidos*, pero actualmente se mide utilizando un equipo denominado Rancimat ya que resulta un método más informativo y adecuado para medir la formación de hidroperóxidos.

El Rancimat® Metrohm, S. A (Suiza) es un equipo utilizado normalmente para medir la estabilidad de los aceites a una oxidación acelerada inducida, que consiste en la determinación conductométrica de los productos de degradación volátiles del aceite calentado a 120 °C con aireación forzada. Las grasas, al descomponerse, generan hidroperóxidos que dan lugar a diversos ácidos orgánicos de cadena corta, principalmente ácido fórmico (figura 23).

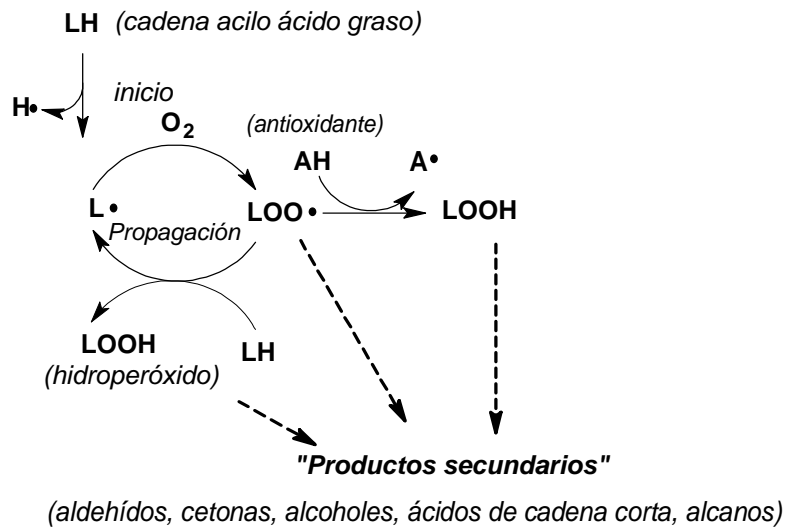


Figura 23: Autoxidación de lípidos y actuación de compuestos antioxidantes.

Estos ácidos se recogen en una trampa de agua donde un sensor mide automáticamente los cambios de conductividad que tienen lugar en el agua con la disolución y acumulación del ácido fórmico. La formación de hidroperóxidos en estas condiciones de oxidación acelerada sigue un perfil formado por dos curvas (figura 24) cuyo punto de intersección de ambas tangentes se denomina tiempo de inducción (TI) e indica la mayor o menor estabilidad de un aceite o un aceite y sus antioxidantes lipídicos.

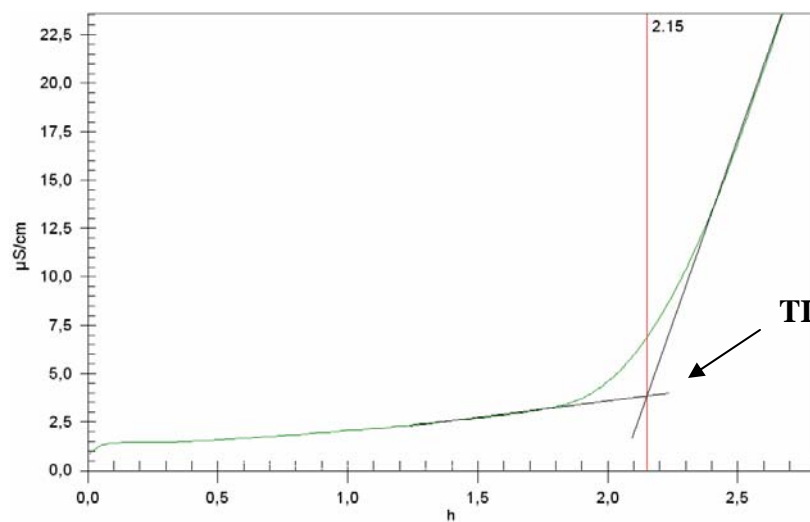


Figura 24. Curva de estabilidad de un aceite mezclado con antioxidante sometido a oxidación acelerada (verde). Tangentes calculadas de cada una de las fases de la oxidación (negro). Tiempo de inducción (rojo).

Si el aceite se mezcla previamente con compuestos potencialmente antioxidantes se puede valorar la capacidad de los mismos de inhibir la formación de hidroperóxidos durante las condiciones de oxidación acelerada seleccionadas. Si un compuesto reduce el tiempo de inducción (parámetro que indica la estabilidad del aceite) se puede considerar como antioxidante lipídico (Cheung y Cheung, 2005).

Los métodos de estabilidad a altas temperaturas presentan algunas limitaciones como son: que el mecanismo de oxidación lipídica cambia a temperaturas elevadas, que las velocidades de oxidación dependen de la concentración del oxígeno y su solubilidad a altas temperaturas disminuye, que existen reacciones colaterales como polimerizaciones y ciclaciones que pueden interferir con las medidas y la posible descomposición de los antioxidantes a temperaturas tan elevadas (Madhavi y col., 1996).

1.3.2.6. Método detiobarbitúrico (TBARS)

El método del tiobarbitúrico se emplea para la determinación de las alteraciones autooxidativas de las grasas y aceites en productos alimenticios. El malondialdehído (MDA), un producto de descomposición secundaria de ácidos grasos poliinsaturados con tres o más dobles enlaces, reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar un cromóforo estable rosa con una absorbancia máxima a 532 nm. Sin embargo durante la fase secundaria del proceso de la autooxidación otros aldehídos (alcanales, 2-alquenales, dienales) son formados cuando reaccionan con el TBA, y ellos son los responsables de la pérdida de sabor para producir pigmentos amarillos ($\lambda_{\max}=455$ nm), naranjas ($\lambda_{\max}=495$ nm) y rojos ($\lambda_{\max}=532$ nm) (Sun, Q. y col., 2000; Guillén-Sans y Guzmán-Chozas, 1998).

1.3.2.7. TEAC (Actividad antioxidante en equivalentes de trolox)

El método TEAC (*Trolox equivalent antioxidant activity*) fue diseñado por (Miller y col., 1993) para medir la capacidad antioxidante en muestras clínicas, extendiéndose posteriormente su aplicación al análisis de antioxidantes en alimentos y otras muestras biológicas hidrosolubles. Este método consiste en el seguimiento de la actividad antioxidante por la disminución de la absorbancia que producen los supuestos antioxidantes cuando reaccionan con el radical catiónico (ABTS^{•+}) reduciéndolo a 2,2'-azinobis(3-etil-benzotiazolona-6-sulfonato) (ABTS-H) ya que la donación de átomos de

hidrógeno de los antioxidantes al radical de color verde produce la pérdida de su color (figura 25).

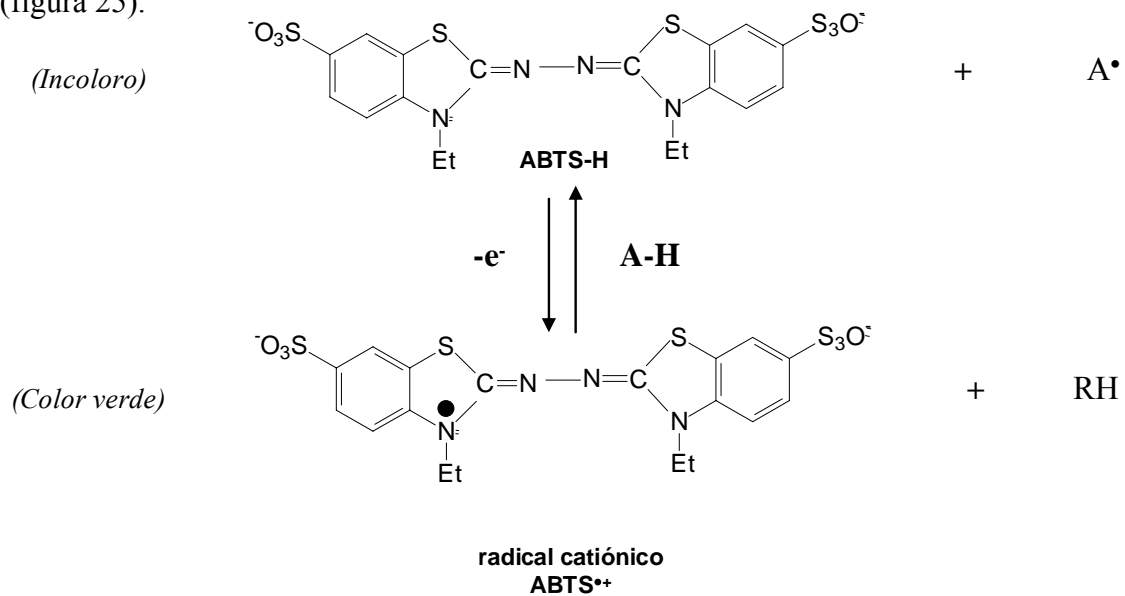


Figura 25. Reacción de oxidación-reducción para la formación del radical ABTS^{•+} y de su forma reducida ABTS-H.

El espectro del ABTS^{•+} en forma radical presenta diferentes máximos de absorción, lo que facilita su medida a varias longitudes de onda: 415, 645, 734 y 815 nm (Cano y col., 2000). Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox, que se refiere a la cantidad de radicales ABTS^{•+} consumidos debido a la acción antioxidante de este compuesto artificial hidrosoluble.

A pesar de las mejoras realizadas el método tiene diversas limitaciones, por ejemplo la interacción de los flavonoides con algunos reactivos que generan la forma radical del ABTS^{•+}, (óxido de manganeso, persulfato potásico K₂SO₅, etc.) y la interferencia con otros mecanismos de complejos lipídicos alimenticios, de los sustratos, o de enzimas oxidativas (Frankel y Meyer, 2000).

1.3.2.8. Capacidad secuestradora de radicales (ensayo del DPPH)

Este método fue primeramente sugerido en 1950 para medir la capacidad de donación de átomos de hidrógeno de compuestos actuando así como antioxidantes. El método se basa en la capacidad del radical coloreado 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo para ser reducido por el supuesto antioxidante (R-H donador de átomos de hidrógeno) según indica en la siguiente figura:

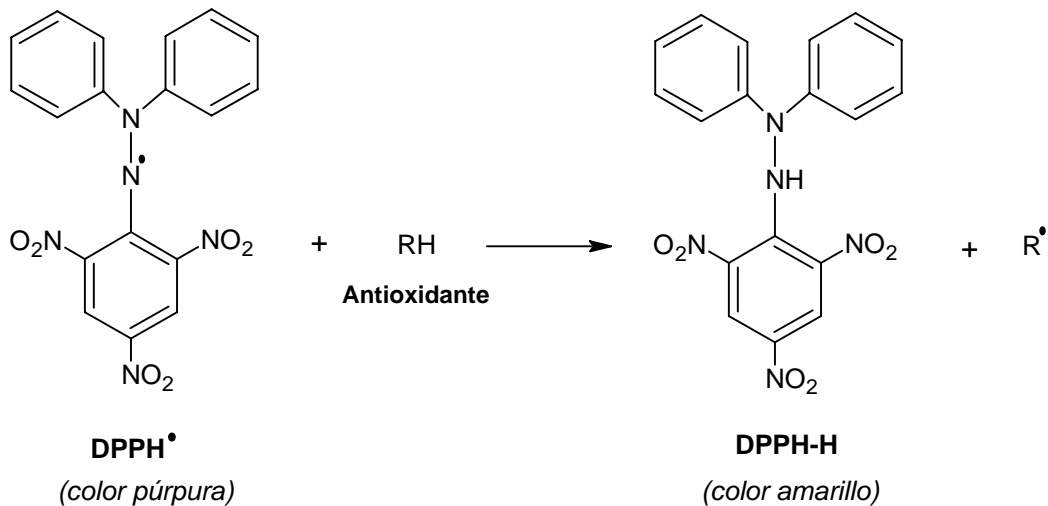


Figura 26. Reacción coloreada del radical DPPH[•] (color púrpura) en presencia de un antioxidante para producir DPPH-H reducido (color amarillo).

La acción de los antioxidantes se visualiza espectrofotométricamente por la desaparición del color púrpura del radical a 515 nm hasta que la absorbancia permanece constante. La capacidad antioxidante se cuantifica de diversos modos, o bien determinando el parámetro EC₅₀ que se define como la cantidad de antioxidante necesario para reducir la concentración inicial de DPPH[•] a la mitad o bien como el porcentaje de DPPH[•] captado por el antioxidante.

Este método, como todos los descritos hasta ahora, también tiene sus limitaciones, una de ellas es la posible interacción entre los radicales DPPH[•] y otros radicales (alquil), otro problema puede ser el tiempo que se necesita en algunas ocasiones para alcanzar el estado estacionario de la reacción que en algunos casos puede no ser lineal con diferentes concentraciones de antioxidante/DPPH[•] (Frankel y Meyer, 2000; Prior y *col.*, 2005; Roginsky y Lissi, 2005).

1.3.3. Efecto de la dieta en el estado antioxidante

El sistema de defensa antioxidante del cuerpo consiste en antioxidantes endógenos y exógenos que trabajan en conjunto, a nivel molecular, para proteger las membranas celulares, lipoproteínas y DNA de los efectos dañinos de los radicales libres. Los antioxidantes endógenos son enzimas fisiológicas como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa y la catalasa, mientras que los antioxidantes exógenos

incluyen sustancias que entran al cuerpo a través de la dieta, clasificándose en nutrientes y no nutrientes. Dentro de los nutrientes, se incluyen vitaminas como la E, C y A y minerales (Cu, Mn, Zn, Se, Fe) o riboflavina, todos importantes cofactores de las enzimas antioxidantes endógenas. El otro grupo de antioxidantes (no nutrientes) estaría compuesto por un gran número de compuestos fitoquímicos presentes en frutas y verduras, como carotenoides, taninos, terpenoides, tocoferoles, fenoles y polifenoles entre otros (Lin, 1995). Por otro lado, hay determinados componentes de la dieta que pueden tener efectos prooxidantes, tales como los ácidos grasos poliinsaturados o ciertos metales de transición.

1.3.3.1. Conservación y procesado industrial del alimento

Desde su obtención en fresco hasta que llega al consumidor, un alimento puede verse sometido a una serie de procesos que pueden producir cambios más o menos importantes en su naturaleza. Durante la cadena de recolección, transporte, almacenamiento, tratamientos industriales, etc., pueden tener lugar reacciones debidas a contaminaciones microbianas, activación de enzimas, o reacciones espontáneas por contacto con el oxígeno, que son las responsables directas de esos cambios en el producto final. De todos estos factores, uno de los que más contribuyen a la degradación del alimento es la autooxidación de lípidos. Como se explicó anteriormente, la autooxidación lipídica es la reacción de oxidación que tiene lugar entre los ácidos grasos insaturados de un alimento y el oxígeno, desencadenando una serie de reacciones, que terminan con la formación de radicales libres de diversa naturaleza, incluyendo hidroperóxidos y la descomposición de la grasa del alimento (enranciamiento), dando lugar a un cambio en sus propiedades sensoriales y nutritivas, cambiando su color, textura, olor y sabor; y produciéndose una pérdida de vitaminas y de calidad de las proteínas. Además de este deterioro químico del alimento, hay indicios que demuestran que los productos formados durante la oxidación lipídica influyen de manera negativa en la salud si son ingeridos (Pulido-Ferrer, 2003).

Así, la mayoría de los alimentos que consumimos contienen aditivos que ayudan a frenar estas reacciones de oxidación. Antioxidantes sintéticos y naturales son usados frecuentemente por la industria alimentaria para prevenir la oxidación de los alimentos, principalmente aquéllos que contienen aceites y grasas. Los antioxidantes sintéticos más comunmente utilizados son compuestos fenólicos como butil-hidroxianisol (BHA),

butil-hidroxitolueno (BHT), *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ), propil galato y varios tocoferoles (α -tocoferol, γ -tocoferol, δ -tocoferol). Sin embargo, hoy en día existe una tendencia pronunciada a sustituir los compuestos sintéticos por extractos antioxidantes naturales, debido a la preocupación creciente en torno a los potenciales efectos tóxicos de los antioxidantes sintéticos. Los antioxidantes añadidos a los alimentos para prevenir su oxidación, pueden tener también un impacto en el estado antioxidante de nuestro organismo al ser ingeridos. Por lo que actualmente están proliferando en el mercado los productos suplementados con antioxidantes de origen natural. En este sentido, podemos citar, entre otros, a la línea de productos cárnicos FrialVida® que contiene Vitalim® una fórmula exclusiva con extracto de romero como antioxidante. También Danone lanzó al mercado hace unos años Esensis, un producto lácteo enriquecido con ProNutris® que incluye extracto de té enriquecido en polifenoles entre otros constituyentes. Las compañías Coca-cola y Nestlé lanzaron al mercado una bebida llamada “Enviga” con extracto de té verde y enriquecido con el antioxidante Epigallocatequin gallato y la compañía Pepsico creó una bebida natural llamada “SoBe Life” enriquecido también con antioxidantes.

En la actualidad y a pesar de la existencia de estudios que avalan las propiedades antioxidantes de los hongos, en España no se comercializa ningún producto que contenga hongos o sus extractos lo que deja una puerta abierta a la formulación de nuevos productos funcionales, donde además de impedir la oxidación del producto alimenticio, puedan también actuar como antioxidantes dentro del organismo.

La mayoría de los compuestos antioxidantes se ven afectados en mayor o menor medida por los procesos industriales a los que se someten los productos alimenticios. Se puede decir que uno de los antioxidantes más afectados es el ácido ascórbico, ya que incluso se utiliza como marcador para evaluar las pérdidas nutricionales de un proceso nuevo. Los tratamientos térmicos como la esterilización, el enlatado, el escaldado y el secado con aire caliente para deshidratar pueden producir grandes pérdidas (50%) de este compuesto, dependiendo del tipo de verdura que se este procesando, normalmente en las frutas las pérdidas son algo menores. La deshidratación de patatas puede ser muy destructiva llegando al 75% de pérdida en ác. ascórbico. La congelación no supone un grave problema pero si el escaldado previo, que dependiendo de la verdura puede producir pérdidas desde un 10% en el maíz a un 37% en guisantes (Davey y col., 2000).

Los carotenoides no se ven tan afectados por los procesados industriales como la vitamina C, incluso se recomienda un tratamiento térmico para aumentar su biodisponibilidad. Sin embargo, durante el procesado se ven afectados porque la pérdida de integridad estructural de la matriz alimenticia facilita su oxidación. El secado de zanahorias, por ejemplo, supone pérdidas de entre el 18 – 28% de los carotenos, si se seca usando un microondas las pérdidas pueden llegar al 37% y su enlatado produce pérdidas de entre el 30-55%. Sin embargo, el licopeno de los tomates es bastante resistente a cualquiera de los tratamientos industriales (Van den Berg *y col.*, 2000).

Los tocoferoles se degradan en mayor o menor medida dependiendo del tipo de ácidos grasos poliinsaturados que contenga la matriz lipídica donde se encuentran y si ésta posee también compuestos fenólicos con los que forman sinergias. El refinado de aceites supone una pérdida en tocoferoles de entre un 15% en el aceite de oliva hasta un 40% en aceites de girasol o cacahuete (Bramley *y col.*, 2000). Los esteroides de esos aceites vegetales también se ven afectados de forma similar, aunque lo que más les afecta es el almacenado posterior del aceite antes de iniciar una segunda fritura. Los antioxidantes fenólicos procedentes de la oliva sufren transformaciones e hidrólisis cuando las aceitunas se introducen en las salmueras que facilitan su fermentación. Este proceso genera compuestos fenólicos más simples pero que también tienen alta capacidad antioxidante como por ejemplo el hidroxitirosol. Durante el procesado para la fabricación de aceite de oliva, la producción de aceite “virgen extra” con prensado en frío, mantiene los niveles de estos compuestos mientras que con el calentamiento que se produce durante su refinado se reducen (Soler Rivas *y col.*, 2000). Efectos similares se han observado en fenoles derivados del ácido hidroxibenzoico (Tomás-Barberán *y Clifford*, 2000), del ácido clorogénico y otros cinamatos (Clifford, 2000) que son relativamente estables y sólo procesos donde intervengan altas temperaturas reducen sus concentraciones. Los flavonoides, incluyendo las antocianinas, con procesos térmicos suaves pierden sus glucósidos y se quedan en forma de agliconas lo que influye negativamente en su biodisponibilidad pero no en su capacidad antioxidante (Hollman *y Arts*, 2000). Otros compuestos antioxidantes como las procianidinas, taninos, elagitaninos, etc., de estructuras más complejas, pueden, si el tratamiento térmico es prolongado formar estructuras aun más complejas, perdiendo su color y formando estructuras de difícil absorción (Santos-Buelga *y Scalbert*, 2000).

El efecto del procesado industrial sobre los diferentes compuestos antioxidantes de las frutas y las verduras ha sido muy estudiado. Sin embargo, hay pocos trabajos que describan el efecto de los procesos industriales en las propiedades antioxidantes de los hongos o en los compuestos responsables de su actividad. Normalmente, las actividades antioxidantes se miden en cuerpos fructíferos frescos, a pesar de que una parte importante de los hongos cultivados (aprox. el 35% de *A. bisporus*) se somete a procesos industriales como la congelación, el enlatado o la deshidratación para conservar los hongos durante largos periodos de transporte y almacenamiento. Se sabe que estos tratamientos modifican su composición química, lo que significa que probablemente sus propiedades antioxidantes también se ven afectadas.

En publicaciones recientes, se ha observado que la congelación de *B. edulis* reduce su contenido en ácido ascórbico desde 0,18 a 0,16 mg/g debido principalmente al blanqueado preliminar al que se le somete antes de su almacenamiento en cámaras frigoríficas. Posteriormente, se observó una reducción del 47% tras 12 meses de almacenamiento a -25°C (Jaworska y Bernas, 2009).

Tanto el proceso de enlatado de *A. bisporus* en agua, sal y ácido cítrico como el proceso de deshidratación y rehidratación de *B. edulis* no modifican de manera importante y el nivel de compuestos antioxidantes de ambos hongos únicamente, se observan variaciones cuando se les someten a tratamientos térmicos más drásticos. En este último caso, se observan disminuciones en los niveles de fibras dietéticas (β -glucanos) y de compuestos fenólicos (Manzi y col., 2001; Manzi y col., 2004). El tratamiento térmico, en comparación con la congelación y la deshidratación como procesos de conservación, fue también el proceso más perjudicial para las actividades captadoras de radicales DPPH[•], las capacidades de inhibición del blanqueamiento del β -caroteno y de la peroxidación lipídica y el poder reductor observadas en hongos como *L. deliciosus*, *M. mastoidea*, *M. procera* y *S. imbricatus* (Barros y col., 2007b).

1.3.3.2. Tratamientos culinarios del alimento

La mayoría de las verduras o los productos que incluyen antioxidantes extraídos de las plantas no se consumen crudos, sino que son sometidos a tratamientos culinarios por parte del consumidor. Este segundo procesado puede ser tan drástico o aun más que el tratamiento industrial para la fabricación del producto. El efecto de las cocciones

domésticas sobre los antioxidantes de las frutas y las verduras se ha estudiado en detalle.

Los tratamientos térmicos en medios acuosos son menos dañinos para los pigmentos liposolubles, como los carotenoides, que aquéllos en medio graso como las frituras. Los epoxicarotenoides son más sensibles al calor que por ejemplo la luteína, el α - y β -caroteno y el licopeno, aunque depende mucho del alimento donde se encuentran. Las cocciones a vapor o en una olla a presión provocan más pérdidas que el hervido en una olla convencional o mediante un microondas, en judías verdes y calabaza. La fritura superficial suele provocar mayores pérdidas para los carotenoides que la fritura profunda (en fridora), por la mayor accesibilidad del oxígeno. El asado también parece reducir el contenido en carotenoides precursores de la vitamina A a niveles similares a la fritura profunda, aunque no hay muchas publicaciones respecto a este medio de cocción. El licopeno es el compuesto más resistente a todos los tipos de cocción. Otros antioxidantes lipofílicos como los tocoferoles, tampoco se ven muy afectados por las técnicas culinarias que requieren agua. Así, el hervido, el estofado, la cocción a vapor con o sin presión y en microondas, suponen pérdidas de tocoferoles que rondan el 10 – 20% en varios alimentos, aunque los datos varían mucho según las diferentes publicaciones y si son alimentos de origen vegetal o animal. Cuando los alimentos se someten a frituras, parte de los tocoferoles del medio pasan al alimento y este aumenta su concentración en tocoferoles, sobre todo si se utiliza aceite de oliva. Lo que produce mayor destrucción de estos compuestos, es la fritura en aceites que han sufrido múltiples ciclos de fritura (fritura – enfriamiento – almacenamiento – fritura...). Así, tras 4 ó 5 ciclos el α -tocoferol de las patatas puede sufrir hasta un 50% de pérdida. β - y γ -tocoferol son más estables y se alcanza ese 50% de pérdida después de 7 u 8 ciclos. El horneado de un pan también produce pérdidas de tocoferol por la previa incorporación de oxígeno a la masa durante su amasado. El efecto de las cocciones sobre los compuestos esteroideos no está muy bien estudiado y sólo para los esteroides de origen vegetal como el sitosterol, campesterol, stigmasterol, etc. Según algunos autores, las pérdidas mayores ocurren a temperaturas altas como las alcanzadas durante la fritura profunda, ni los tratamientos acuosos ni el microondas provocan pérdidas significativas (Ruiz-Rodríguez *y col.*, 2008).

Los antioxidantes más polares como los polifenoles se ven más afectados por las cocciones en medio acuoso, sobretudo el hervido es el método que produce mayores pérdidas, ya que induce un lixiviado de los mismos al medio de cocción. Una vez allí, los compuestos pueden ser más fácilmente oxidados dependiendo del tiempo de cocción. Las pérdidas dependen mucho del tipo de alimento considerado, por ejemplo en legumbres las pérdidas de fenoles totales tras el hervido rondan el 15% mientras que otras como el esparrago pueden llegar al 70%. Las cocciones con vapor son menos perjudiciales, porque no se producen procesos osmóticos que facilitan la salida de estos compuestos al exterior. La fritura requiere de temperaturas altas que suelen afectar más a los fenoles simples más que a los complejos, aunque en este caso, si se utilizan aceites ricos en compuestos fenólicos, se produce un intercambio de los mismos entre el alimento y el aceite. El microondas tampoco es muy recomendable para mantener este tipo de compuestos, (Vallejo *y col.*, 2003) describieron pérdidas que rondan el 70 – 80% de fenoles simples, mucho más elevadas que otros métodos más tradicionales como la cocción a presión y la fritura a vapor.

La fibra dietética de los cereales no se ve muy afectada si se hierve durante periodos cortos, pero si se usa una olla a presión puede haber pérdidas del 8%. Otros autores han mencionado pérdidas en celulosa y hemicelulosa que rondan del 17% - 42% en varios tipos de legumbres, mientras que sus contenidos no se ven casi afectados por hervidos en olla o usando microondas y la fritura supone pequeñas pérdidas (5%) (Ruiz-Rodriguez *y col.*, 2008).

El compuesto antioxidante hidrosoluble que más se ve afectado por este tipo de tratamientos es el ácido ascórbico. En un simple hervido corto de espinacas se producen pérdidas que rondan el 60%, su cocción a vapor supone el 46% y su cocción a presión el 58%. Sin embargo, el uso de microondas suele ser menos dañino con la vitamina C que con los compuestos fenólicos, sobre todo si se añade sólo una pequeña cantidad de agua para cocinar. En realidad, la proporción alimento: agua es el factor que más influye a la hora de evaluar las pérdidas de esta vitamina, cuanto mayor cantidad de agua se utilice mayor concentración de vitamina C saldrá del alimento por procesos osmóticos y se oxidará en el medio. También hay pérdidas significativas si el alimento se mantiene durante periodos prolongados a altas temperaturas como en el caso de una cocción al baño María, pueden llegar a alcanzar el 40% de pérdida (Davey *y col.*, 2000).

Tanto los hongos frescos como los sometidos a un procesado industrial también son sometidos a tratamientos culinarios antes de ser ingeridos, sin embargo hay muy poca información sobre el efecto de estos procesos sobre sus compuestos antioxidantes. (Ganguli y col., 2006) demostró que los extractos obtenidos de *A. bisporus* en fresco presentan actividades captadoras de radicales DPPH• y ABTS•⁺ y contenido en fenoles más elevados que los hongos encurtidos preparados utilizando una receta tradicional. El contenido en fenoles totales y sus propiedades antioxidantes disminuyen después de someterlos a una fritura con aceite de mostaza, paso que se realiza antes de su inmersión en la salmuera, ambos parámetros disminuyen de forma proporcional al tiempo de fritura. Tras el tratamiento térmico no se observaba ninguna influencia negativa en los valores de fenoles totales y capacidad antioxidante, durante su encurtido y posterior almacenamiento. Estos resultados indican que el tiempo de fritura es un factor crítico en el proceso tradicional de encurtido de los hongos. La cocción aumenta la proporción de peso seco de los hongos debido a la pérdida de agua, por ejemplo, el hervido durante 10 min de especies como *A. bisporus* (variedad Portabella) disminuye de peso un 30%, aunque en otros hongos las diferencias son menores como en *Grifota frondosa* y *Flammulina velutipes* donde sólo varía un 11-16% (Dikeman y col., 2005). Otros trabajos (Barros y col., 2007b; Manzi y col., 2004) también demuestran que los hongos cocinados (*L. deliciosus*, *Macrolepiota mastoidea*, *Macrolepiota procera* y *Sarcodon imbrictus*) poseen un menor contenido en nutrientes (incluyendo fenoles) y una menor actividad antioxidante que en fresco. Solamente los estudios de (Choi y col., 2006) han señalado un aumento tanto en las concentraciones fenólicas como en las propiedades antioxidantes de *L. edodes*. Estas diferencias con respecto a los trabajos anteriores podrían ser debidas a que no tuvieron en cuenta las pérdidas de humedad y de sólidos solubles que concentran la muestra por unidad de peso y/o su mejor extracción dependiendo del tiempo de cocción o temperatura. La ergotioneína parece ser bastante resistente a las cocciones (Kalac, 2009) aunque si se realiza un hervido no se pueden evitar pérdidas por lixiviación.

1.3.3.3. Digestibilidad y biodisponibilidad

Hoy en día se pueden encontrar en los supermercados productos que alegan propiedades beneficiosas para la salud sin tener estudios sobre si los compuestos que producen estas propiedades beneficiosas resisten un proceso tan drástico como el que supone la

digestión humana y si los que resisten, son absorbidos y asimilados por el organismo, es decir, son biodisponibles.

La digestión es el proceso por el cual los alimentos se transformaron en compuestos más simples para que puedan ser asimilados y pasar a la sangre o excretados. En el hombre, la digestión comienza en la boca con el triturado y la digestión enzimática de la saliva donde principalmente se degradan polisacáridos. En el estómago, se continúa la degradación del bolo alimenticio por los movimientos gástricos, el bajo pH y la mezcla con pepsinas y lipasas gástricas. En este paso se produce la degradación de las proteínas y los péptidos, aunque existe hidrólisis parcial de triglicéridos (10 – 30% del total de triglicéridos) (Porter *y col.*, 2008). La presencia de lípidos en el duodeno estimula la secreción de sales biliares, fosfatidilcolina y colesterol de la vesícula biliar y fluidos pancreáticos (que contienen lipasas y colipasas pancreáticas). Las lipasas se unen a la superficie de las gotas de aceite que se forman por las sales biliares y los emulgentes formando una serie de partículas coloidales formadas por los compuestos de degradación de lípidos de tamaños diversos incluyendo gotitas emulsionadas, vesículas, micelas, etc. Los compuestos lipófilos sólo serán absorbidos por los enterocitos intestinales si se encuentran formando parte de las membranas o incluidos dentro de las llamadas micelas mixtas (Christensen *y col.*, 2004). Los compuestos hidrófilos estarán solubilizados en los fluidos intestinales y pueden llegar directamente a las microvellosidades intestinales, su posterior absorción o no por los enterocitos dependerá de numerosos factores, por ejemplo de la naturaleza de los compuestos y su estructura química (ej. estereoconfiguración), del tipo de enlace molecular (ej. esterificación, glicosilación), de la cantidad (cantidad y frecuencia de exposición, en una sola dosis o en múltiple), de la interacción con otros compuestos (ej. antioxidantes con mecanismo similar de absorción), de la naturaleza de la matriz alimenticia (ej. sólido, líquido, vegetal, animal), de la presencia de compuestos que mejoran la absorción (ej. proteínas y lecitinas que facilitan la formación micelar, grasas que promueven la absorción de antioxidantes liposolubles, fibras u otras sustancias que secuestran moléculas en su estructura reduciendo la absorción), de si son alimentos procesados (ej. tratamientos térmicos, homogeneización, congelación, liofilización, etc.) y de factores relacionados con el individuo que los consume que se pueden subdividir en factores intestinales (ej. capacidad de secreción de HCl y de enzimas, el tiempo de tránsito intestinal y actividad enzimática), factores sistémicos (como por ejemplo, sexo, edad,

estado hormonal, genética, condición fisiológica (ej. embarazo) y desórdenes y/o patologías (ej. del tracto intestinal).

Los diferentes compuestos antioxidantes son absorbidos y metabolizados de distinta manera según sean liposolubles o hidrosolubles y dentro de una misma categoría, depende del tipo de antioxidante específico, porque por ejemplo, el mecanismo de absorción de la vitamina C es muy diferente al de algunos compuestos fenólicos.

Los carotenoides de las frutas y verduras pueden formar complejos complicados con proteínas dentro de cloroplastos u otras estructuras celulares, por lo que su solubilización dentro del intestino requiere bastante tiempo. En algunas frutas (ej. mango y papaya) se encuentran presentes en gotas de aceite dentro de los cromoplastos y se pueden extraer más fácil durante la digestión. Algunos procesos tecnológicos, tales como la homogeneización y la cocción de las verduras aumentan la biodisponibilidad de los carotenoides porque degradan parcialmente las paredes celulares y las estructuras complejas de los alimentos. Por ejemplo, el licopeno es más bioaccesible en productos derivados del tomate (ej. puré y pasta de tomate) que el tomate crudo, también el β -caroteno de zanahorias y espinacas se absorbe mejor desde un alimento cocinado ya que se detectan mayores niveles en plasma después de la ingestión de puré de espinacas y zanahorias que después de haber ingerido los mismos vegetales pero crudos. Aunque hay que tener en cuenta que, como se dijo anteriormente, los tratamientos térmicos producen isomerizaciones y formación de subproductos (ej. *cis*-isómeros, productos oxidados, etc.) que son menos biodisponibles y pueden reducir la absorción de los compuestos activos deseables.

Por el contrario, las cocciones de los alimentos reducen la asimilación de los compuestos polifenólicos ya que éstos se suelen encontrar glucosilados, esterificados o formando polímeros y el calor induce la ruptura de enlaces y pérdida de los glucósidos lo que reduce su absorción ya que la presencia del azúcar facilita su asimilación. Al atravesar la barrera intestinal durante su absorción, estos compuestos sufren nuevas modificaciones tanto a nivel de las células intestinales como después en el hígado (ej. conjugación por metilación, sulfatación, glucoronidación) que son las formas en las que se pueden encontrar en la sangre y en la orina.

En la actualidad, no se ha realizado ningun estudio sobre la digestibilidad y la biodisponibilidad de los antioxidantes de los hongos. Se sabe que contienen una alta proporción de quitina indigerible lo que podría limitar la disponibilidad de estos compuestos, pero no existen datos que confirmen esta hipótesis (Kalac, 2009).

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo de investigación ha sido la obtención y la caracterización química y funcional de compuestos bioactivos a partir de diversos hongos comestibles para el diseño de productos cárnicos funcionales.

Para poder llevar a cabo dicho objetivo principal se desarrollaron los siguientes objetivos parciales:

1. Desarrollo de metodologías de preparación de extractos a partir de hongos comestibles (cultivados y silvestres) para la obtención de fracciones bioactivas mediante el uso de disolventes de diferente naturaleza.
2. Estudio de las propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antivirales de las diferentes fracciones obtenidas a partir de los hongos comestibles. Determinación de la influencia de las enzimas oxidativas en dichas propiedades.
3. Caracterización química de los extractos bioactivos de los hongos para la identificación de los compuestos potencialmente responsables de las actividades biológicas determinadas.
4. Estudio de la influencia del tratamiento culinario y del proceso de digestión en la capacidad antioxidante de las fracciones bioactivas de *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes* y *Boletus edulis*. Determinación posterior de su biodisponibilidad *in vitro* mediante células caco-2.
5. Diseño de un paté de hígado cerdo con *Boletus edulis* como ingrediente con capacidad antioxidante. Estudio del efecto del procesado y almacenamiento en sus propiedades antioxidantes.
6. Diseño de croquetas de pollo con *Boletus edulis* como ingrediente funcional. Estudio del efecto de la fritura con distintos aceites y del proceso de digestión en los compuestos antioxidantes y evaluación de su posterior biodisponibilidad *in vitro*.

3. Materiales y métodos

3.1 Hongos comestibles

Los cuerpos fructíferos de siete especies de basidiomicetes (tabla 9) se han obtenido de un supermercado local. Todos los hongos se han adquirido en temporada con el fin de obtenerlos lo más frescos y sanos posible. *Cantharellus cibarius* (cantarelas) L. (Fries), *Lactarius deliciosus* (niscalos) L. (Gray), *Lentinus edodes* (shiitakes) S. (Berkeley), *Pleurotus ostreatus* (setas pleurotas) (Jacq. Ex Fr.) Kummer, *Boletus edulis* (boletos) (Fries/Bull), *Agaricus bisporus* (champiñones) L. (Imbach) y *Amanita caesarea* (amanitas) Scop. ex Fries (Persoon).

Tabla 9: Clasificación taxonómica de los hongos estudiados. Todos pertenecen a la división Basidiomycota, subdivisión Agaricomycotina y clase Agaricomycetes y subclase agaricomycetidae.

Orden	Familia	Género	Especie	Taxonomía	Nombre común en España
Agaricales	Agaricaceae	<i>Agaricus</i>	<i>bisporus</i>	J.E. Lange	Champiñón
Agaricales	Tricholomataceae	<i>Lentinus</i>	<i>edodes</i>	(Berk.) Singer	Shiitake
Agaricales	Pleurotaceae	<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>	(Jacq. ex Fr.) Kumm	Pleurota
Agaricales	Pluteaceae	<i>Amanita</i>	<i>caesarea</i>	(Scop.) Pers.	Amanita
Boletales	Boletaceae	<i>Boletus</i>	<i>edulis</i>	Bull. : Fr.,	Boleto
Cantharellales	Cantharellaceae	<i>Cantharellus</i>	<i>cibarius</i>	Fr.	Cantarela
Russulales	Russulaceae	<i>Lactarius</i>	<i>deliciosus</i>	L. (Gray)	Niscalos

Los cuerpos fructíferos de los hongos frescos se han cortado en trozos de aproximadamente 1 cm³ y se han sometido a un proceso de deshidratación, bien mediante la utilización de un secador de bandejas Edibon, S.A. (Alcorcón, Madrid, España) o bien mediante un proceso de liofilización (Unitop 400 SL, Virtis, Gardiner, NY, EEUU). En el proceso llevado a cabo en el secador de bandejas se fijan los siguientes parámetros: 60°C para la temperatura de secado, el flujo de ventilación al 70% y 9 h de tiempo de secado. Con respecto a la liofilización, ésta se realiza en tres

etapas, en la primera se fija la temperatura a -10°C sin vacío durante 6 minutos, en la segunda se mantiene la misma temperatura pero aplicando vacío durante 45 minutos, y por último, en la tercera se aumenta la temperatura de -10°C a 4°C con un gradiente de $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta que el alto vacío alcanzado indica que la liofilización ha terminado.

Una vez deshidratados, los trozos de hongos se han homogenizado en un molino JR MF10basic IKA (Laburtechnick, Germany) hasta obtener un tamaño de partícula inferior a $300\ \mu\text{m}$, el carpóforo pulverizado se almacena a -20°C .

3.2 Medida de la actividad antioxidante

3.2.1. Obtención de los extractos

Se han preparado tres tipos de extractos utilizando como disolventes agua, metanol y metil *terc*-butil éter, con el fin de evaluar la actividad antioxidante de los compuestos químicos extraídos con los diferentes disolventes: compuestos muy polares (agua), compuestos solubles en disolventes orgánicos pero de naturaleza polar (metanol) y apolares (metil *terc*-butil éter).

Extractos acuosos

Estos extractos se preparan añadiendo agua Milli Q a una cantidad determinada de hongo deshidratado en polvo, agitando durante 1 minuto y centrifugando posteriormente (Mikro 12-24 Hettich Zentrifugen, Alemania) durante 2 minutos a 14.000 rpm. El sobrenadante se utiliza inmediatamente para los ensayos o bien se coloca en vidrios de reloj durante 48 h a temperatura ambiente, en oscuridad, para calcular el peso seco del extracto.

El fraccionamiento de los extractos acuosos se lleva a cabo usando un método de filtración-centrifugación. Este método consiste en colocar los extractos acuosos obtenidos en la parte superior de unos filtros de celulosa específicos (YM-10 10.000 NMWL; Microcon, Millipore) que sólo permiten el paso de moléculas con peso molecular inferior a 10.000 daltons. Estos filtros se encuentran dispuestos en unos viales

tipo Eppendorf que se pueden insertar en microcentrífugas para usar la fuerza de la centrifugación como método de succión o filtración, obteniéndose así dos fracciones: una de bajo peso molecular o LMW (filtrado) y otra de alto peso molecular o HMW (residuo retenido en el filtro). La centrifugación se realiza evitando subidas de temperatura que pudieran deteriorar las muestras. Ambas fracciones se mantienen en hielo y se utilizan inmediatamente. Para determinar el peso seco de ambas fracciones, transcurrida la separación, las fracciones se colocan en un concentrador a vacío hasta su total sequedad (SpeedVac® plus SC250DDA, Savant; Instruments Inc. Holbrook, NY.). Inmediatamente después, se pesa cada fracción usando una balanza de precisión. La determinación se realiza por duplicado.

Extractos metanólicos

Se preparan añadiendo metanol a una cantidad determinada del polvo de los distintos hongos deshidratados, agitando posteriormente cada suspensión y centrifugado de la misma manera que se ha explicado en la preparación de los extractos acuosos. El sobrenadante se ha utilizado para la realización inmediata de los ensayos o se ha congelado a -20 °C. Para calcular el peso seco, los sobrenadantes se han transferido a tubos de ensayo para su posterior desecado utilizando un concentrador a vacío.

Extractos etéreos

Para la obtención de extractos etéreos se han pesado distintas cantidades del carpóforo pulverizado de cada hongo deshidratado en un eppendorf y se le ha añadido el metil *tert*-butil éter. Las suspensiones se han agitado y centrifugado de la misma forma descrita anteriormente en los extractos metanólicos y acuosos. Los sobrenadantes se han llevado a sequedad bajo una corriente de nitrógeno para poder ajustar los extractos a las concentraciones requeridas.

3.2.2. Método del ABTS^{•+}

Este método se ha utilizado para medir la capacidad antioxidante de los extractos acuosos obtenidos a partir de los distintos hongos, así como de las fracciones de alto y bajo peso molecular obtenidas tras el fraccionamiento de los extractos acuosos.

Preparación del radical ABTS^{•+} a partir de ABTS-H

Para la realización de este ensayo, se ha utilizado el método sugerido por (Rice-Evans y Miller, 1994), donde, es necesario generar el radical ABTS^{•+} (figura 25) a partir de su forma reducida que es la disponible comercialmente 2,2'-azinobis(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato (ABTS-H). Para ello, se disuelven 0,2 g de ABTS-H en 20 mL de agua Milli Q (10 mg/mL). Adicionando a continuación y bajo agitación vigorosa 1 g de óxido de manganeso (50 mg/mL) como agente oxidante. Una vez generado el radical ABTS^{•+} de color verde intenso (5 minutos aprox.), la preparación se filtra hasta obtener una solución sin trazas de MnO. La absorbancia final de la preparación debe alcanzar valores cercanos a la unidad a una longitud de onda de 414 nm.

Medida de la capacidad antioxidante de las muestras

La determinación de la capacidad captadora del radical ABTS^{•+}, se lleva a cabo espectrofotométricamente mezclando en cubetas desechables de 3 mL de metacrilato 100 µL de diferentes concentraciones de los extractos acuosos (0–1 mg/mL) con 2,9 mL de la solución de ABTS^{•+}. En el caso de los extractos obtenidos del fraccionamiento de las muestras acuosas solamente se utilizan 100 µL de una concentración de 10 mg/mL. En ambos casos, la mezcla se agita vigorosamente y se incuba a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 min. Posteriormente, se mide su absorbancia a 414 nm en el espectrofotómetro UV. El radical ABTS^{•+} es estable durante un tiempo superior a los 15 minutos de medida (1 h). La determinación se realiza por duplicado.

La actividad captadora de ABTS^{•+} se expresa de forma porcentual como la cantidad de radical captado por el extracto antioxidante, calculándolo según la ecuación:

$$\% \text{ ABTS}^{\bullet+} = (1 - (\text{Abs muestra})_{t_{15}} / (\text{Abs control})_{t_{15}}) * 100$$

donde:

(Abs control)_{t₁₅} = absorbancia de la disolución control de ABTS^{•+} al cabo de 15 min de incubación; (Abs muestra)_{t₁₅} = absorbancia de la muestra al cabo de 15 minutos.

Una vez calculado el porcentaje de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ captado para cada una de las concentraciones de las muestras utilizadas se representa frente a la concentración de cada muestra y se calcula el valor de EC_{50} para cada muestra. El EC_{50} se define como la concentración de muestra a la que se produce el 50% de captación del radical, por lo que los extractos con menor EC_{50} son mejores antioxidantes.

3.2.3. Método del DPPH[•]

La determinación de la actividad antioxidante de los extractos de los distintos hongos se ha evaluado como la capacidad de los mismos para captar radicales libres según el método propuesto por (Sanchez-Moreno *y col.*, 1998). Para dicha determinación se ha utilizado el radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo hidrato), (figura 26) ya que su forma como radical presenta un color morado intenso, mientras que su forma reducida tiene un color amarillo. De este modo se puede medir la desaparición del radical DPPH[•], debida a la capacidad de captación de radicales libres de la muestra, mediante la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm. Esta determinación se efectúa con distintas concentraciones de la muestra, de tal manera que permita la construcción de una curva donde se refleje el porcentaje de radical DPPH[•] remanente en cada caso. Haciendo uso de la parte recta de dicha curva se establece por interpolación la cantidad de muestra necesaria para producir un 50% de reducción del porcentaje de radical DPPH[•] (EC_{50}).

A 100 μL de los extractos con concentraciones comprendidas entre (0 y 10 mg/mL), se les añade 900 μL de una solución metanólica de DPPH[•] (76 μM), directamente sobre cubetas desechables de 1 mL de metacrilato. Así mismo, se prepara un control mediante la adición de 100 μL de metanol, agua Milli Q o metil *terc*-butil éter a los 900 μL de solución metanólica del radical DPPH[•]. Las mezclas (vigorosamente agitadas) se incuban durante 15 min en oscuridad y a temperatura ambiente, transcurrido ese tiempo se monitoriza su absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro UV-vis, empleándose el metanol como blanco. El radical es estable durante un tiempo muy superior a los 15 minutos de medida. La determinación se realiza por duplicado.

El porcentaje de DPPH• captado para cada una de las concentraciones de las muestras utilizadas se representa frente a la concentración de cada muestra. Una vez representado, se calcula el valor de EC₅₀ para cada muestra.

$$\% \text{ DPPH}^\bullet = (1 - (\text{Abs muestra})_{t_{15}} / (\text{Abs control})_{t_{15}}) * 100$$

donde:

(Abs control)_{t₁₅} = absorbancia de la disolución control de DPPH• al cabo de 15 min de incubación; (Abs muestra)_{t₁₅} = concentración de la muestra al cabo de 15 minutos.

3.2.4. Método para la determinación de la capacidad inhibitoria de la peroxidación lipídica

Para determinar si los hongos seleccionados poseen la capacidad de evitar la oxidación de las grasas, actuando así como antioxidantes lipídicos, se han preparado mezclas de aceite de girasol con cuerpos fructíferos pulverizados de los distintos hongos y con los extractos metanólicos obtenidos a partir de esos hongos y se les ha sometido a una oxidación acelerada utilizando un Rancimat® Metrohm, S.A., (Suiza).

Primeramente se han realizado ensayos mezclando 3g de aceite de girasol con 20 mg de polvo de cada cuerpo fructífero deshidratado para hacer un muestreo entre las diferentes especies en busca de antioxidantes lipídicos. Posteriormente las muestras se preparan mezclando 3g de aceite de girasol con 15 mg del extracto metanólico seco de cada hongo. También se ha preparado un ensayo añadiendo a los 3g de aceite, α-tocoferol (1,67 mg/g aceite) como control positivo y otro con sólo 3g de aceite como control negativo. La oxidación acelerada se realiza por duplicado a una temperatura de 120°C con un flujo de aire de 20 L/h, durante el tiempo suficiente para poder determinar los tiempos de inducción. El efecto de las muestras en retrasar la oxidación del aceite se expresa como factor de protección (*Pf*) y se calcula según la ecuación:

$$Pf = \frac{IP_{antiox}}{IP_{control}}$$

donde:

IP_{antiox} y *IP_{control}* son los tiempos de inducción de oxidación del aceite con y sin antioxidante (Han, y col., 2008)

3.3 Análisis de compuestos con capacidad antioxidante

3.3.1. Cromatografía en capa fina (TLC)

Para la separación y detección de compuestos con capacidad antioxidante, los extractos acuosos y metanólicos se han analizado por Cromatografía en capa fina (TLC). Así se añaden 10 µL de cada extracto metanólico (100 mg/mL) a una placa de sílica gel (60 F₂₅₄) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), utilizándose una fase móvil compuesta por tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (50:40:10) (v/v/v). Posteriormente, la tinción de placas se realiza por inmersión de la placa en una solución 1,27 mM de DPPH• según el procedimiento de (Soler Rivas y col., 2000). Junto a las muestras metanólicas se desarrollan compuestos patrón propuestos en la bibliografía como posibles responsables de la actividad antioxidante en diferentes especies de hongos comestibles. Así, se aplican 10 µL de soluciones patrón de 1 mg/mL de ergosterol y de vitamina D₃ (el ergocalciferol o vitamina D₂ co-migra con la vitamina D₃) y 0,5 mg/mL tocoferol y ácido ascórbico.

Los extractos acuosos (100 mg/mL) se filtran para la obtención de la fracción LMW. De esta fracción se añaden a la placa de sílice 6 µL de *C. cibarius*, *L. deliciosus*, *L. edodes*, *P. ostreatus*; 4 µL de *A. bisporus* y *A. caesarea* y 2 µL de *B. edulis*. La fase móvil utilizada está compuesta de una mezcla de metanol; ácido acético: ácido fórmico: agua (75:8:16:1) (v/v/v/v). La tinción de placas se realiza también con la misma solución de DPPH• anteriormente mencionada. Del mismo modo que para los extractos metanólicos, junto a las muestras se desarrollan compuestos patrón señalados en la bibliografía como responsables de la actividad antioxidante, así se utilizan 2 µL de soluciones patrón de 1 mg/mL ergotioneína y 0,5 mg/mL ácido ascórbico.

Posteriormente, se han calculado los factores de retención (R_fs) de las bandas observadas en las muestras y patrones según la fórmula:

$$R_f = \frac{R_m}{R_t}$$

donde R_m es la distancia migrada por la banda (desde el punto de aplicación) y R_t la distancia migrada por el frente.

Cuando los R_fs de las bandas observadas en las muestras coinciden con los patrones, se desarrollan TLC preparativas, y se extrae la banda visualizándola bajo una lámpara UV

ya que la sílice esta impregnada de un compuesto fluorescente a 254 nm. Los compuestos retenidos por la sílice separada se extraen con 3 mL de agua Milli Q, tras agitación en un Vórtex y centrifugación (5 min, 12.000 rpm). El sobrenadante se traspa a una cubeta de espectrofotómetro de barrido para poder visualizar su espectro UV-visible. El mismo proceso se realiza con el patrón coincidente.

3.3.2. Ergosterol

La identificación y cuantificación del ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol) presente en los cuerpos fructíferos de los hongos comestibles se ha realizado por cromatografía de gases (CG). En primer lugar, se lleva a cabo una saponificación, a 0,2 g de cada hongo se les añade 300 mg de ácido ascórbico y 10 mL de una solución de KOH al 11,5% en una mezcla de etanol absoluto (55% v/v) y agua (45% v/v), llevándose la mezcla a un baño termostatizado a 80° C con agitación vigorosa a 300 rpm durante 15 minutos. Se enfría rápidamente y se adicionan 10 mL de una solución de butil-hidroxitolueno (BHT) (0,01% w/v en hexano), se agita vigorosamente durante 2 minutos y se deja reposar para separar las fases durante 5 min. Seguidamente se extrae la fase orgánica y se añaden 5 mL más de BHT para realizar una segunda extracción. La segunda fase orgánica que se origina se adiciona a la primera extracción y se llevan a sequedad en un concentrador de vacío. El residuo seco se resuspende en 500 μ L hexano inyectándose 2 μ L en el cromatógrafo de gases (Varian CP-3380).

Para el análisis por CG de las muestras se ha utilizado una columna de metil silicona (007-1) de 30 m (QUADREX Corporation), programándose (software Star Chromatography Workstation 6.2, Varian) una rampa de temperaturas consistente comenzar con una temperatura de 80°C aumentando hasta 180°C con un ratio de 40°/min (2,5 min) y después llegar hasta 300°C a 6°/min manteniéndose durante 10 min (32,5 min). Posteriormente se vuelve a aumentar hasta 350°C a 15°/min durante 13 min (48,83 min). La temperatura del inyector se mantiene a 320°C y la del detector FID a 350 °C, seleccionándose un split de 1:5. El ergosterol, como estero mayoritario de los hongos de este estudio, se cuantifica usando una recta patrón de ergosterol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Su tiempo de retención en el método seleccionado es de 22,9 min.

3.3.3. Tocoferoles

La identificación y cuantificación de tocoferoles de los cuerpos fructíferos de los hongos seleccionados en este estudio se ha llevado a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La extracción de tocoferoles se ha realizado utilizando el mismo protocolo de saponificación y extracción descrito en el apartado anterior.

Posteriormente, la identificación y cuantificación de tocoferoles se lleva a cabo inyectando 20 μ L del extracto de cada hongo en un HPLC (ProStar 230 Varian) equipado con una columna Novapack C-18 RP (Waters) de 18 cm y de 5 micras de partícula y un detector de fotodiodos (PDA Prostar 330, Varian). La fase móvil está compuesta por 1% ácido acético en agua (A) y metanol (B) y se desarrolla a un flujo de 1 mL/min programando un gradiente de disolventes que comienza con un 70% de B aumentando a 95% a los 5 min, y manteniendo estas condiciones durante los 15 min. Después, al minuto siguiente se aumenta a 100% para mantener el flujo durante 4 min más. La identificación de los tocoferoles se lleva a cabo por la visualización de su espectro UV-visible y su tiempo de retención en comparación con patrones. Su cuantificación se lleva a cabo a 295 nm según una curva patrón de α -tocoferol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Los tiempos de retención de los tocoferoles desarrollados con el método programado han sido de 10,5 min para el δ -tocoferol, 11,2 min para β y γ - tocoferol y 12,1 min para el α -tocoferol.

3.3.4. Proteínas y péptidos

La determinación de proteínas y péptidos se ha realizado mediante el método de (Bradford, 1976) utilizando el Reactivo de Bradford mejorado (Sigma). El método consiste en la formación de complejos coloreados que tiene lugar entre el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 y los residuos básicos y aromáticos de aminoácidos (especialmente arginina) de las proteínas o péptidos en solución (figura 27).

La cantidad de proteínas se ha medido en diversos tipos de muestra. Si se utiliza el hongo completo, se pesan 10 mg del hongo comestible en polvo, se disuelven en 1 mL de agua Milli Q, se agitan 2 min en un Vórtex y se centrifugan 2 min a 14.000 rpm. El

sobrenadante que resulta es la fracción que se utiliza en el ensayo. Si se parte de otras muestras acuosas, como las fracciones de bajo peso molecular, éstas se centrifugan y se aplican directamente. En ambos casos, el sobrenadante (30 μL) se mezcla en una cubeta de 1 mL de espectrofotómetro con 970 μL del reactivo de Bradford (Sigma, Madrid), se agitan, se dejan incubar 5 min y transcurrido ese tiempo se realiza la lectura de su absorbancia a 595 nm. Como blanco se emplea agua. Las determinaciones se han realizado por duplicado.

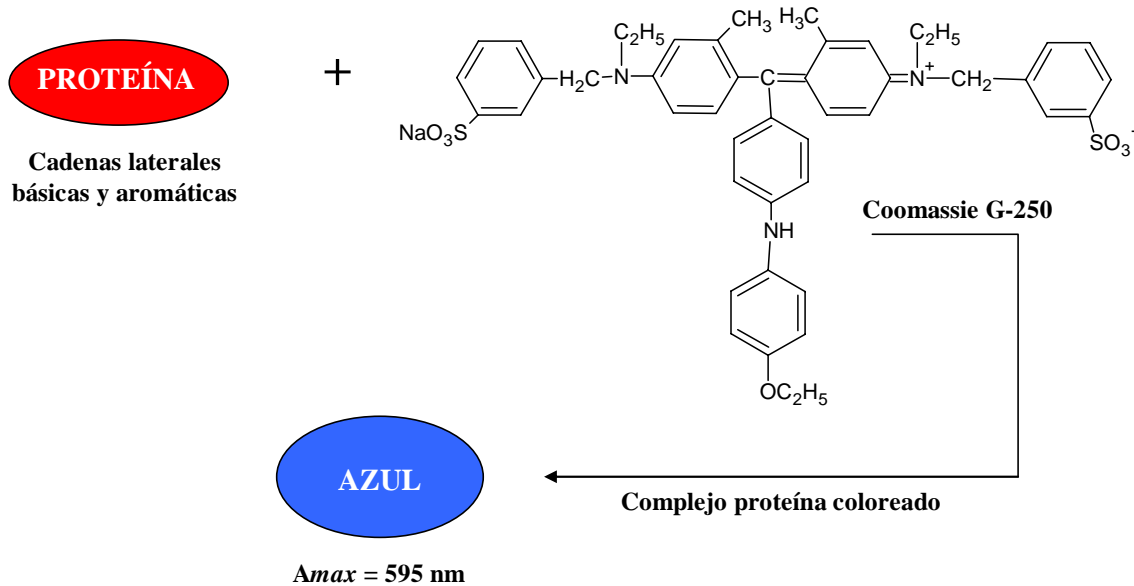


Figura 27: Formación del complejo coloreado entre el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 y proteínas o péptidos en solución.

Previamente, se prepara una curva patrón de albúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) de concentraciones comprendidas en el rango lineal de entre 0,1 y 1,4 mg/mL.

3.3.5. Fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se ha realizado por el método de Folin-Ciocalteu, de acuerdo al procedimiento de (Mau y col., 2002). Este método está basado en la reacción coloreada que tiene lugar entre el reactivo Folin-Ciocalteu y el grupo fenilo de los compuestos fenólicos. Como los residuos de tirosina o triptófano de péptidos o proteínas pueden interferir en el método, las muestras son normalmente pretratadas con TCA o HCl para precipitar las proteínas.

La determinación de estos compuestos se lleva a cabo en las muestras correspondientes al cuerpo fructífero pulverizado de hongos y en sus correspondientes extractos metanólicos y acuosos. En el caso de los extractos acuosos y para evitar el posible deterioro de los compuestos fenólicos por las enzimas oxidativas presentes, algunos de estos extractos llevan añadido 0,1M de piro sulfito de potasio, un inhibidor de este tipo de enzimas. También se ha evaluado la concentración fenólica en muestras incubadas durante 48h a temperatura ambiente y en oscuridad.

El análisis se efectúa disolviendo 10 mg de muestra en 1 mL de una solución de HCl (1,48%)-MeOH (60-40%), agitándola a continuación durante 1 minuto y centrifugándola a 14.000 rpm durante dos minutos. Posteriormente, se toman 100 μ L del sobrenadante de la muestra a cubetas de espectrofotómetro de 3 mL y se le añaden 2 mL de una solución de carbonato de sodio 2% (p/v). Se incuba durante 3 min, se le adiciona 50 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu y se incuba de nuevo durante 30 min a temperatura ambiente. La lectura se realiza a una longitud de onda de 750 nm. La determinación se ha llevado a cabo por duplicado.

Previamente se ha preparado una curva patrón con un fenol (ácido gálico). La recta de calibrado se ha realizado en cuadruplicado.

3.3.6. Ergotioneína

Para estimar de forma aproximada el contenido en ergotioneína se ha realizado una curva patrón partiendo de una concentración de 0,025 mg/mL y midiendo su absorbancia a 257 nm, el máximo de absorción del compuesto. Posteriormente, se mide la absorbancia, a esa misma longitud de onda, de la banda aislada de la placa de TLC que coincide con el punto de migración de la banda de ergotioneína.

3.4. Medida de las actividades de las enzimas oxidativas

Para el estudio de la actividad de las enzimas oxidativas (peroxidasas y polifenol oxidasas) de los hongos, se ha preparado una disolución de 40 mg/mL del hongo pulverizado en dos tipos diferentes de tampones, según el tipo de enzima. Para el ensayo

de la actividad peroxidasa se utiliza un tampón fosfato-ácido láctico 0,1 M a pH 4,5, mientras que para medir la actividad de las polifenol oxidasas se usa un tampón fosfato 50 mM a pH 6,5. Se agita posteriormente en un Vórtex durante 1 min y se centrifuga a 14000 rpm durante 2 min. El sobrenadante obtenido se mantiene en hielo hasta la realización del ensayo.

3.4.1. Medida de la actividad enzimática de las polifenol oxidasas

La actividad de las polifenol oxidasas (PPO) se ha medido utilizando como sustrato la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-Dopa) en presencia de un potente agente nucleofílico, la 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH), la cual, interactúa inmediatamente con el producto de la oxidación de la L-Dopa produciendo una reacción coloreada rosa (figura 28).

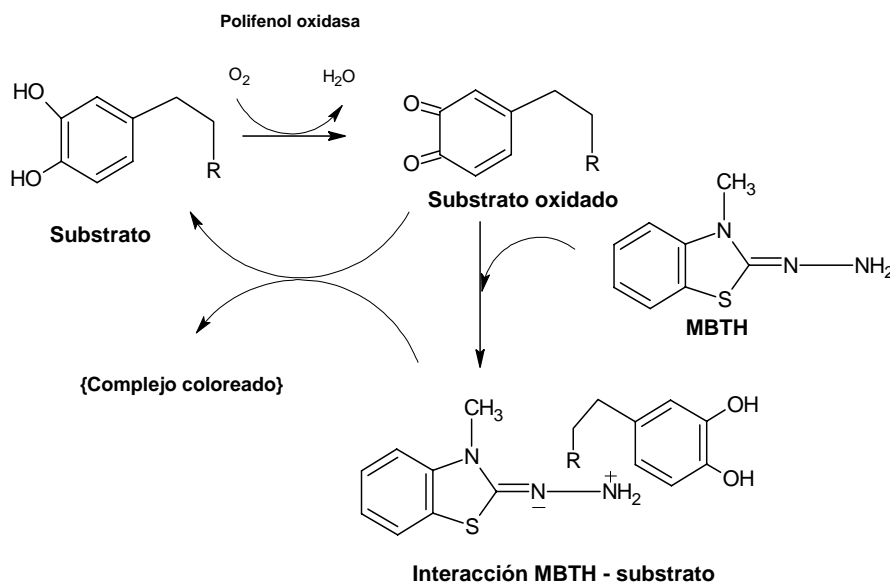


Figura 28. Mecanismo de acción de las polifenol oxidasas sobre un sustrato fenólico en presencia de MBTH, dando lugar a un complejo coloreado resultado de la actividad enzimática.

La actividad medida es la mitad de la actividad real, ya que por cada dos de las quinonas generadas, una de ellas reacciona para formar el complejo coloreado y la otra es reducida por el MBTH. Por lo tanto, las pendientes se multiplican por dos según lo postulado por (Espín y col., 1997).

Como se ha descrito en la introducción, los hongos poseen principalmente dos tipos de polifenol oxidasas, las tirosinasas (Tir^{asa}) y las lacasas (Lac). En algunos hongos, las tirosinasas se encuentran prácticamente en su totalidad en forma latente, por lo que para cuantificar el contenido total de este enzima se deben activar utilizando un 0,11% (w/v) de dodecil sulfato de sodio (SDS) (Yamaguchi y col., 1970), mientras que las lacasas se encuentran siempre activas. Así, para poder determinar el porcentaje de actividad debido a un tipo u otro de PPO se puede realizar el ensayo en presencia de un compuesto inhibidor específico de tirosinasa, como es la tropolona ($6.7\mu M$) (Kahn y Andrawis, 1985). Las formas de realizar el ensayo y calcular las actividades de cada una de las enzimas se esquematizan a continuación:

Ensayo	SDS	Tropolona	Actividad	
1	Si	No	Total Tir^{asa} (latente + activa) + Lac	Lac = ensayo 3 Tir^{asa} activa = ensayo 2 – ensayo 3 Tir^{asa} latente = ensayo 1 – ensayo 2
2	No	No	Tir^{asa} activa + Lac	Activ. tirosinasa total = ensayo 1 – ensayo 3
3	No	Si	Lac	Actividad PPO total = ensayo 1

La determinación de la actividad de las polifenol oxidasas totales (ensayo 1) se realiza mezclando en el siguiente orden: 20 μL de N,N-Dimetil formamida (DMF) (2% v/v), 100 μL de MBTH (5 mM), 780 μL de L-Dopa (14mM) en una cubeta de 1 mL de espectrofotómetro. Posteriormente se añaden 100 μL de una solución preparada previamente y que contiene 10 μL de muestra, 35 μL de una solución de SDS (3,5mM) y 55 μL agua Milli Q. La monitorización espectrofotométrica de la reacción se lleva a cabo usando un espectrofotómetro UV-1700 Pharmaspec, UV-visible Shimadzu (Suzhou Instruments Manufacturing, Co. Ltd, China) capaz de medir el cambio de absorbancia durante un tiempo establecido. Así se mide el cambio de color de la reacción a 484 nm, durante 2 min según se describe en el protocolo de (Espín y col., 1997).

Para la realización del ensayo 2 se han mezclado los mismos reactivos que en el ensayo 1 pero los 100 μL últimos se añadieron directamente de la muestra, sin realizar ningún paso de activación previa. Y para el ensayo 3 se han añadido los 100 μL de muestra con un $6,7\mu M$ de tropolona añadido previamente. Los ensayos se realizan por duplicado.

Aunque la monitorización de la reacción enzimática se visualiza durante 2 min, la pendiente de la curva se calcula aproximadamente durante los 10 primeros segundos de reacción, tiempo en el que, según se observa en la evolución de la curva de la reacción (figura 29), el cambio de absorbancia sigue una línea recta respecto al tiempo, indicando que en ese periodo, la reacción sigue una ecuación de primer orden donde los valores de absorbancia se pueden considerar proporcionales a los de la actividad.

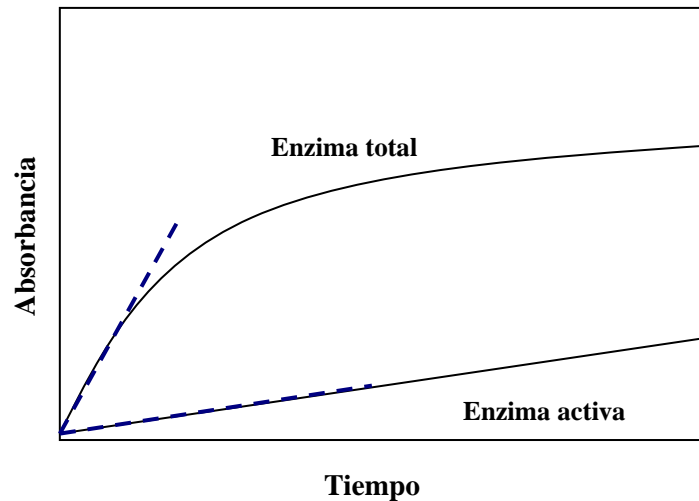


Figura 29. Curvas de reacción cuando las enzimas se activan totalmente por adición de SDS o cuando sólo se miden aquéllas que estén ya activas en el cuerpo fructífero del hongo.

Para transformar los valores de las pendientes de las curvas, expresados como incremento de absorbancia por minuto ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$), en unidades internacionales establecidas para las actividades enzimáticas: katal/g peso seco de hongo (katal = mol/s), se ha aplicado la siguiente fórmula de conversión:

$$\text{Actividad} = \frac{\text{Abs}}{\varepsilon * 60} * \frac{V \text{ (cubeta)}}{V_m \text{ (muestra)} * C \text{ (muestra)}} = \frac{\text{Abs}}{22.300 * 60} * \frac{1 \text{ (mL)}}{V_m \text{ (mL)} * C \text{ (mg/mL)}}$$

donde: Abs: Absorbancia obtenida en la parte lineal de la curva; V: Volumen de reacción (mL); V_m : Volumen de muestra aplicada (mL); C: Concentración de muestra aplicada (mg/mL); ε : Coeficiente de extinción del producto de reacción (22.300) calculado por (Espín y col., 1997) para las condiciones de ensayo aplicadas. La actividad también se puede expresar como mkat/g o $\mu\text{kat}/\text{g}$.

3.4.2. Medida de la actividad enzimática de las peroxidasas

La actividad de las peroxidasas se ha medido siguiendo el método descrito por (Castillo y col., 1994) en el que utiliza como sustrato de peroxidasas la 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH), la cual, interactúa con el ácido 3-(dimetilamino)benzoico (DMAB) produciendo una reacción coloreada púrpura en presencia del enzima, peróxido de hidrógeno y Mn (figura 30).

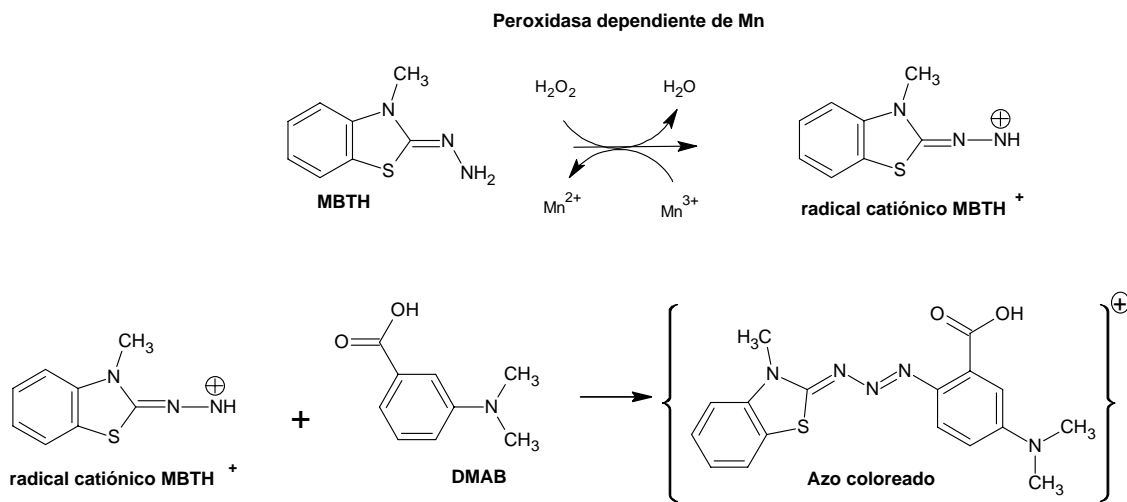


Figura 30. Reacción de la peroxidasa según el método de (Castillo y col., 1994) que da lugar a un compuesto coloreado que se utiliza para medir la actividad del enzima.

Si el ensayo se realiza con la presencia de Mn y H₂O₂ en el medio de reacción, el valor obtenido corresponde a la actividad de los dos tipos de peroxidasas: la MnP (peroxidasa dependiente de manganeso) y LiP (peroxidasa independiente de manganeso) y a la de la lacasa. Este último enzima es una polifenol oxidasa que también es capaz de catalizar la reacción e interfiere en las medidas. Pero, si el ensayo se vuelve a realizar sin presencia de H₂O₂ se obtiene el valor de actividad debido exclusivamente a la lacasa ya que este enzima no necesita el cofactor para llevar a cabo la reacción. Con la substracción de este valor al primero obtenido se estima la actividad debida exclusivamente a las peroxidasas. Para diferenciar entre MnP y LiP sólo hay que volver a realizar el ensayo con H₂O₂ pero sustituyendo el Mn por EDTA (agente quelante de los iones, incluido el Mn), la actividad resultante se deberá a la acción exclusiva de LiP y la lacasa. Luego las

formas de realizar el ensayo y calcular las actividades de cada una de las tres enzimas se esquematizan a continuación:

Ensayo	H ₂ O ₂	Mn ⁺²	Actividad	
1	Si	Si	MnP + LiP + Lac	Lac = ensayo 3 LiP = ensayo 2 – ensayo 3
2	Si	No	LiP + Lac	MnP = ensayo 1 – ensayo 2
3	No	No	Lac	Actividad peroxidasa total (POD) = MnP + LiP

Para la realización del ensayo 1 se mezclan 100 µL de una solución de MBTH (0,07 mM)-DMAB (1 mM), 830 µL de tampón fosfato-láctico, 10 µL de una solución de MnSO₄ (0,06 mM), 10 µL solución H₂O₂ (0,1 mM) y por último se adicionan 50 µL de la muestra en una cubeta de 1 mL de espectrofotómetro. La monitorización de la reacción enzimática se lleva a cabo midiendo la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a 590 nm durante 2 min, según el método descrito por (Mata y Savoie, 1998). Para la realización del ensayo 2 se toma la misma cantidad de solución sustrato MBTH-DMAB, del tampón fosfato-láctico y de la solución de H₂O₂ descritos en el procedimiento anterior sólo que en este caso se sustituye el MnSO₄ por 10 µL de una solución EDTA (0,133mM). La monitorización espectrofotométrica también se ha realizado con los mismos parámetros descritos anteriormente. Y por último, para la realización del ensayo 3, la determinación de la lacasa (Lac), se mezcla la misma cantidad de solución sustrato MBTH-DMAB, del tampón fosfato-láctico expuestos anteriormente con 20 µL de agua Milli Q y 50 µL de muestra y se mide de igual forma en el espectrofotómetro. Las determinaciones se realizan por duplicado.

Para transformar los valores de las pendientes de las curvas de absorbancia frente al tiempo en unidades internacionales establecidas para las actividades enzimáticas: katal/g de peso seco de hongo (katal=mol/s), se ha aplicado una fórmula similar a la indicada anteriormente para las polifenol oxidasas; variando sólo en este caso el valor de ϵ que es el coeficiente de extinción (32.900) del producto coloreado formado en las condiciones de ensayo descritas según ha sido descrito en (Mata y Savoie, 1998).

3.5. Determinación de la actividad antimicrobiana

3.5.1. Preparación de muestras para análisis

Los extractos se preparan a partir de una concentración de 40 mg/mL de polvo del hongo liofilizado en agua o metanol. Estas muestras se agitan para mejorar la disolución del polvo y se centrifugan durante 2 minutos a 14.000 rpm. El sobrenadante se utiliza inmediatamente para los ensayos o bien se lleva a sequedad. También se han preparado extractos donde el agua se sustituye por soluciones acuosas que contienen inhibidores de las enzimas oxidativas como son el piro-sulfito de potasio (0,01 y 0,1M) y la azida de sodio (0,01 y 0,1M), las cuales se agitan y centrifugan siguiendo el mismo método que para las acuosas.

3.5.2. Microorganismos y medios de cultivo

La actividad antimicrobiana de los distintos extractos se ha medido frente a una bacteria gram +, *Staphylococcus aureus* ATCC (american type culture collection) 25923, una bacteria gram -, *Escherichia coli* ATCC 11775 y la levadura *Candida albicans* ATCC 60193. Dichos microorganismos se han conservado congelados en nitrógeno líquido hasta su utilización. En la tabla 10 se muestran los distintos medios de cultivo líquidos y sólidos empleados para el crecimiento de los microorganismos utilizados, así como la temperatura y tiempo de incubación para cada uno de ellos.

Tabla 10. Condiciones y medios de cultivo de los microorganismos empleados.

Microorganismo	Medio de cultivo (líquido)	Medio de cultivo (sólido)	T ^a (°C)	Tiempo de incubación (h)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nutritivo	Nutritivo	37 °C	24
<i>Escheriquia coli</i>	Nutritivo	Nutritivo	37 °C	24
<i>Cándida albicans</i>	Sabouraud Dextrose	Sabouraud Dextrose	25 °C	48

3.5.3. Cálculo del número de unidades formadoras de colonias

Para controlar la cantidad de microorganismos utilizados en los ensayos, se ha realizado una correlación entre la densidad óptica (a 640 nm) del cultivo y el número de unidades

formadoras de colonias (ufc)/mL presentes en el mismo. Así, se ha medido la densidad óptica tanto del cultivo stock, como de una serie de diluciones seriadas a partir del mismo, para posteriormente extraer una alícuota de las distintas diluciones y proceder a su sembrado en placa con el fin de contar el número de unidades formadoras de colonias obtenidas en cada caso. A partir de estos datos se ha construido una curva de calibrado para cada microorganismo, en las condiciones de cultivo empleadas, que relaciona la densidad óptica del cultivo con el número de ufc/mL en cada caso.

3.5.4. Cálculo de las concentraciones inhibitorias mínimas y de las concentraciones bactericidas y fungicidas mínimas.

Estos ensayos se llevan a cabo en placas de 96 pocillos, añadiendo en cada uno de ellos 165 μL del medio líquido de cultivo, adecuado para cada microorganismo, 5 μL de los inóculos y 30 μL de las distintas disoluciones de los extractos. El volumen final de cada pocillo es de 200 μL . Los inóculos de los distintos microorganismos se preparan a partir de cultivos de 24 horas con una densidad final de 10^7 ufc/mL para las bacterias y de 10^6 ufc/mL para la levadura. Las disoluciones de los distintos extractos, en agua o metanol, se preparan en un rango de concentraciones de 70 a 1 mg/mL. Como controles negativos se añaden 30 μL de agua y metanol. El cloranfenicol y la anfotericina B se utilizan como controles positivos.

Las placas se incuban durante 24 horas para las bacterias y durante 48 horas para la levadura. La concentración inhibitoria mínima de cada extracto se determina mediante la inspección visual de los pocillos, una vez concluido el tiempo de incubación, ya que el crecimiento de los microorganismos se pone de manifiesto por la presencia de un precipitado en el fondo de los pocillos. La concentración de extracto más baja que inhibe el crecimiento de los microorganismos, medido como ausencia de precipitado, se designa concentración inhibitoria mínima (MIC). La concentración bactericida (MBC) y fungicida mínima (MFC) se determinan mediante la siembra en placa de una alícuota proveniente de los pocillos donde no se aprecia presencia del precipitado. Cada ensayo se ha realizado por duplicado y se ha repetido tres veces.

3.6. Medida de la actividad antiviral

La medida de la actividad antiviral de los distintos extractos (preparados del mismo modo que para la determinación de la actividad antimicrobiana) se ha llevado a cabo frente al virus del herpes simplex tipo 1 (HSV-1) (KOS) obtenido de la ATCC y conservado a -80°C hasta su uso. Para el crecimiento de este virus se ha utilizado la línea celular Vero (células de hígado de mono verde africano) suministrada por la empresa Vircell (Granada, España). El medio de crecimiento de esta línea celular está compuesto por MEM (medio mínimo esencial con sales de Earl) suplementado con un 5% de suero bovino fetal (FBS), un 1% de penicilina-estreptomicina, un 1% de hepes, un 1% de aminoácidos no esenciales y un 1% de glutamina. El medio de mantenimiento es el mismo que el descrito anteriormente pero con un 2% de suero fetal bovino. La titulación del virus se ha realizado mediante ensayos de reducción de placas en células Vero y se expresa como unidades formadoras de placas (pfu) por mL.

3.6.1. Ensayos de toxicidad

El efecto citotóxico de los distintos extractos sobre las células Vero se ha evaluado utilizando 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), de acuerdo al método publicado por Mosmann (1983). El MTT es un compuesto de color amarillo soluble en agua que es reducido por las deshidrogenadas mitocondriales de las células vivas (pero no por las muertas) a formazan púrpura insoluble en agua.

Los ensayos de toxicidad se llevan a cabo en placas de 24 pocillos que contienen monocapas de células Vero sobre las cuales se añaden distintas concentraciones de los extractos cuya toxicidad se quiere evaluar. Dichos extractos se disuelven en medio completo con un 2% de suero bovino fetal y las placas se incuban a 37°C y 5% de CO_2 durante 48 h. Al cabo de este tiempo, las células se lavan con PBS y se añaden 500 μL de una solución de 0,5 mg/mL de MTT. Las placas se incuban a 37°C durante 4 h para permitir la conversión del MTT en el formazan púrpura. Pasado este tiempo se eliminan los sobrenadantes y se añaden a cada pocillo 500 μL de una solución que contiene un 10% de dodecilsulfato sódico en una mezcla a partes iguales de agua y dimetilformamida y cuyo pH se ha ajustado a 4,7 con ácido acético, solución que es

capaz de disolver los cristales de formazan formados. Al cabo de 24 horas de incubación a 37°C, se cuantifica la cantidad de formazan formada midiendo la absorbancia de cada pocillo a 570 nm en un lector de placas Sunrise Tecan (Grödig, Austria). El efecto citotóxico de cada extracto a distintas concentraciones se expresa como porcentaje, comparando las células tratadas con células incubadas sólo con el medio de cultivo. Los resultados se indican como CC₅₀ que es la concentración necesaria para reducir al 50% el número de células viables.

3.6.2. Evaluación de la actividad antiviral

La evaluación de la actividad antiviral de los extractos se ha llevado a cabo a diferentes tiempos durante el periodo de infección del virus. Así, (1) el virus se ha incubado con el extracto durante 1h antes de proceder a la infección de las células (viricida), (2) las células se han pre-tratado con el extracto durante 3h previa infección con el virus (pre-tratamiento), (3) el extracto se ha añadido al mismo tiempo que el virus durante el periodo de infección de las células (adsorción) y (4) el extracto se ha añadido a las células inmediatamente después de su infección con el virus (replicación intracelular).

Efecto viricida

Mediante este ensayo se ha evaluado el efecto directo que sobre el virus del herpes simple tipo 1 tienen los extractos obtenidos a partir de los distintos hongos. Para ello, se ha incubado una suspensión del virus en medio de cultivo en presencia de distintas concentraciones de los extractos durante 1 h a 37°C y, previa dilución, estos virus se han utilizado para infectar las monocapas de células Vero. Después de la incubación a 37°C durante 1 h para permitir la adsorción del virus, se lavan los pocillos con PBS y se añade medio de mantenimiento. Después de 48 h a 37°C, las monocapas se fijan con una mezcla de acetona:metanol (50:50) a 4°C, se tiñen con una solución al 1% de cristal violeta y se cuenta el número de unidades formadoras de placas al microscopio.

La cantidad de virus capaces de infectar las células que quedan en la suspensión tras estar en contacto con los extractos se expresa como porcentaje de actividad residual comparado con un control. Como control se emplea una suspensión del virus que se incuba durante 1h en ausencia de los extractos (sólo medio de cultivo).

Efecto del pre-tratamiento

Con este ensayo se quiere evaluar el efecto protector que sobre la infección de células Vero por el HSV-1 tiene un pre-tratamiento con los distintos extractos empleados. Para llevar a cabo este ensayo, sobre monocapas de células Vero se añaden distintas concentraciones de los extractos acuosos y metanólicos obtenidos a partir de los hongos y se incuban durante 3h a 37°C. Posteriormente se lavan los pocillos con PBS, se infectan con 120 ufc/mL del HSV-1, diluido en 150 µL del medio suplementado con un 2% de FBS y se incuban a 37°C durante 1 h. Se lavan los pocillos con PBS y a las 48 h, las monocapas se fijan con una mezcla de acetona:metanol (50:50) a 4°C, se tiñen con una solución al 1% de cristal violeta y se cuenta el número de unidades formadoras de placas. El efecto del pre-tratamiento con los distintos extractos se expresa como el porcentaje de unidades formadoras de placas obtenido en cada caso respecto al que se obtiene cuando el pre-tratamiento se realiza con un control que sólo contiene el medio de cultivo.

Efecto sobre la adsorción

En este ensayo los distintos extractos se añaden durante la etapa de adsorción del virus en la célula, con el fin de estudiar si dicha etapa se ve modificada por su presencia. Así, sobre monocapas de células Vero se añade, al mismo tiempo, 120 ufc/mL del HSV-1, diluido en 150 µL del medio donde se encuentra disuelto el extracto correspondiente y se incuban a 37°C, durante 1h. Se lavan los pocillos con PBS y a las 48 h, las monocapas se fijan con una mezcla de acetona:metanol (50:50) a 4°C, se tiñen con una solución al 1% de cristal violeta y se cuenta el número de unidades formadoras de placas. El efecto sobre la adsorción del virus de los distintos extractos se expresa como el porcentaje de placas obtenido en cada caso respecto al que se obtiene cuando el ensayo se realiza con un control que sólo contiene el virus en medio de cultivo, sin la presencia del extracto.

Efecto sobre la replicación intracelular

Para determinar si los extractos obtenidos tienen influencia en la etapa de replicación intracelular del virus, monocapas de células Vero se infectan con 120 ufc/mL del HSV-

1, diluido en 150 μ L del medio suplementado con un 2% de FBS. Después de la incubación a 37°C durante 1 h para permitir la adsorción del virus, se lavan los pocillos con PBS y se añade medio de mantenimiento que contiene disueltas las distintas concentraciones de los extractos cuya capacidad antiviral se quiere evaluar. Después de 48 h de incubación, las monocapas se fijan con una mezcla de acetona:metanol (50:50) a 4°C, se tiñen con una solución al 1% de cristal violeta y se cuenta el número de unidades formadoras de placa al microscopio. Los resultados se expresan como IC₅₀ (concentración inhibitoria al 50%) que es la concentración necesaria del extracto para reducir el número de placas formadas en un 50% frente a un control. Los valores de IC₅₀ se han calculado a partir de las curvas de dosis-respuesta obtenidas a partir de los datos.

3.6.3. Determinación de polisacáridos

El aislamiento y la cuantificación de la fracción correspondiente a los polisacáridos de los hongos seleccionados se llevó a cabo según el protocolo descrito por (Jeurink *et al.*, 2008). Para aislar los polisacáridos se parte de 1 g del polvo liofilizado del hongo, el cual se resuspende en 100 mL de agua Milli Q a 120°C (autoclavada durante 20 min), se enfría a 4°C y posteriormente, se precipitan los polisacáridos añadiendo 2 volúmenes de etanol frío (toda la noche a 4°C). Los polisacáridos precipitados se recuperan por centrifugación de la disolución anterior a 4.000 rpm durante 60 min a 4°C. Inmediatamente, se descarta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 100 mL de agua Milli Q y se somete de nuevo al procedimiento de extracción descrito anteriormente. Posteriormente, se procede a dializar los polisacáridos durante 24h utilizando una membrana de diálisis (3500 Daltons, Medicell International, Ltd, Liverpool Road, London) en agua Milli Q. Después de la diálisis se liofiliza el contenido de la membrana y se conserva a -20°C hasta su utilización.

Las membranas de diálisis se acondicionan mediante un lavado con agua a 100°C que contiene un 1% de EDTA 0,5 M durante 10 min, seguido de un enfriamiento mediante una inmersión en agua Milli Q.

La determinación del contenido total de carbohidratos en los liofilizados obtenidos se ha llevado a cabo mediante el método de (Fox y Robyt, 1991), método modificado del fenol-ácido sulfúrico. Partiendo de una disolución de 1 mg/mL en agua del liofilizado

obtenido en el paso anterior, se mezclan 25 μL de dicha solución con 25 μL de 5% (p/v) fenol. Esta mezcla se agita y se coloca sobre hielo donde se añaden 125 μL de H_2SO_4 , se calienta a 80°C durante 30 min e inmediatamente se mide la absorbancia a 490 nm en un lector de placas. Previamente se ha preparado una curva patrón con glucosa en las mismas condiciones. La determinación se realiza por triplicado.

3.7. Tratamiento culinario de hongos

Los cuerpos fructíferos frescos de los hongos seleccionados se cortan en trozos de aprox. 1 cm^3 y se someten a los siguientes tratamientos culinarios:

Cocción en seco

Los trozos de hongos (30 g) se cocinan durante 10 min directamente en una plancha de fondo no enervado de teflón precalentada a 180°C. Cada cierto tiempo se remueven con una espátula de madera para evitar que se quemen simulando las condiciones típicas domésticas.

Cocción en medio graso

Las muestras (30 g) se someten a una fritura superficial en una sartén de teflón de 20 cm de diámetro que contiene 15 mL de aceite de oliva extra virgen precalentado a 160°C, durante 10 minutos. Los trozos de hongos se remueven cada cierto tiempo.

Cocción en medio acuoso

Los trozos de hongos (30 g) se vierten en agua hirviendo (1,5 L) y se mantienen en un hervor suave durante 10 min. Posteriormente, los hongos cocinados se colocan sobre papel filtro para eliminar el exceso de agua.

Cocción en microondas

Las muestras (30 g) se someten a un tratamiento de cocción en un microondas doméstico (Whirlpool MD 111, Sweden) durante distintos tiempos (1, 2,5, 5 y 10 min) a

900 vatios con 1,5 L de agua. Después se colocan sobre papel filtro para eliminar el exceso de agua.

Las muestras cocinadas según los distintos métodos se han deshidratado a 40°C en una estufa (J.P. Selecta, Barcelona, España). Posteriormente, las muestras deshidratadas se muelen en un mortero hasta obtener un fino polvo y se almacenan a -20°C hasta su análisis.

3.7.1. Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de las alícuotas secas y pulverizadas obtenidas después de los procesos de cocción en los diferentes medios, se han sometido a una extracción acuosa y a otra metanólica con el fin de determinar si los compuestos responsables de la actividad antioxidante son solubles en agua o en metanol. Para ello se toman 100 mg de cada muestra, se disuelven en 1 mL de metanol, se agitan en un Vórtex durante 2 min y se centrifugan (14.000 rpm, 2 min). El sobrenadante se utiliza para la medida de su capacidad captadora del radical DPPH[•], según el protocolo previamente descrito. Para las muestras acuosas, se toman 20 mg, se disuelven en 1 mL de agua Milli Q, se agitan y se centrifugan como se ha descrito para los extractos metanólicos, y se mide la capacidad captadora del radical ABTS^{•+} de los sobrenadantes resultantes según el método descrito anteriormente. Las determinaciones se realizan por duplicado.

3.8. Medida de la biodisponibilidad de los compuestos antioxidantes presentes en los hongos

3.8.1. Digestión in vitro

Los cuerpos fructíferos frescos cortados en trozos, se cocinan siguiendo el método descrito anteriormente como cocción en seco y se someten a una digestión *in vitro* basándose en el método de (Miller y *col.*, 1981), con algunas variaciones.

Masticación

La muestra cocinada (130 g) se mezcla con 10 mL de saliva humana obtenida de voluntarios y 10 mL de agua y se tritura durante 5 minutos en un mortero. Se separa una alícuota (2 g) para la determinación de la actividad antioxidante después del proceso de masticación.

Digestión estomacal

Las muestras masticadas se diluyen con 100 mL de agua y el pH de la mezcla se reduce a 2 mediante la adición de HCl 6M. Una vez ajustado el pH, se añade una cantidad de solución de pepsina porcina en proporción 0,5 g de pepsina/100 g homogeneizado (0,8 g de pepsina (Sigma) en 5 mL HCl 0,1 M) y se deja incubar durante 2 h a 37°C con una agitación rotacional lenta a 60 rpm. En este momento, se separa una alícuota (20 g) que se congela y deshidrata para calcular el peso seco y para la determinación de la actividad antioxidante después de la digestión estomacal.

Digestión intestinal

A la mezcla resultante de la digestión estomacal (80 g) se le añade 20 mL de una solución pancreática (0,08 g de pancreatina de porcino (Sigma) y 0,5 g de sales biliares (Sigma) en 20 mL de NaHCO₃ 0,1M) y se ajusta el pH a 7,5 con NaOH 0,5 M. Después, la mezcla digerida (80 g) se estabiliza con NaHCO₃, donde la cantidad necesaria se ha obtenido mediante la siguiente fórmula:

$$\text{g de NaHCO}_3 = \frac{2 * (\text{mL gastados de NaOH } 0,5\text{M}) * 84}{1000}$$

Posteriormente, se incuba durante 30 min hasta que el pH disminuya a 5. Si ésto no se produce, se adiciona HCl 6 M hasta conseguirlo. Después, se añaden otros 20 mL de la solución pancreática y se incuba hasta 2 h a 37°C con una agitación rotacional lenta a 60 rpm. Se separan alícuotas antes y después de la adición de NaHCO₃ para estudiar el efecto de este compuesto y del cambio de pH sobre la medida de la actividad antioxidante. La preparación obtenida tras la digestión es una mezcla de un

sobrenadante líquido que se corresponde con la parte que los enterocitos intestinales podrían adsorber y un precipitado sólido que atravesaría el intestino y posteriormente sería o bien asimilado por las bacterias del colon o bien descartado en las heces.

3.8.2. Medida de la absorción intestinal *in vitro*

La determinación de la absorción intestinal se ha llevado a cabo mediante el empleo de la línea celular Caco-2 (Invitrogen, Barcelona) procedente de adenocarcinoma de colon humano. Las células se mantienen en el medio Dubelcco's Modified Eagle's (DMEM) con un alto contenido en glucosa (4,5 g/L) y suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS), un 1% de penicilina-estreptomicina, un 1% de hepes, un 1% de aminoácidos no esenciales y un 1% de glutamina.

Previamente a la realización de los ensayos de absorción, se ha medido la toxicidad de los distintos extractos utilizados frente a monocapas de células Caco-2, utilizándose un método análogo al descrito anteriormente para la determinación de la toxicidad de los extractos frente a las células Vero.

Para llevar a cabo los ensayos de absorción se han utilizado células Caco-2 entre los pases 30 y 45. Empleándose placas de 12 pocillos Transwell® (Costar, Corning, NY, USA) que constan de una zona apical y otra basolateral separadas entre si por una membrana de poliéster semipermeable (figura 31).

Las células se siembran con una densidad de 10^5 células/cm² sobre la membrana contenida en el soporte de cada pocillo (tamaño de poro 0,4 μm, diámetro, 12 mm de diámetro, 1,1 cm² de superficie de crecimiento) y se añade medio de cultivo tanto en la zona apical (750 μL) como basolateral (1,5 mL). El medio de cultivo se reemplaza cada 2 días y se permite que las células Caco-2 crezcan sobre la membrana formando una monocapa (cubriendo toda la superficie) y que posteriormente se diferencien formando el borde de cepillo característico de los enterocitos intestinales. Todo el proceso dura aproximadamente 21 días.

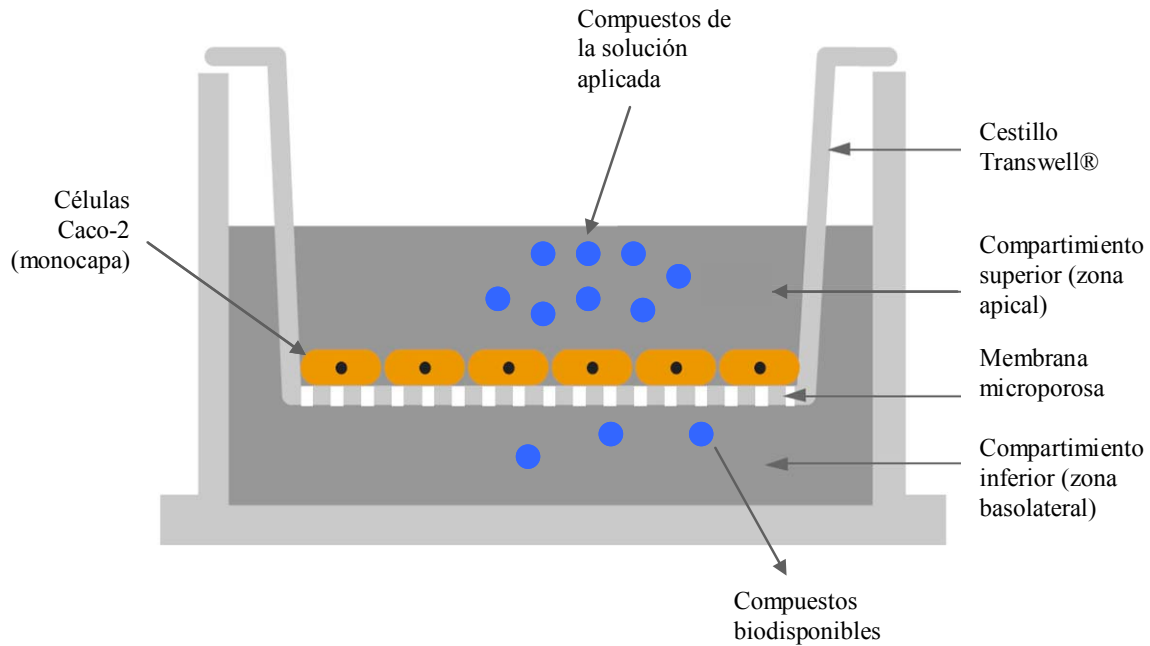


Figura 31: Esquema de un pocillo de las placas Transwell® donde las células Caco-2 crecen sobre una membrana cubriendo toda la superficie y dejando separados los compartimentos apical y basolateral.

Previamente a la realización de los estudios de absorción se evalúa la integridad de la monocapa de células midiendo el potencial transmembrana (TEER) mediante un voltímetro (Evon, World Precision Instruments, Sarasota, FL) y su diferenciación mediante la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP). Sólo se realizan los ensayos cuando la medida del TEER es $> 250 \Omega\text{cm}^2$ y los valores de actividad ALP rondan los 12 - 14 mUI/mg proteína (figura 33). Una vez comprobada la integridad de la membrana celular y la diferenciación celular, se añade a la zona apical del pocillo una concentración determinada no tóxica del sobrenadante obtenido tras la digestión intestinal disuelto en 750 μL de medio de cultivo, y en la zona basolateral se añade 1 mL de medio de cultivo. Estas placas se incuban a 37°C y 5% CO_2 durante 3h y se procede a la recuperación del medio de cultivo tanto de la zona apical como basolateral para su posterior análisis.

Medida del potencial transmembrana

La integridad de las monocapas celulares se ha determinado midiendo el potencial transmembrana (TEER) mediante el uso de un aparato específico que consiste en unos

electrodos especiales acoplados a un voltímetro (Evon). Estos electrodos tienen diferente longitud para facilitar que cuando el electrodo más largo se coloque sobre el fondo del compartimiento basolateral, el electrodo más corto, que se introduce en el compartimiento apical, no roce la monocapa de células (figura 32).

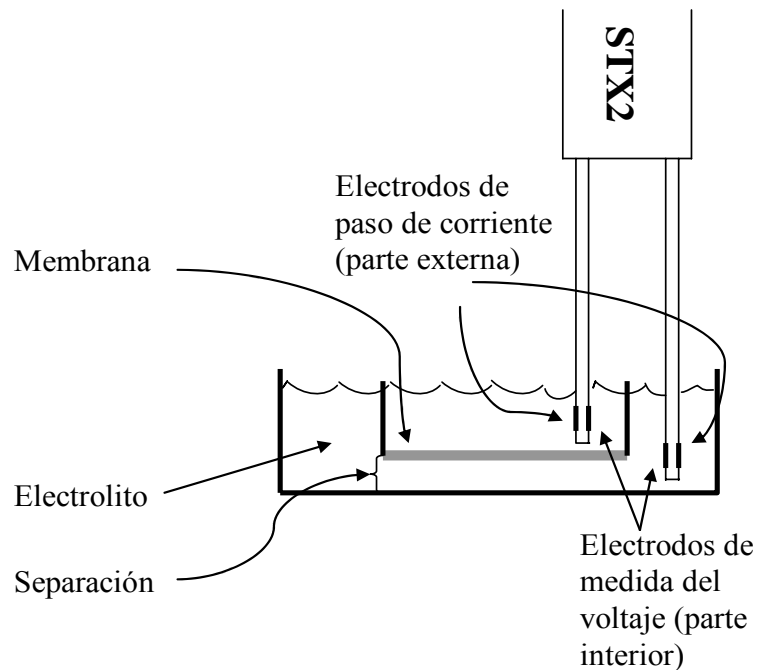


Figura 32: Esquema de la medida del potencial transmembrana

Antes de realizar la medida, los electrodos se han esterilizado por inmersión en una solución al 70% de etanol durante 15 min. y posteriormente se han introducido en una solución esterilizada de 0,15 M KCl para equilibrarlos. Como control se mide el TEER de un pocillo que sólo contiene medio de cultivo (sin células). Los valores del TEER se han expresado como resistencia por unidad de área, ya que ésta es independiente del área de la membrana utilizada, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Resistencia (monocapa)} = \text{Resistencia (total)} - \text{Resistencia (blanco)}$$

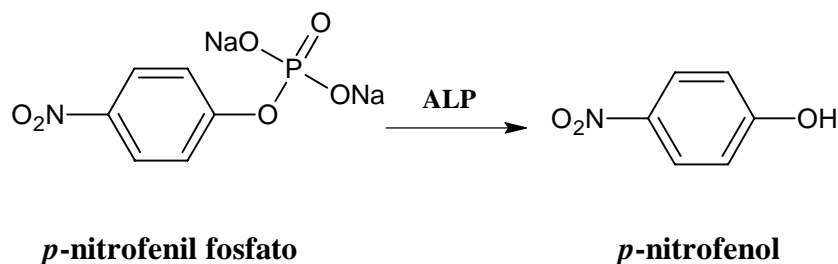
Donde Resistencia total es el valor obtenido en un pocillo que contiene células Caco-2 con su correspondiente medio de cultivo y Resistencia blanco es el obtenido en un pocillo donde sólo hay medio de cultivo. Así, Resistencia (monocapa) es el valor debido sólo a la monocapa de células.

$$\text{Resistencia} * \text{Área de la membrana} = \text{Resistencia (monocapa)} * \pi d^2 / 4 \quad (\Omega\text{cm}^2)$$

En este trabajo, las membranas utilizadas tienen un diámetro (d) de 1,2 cm y los pocillos con sólo medio de cultivo presentan una resistencia de 80-85 Ω . Por lo que se ha considerado que las monocapas están íntegras cuando los valores de TEER obtenidos son superiores a 250 Ωcm^2 .

Medida de la actividad fosfatasa alcalina (ALP)

La fosfatasa alcalina es un enzima que cataliza la hidrólisis de ésteres de fosfato en medios alcalinos dando lugar a la formación de radicales orgánicos y fosfato inorgánico. La medida de la actividad de la fosfatasa alcalina *in vitro* se ha realizado siguiendo el método recomendado por la IFCC (Internacional Federation of Clinical Chemistry) (Tietz y col., 1983) donde se utiliza como substrato *p*-nitrofenil fosfato que es transformado por la fosfatasa en *p*-nitrofenol y fosfato. La reacción se lleva a cabo a pH básico para asegurar que se trata de la fosfatasa alcalina. El *p*-nitrofenil es un compuesto coloreado (amarillo) que absorbe a 405 nm.



Como la actividad del enzima aumenta conforme aumenta el número de células, la ALP se expresa dividida por la concentración de proteínas totales, usando el nivel de proteínas como un valor directamente relacionado con el número de células.

Como paso previo a la realización del ensayo, las células que crecen sobre la membrana se lisan mediante el uso de una solución de Tritón X 0,1% en PBS, durante 30 minutos. Posteriormente se recoge el lisado en 400 μL de PBS y se sonica durante 20 segundos, se coloca en hielo otros 20 s y se vuelven a sonicar repitiendo la operación hasta un total de 3 veces. Después se agitan en un Vórtex durante 1 min, se centrifugan durante 1 min a 12.000 rpm y se recoge el sobrenadante para los ensayos de ALP y proteínas (Dihal y col., 2006).

Para cuantificar la cantidad de proteínas se toman 30 μL del sobrenadante de células y se mezclan en una cubeta de 1 mL con 970 μL del reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich,

Steinheim, Alemania). Posteriormente se mide su absorbancia a 595 nm después de 5 min tal como se ha descrito previamente. La determinación se realiza por duplicado.

Para la determinación de la actividad ALP se toman 200 μL de sobrenadante y se mezclan vigorosamente en una cubeta de espectrofotómetro de 1 mL con 700 μL de un tampón Tris-HCl 1M pH 8,0 y 100 μL de la solución de *p*-nitrofenil fosfato (*p*-NPP) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Transcurridos 4 min, se mide su absorbancia a 405 nm (Bestwick y Milne, 2000). La determinación se realiza por duplicado. La actividad se expresa como UI/L o UI/mL según la fórmula:

$$\text{Actividad ALP (UI/mL)} = \frac{(\text{Abs}_{4\text{min}} - \text{Abs}_{0\text{min}}) + V (\text{cubeta})}{\text{Tiempo} * \epsilon * l * V_m (\text{muestra})} = \frac{(\text{Abs}_{4\text{min}} - \text{Abs}_{0\text{min}}) + 1}{4 * 18,75 * 1}$$

donde:

ϵ : Coeficiente de extinción del producto de reacción; *p*-nitrofenol $\epsilon = 18,75 \text{ mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}$;
 V: Volumen de reacción (mL); V_m : Volumen de muestra aplicada (mL); l: Longitud de la cubeta (cm), distancia que la luz atraviesa por la cubeta.

También se puede expresar como $\text{mUI/mL} = \text{UI/mL} * 1000$ y se suele referir a los mg de proteína medidos (figura x APL/TEER).

$$\text{Actividad ALP (mUI/mg proteína)} = \frac{\text{Actividad ALP (UI/mL)}}{\text{Conc. proteínas (mg/mL)}}$$

En los cultivos este potencial coincidía con la diferenciación de las células medida por su actividad ALP (figura 33).

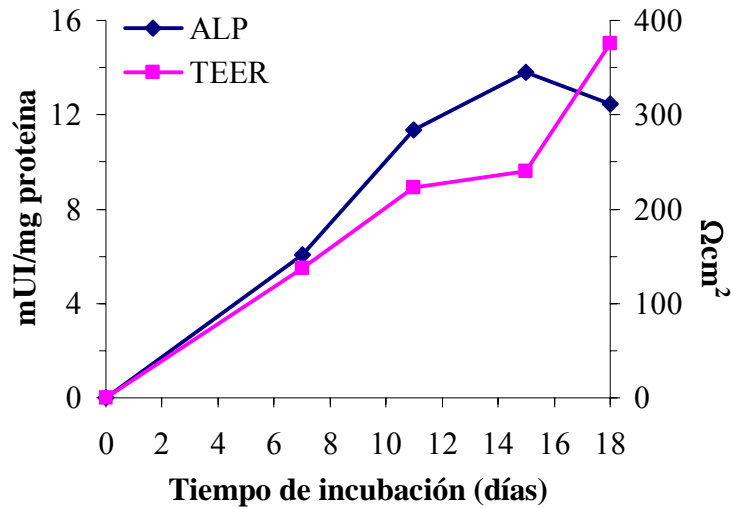


Figura 33: Actividad fosfatasa alcalina y potencial transmembrana de las Caco2.

3.8.3. Medida de la capacidad antioxidante de las fracciones resultantes de la digestión y del ensayo de absorción

La capacidad antioxidante de las alícuotas secas y pulverizadas obtenidas después de los procesos de masticación, digestión estomacal e intestinal, así como los pasos intermedios anterior y posterior a la adición de bicarbonato sódico, se han sometido a una extracción acuosa y metanólica y se ha medido la capacidad antioxidante de dichas fracciones con el mismo protocolo descrito en el apartado 3.7.1. Al final del proceso de la digestión se ha obtenido un sobrenadante líquido y un precipitado sólido. Este sobrenadante líquido se considera que es la fracción bioaccesible y por tanto, la que puede ser absorbida por las células Caco2. Así, la capacidad antioxidante del sobrenadante, se ha medido mediante el método del $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por ser un medio acuoso. Además, se ha separado un 1 mL de esta fase y se ha llevado a sequedad para el cálculo de su peso seco.

La capacidad antioxidante del pocillo apical y basolateral en los ensayos de absorción “*in vitro*” se ha medido también utilizando el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Se toman 200 μL del compartimiento apical y basolateral y se mezclan en una cubeta de 1 mL de espectrofotómetro con 800 μL de la solución de $\text{ABTS}^{\bullet+}$, midiéndose el cambio de color a 414 nm, después de 90 min de incubación en oscuridad y a temperatura ambiente. También se ha medido la capacidad captadora del $\text{ABTS}^{\bullet+}$ del medio completo que se

aplica a las células Caco-2 para restar su actividad a la observada en las muestras. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

3.8.4. Determinación de los compuestos responsables de la capacidad antioxidante después de la digestión

Para la determinación de proteínas, se toman 30 μL del sobrenadante líquido tras la digestión completa y se ajusta a un volumen de 70 μL con la adición de agua Milli Q, adicionándose después los 930 μL del reactivo Bradford y llevándose a cabo la lectura a 595 nm.

Para los fenoles totales su determinación se ha llevado a cabo en las mismas muestras que la determinación de proteínas. Se han tomado 30 μL del sobrenadante líquido tras la digestión completa y se ajustan a un volumen de 100 μL con la adición de la solución de HCl (1,48%)-MeOH (60-40%). Se agitan, se les añade 1.9 mL de la solución de carbonato de sodio 2% (w/v) y se lleva a cabo la incubación, la adición del reactivo Folin-Ciocalteu (50 μL) y la lectura a 750nm. También se han repetido las determinaciones añadiendo 1 mg/mL de BSA a las muestras para asegurarse que con los nuevos volúmenes ensayados todas las proteínas precipitaban y la absorbancia medida se debía exclusivamente a los compuestos fenólicos presentes en los extractos sin ningún tipo de interferencia. Todos los ensayos se realizaron en duplicado.

3.9. Diseño de un alimento funcional a base de hongos I: paté de hígado

3.9.1. Elaboración de los patés

Para la obtención de 500 g de paté, se pican 166 g de hígado de cerdo junto con 333 g de tocino ibérico y una vez homogeneizado se añaden 3,33 g de sal fina, 0,42 g de pimienta blanca, 0,33 g de ajo en polvo y 25 mL de vino blanco mezclándose perfectamente. Una parte de esta masa se reserva como paté control y la otra se mezcla con diferentes preparaciones obtenidas de *B. edulis*. La masa de paté cruda (suplementada o no) (90 g) se introduce en tarros de cristal herméticos de 200 mL y se

esteriliza en un autoclave a 121°C durante 20 minutos. Para ciertos experimentos los tarros se almacenaron en la oscuridad a 4°C durante 60 días.

Los patés se suplementan con tres tipos diferentes de preparaciones: con el cárpforo de *B. edulis* completo liofilizado y pulverizado y añadido en proporciones de 1%, 2,5%, 5% y 7,5% (p/p), y con las fracciones obtenidas mediante extracciones con agua y metanol. La fracción acuosa se prepara mezclando 500 mL de agua destilada con 10 g de polvo de *B. edulis*. La mezcla se agita, se centrifuga a 5 °C, 3500 rpm durante 15 min y el sobrenadante se congela a -20 °C y se liofiliza. Añadiéndose a los patés en proporciones de 0,25 y 1,25%. La fracción metanólica se prepara añadiendo 10 mL de metanol a 1 g de polvo del hongo. Posteriormente se agita en un Vórtex durante 2 min, se centrifuga a 12.000 rpm durante 2 minutos y el sobrenadante se lleva a sequedad en un concentrador de vacío (SpeedVac plus, Savant Instruments Inc. Holbrook, NY, USA). Los patés se han suplementado con 0,12 y 0,62% del extracto seco metanólico.

3.9.2. Determinación de la capacidad antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante se ha llevado a cabo en los extractos acuosos y metanólicos obtenidos a partir de los distintos tipos de patés formulados. Para la obtención de los extractos acuosos a partir de los patés, se procede como se indica a continuación. A 5 g de paté se le adicionan 10 mL de agua Milli Q, se homogeneiza durante 4 min en un Vórtex, después durante 10 segundos en un Ultra-Turrax (Ika-Werke GmbH & Co., Germany) a 11.000 rpm y a continuación se filtra. Del filtrado se toma 1 mL y se centrifuga a 14000 rpm durante 2 min, conservando el sobrenadante en hielo para el análisis inmediato. Se reserva 1 mL y se lleva a sequedad en un horno a 40°C para el cálculo de su peso seco. La capacidad antioxidante de estos sobrenadantes se mide mediante el método del ABTS. Las determinaciones se realizan por duplicado.

Los extractos metanólicos también se obtienen a partir de 5 g de paté pero utilizando dos métodos de extracción diferentes. En uno de ellos, se realiza un pre-lavado con 10 mL de hexano. El paté se agita durante 4 min en este disolvente y se recupera la pasta mediante filtración a vacío usando un quitasatos. Se repite un segundo lavado y sobre el residuo sin grasa se realiza una doble extracción con metanol (10 mL cada uno), se agita durante 2 min y se filtra. Los 20 mL obtenidos se evaporan mediante un concentrador a

vacío y el extracto seco se resuspende en 3 mL de metanol, se conserva en hielo y se procede a su análisis inmediato. En el otro método, se mezclan directamente 5 g de paté con 10 mL de metanol (dos extracciones) se filtran, se concentran y se analizan como las muestras desengrasadas. La medida de la capacidad antioxidante se lleva a cabo mediante el método del DPPH[•]. Los ensayos se realizan por duplicado.

3.9.3. Determinación de los niveles de oxidación lipídica

Esta medida se ha llevado a cabo mediante el método del tiobarbitúrico. Este método se basa en la determinación del malondialdeído (MDA), proveniente de la oxidación de lípidos, mediante su reacción colorimétrica con TBA (ácido tiobarbitúrico) para formar un complejo de color naranja-rosa. A 5 g de paté se le añaden 10 mL de ácido tricloroacético TCA (10%), se homogeneiza en un Ultra-Turrax (10 s, 11.000 rpm) y se centrifuga 20 min a 3.500 rpm y 5°C. Se toman 2 mL del filtrado, se añaden 2 mL de una disolución de TBA (0,3% p/v en TCA al 10%) y se colocan al baño María durante 20 min para que se desarrolle la reacción. Tras enfriar a temperatura ambiente, se lee la absorbancia a 531 nm. La determinación se realiza por duplicado.

Debido a que el MDA es un compuesto altamente inestable, que no se puede utilizar como estándar, se ha realizado la curva de calibrado con una disolución patrón de TEP (1,1,3,3, tetraethoxypropano). El TEP es un intermediario orgánico que al someterse a una hidrólisis ácida da lugar al malondialdeído. El valor de TBARS se expresa como µg MDA/kg paté y los resultados se calcularon en duplicado con respecto a la curva patrón de TEP.

3.10. Diseño de un alimento funcional a base de hongos II: croquetas de pollo

3.10.1. Elaboración y fritura de las croquetas

La elaboración de las croquetas se ha llevado a cabo mediante el uso de una Thermomix® TM31 (Vorwerk, Germany), en cuyo interior se han añadido 15 g aceite de oliva extra virgen y 65 g de mantequilla que se han mezclado durante 2 min a una velocidad 3,5 y a una temperatura de 100°C. Después se han añadido 85 g de harina de trigo mezclándose durante 1 min a 100°C (velocidad 2,5). Trascurrido ese tiempo, se

adicionan 400 g de leche semidesnatada y 95 g de pollo triturado previamente frito y se cocinan a 100°C sin dejar de agitar (velocidad 4), durante 7 min. La masa resultante se divide en dos fracciones, una se utiliza como control y a la otra (310 g) se le añaden 8 g del cuerpo fructífero en polvo de *B. edulis* para obtener las croquetas suplementadas. Ambas fracciones se mezclan durante 2 min y se dejan enfriar a temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente, esta pasta se almacena durante toda la noche a 4°C y se procede preparar cada unidad de croqueta. Para ello, una fracción de la pasta de croqueta (30 g) se moldea con la forma típica, se cubre con dos capas de pan rallado con una capa de huevo batido entre ellas y se fríe en una sartén de teflón conteniendo 200 g de aceite o manteca precalentada a 180°C, durante 2 min, simulando las prácticas de cocción caseras. La fritura se realiza utilizando distintos tipos de grasas culinarias: aceite de oliva virgen extra, aceite de girasol alto oleico, aceite de maíz y manteca de cerdo.

3.10.2. Digestión y absorción *in vitro*

Después del proceso de fritura de las croquetas en los distintos tipos de grasas, las croquetas control y las suplementadas con *B. edulis* se someten a una digestión *in vitro*. Las croquetas fritas (35 g) se mezclan con 5 mL de saliva y 5 mL de agua y se procesan siguiendo el mismo protocolo referido anteriormente para la masticación. Posteriormente, para la digestión estomacal se adicionan sólo 5 mL de agua, y 1,1 mL de la solución de pepsina y para la digestión intestinal, se le añaden 8,3 mL de solución pancreática. Como ocurre con las muestras de hongos, el digerido final es una mezcla de sobrenadante líquido y un precipitado sólido.

Previamente a los ensayos de absorción se mide la toxicidad del sobrenadante líquido obtenido tras la digestión sobre las células Caco-2. Los ensayos se han realizado por duplicado.

Para la medida de la absorción intestinal se añaden 60 µL del sobrenadante líquido obtenido tras la digestión de las croquetas al pocillo apical, utilizando el mismo protocolo que se ha descrito previamente.

3.10.3. Determinación de la actividad antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante tras la fritura se ha llevado a cabo en los extractos acuosos y metanólicos obtenidos a partir de los distintos tipos de croquetas: controles y suplementadas con *B. edulis* para cada uno de los distintos aceites utilizados. Para la obtención de los extractos acuosos y metanólicos a partir de 5g de croquetas se procede del mismo modo que el indicado para los patés (apartado 3.9.2). Utilizando el método de extracción directa con metanol sin prelavado con hexano para las muestras metanólicas. La capacidad antioxidante de los extractos acuosos se mide mediante el método del ABTS^{•+} y la de los metanólicos mediante el del DPPH[•]. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

La determinación de la capacidad antioxidante en las alícuotas obtenidas a partir de los diferentes pasos de la digestión *in vitro* y se realizan según el protocolo previamente descrito y en duplicado, pero usando concentraciones de 150 mg/mL para los extractos acuosos y 300 mg/mL para los extractos metanólicos en un volumen de reacción de 1 mL.

La capacidad antioxidante durante el ensayo de absorción celular se midió utilizando el radical ABTS^{•+} y siguiendo el procedimiento previamente indicado.

4. Resultados y discusión

4.1. Los hongos como alimentos funcionales

4.1.1 Actividad antioxidante

4.1.1.1 Preparación de muestras

Los hongos tienen en su composición un alto porcentaje de humedad que varía en función de las condiciones ambientales en las que se produce su crecimiento (sobre todo en los hongos silvestres), de las condiciones de almacenamiento y por último de sus procesos metabólicos. Así pues, para evitar variaciones en los resultados debidos a los distintos porcentajes de humedad, y posibles deterioros en las muestras por la presencia de agua, es necesario eliminarla inmediatamente después de su adquisición.

Métodos de deshidratación

Para determinar qué método de deshidratación es más efectivo para minimizar las pérdidas en compuestos antioxidantes o sustancias relacionadas, se han comparado dos procesos: la deshidratación utilizando un secador de bandejas y la liofilización. Así pues, se ha determinado la capacidad de captación del radical DPPH• de extractos metanólicos preparados a partir de las muestras sometidas a ambos procesos de deshidratación.

Los extractos metanólicos de cuatro de los hongos seleccionados no muestran diferencias significativas en el porcentaje de captación de radicales DPPH•, cualquiera que sea el método de deshidratación empleado (figura 34). Sin embargo, los extractos metanólicos de *L. deliciosus* y *A. bisporus* presentan una mayor actividad antioxidante cuando se emplean las muestras liofilizadas que las deshidratadas usando el secador de bandejas, aunque las diferencias no son muy acusadas. Únicamente para *L. deliciosus* se observa una disminución en la actividad antioxidante de las muestras sometidas a deshidratación en secador de bandejas frente a las liofilizadas de un 7%.

Por lo que, aunque las diferencias entre los dos métodos de deshidratación empleados no han sido importantes, se ha optado por la liofilización ya que es un método más rápido y no implica el calentamiento de las muestras.

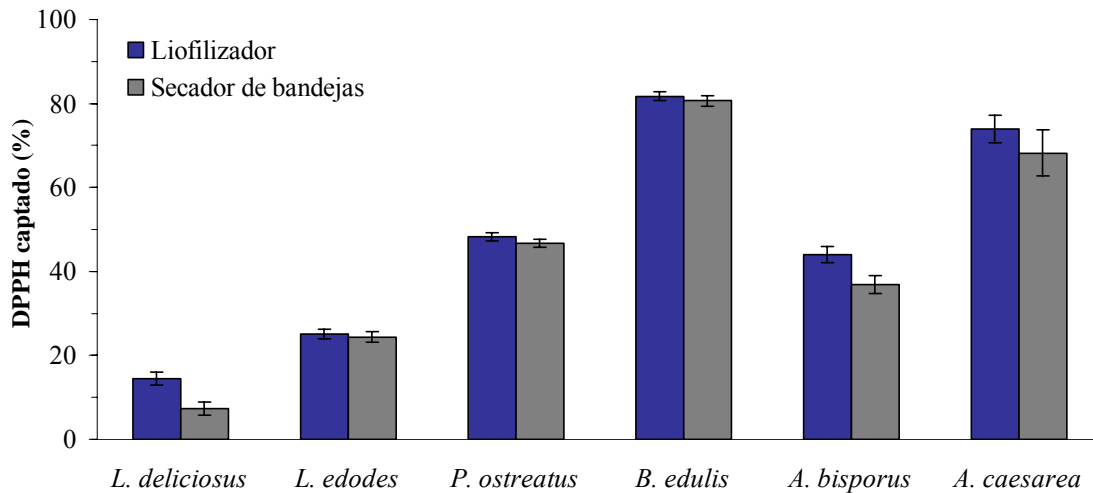


Figura 34. Porcentaje de captación del radical DPPH[•] de los extractos metanólicos de los cuerpos fructíferos de los hongos sometidos a distintos procesos de deshidratación.

Extracción con distintos disolventes

A partir de los hongos liofilizados y pulverizados se han realizado extracciones utilizando como disolventes agua, metanol y metil *terc*-butil éter, con el propósito de extraer compuestos de diferente naturaleza: compuestos hidrosolubles muy polares (agua), compuestos solubles en disolventes orgánicos pero de naturaleza polar (metanol) y de naturaleza más apolar (metil *terc*-butil éter). No se han utilizado disolventes más apolares que el metil *terc*-butil éter y por tanto, más adecuados para la extracción de compuestos lipídicos, debido a la escasa concentración de grasas en los cuerpos fructíferos de los hongos.

Después de cada extracción se ha calculado su rendimiento mediante la evaporación del disolvente y la cuantificación del material seco extraído (tabla 11). En todos los hongos analizados, el agua ha sido el disolvente con el que más compuestos se han extraído, seguido por el metanol y por último el éter.

A partir de los datos obtenidos, se observa que los extractos acuosos de *A. bisporus* son los que más cantidad de material contienen, seguidos por *B. edulis*, y luego *C. cibarius*, *A. caesarea*, *P. ostreatus*. y *L. edodes* con concentraciones similares y superiores a *L. deliciosus*. Los extractos metanólicos obtenidos de *A. caesarea* son los que contienen mayor cantidad de compuestos, seguidos por los de *A. bisporus*. La extracción con éter ha sido la que ha proporcionado un rendimiento más bajo, ya que en algunas especies

los valores no sobrepasan los 10 mg/g, siendo la *A. caesarea*, también en este caso, la que muestra una mayor cantidad de compuestos apolares solubles en este disolvente.

Tabla 11. Peso seco de los extractos acuosos, metanólicos y etéreos obtenidos a partir de los cuerpos fructíferos de los hongos.

Especies de hongos	Acuosos (mg/g ps)	Metanólicos (mg/g ps)	Etéreos (mg/g ps)
<i>C. cibarius</i>	218,00 ± 9,90	68,00 ± 6,70	13,20 ± 0,40
<i>L. delicious</i>	175,50 ± 17,70	90,20 ± 9,20	22,30 ± 0,30
<i>L. edodes</i>	207,50 ± 23,30	131,20 ± 0,20	6,20 ± 0,30
<i>P. ostreatus</i>	213,00 ± 24,00	97,60 ± 5,80	13,00 ± 0,40
<i>B. edulis</i>	247,50 ± 4,90	126,40 ± 5,10	9,40 ± 0,40
<i>A. bisporus</i>	302,50 ± 3,50	144,00 ± 2,10	9,20 ± 0,20
<i>A. caesarea</i>	217,00 ± 0,00	170,10 ± 0,20	62,90 ± 2,10

Además de presentar unos rendimientos muy bajos, los extractos etéreos también muestran las actividades antioxidantes más bajas. Así, si se compara la actividad antioxidante de los extractos obtenidos con los distintos disolventes para *Cantharella cibarius* (figura 35), se puede observar que para una misma concentración (100 µl de cada extracto obtenido a partir de 10 mg/mL de polvo de hongo), los extractos etéreos presentan una capacidad de captación de radicales DPPH• casi insignificante (2%), siendo ésta un poco más elevada en los extractos metanólicos y sobretodo en los extractos acuosos, capaces de captar hasta el 38% del radical. En el caso de *Agaricus bisporus* se repite el mismo comportamiento que para *C. cibarius*, ya que los extractos etéreos son los que presentan la menor actividad antioxidante. El resto de los hongos analizados muestran resultados similares, así en todos los casos los extractos etéreos han sido los que presentan una actividad antioxidante menor.

Para confirmar esta baja actividad antioxidante obtenida con los extractos etéreos, estos extractos se han analizado de nuevo, pero disolviendo el radical DPPH• en acetato de etilo en vez de en metanol, un disolvente más afín a los compuestos apolares que puede dar lugar a una medida más exacta de la capacidad de captación de este radical por los compuestos disueltos en éter. Sin embargo, los resultados obtenidos han sido similares a los mostrados cuando el radical se disolvía en metanol, ya que ninguna de las especies de hongos analizadas poseía compuestos solubles en éter con una actividad antioxidante importante.

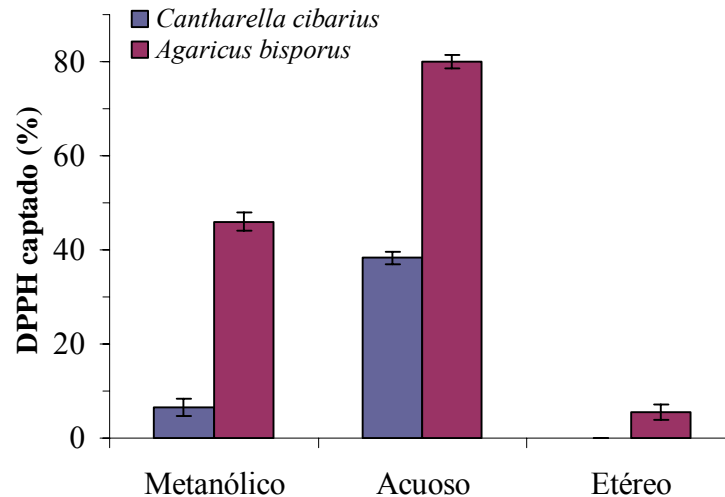


Figura 35. Capacidad de captación de radical DPPH[•] de los extractos obtenidos a partir de los cuerpos fructíferos de *Cantharella cibarius* y *Agaricus bisporus*.

Estos resultados confirman la baja capacidad de captación de DPPH[•] mostrada por las fracciones etéreas de los hongos estudiados, en comparación con la encontrada para los extractos acuosos y metanólicos de los mismos hongos. Datos que concuerdan con publicaciones anteriores, que estudian la actividad antioxidante de otras especies de hongos e indican que las fracciones más activas son la acuosa y la metanólica. Algunas concluyen que la actividad antioxidante más alta se encuentra en los extractos metanólicos, en vez de los acuosos (Yang y col., 2002), mientras que otras, por el contrario, han señalado que las fracciones acuosas son más activas (Mau y col., 2002). También hay autores que describen que los extractos más activos son aquéllos que combinan ambos disolventes, por ejemplo, un 80:20 metanol:agua (Hui-Yin y Den-en, 2002) o un 75:25 etanol:agua (Lee y Jang, 2004) y los obtenidos con agua caliente (Tsai y col., 2007) o hirviendo (Puttaraju y col., 2006). Por ello, también se han preparado diversos extractos de *Agaricus bisporus* en diferentes proporciones de agua y metanol, observándose que las mezclas más activas eran las de 100% agua, seguidas de las de 100% metanol (figura 36). En este trabajo no se ha utilizado agua caliente para evitar el efecto negativo del calor sobre el total de los compuestos antioxidantes, ya que aunque existen indicios de que algunos antioxidantes son termoresistentes, otros son destruidos por las altas temperaturas (Manzi y col., 2004; Barros y col., 2007b).

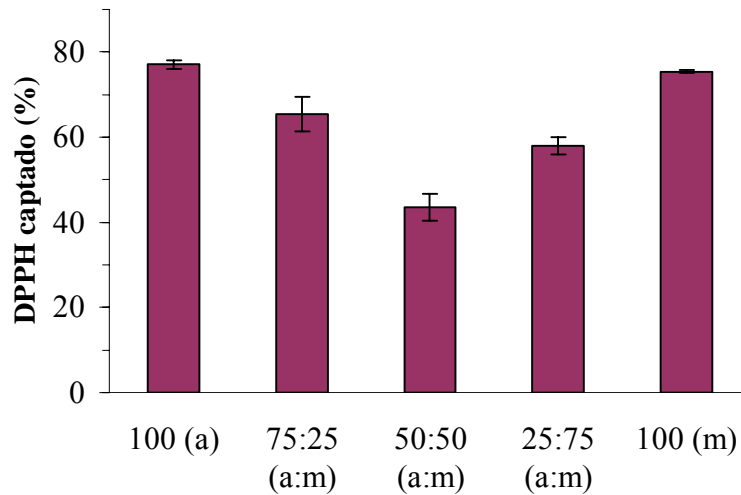


Figura 36: Capacidad captadora del radical DPPH[•] de diferentes extractos preparados usando mezclas de agua y metanol como disolventes de extracción a partir de cuerpos fructíferos de *A. bisporus* pulverizados. a= agua, m= metanol.

En conclusión, teniendo en cuenta el bajo rendimiento obtenido para los extractos etéreos y su baja capacidad antioxidante, así como que los extractos llevados a cabo con un 100% de agua o un 100% metanol son más activos que sus mezclas, este trabajo se ha centrado en el estudio de los extractos 100% acuosos y metanólicos obtenidos a partir de los distintos hongos, descartándose los extractos etéreos, y las mezclas agua: metanol.

4.1.1.2 Medida de la actividad antioxidante

A partir de los cuerpos fructíferos de los distintos hongos se han obtenido extractos acuosos y metanólicos, cuya capacidad antioxidante se ha medido utilizando distintos ensayos.

En primer lugar, se ha estudiado cuál es el mejor método para poder comparar la capacidad antioxidante de ambos tipos de extractos, observándose que si se utiliza el método del DPPH[•], sólo se pueden utilizar concentraciones de los extractos acuosos muy pequeñas, ya que con concentraciones mayores, en algunos hongos como *A. bisporus* y *A. caesarea*, se producen precipitados que provocan turbidez en el medio e imposibilitan la medida de la actividad captadora del DPPH[•] de forma adecuada. Aparentemente, las fracciones acuosas de *A. bisporus* y *A. caesarea* poseen compuestos,

posiblemente péptidos, proteínas o glicoproteínas que son completamente insolubles en disolventes orgánicos como el metanol.

Para solucionar este problema, se ha intentado medir la capacidad antioxidante de ambos tipos de extractos con el método del ABTS^{•+} disuelto en agua y esta vez son algunos de los extractos metanólicos los que producen turbidez o desviaciones estándar muy amplias debidas a la solubilización sólo parcial sus compuestos. Por lo tanto, se ha utilizado el ABTS^{•+}, como radical catiónico soluble en agua para medir la actividad antioxidante de los extractos acuosos y el DPPH[•] para los extractos metanólicos.

En las muestras metanólicas, que contienen compuestos solubles en disolventes orgánicos y aceites, además de la determinación de su actividad antioxidante mediante la medida de la captación de radicales DPPH[•] se ha determinado también su potencial como inhibidores de la peroxidación lipídica.

Actividad antioxidante de los extractos metanólicos

Capacidad de captación del radical DPPH[•]

La actividad antioxidante de los extractos metanólicos obtenidos a partir de los hongos seleccionados en este trabajo se ha estimado en primer lugar como su capacidad de captación del radical DPPH[•].

Previamente, para adaptar el método de medida a las actividades de los extractos, hay que evaluar el tiempo de estabilización del radical en presencia de concentraciones fijas de extractos para que se puedan ajustar a reacciones de primer o pseudo-primer orden, donde la desaparición del radical sea proporcional a las absorbancias medidas. Según los resultados (figura 37), 15 min son suficientes para que todo el radical que puede ser captado reaccione con los antioxidantes de los extractos aplicados en concentraciones de hasta 2 mg/mL. Así pues, se ha fijado como el tiempo final de medida 15 min para concentraciones de extractos metanólicos entre 0,2 y 2 mg/mL.

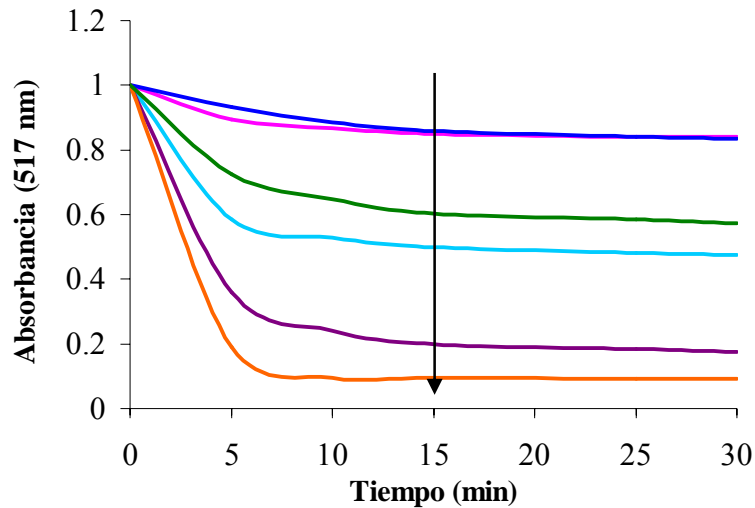


Figura 37: Desaparición del radical DPPH• durante 30 min en presencia de los extractos metanólicos de diferentes hongos. (—) *C. cibarius*, (—) *L. deliciosus*, (—) *L. edodes*, (—) *P. ostreatus*, (—) *B. edulis* y (—) *A. bisporus*.

Cuando se describe la capacidad antioxidante de las muestras como el porcentaje de radical que éstas son capaces de captar, los extractos metanólicos de *A. bisporus* y *B. edulis* muestran una actividad antioxidante muy alta, ya que son capaces de captar más del 90% del radical a concentraciones de 1,8 mg/mL (figura 38).

Sin embargo, si lo que se mide es la EC_{50} (tabla 12), otra forma de cuantificar la capacidad antioxidante, que nos indica la concentración de extracto necesaria para inhibir la oxidación del 50% del radical, el extracto metanólico de *P. ostreatus* muestra una mayor capacidad antioxidante que los de *A. bisporus* y *B. edulis*, ya que su EC_{50} es de 0,32 mg/mL, aunque a la máxima concentración utilizada sólo es capaz de captar el 82,5% del radical.

Otros extractos de hongos tales como *L. edodes* o *A. caesarea* poseen menor capacidad antioxidante que los extractos anteriores, pero aun así, a las concentraciones más altas empleadas muestran una capacidad de captación del radical del 82,2% y 75,2% respectivamente, seguidas por *C. cibarius* con una capacidad captadora intermedia (58,6%). Los extractos metanólicos de *L. deliciosus* exhibieron los valores de actividad más bajos de todos los cuerpos fructíferos analizados.

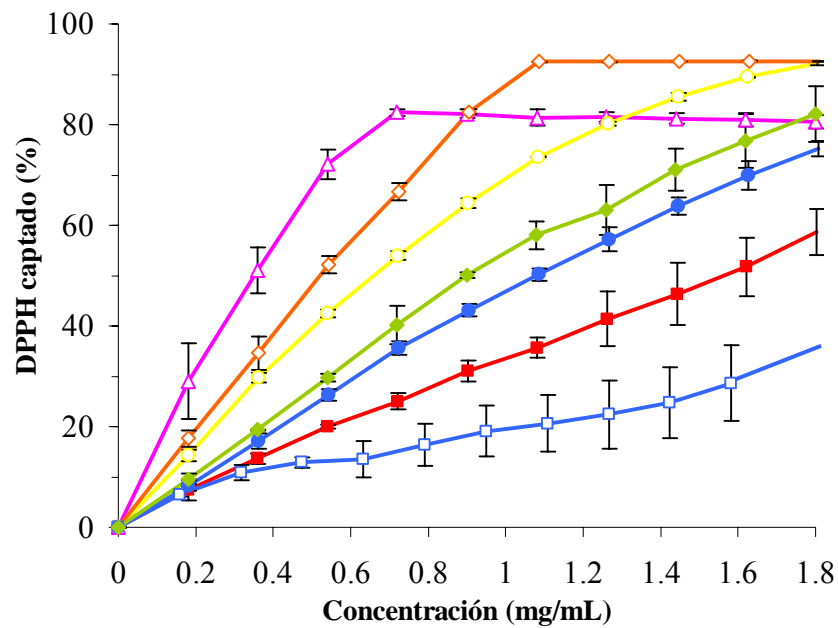


Figura 38. Capacidad de captación del radical DPPH• de los extractos metanólicos obtenidos a partir de los cuerpos fructíferos de (■) *C. cibarius*, (□) *L. deliciosus*, (◆) *L. edodes*, (△) *Pleurotus ostreatus*, (○) *B. edulis*, (◇) *A. bisporus* y (●) *A. caesarea*.

Tabla 12: Valores de la EC₅₀ de los extractos metanólicos de los distintos hongos estudiados.

Hongo	EC ₅₀ (mg/mL)
<i>P. ostreatus</i>	0,32 ± 0,04
<i>A. bisporus</i>	0,50 ± 0,04
<i>B. edulis</i>	0,65 ± 0,04
<i>L. edodes</i>	0,88 ± 0,01
<i>A. caesarea</i>	1,05 ± 0,03
<i>C. cibarius</i>	1,55 ± 0,03
<i>L. deliciosus</i>	> 1,8

Las variedades de *P. ostreatus* y *L. edodes* seleccionadas en este estudio presentan, a concentraciones similares, una mayor actividad de captación del radical DPPH• que los niveles descritos en publicaciones anteriores (Fu y Shieh, 2002; Yang y col., 2002; Cheung y col., 2003), *B. edulis* muestra niveles similares a los descritos por (Sarikurkcu

y col., 2008) y superiores a (Tsai y col., 2007) y (Puttaraju y col., 2006). Para *L. deliciosus*, también se han encontrado niveles más altos de actividad que en los ensayos llevados a cabo por (Puttaraju y col., 2006). Las diferencias probablemente se deben a que las variedades de hongos analizadas son distintas y a que las condiciones de cultivo son diferentes, ya que valores descritos en esos estudios también difieren entre sí.

El extracto metanólico que mostró mayor capacidad antioxidante expresada como porcentaje de captación del radical fue el procedente de *A. bisporus*, este resultado corrobora los estudios de (Lee y Jang, 2004) y (Fu y Shieh, 2002) que concluyen que este hongo es el que presenta una mayor capacidad antioxidante si se compara con otras especies de hongos comestibles como *Hypsizigus marmoreus* > *Volvariella volvacea* > *Flammulina velutipes* > *Pleurotus eryngii* > *P. ostreatus* > *Lentinus edodes* > *Hericiium erinaceus*.

Medida de la inhibición de la formación de hidroperóxidos

En los ensayos para medir la inhibición de la formación de hidroperóxidos se han utilizado en primer lugar, los cuerpos fructíferos de los diferentes hongos con el fin de determinar aquellas especies que pudieran mostrar este tipo de actividad. Los resultados indican que todos los hongos muestran una ligera capacidad inhibitoria de la formación de hidroperóxidos. Por lo que, como se espera que los compuestos responsables de esta actividad se encuentren en los extractos metanólicos, se ha realizado de nuevo el ensayo utilizando los extractos metanólicos de los hongos. Su actuación como antioxidantes se ha estimado según su *factor de protección* (Pf).

Todos los extractos metanólicos muestran un Pf mayor que la unidad, indicando que son capaces de estabilizar el aceite retrasando la formación de hidroperóxidos (tabla 13). Los extractos metanólicos de *P. ostreatus*, *L. edodes*, *A. caesarea*, *A. bisporus* y *C. cibarius* son más activos que concentraciones de 1,67 mg/g de α -tocoferol (cantidad aproximadamente 5 veces mayor que el contenido normal de un aceite). El extracto metanólico de *P. ostreatus* presenta una buena actividad como inhibidor de peróxidos y también tiene una buena capacidad de captación del radical DPPH[•], mientras que, *B. edulis* que también posee una capacidad captadora de radicales alta, presenta una baja actividad como inhibidor de peróxidos. Ésto indica que aunque los extractos de ambos hongos tienen una capacidad similar para captar el radical DPPH[•], los compuestos

antioxidantes presentes en ambos extractos deben ser de naturaleza diferente ya que tienen mecanismos de actuación distintos. Este hecho es frecuente en matrices complejas como preparaciones o extractos de alimentos con composiciones químicas muy diversas.

Tabla 13: Incremento del Pf en presencia de los extractos metanólicos (5 mg/g de aceite) respecto a un control de aceite de girasol. La concentración aplicada de α -Tocoferol fue de 1,67 mg/g de aceite.

Hongo	Pf
<i>P. ostreatus</i>	1,67 \pm 0,080
<i>L. edodes</i>	1,50 \pm 0,066
<i>A. caesarea</i>	1,43 \pm 0,075
<i>A. bisporus</i>	1,39 \pm 0,035
<i>C. cibarius</i>	1,35 \pm 0,049
<i>L. deliciosus</i>	1,21 \pm 0,031
<i>B. edulis</i>	1,18 \pm 0,018
α -Tocoferol	1,25 \pm 0,053

Las propiedades inhibitorias de la peroxidación lipídica de los hongos también se han estudiado utilizando otro tipo de ensayos como el de la oxidación lipídica en tejido cerebral de rata o la medida de la oxidación de las LDL humanas (Cheung y Cheung, 2005; Puttaraju y col., 2006). En estos estudios, los extractos metanólicos de *L. edodes* también muestran una capacidad inhibitoria de peroxidación lipídica alta. (Puttaraju y col., 2006) también encuentran actividades bajas en extractos metanólicos obtenidos de *B. edulis*, *C. cibarius* y *L. deliciosus* comparadas con otras especies. Otros ensayos como el del β -caroteno-ácido linoleico (blanqueamiento del β -caroteno) también confirman los estudios de Cheung y Cheung, 2005 para *L. edodes* (Soares y col., 2009).

Actividad antioxidante de los extractos acuosos

La actividad antioxidante de los extractos acuosos de los diferentes hongos se ha evaluado como su capacidad de captura de radicales como el ABTS^{•+}, un radical catiónico hidrosoluble. Al igual que se ha realizado con la medida del DPPH[•], antes de realizar ningún ensayo, se ha evaluado el tiempo de estabilización del radical en

presencia de concentraciones fijas de los extractos. Los resultados fueron similares a los mostrados en la figura 37, así que se ha medido la captación del radical ABTS^{•+} a los 15 min de incubación, pero a concentraciones inferiores (0,01- 0,15 mg/mL).

Como se observa con los extractos metanólicos, la actividad antioxidante de los extractos acuosos depende de la concentración a la que se aplican, mostrando una curva de comportamiento similar (figura 39a), aunque se necesitan concentraciones menores de los extractos para captar totalmente al radical ABTS^{•+}.

En este caso, los extractos acuosos más activos no se corresponden con las especies de hongos cuyos extractos metanólicos muestran los mejores resultados. Los extractos acuosos que tienen una capacidad de captación de ABTS^{•+} más elevada son los obtenidos a partir de *B. edulis*, *L. edodes* y *A. caesarea*, capaces de captar entre el 85,8 - 92% del radical a concentraciones muy bajas (0,14 mg/mL), unas 12 veces más bajas que las de los extractos metanólicos. Los extractos acuosos de *A. bisporus*, *P. ostreatus* y *L. deliciosus* muestran valores intermedios de actividad antioxidante, entre el 60% y el 26%, y la actividad más baja se observa en el extracto acuoso de *C. cibarius* con un porcentaje de captación que no supera el 11%. En este ensayo, los hongos con mayor porcentaje de ABTS^{•+} captado son también los que presentaron menor EC₅₀ (tabla 14).

Si los extractos acuosos se incuban durante 48 horas antes de medir su capacidad antioxidante, se observa que la capacidad de captación del radical ABTS^{•+} disminuye considerablemente en casi todos los extractos (figura 39b), aunque no todas las especies de hongos se ven afectadas en la misma proporción. Así, los extractos acuosos de *L. edodes* muestran una reducción de casi el 60% en su actividad antioxidante cuando ésta se mide a las 48 h, respecto a la obtenida inmediatamente después de la extracción. Mientras que otros hongos como *A. caesarea* y *A. bisporus* pierden aproximadamente entre el 20-30% de su capacidad de captación del radical. La pérdida de capacidad antioxidante observada puede deberse a 2 factores: i) a la degradación espontánea y paulatina de los antioxidantes durante las 48 h de incubación y/o ii) a la actividad de las enzimas oxidativas de los hongos (que se encuentran en los extractos acuosos) si los antioxidantes son también sustratos susceptibles de oxidación enzimática (compuestos fenólicos).

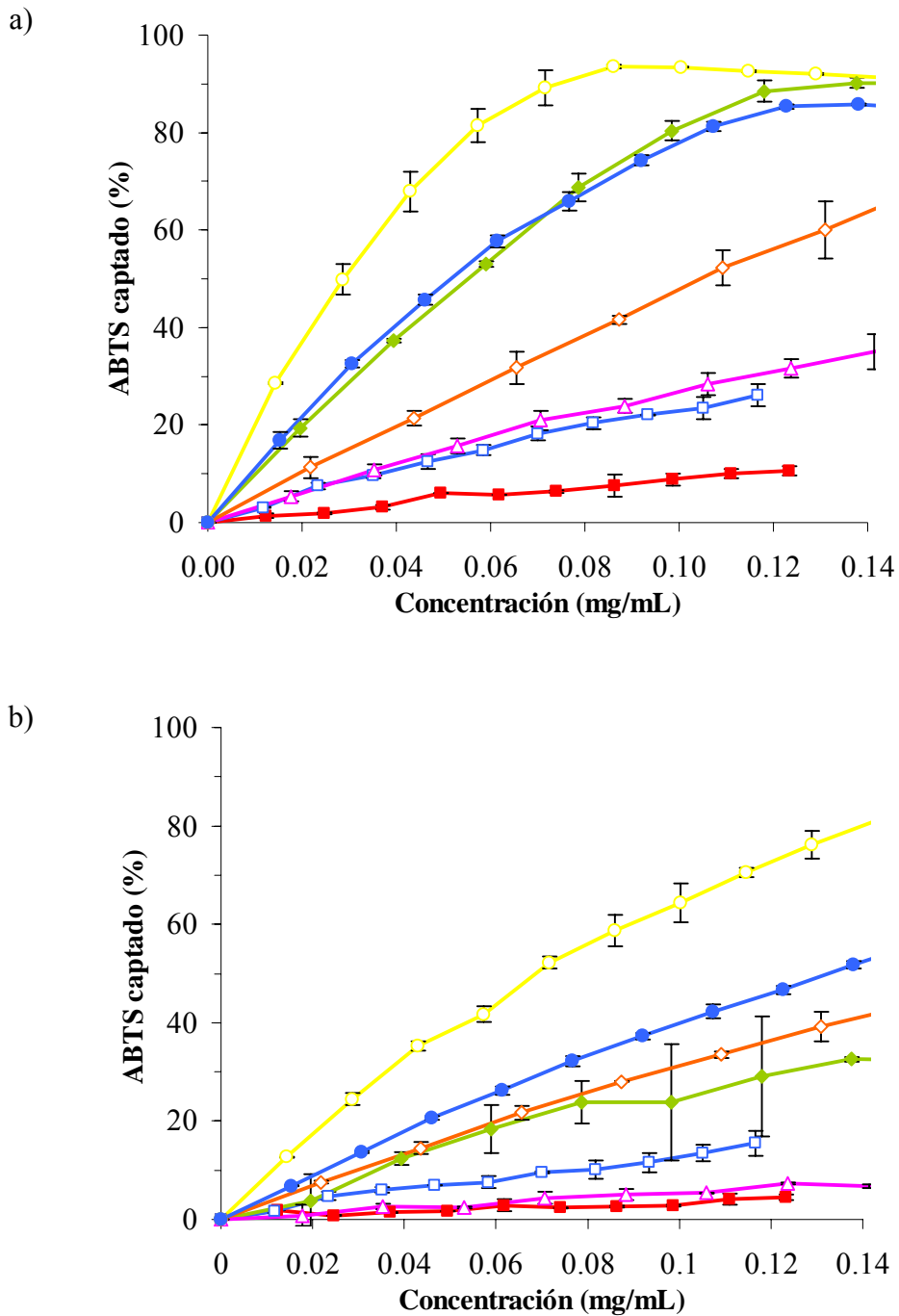


Figura 39: Capacidad de captación del radical ABTS⁺ de extractos acuosos obtenidos de los cuerpos fructíferos de (■) *C. cibarius*, (□) *L. deliciosus*, (◆) *L. edodes*, (△) *P. ostreatus*, (○) *B. edulis*, (◇) *A. bisporus* y (●) *A. caesarea*, a) inmediatamente analizados y b) después de 48 h de incubación.

Tabla 14: EC₅₀ de los extractos acuosos de los cuerpos fructíferos de los hongos medido inmediatamente y a las 48 h.

Hongo	EC ₅₀ (mg/mL)	
	Inmediata	48 h
<i>C. cibarius</i>	> 0,14	> 0,14
<i>L. deliciosus</i>	> 0,14	> 0,14
<i>L. edodes</i>	0,054 ± 0,00	> 0,14
<i>P. ostreatus</i>	> 0,14	> 0,14
<i>B. edulis</i>	0,028 ± 0,00	0,069 ± 0,00
<i>A. bisporus</i>	0,105 ± 0,01	> 0,14
<i>A. caesarea</i>	0,051 ± 0,00	0,136 ± 0,00

Actividad antioxidante de las fracciones acuosas de alto y bajo peso molecular

Según estudios previos realizados en plantas y en otras especies de hongos, las propiedades antioxidantes se atribuyen a la fracción de bajo peso molecular, principalmente a los compuestos fenólicos, tanto en los extractos acuosos como metanólicos (Sugimura, 2002). Sin embargo, otras publicaciones describen que los polisacáridos y complejos proteína-polisacárido de alto peso molecular de algunos hongos también poseen propiedades antioxidantes (Liu y col., 1997; Yen y col., 2007; Bobek y Galbavy, 2001; Yu y col., 2009).

Para estudiar más en detalle la naturaleza de los compuestos responsables de la actividad antioxidante observada en los extractos acuosos de los hongos seleccionados, dichos extractos se han fraccionado en dos tipos de fracciones: una de alto peso molecular (HMW), que contiene moléculas como polisacáridos, proteínas y glicoproteínas o proteoglucanos (todas aquellas moléculas mayores de 10.000 dalton), y otra de bajo peso molecular (LMW) que contiene moléculas simples tipo fenoles, péptidos, aminoácidos libres, etc.

A partir de los datos obtenidos (tabla 15), se puede concluir que la mayoría de los compuestos presentes en los extractos acuosos son de bajo peso molecular, ya que se retienen muy pocos en la fracción de alto peso molecular. En este sentido, *A. bisporus* es el hongo cuyo extracto acuoso contiene mayor cantidad de compuestos de bajo peso

molecular seguido por *B. edulis* y *P. ostreatus*, *L. edodes*, *A. caesarea*, *C. cibarius* y *L. deliciosus* que contienen cantidades similares de compuestos de bajo peso molecular.

Tabla 15. Distribución del peso seco (%) entre las fracciones de bajo peso molecular (LMW) y alto peso molecular (HMW) obtenidas a partir de los extractos acuosos y porcentaje del peso total recuperado.

Especies de hongos	Fracción LMW (%)	Fracción HMW (%)	Peso recuperado (%)
<i>C. cibarius</i>	66,5	1,0	67,5
<i>L. deliciosus</i>	63,5	7,5	71,0
<i>L. edodes</i>	68,5	10,0	78,5
<i>P. ostreatus</i>	72,0	17,5	89,5
<i>B. edulis</i>	76,5	6,0	82,5
<i>A. bisporus</i>	87,5	9,0	96,5
<i>A. caesarea</i>	62,0	10,5	72,5

Cuando se estudia la capacidad antioxidante de las dos fracciones y se compara con la del extracto acuoso completo, se puede observar claramente que la fracción de bajo peso molecular es prácticamente la responsable de la totalidad de la actividad antioxidante de los extractos acuosos en todos los hongos seleccionados (figura 40).

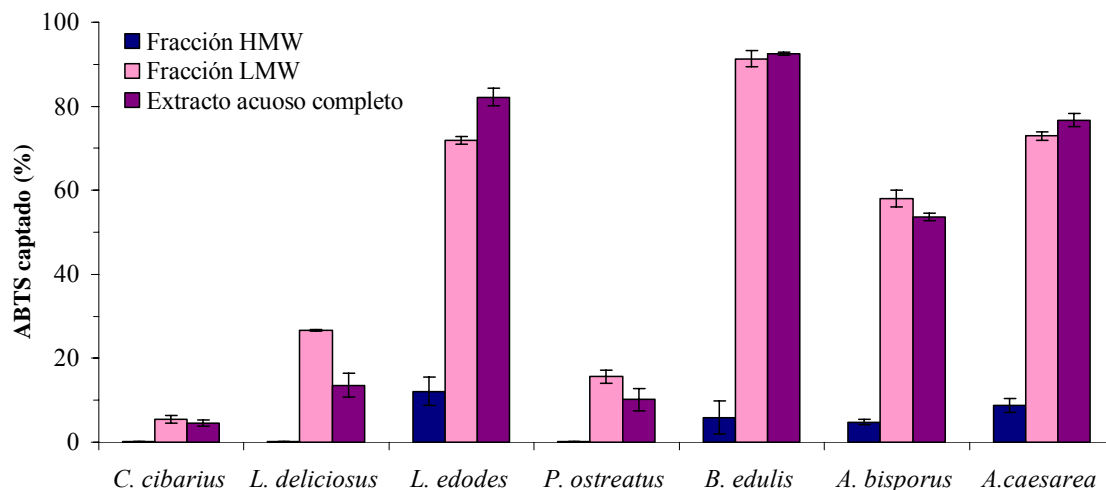


Figura 40. Capacidad de captación de ABTS^{•+} de extractos acuosos y sus fracciones LMW y HMW separadas utilizando microfiltros que retienen a moléculas de peso molecular mayor de 10.000 Da.

La fracción de alto peso molecular (HMW) de los extractos acuosos de *P. ostreatus*, que es la que presenta un mayor peso seco, no presenta sin embargo, prácticamente actividad antioxidante en comparación con las fracciones de alto peso molecular de otros hongos. En este sentido, los polisacáridos de *Pleurotus abalonus* y *P. ostreatus* muestran importantes actividades antioxidantes en los estudios de (Bobek y Galbavy, 2001; Li y col., 2007), aunque no se debían a que la fracción de polisacáridos en sí tuviera actividad, si no a que su consumo aumentaba la actividad y la expresión génica de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión reductasa etc.). También reducían la peroxidación lipídica en ratones con envejecimiento acelerado. Otras fracciones HWM con peso seco más bajo, como el caso de *L. edodes* y *A. caesarea*, contienen polisacáridos, proteínas y/u otros polímeros que deben tener una alta capacidad antioxidante, ya que se manifiesta a pesar de su baja concentración. La capacidad antioxidante de los polisacáridos de *L. edodes* ya ha sido previamente demostrada por los estudios de (Liu y col., 1997) y (Yen y col., 2007) e incluso con estudios *in vivo* (Yu y col., 2009). Sin embargo, es la primera vez que se observa actividad antioxidante en la fracción de alto peso molecular de *A. caesarea* a niveles casi similares a los observados en *L. edodes*.

Al sumar la capacidad antioxidante del alto y bajo peso molecular y compararla con la del extracto acuoso completo se puede observar que son prácticamente iguales o inferiores (*L. deliciosus*), lo que indica que no hay efectos sinérgicos realmente importantes entre los compuestos de ambas fracciones.

Si la fracción de LMW se incubaba durante 24 horas bajo condiciones similares a los extractos acuosos completos, la capacidad de captación de ABTS^{•+} no disminuye significativamente (figura 41) como ocurre con el extracto completo. Esta fracción no contiene ningún tipo de enzimas oxidativas, ya que éstas tienen un tamaño superior a 10.000 dalton y además, en esta fracción no se ha encontrado actividad enzimática alguna. Estos resultados sugieren que las reacciones llevadas a cabo por las enzimas oxidativas de los hongos pueden jugar un papel importante en la capacidad antioxidante tan elevada encontrada en los hongos comestibles. También sugieren que los antioxidantes son principalmente moléculas de bajo peso molecular y que por tanto podrían ser compuestos fenólicos susceptibles de oxidación por estas enzimas.

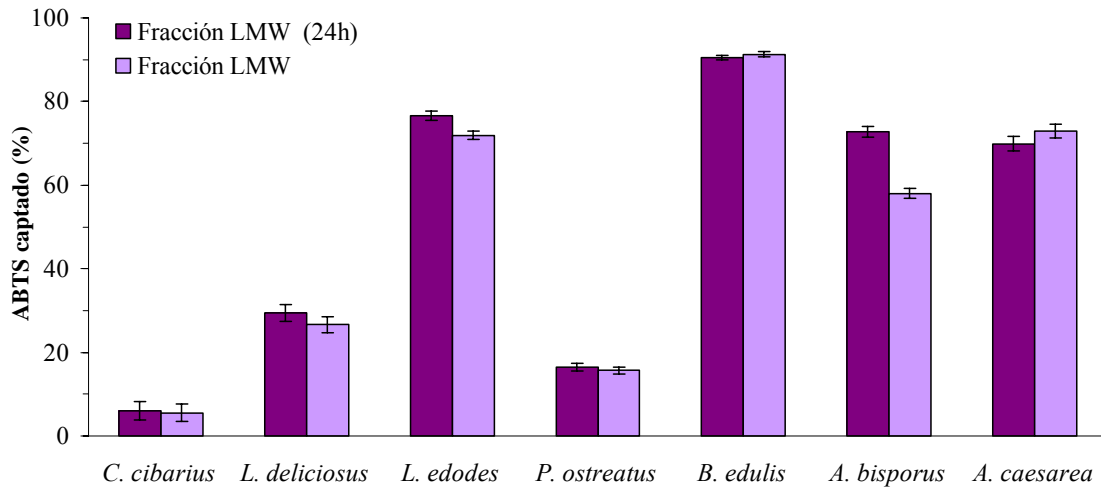


Figura 41. Porcentaje de captación del radical ABTS^{•+} de las fracciones de bajo peso molecular de extractos acuosos medidos de forma inmediata y tras su incubación durante 24 horas.

4.1.1.3. Análisis químico de los extractos metanólicos y acuosos

Evaluación preliminar por cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina (TLC) puede emplearse como método preliminar para la separación y detección de compuestos antioxidantes. Una vez desarrollada la cromatografía, la placa de sílice se puede teñir con un radical como el DPPH[•] y aquellas bandas que cambian su color de púrpura a amarillo contienen compuestos antioxidantes (Soler-Rivas *y col.*, 2000). Los extractos acuosos y metanólicos de los diferentes hongos se han desarrollado por TLC al mismo tiempo que varios compuestos patrón, descritos por la bibliografía como posibles responsables de la actividad antioxidante, con la finalidad de realizar una identificación preliminar, dependiendo del factor de retención (R_f) que presenten la muestra y el patrón. Los extractos metanólicos y los acuosos se han desarrollado de forma separada porque hay que utilizar fases móviles distintas, debido a la diferente polaridad de las moléculas disueltas en uno u otro disolvente.

La separación cromatográfica de los extractos metanólicos y su posterior tinción con DPPH[•] muestra dos bandas más intensas, presentes en todos los extractos y otras minoritarias sólo apreciables en algunos extractos (figura 42). Una de las bandas más intensas y común a todos los hongos mostraba un R_f de 0,86 y la otra se encontraba en el punto de aplicación. La banda con un R_f de 0,86 co-migraba con el patrón de

ergosterol. El ergosterol es un componente característico de las membranas de las hifas de los hongos (Barajas-Aceves, M., y col. 2002), así que no es de extrañar que se encuentre en todos los extractos de hongos y en cantidades abundantes. En los hongos silvestres y en aquéllos cultivados pero que requieren ciclos de luz para su crecimiento y fructificación se produce la transformación parcial del ergosterol en ergocalciferol (Vitamina D₂) ya que esta reacción necesita de luz para llevarse a cabo (Teichmann y col., 2007). El R_f del colecalciferol o vitamina D₃, que aunque no se encuentre presente en hongos, es el mismo que el de la Vitamina D₂, con las fases móviles utilizadas, fue de 0,89. Sin embargo, ninguno de los hongos analizados muestra una banda significativa con el mismo R_f. Estos resultados no son sorprendentes ya que las concentraciones de ergosterol rondan, dependiendo de la especie considerada, entre 7 – 1 mg/g ps y las de vitamina D₂ no superan los 2 µg/g en el mejor de los casos (Mattila y col., 1999; Teichmann y col., 2007). Probablemente, esas concentraciones están por debajo del límite de detección de esta técnica.

En este sistema cromatográfico, un compuesto tan apolar como el β-caroteno migra con el frente y presenta un color anaranjado antes de la tinción con DPPH•. Sin embargo, no se detectó ninguna banda similar en ninguno de los extractos metanólicos de los hongos de este estudio, ni siquiera en *C. cibarius* ni en *L. deliciosus* cuyos cuerpos fructíferos son de color naranja. Probablemente, su concentración también esté por debajo del límite de detección ya que para *C. cibarius*, uno de los hongos con mayor cantidad de carotenoides de entre varias especies coloreadas contiene alrededor de 13,5 µg/g de β-caroteno (Barros y col., 2008a).

Los extractos metanólicos de algunas de las especies de hongos como *L. deliciosus*, *L. edodes* y *P. ostreatus* presentan una banda fina (a veces apenas apreciable) que coincide con el α-tocoferol (R_f= 0,91), por lo que el contenido en tocoferoles de estos hongos se debe estudiar con técnicas analíticas más precisas antes de sacar otras conclusiones ya que diversos estudios ratifican que algunas de estas especies contienen tocoferoles (Yang y col., 2002).

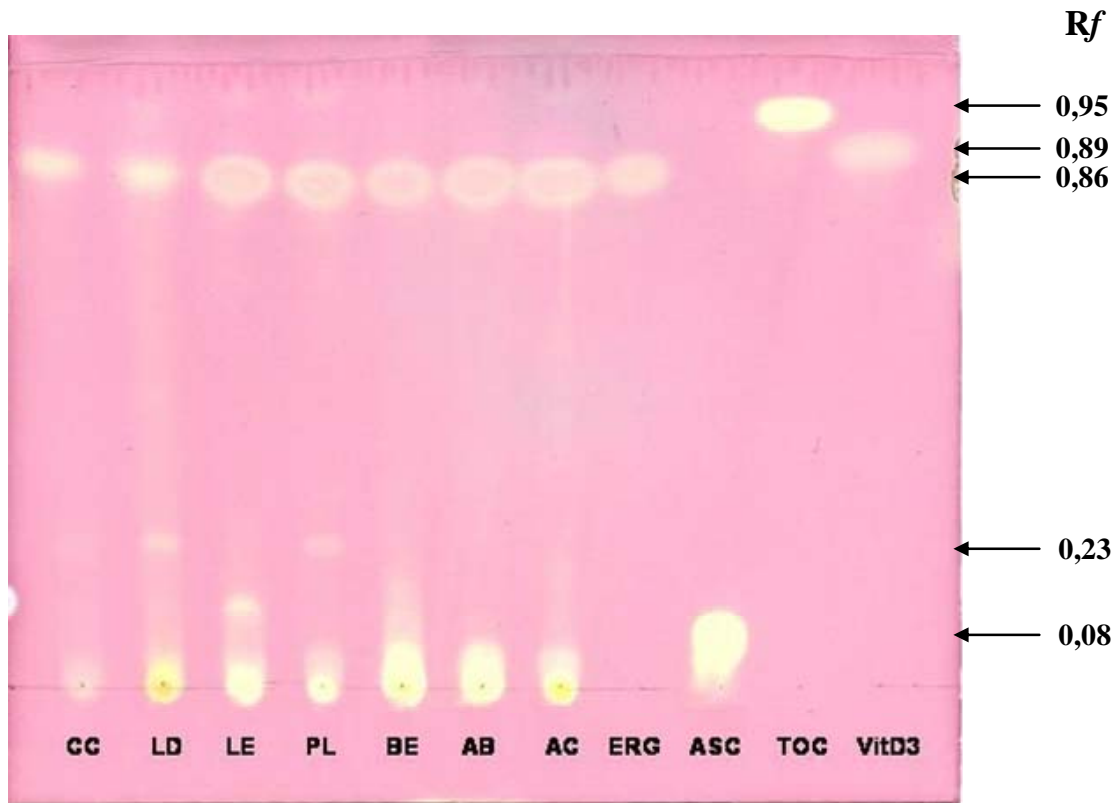


Figura 42: TLC de los extractos metanólicos de hongos. Fase móvil: tolueno:acetato de etilo:ác. fórmico (50:40:10) (v/v/v) y revelada con DPPH[•] 1,27 mM. **CC**= *C. cibarius*, **LD**= *L. deliciosus*, **LE**= *L. edodes*, **PL**= *P. ostreatus*, **BE**= *B. edulis*, **AB**= *A. bisporus*, **AC**= *A. caesarea*, **ERG**= Ergosterol, **ASC**= Ácido ascórbico, **TOC**= Tocoferol y **VitD3**= Colecalciferol.

Ningún extracto metanólico contiene ácido ascórbico a niveles detectables, excepto el obtenido de *Lentinus edodes*. Sin embargo la migración de este compuesto en este sistema cromatográfico era tan escasa que no se puede asegurar que sus Rf's sean totalmente coincidentes.

Los extractos metanólicos de *L. deliciosus* y *P. ostreatus* mostraron una banda común con $R_f = 0,23$ que no corresponde a ninguno de los compuestos identificados con anterioridad, ya que compuestos fenólicos como los ácidos protocatechuico y cafeico descritos en algunas especies (Puttaraju y col., 2006) tienen, en esta fase móvil, Rf's de 0,6 y 0,53 respectivamente (Espín y col., 2000).

Puesto que la banda más intensa en la mayoría de las especies se encuentra en el punto de aplicación y, que los extractos acuosos contenían mayor cantidad de compuestos que

los metanólicos, la actividad antioxidante observada puede deberse a compuestos acuosos que también son parcialmente solubles en metanol, pero que por su alta polaridad no son capaces de migrar con la mezcla de disolventes orgánicos elegida.

Para el estudio de las fracciones acuosas se optó por desarrollar una TLC usando otra fase móvil. Los extractos acuosos producen una mancha que cubre toda la línea desde el punto de aplicación hasta el frente, que probablemente se debe a la presencia de polisacáridos que no se pueden analizar fácilmente con esta técnica. Con el fin de evitarlo, sólo se han desarrollado mediante TLC las fracciones de bajo peso molecular (<10.000 d) de los extractos acuosos de los hongos estudiados (figura 43), que es donde se encontraban los compuestos con la capacidad antioxidante más elevada.

Con la fase móvil empleada, las escasas bandas que se hicieron visibles no se corresponden con ninguno de los compuestos descritos por la bibliografía. *L. edodes* y *A. bisporus* muestran una banda común con $R_f = 0,72$, *B. edulis* mostraba una banda de muy baja intensidad ($R_f = 0,68$) y otra al mismo R_f que la ergotioneína y *A. caesarea* mostró una banda con un $R_f = 0,27$.

A pesar de que varios autores describen la presencia de ergotioneína en especies de hongos como *A. bisporus*, *L. edodes*, *P. ostreatus* (Dubost y col., 2006; Dubost y col., 2007) sólo los cuerpos fructíferos de *B. edulis* contienen este compuesto en cantidades de hasta 4 veces superior a las otras especies (528,14 mg/kg pf) (Ey y col., 2007) por eso probablemente, y debido a las restricciones de sensibilidad de esta técnica, sólo se detecta ergotioneína en esta especie.

Para confirmar que este compuesto se corresponde con la ergotioneína se ha realizado una nueva TLC-preparativa de la fracción de bajo peso molecular del extracto acuoso de *B. edulis*, se ha extraído de la sílice con agua la banda cuyo R_f coincide con el de ergotioneína y se ha comparado su espectro UV-vis con el de la banda correspondiente al patrón de ergotioneína (figura 44). Al mostrar el máximo de absorción a 257 nm característico de la ergotioneína, se ha podido confirmar que la banda analizada contenía este compuesto, aunque no exclusivamente este compuesto, ya que también se observaba una absorbancia elevada en la región de UV.

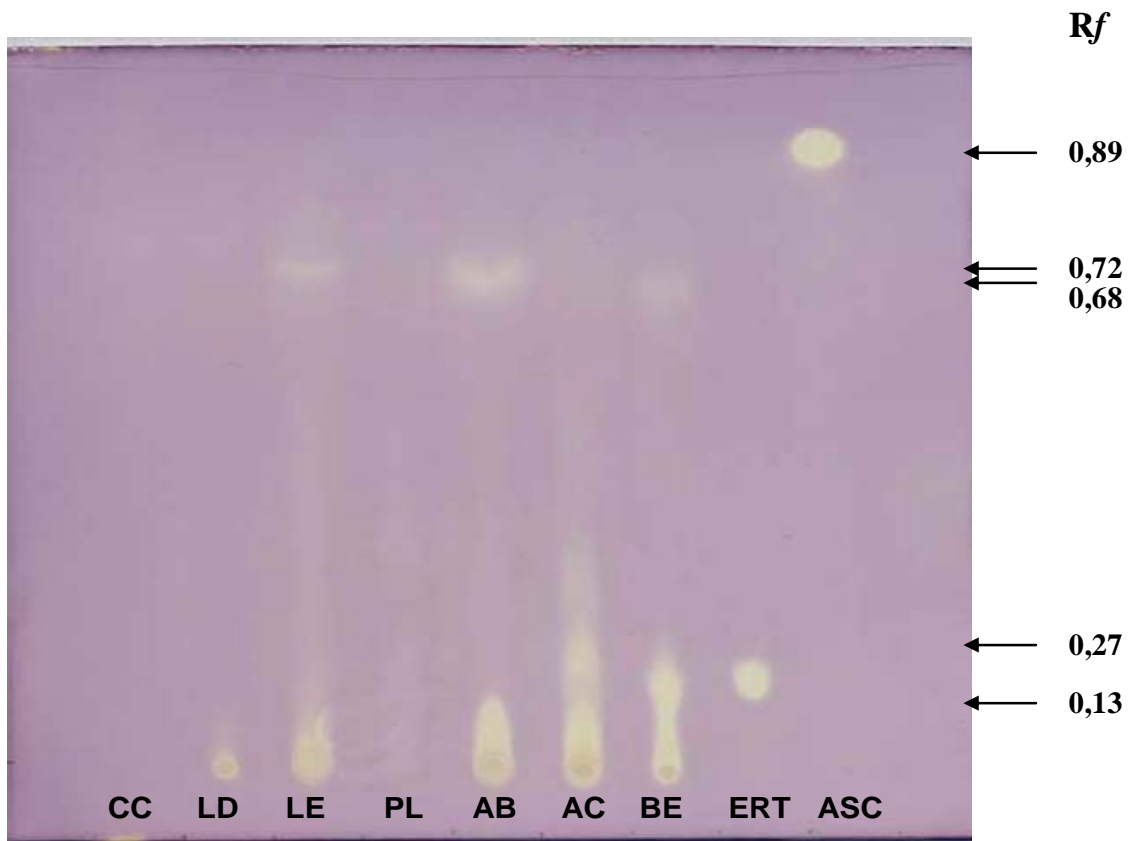


Figura 43: TLC de las fracciones de LMW de los extractos acuosos de hongos. Fase móvil: metanol: ác. acético: ác fórmico: agua (75:8:16:1) (v/v/v/v) y revelada con DPPH• 1,27 mM. **CC**= *C. cibarius*, **LD**= *L. deliciosus*, **LE**= *L. edodes*, **PL**= *P. ostreatus*, **AB**= *A. bisporus*, **AC**= *A. caesarea*, **BE**= *B. edulis*, **ERT**= Ergotioneína, **ASC**= Ácido ascórbico.

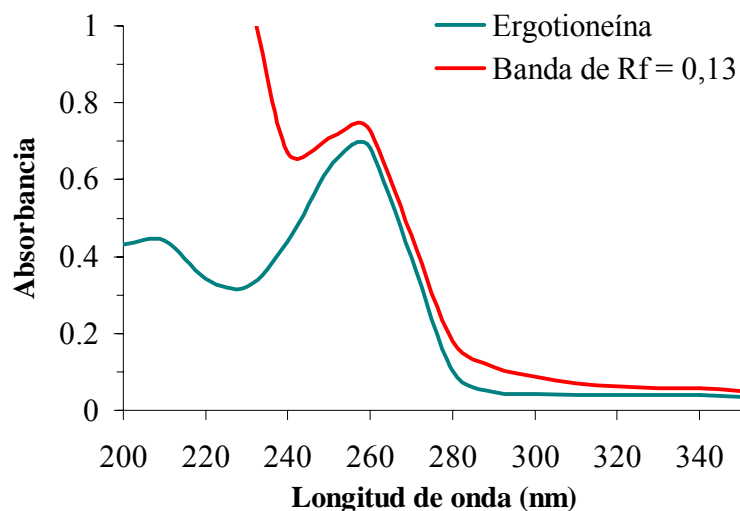


Figura 44: Espectros UV-Vis del patrón de ergotioneína y banda aislada después de desarrollar la fracción de bajo peso molecular de *Boletus edulis* por una TLC-preparativa.

El contenido en ergotioneína del extracto de *B. edulis* se ha estimado mediante la realización de una curva de calibrado con el patrón de ergotioneína a 257 nm donde se interpreta el valor de absorbancia de la banda de *B. edulis* separada a la misma longitud de onda, estimándose en 8,75 mg/g. Concentraciones superiores a lo previamente descrito por otros autores como (Dubost *y col.*, 2007; Ey *y col.*, 2007), quienes determinan un rango de concentración de ergotioneína entre 0,05-2,6 mg/g ps en *B. edulis*, *A. bisporus*, *L. edodes*, *P. ostreatus*.

En el punto de aplicación de la mayoría de las fracciones LMW de los hongos excepto en *C. cibarius* y *P. ostreatus* siguen observándose bandas amarillas que indican la presencia de otros compuestos con actividad antioxidante. Según algunos autores, los extractos acuosos de los hongos poseen ácidos orgánicos como los ácidos oxálico, cítrico, málico, succínico y fumárico, etc., (Ribeiro *y col.*, 2008) que son compuestos sin actividad antioxidante importante pero que modifican el pH del medio de reacción y se ha demostrado que a pHs ácidos se produce un desplazamiento del espectro de absorción del radical DPPH[•], produciendo falsos positivos cuando se comparan con muestras de pH neutro. Así pues, la presencia de estos compuestos puede influir en las bandas amarillas visualizadas en el punto de aplicación, ya que los ácidos orgánicos mencionados no deben migrar con la fase móvil utilizada. Sin embargo, también hay que considerar la posibilidad de que en el punto de aplicación se encuentren compuestos fenólicos muy polares (ácido gálico) y/o péptidos con capacidad antioxidante, que también pueden influir en el cambio de color de la banda detectada, por lo cual, para poder establecer algún tipo de conclusión, es necesario estudiar con mayor detalle los compuestos fenólicos y péptidos presentes en estas fracciones.

Determinación de ergosterol

A partir de los resultados obtenidos en los estudios preliminares mediante TLC, el ergosterol es uno de los principales compuestos responsables de la capacidad antioxidante de la fracción insaponificable del cuerpo fructífero, por lo que se ha procedido a su cuantificación por Cromatografía de gases. Los perfiles cromatográficos obtenidos para todos los hongos son muy similares variando sólo las áreas de los picos (figura 45).

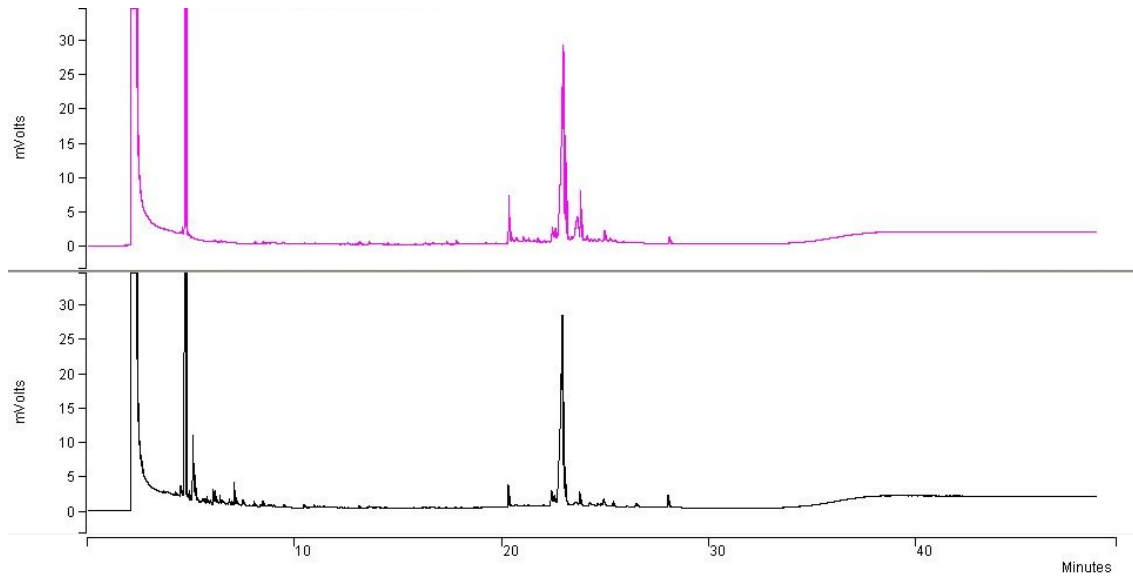


Figura 45: Cromatogramas obtenidos de la fracción insaponificable del cuerpo fructífero de *P. ostreatus* (arriba) y *L. deliciosus* (abajo).

El patrón de ergosterol desarrollado con el mismo método cromatográfico que los hongos muestra un pico único, con un tiempo de retención de 23 minutos coincidiendo con el pico de mayor área de los hongos (figura 46).

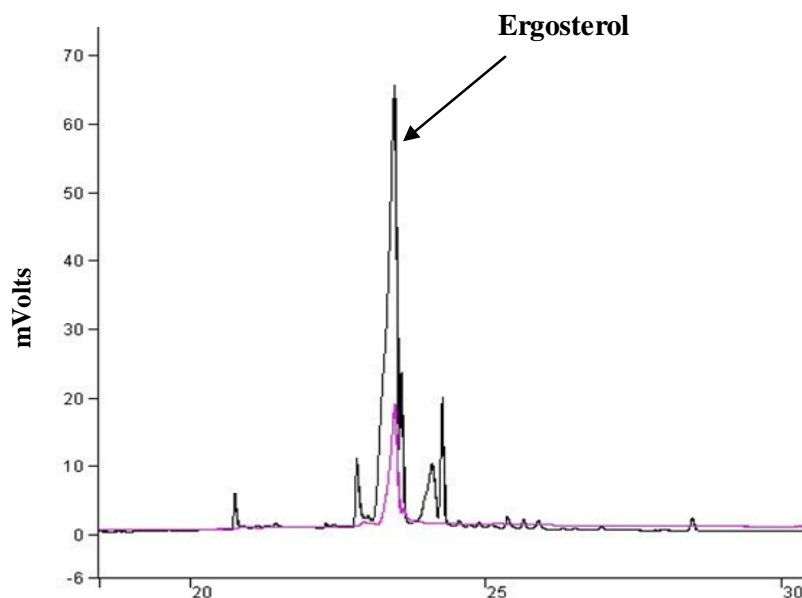


Figura 46: Detalle de los cromatogramas superpuestos de la fracción insaponificable de *A. caesarea* (negro) y el patrón de ergosterol (rosa).

Los otros picos minoritarios detectados en los cromatogramas de los hongos pueden corresponder a compuestos derivados del ergosterol como el ergosta-7,22-dienol,

ergosta-7,5-dienol, fungisterol, etc., descritos por otros autores y con cromatogramas similares (Mattila *y col.*, 2002a; Teichmann *y col.*, 2007; Kalac, 2009). Sin embargo, en este estudio sólo se ha cuantificado el ergosterol ya que es el compuesto mayoritario en todas las especies de hongos analizados y el de mayor contribución a la capacidad antioxidante observada.

El hongo con mayor contenido en ergosterol (figura 47) es, con diferencia, *A. caesarea* (8,1 mg/g) seguido por *A. bisporus*. *C. cibarius*, *L. edodes* y *B. edulis* que tienen valores similares (3,7-3,8 mg/g) y se aproximan a los indicados para *C. cibarius* por (Kalac, 2009). *B. edulis*, sin embargo muestra valores inferiores a los estimados por el mismo autor. Sin embargo hay que tener en cuenta que las concentraciones de ergosterol pueden variar en función de la especie, del estado nutricional, de las condiciones del medio de cultivo o del medio ambiente (silvestres), de las etapas de desarrollo. De hecho, este compuesto se cuantifica como marcador del estado de desarrollo del hongo, ya que sólo cuando las hifas comienzan a detener su expansión porque el medio les es adverso o sufren algún tipo de infección, la síntesis de ergosterol disminuye. En este sentido, otros autores han encontrado valores que rondan los 9,61 a 4,89 mg/g ps en *Boletus edulis*, y 7,8 - 4,4 mg/g ps para *A. bisporus*, *P. ostreatus* y *L. edodes* (Mattila *y col.*, 2002a) y (Teichmann *y col.*, 2007) lo que sólo indica que su estado de crecimiento era diferente del de los hongos analizados en este estudio.

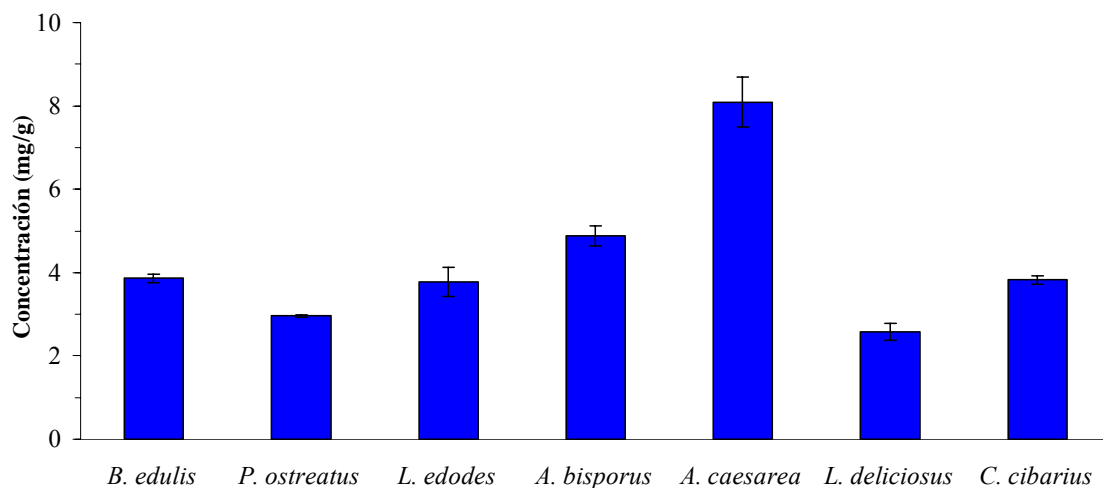


Figura 47: Contenido en ergosterol en los hongos comestibles seleccionados.

Para comprobar si estos compuestos son los principales responsables de la alta actividad antioxidante mostrada por los extractos metanólicos se han representado las

concentraciones de ergosterol frente a los valores de actividad antioxidante (EC_{50}) de estos extractos, obteniéndose a una correlación muy baja ($R^2 = 0,02$). Esta correlación era de esperar ya que, por ejemplo, *A. caesarea* es uno de los hongos con mayor concentración de ergosterol y sin embargo sus extractos metanólicos no presentan la mayor capacidad antioxidante. Cuando se representa de igual manera la capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica con el contenido de este esteroles tampoco se ha detectado correlación alguna. Estos resultados indican que la alta capacidad de captación de DPPH• y su actuación como agentes inhibidores de peróxidos no se deben exclusivamente al contenido en ergosterol, sino que otros compuestos, probablemente los detectados en el punto de aplicación de la TLC y/o los tocoferoles también contribuyen a dichas actividades.

Determinación de tocoferoles

Aunque en los estudios preliminares llevados a cabo mediante TLC algunas especies de hongos muestran bandas casi inapreciables coincidentes con el de α -tocoferol, existen numerosos trabajos donde se describe la presencia de estos compuestos en hongos, (Yang y col., 2002; Mau y col., 2001; Mau y col., 2002; Mau y col., 2004; Tsai y col., 2007), por lo que se ha decidido llevar a cabo su análisis con métodos más sensibles como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Con la columna utilizada, se han logrado separar las isoformas α y δ del tocoferol, aunque no las isoformas β - y γ -tocoferol (figura 48). Sin embargo, esto no supone ningún problema ya que estudios previos indican que el contenido en β -tocoferol en las diferentes especies (incluyendo algunas de las de este estudio) es mínimo, ya que principalmente contienen γ -tocoferol. Sólo existe un trabajo donde se mencionan β -tocoferoles en *Agaricus sp.*, *B. edulis*, *C. cibarius* y otras especies (Barros y col., 2008a). Además se estimará el contenido en tocoferoles totales sumando las concentraciones correspondientes a los tres picos para evitar controversias en el tipo de isoformas.

Los perfiles cromatográficos de las muestras de hongos muestran que el α -tocoferol es el compuesto predominante, aunque algunos hongos también tienen las isoformas γ - y δ - aunque en mucha menor proporción (figura 49).

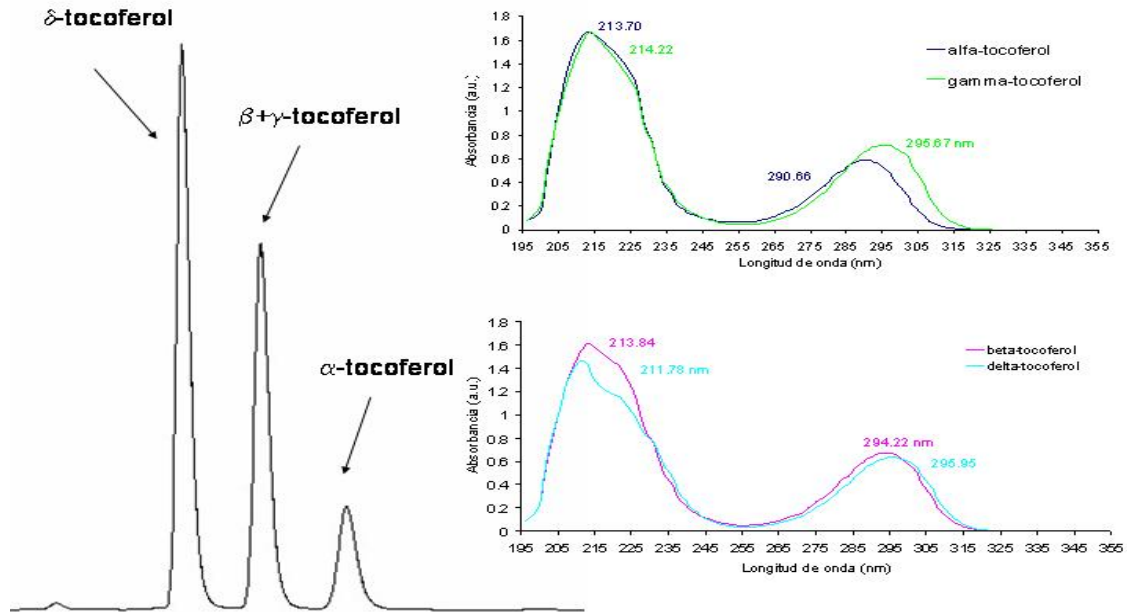


Figura 48: Cromatograma de elución de patrones de tocoferoles por HPLC y sus espectros visualizados con el detector de fotiodo.

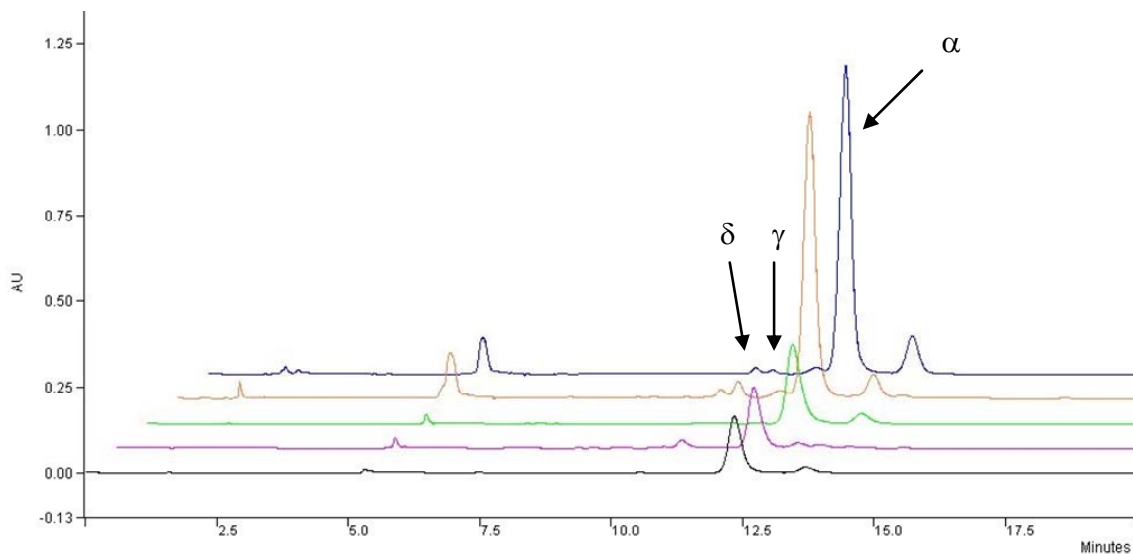


Figura 49: Cromatogramas de HPLC de la fracción insaponificable obtenida de los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* (azul), *B. edulis* (amarillo), *A. caesarea* (verde), *L. edodes* (rosa) y *A. bisporus* (negro).

La cuantificación de las áreas indicó que α -tocoferol está presente en todas las especies pero en concentraciones muy diferentes. *C. cibarius*, *B. edulis* y *L. edodes* muestran las concentraciones más altas, seguidos por *L. deliciosus* y *P. ostreatus* (figura 50). Estos

valores coinciden con otros autores como (Yang y col., 2002) que encuentran valores entre 0,12 y 0,13 mg/g en *L. edodes* y de 0,24 mg/g en *P. ostreatus*.

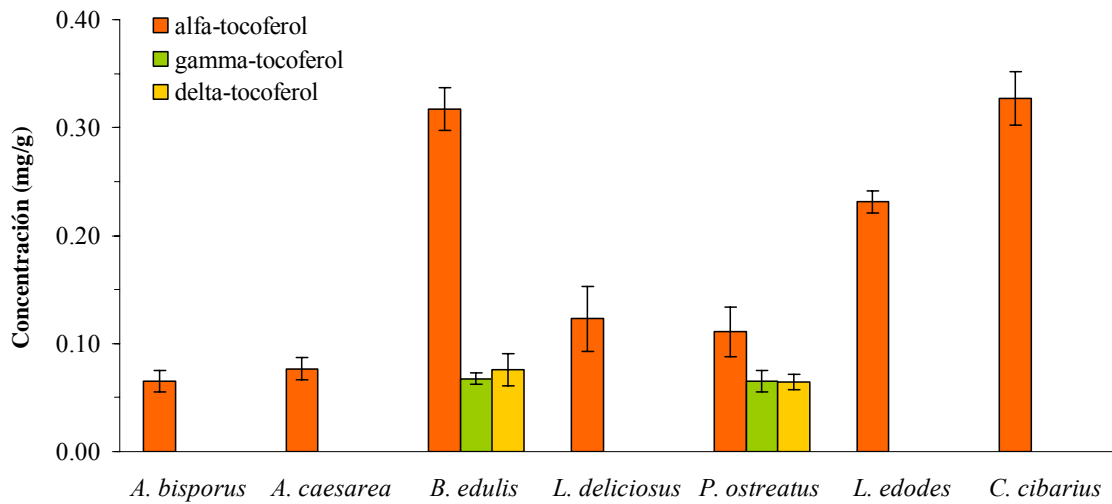


Figura 50: Contenido en α - γ - y δ - tocoferol de los cuerpos fructíferos de los hongos comestibles seleccionados.

Cuando se representa el valor de tocoferoles individuales y la suma de todas las isoformas frente a la actividad de captación del radical DPPH[•] y frente a la capacidad de inhibición de formación de peróxidos de las fracciones metanólicas no se ha encontrado correlación, tampoco si se suman las determinaciones de ergosterol y tocoferol, lo que indica que además de la influencia que puedan ejercer estos compuestos en estas capacidades antioxidantes de los extractos metanólicos, es necesario también tener en cuenta y evaluar la naturaleza de los compuestos que contiene la fracción que queda sin migrar en el punto de aplicación cuando se desarrollan las TLC.

Determinación de proteínas y péptidos

Esta determinación se ha llevado a cabo tanto en los extractos acuosos totales obtenidos de los hongos como en sus correspondientes fracciones de bajo peso molecular. El interés de la determinación de estos compuestos en la fracción de bajo peso molecular viene determinada por la alta capacidad antioxidante detectada en la misma.

Los resultados obtenidos (figura 51) indican que prácticamente la totalidad de las proteínas se encuentran formando parte de la fracción de alto peso molecular, bien como proteínas con peso molecular superior a 10 kD o bien unidas a polisacáridos formando

proteoglucanos. *A. caesarea*, *A. bisporus* y *L. deliciosus* son los hongos que presentan una mayor cantidad de proteínas en el extracto acuoso.

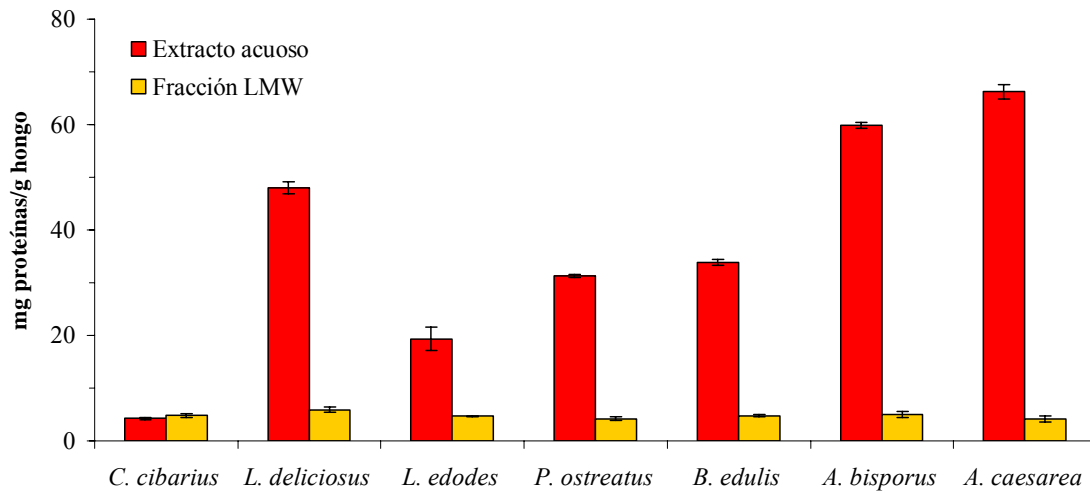


Figura 51: Concentración de proteínas totales en el extracto acuoso completo y en la fracción de bajo peso molecular de los hongos comestibles.

Sin embargo, la cantidad de péptidos y/o aminoácidos libres presentes en la fracción de bajo peso molecular es muy similar en todas las especies de hongos analizadas (6 – 4,1 mg/g). Cuando se representa la capacidad antioxidante de la fracción acuosa con el total de proteínas presentes en esta fase y cuando se representa la actividad de captación del radical $ABTS^{\bullet+}$ con los valores de péptidos totales de la fracción de bajo peso molecular no se encuentra correlación alguna ($R^2 = 0,2054$ y $R^2 = 0,0443$, respectivamente). Estos resultados eran esperables ya que, por ejemplo, el extracto acuoso del hongo *L. deliciosus* y la fracción de bajo peso molecular de *C. cibarius* con un alto porcentaje de proteínas tienen una capacidad de captación de $ABTS^{\bullet+}$ muy bajas.

Determinación de compuestos fenólicos

La cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos acuosos y metanólicos obtenidos de los distintos hongos es de especial interés, ya que en estudios realizados en plantas, la actividad antioxidante se relaciona con este tipo de compuestos (Sugimura, 2002). Aunque estudios realizados en los hongos indican que en algunas especies sí se encuentra dicha correlación, como en *Dictyophora indusiata*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Tricholoma giganteum*, *L. edodes* y *Volvariella volvacea* (Mau y col., 2002; Cheung y Cheung, 2005) en otras especies no (*Auricularia sp.* y *Tremella fuciformis*). Además, los estudios preliminares (TLC) indicaban la presencia

de compuestos con capacidad antioxidante en extractos metanólicos y acuosos que si no son péptidos o proteínas podrían ser fenoles.

Los resultados obtenidos (tabla 16) indican que los extractos acuosos contienen una mayor cantidad de compuestos fenólicos que los metanólicos. En especies como *B. edulis* más del 7% de los compuestos hidrosolubles son de origen fenólico, siendo también esta especie la que mayor cantidad de fenoles presenta en su extracto metanólico. *A. caesarea* y *L. edodes* también muestran un alto contenido fenólico en sus extractos acuosos (más del 5%) pero no así en sus extractos metanólicos, donde *P. ostreatus* y *A. bisporus* son los siguientes a *B. edulis* con más del 2% de fenoles totales extraídos.

Para poder estimar la implicación de los fenoles totales extraídos de cada fracción respecto al total de fenoles de cada hongo completo, también se ha determinado el contenido en fenoles del cuerpo fructífero completo (figura 52).

Tabla 16. Porcentaje de compuestos fenólicos en extractos acuosos y metanólicos obtenidos de cuerpos fructíferos de hongos.

Especies de hongos	Fenoles en extracto metanólico (%) p/p	Fenoles en extracto acuoso (%) p/p
<i>C. cibarius</i>	0,87	1,42
<i>L. deliciosus</i>	1,45	3,56
<i>L. edodes</i>	1,03	5,01
<i>P. ostreatus</i>	2,24	4,23
<i>B. edulis</i>	3,68	7,69
<i>A. bisporus</i>	2,67	3,83
<i>A. caesarea</i>	1,67	5,59

En dos de los hongos, *L. deliciosus* y *C. cibarius*, la suma de los compuestos fenólicos de los extractos acuosos y metanólicos es más baja que los fenoles totales medidos en el cuerpo fructífero completo, indicando que estos hongos contienen otros fenoles, que no son solubles ni en agua ni en metanol, y que tal vez formen parte de la fracción etérea descartada. Para el resto de los hongos, la suma es mayor que los fenoles totales del cuerpo fructífero completo, indicando que algunos de esos fenoles son solubles en ambos solventes.

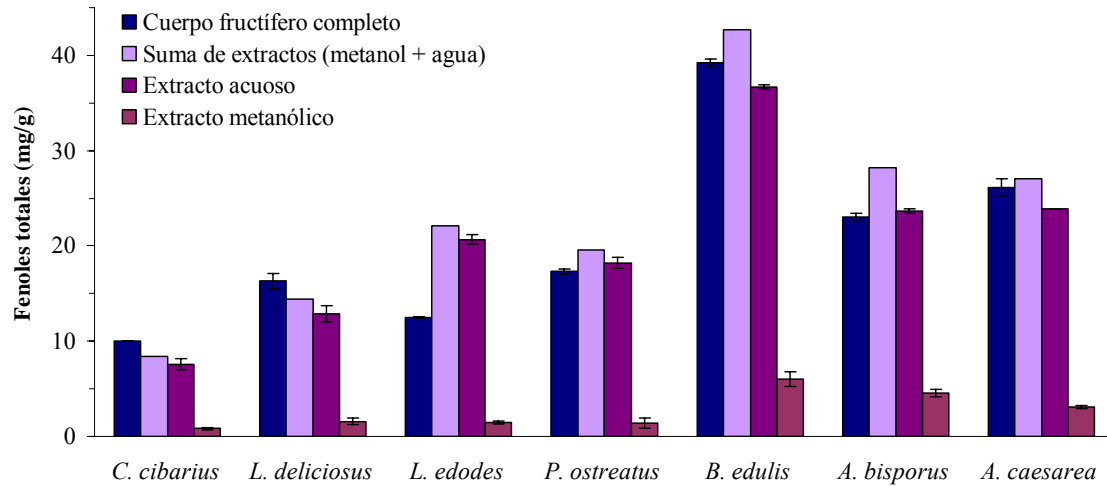


Figura 52: Contenido en fenoles totales en los hongos seleccionados y sus extractos acuosos y metanólicos.

La concentración de fenoles totales en los hongos completos seleccionados varía entre 40 mg/g de *B. edulis*, y los 10 mg/g de *C. cibarius*. Estos valores son más altos que los descritos previamente para especies filogenéticamente cercanas (Signore y col., 1997), sin embargo, hay que tener en cuenta que al igual que otros compuestos, estos valores pueden variar mucho dependiendo de las condiciones ambientales, del momento de recolección, de los disolventes empleados para la extracción, etc., En este sentido, los extractos metanólicos de *P. ostreatus* y *L. edodes* analizados mostraron valores inferiores a los mencionados anteriormente por (Yang y col., 2002) y (Elmastas y col., 2007). También hay trabajos en los que se mencionan concentraciones de fenoles muy similares entre extractos etanólicos y acuosos (obtenidos con agua caliente) de *B. edulis*, entre otros hongos (Tsai y col., 2007) mientras que, otros autores mencionan mayores proporciones (algunos de hasta 10 veces más) en los extractos acuosos (Cheung y col., 2003; Puttaraju y col., 2006).

Los extractos metanólicos de *B. edulis* muestran la mayor concentración en fenoles y la más alta capacidad de captación del radical DPPH• (figura 38), pero si se consideran las demás especies no es posible establecer una correlación entre la concentración fenólica y su porcentaje de captación del radical DPPH• a 1,8 mg/mL ($R^2 = 0,35$) o su EC_{50} ($R^2 = 0,11$). Así, los extractos metanólicos de *L. edodes* muestran menor concentración de compuestos fenólicos que *L. deliciosus* (figura 52) y éste último mostró tres veces menos actividad captadora de DPPH• a la misma concentración que los extractos

metanólicos de *L. edodes* (figura 38). También, si se suman la concentración de fenoles y de ergosterol y se representan frente a la capacidad de captación del radical DPPH• se observa de igual manera, una baja correlación ($R^2=0,4652$) o su EC_{50} ($R^2=0,125$). Tampoco se ha encontrado ninguna correlación entre estos valores y la capacidad de inhibición de la oxidación lipídica. Ni siquiera teniendo en cuenta no sólo los compuestos fenólicos si no también los de contenido en ergosterol y tocoferoles, por ejemplo, *B. edulis* presenta altos niveles de fenoles y tocoferoles y medios de ergosterol y su Pf fue el más bajo de todas las especies estudiadas.

Una comparación similar se ha llevado a cabo en los extractos acuosos. Al representar, la concentración fenólica de los hongos estudiados frente a su capacidad antioxidante a 0,14 mg/mL se encuentra una alta correlación ($R^2= 0,65$). Teniendo en cuenta que los compuestos fenólicos tienen un peso molecular inferior a 10.000 daltons, se puede suponer que se van a encontrar en la fracción de bajo peso molecular y por tanto, se ha representado la capacidad antioxidante de dicha fracción respecto a la cantidad de compuestos fenólicos de cada hongo, obteniéndose una correlación aun mayor que en el caso anterior (figura 53).

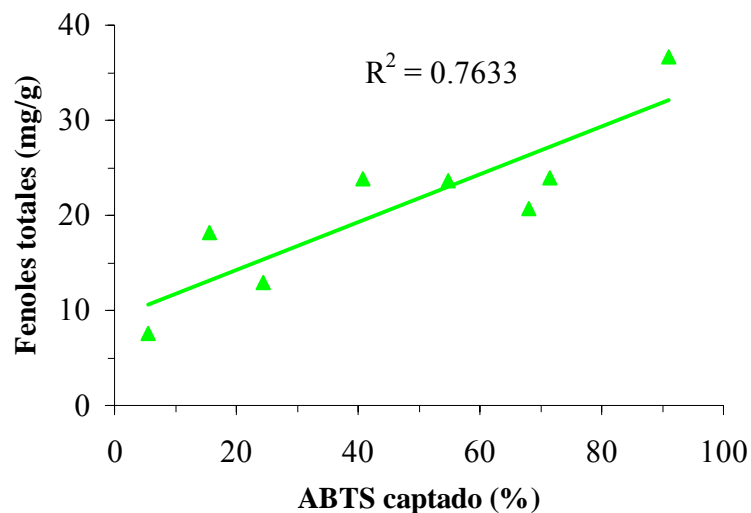


Figura 53. Correlación entre los fenoles totales y el porcentaje de captación de ABTS^{•+} de la fracción acuosa de bajo peso molecular de los hongos.

Por otro lado, si los extractos acuosos se incuban durante 48 horas, el contenido en fenoles disminuye (figura 54) del mismo modo que disminuye la capacidad antioxidante (figura 39b), dato que puede indicar que las enzimas oxidativas son capaces de degradar determinados compuestos fenólicos con capacidad antioxidante durante la incubación.

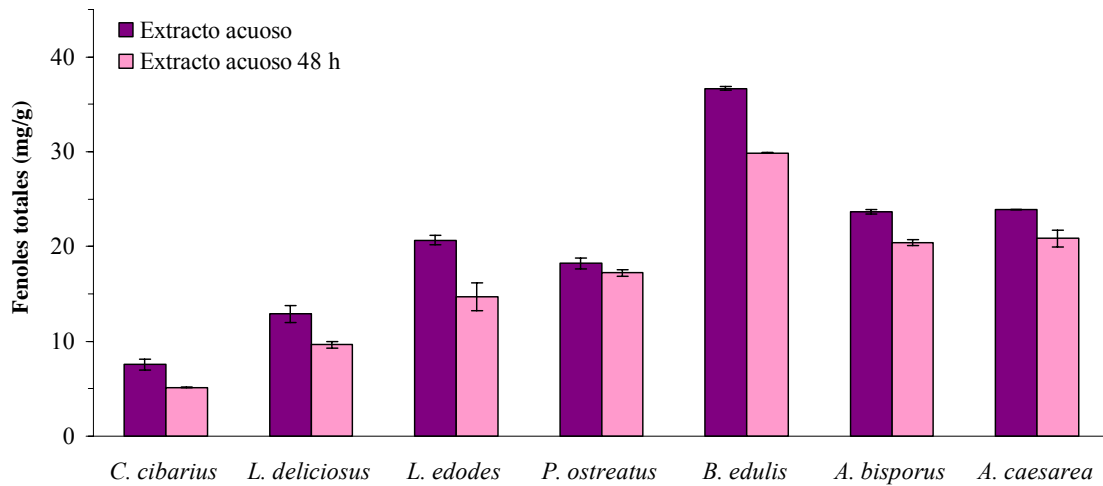


Figura 54: Contenido en fenoles de los extractos acuosos de los hongos analizados de manera inmediata e incubados durante 48 horas.

Tras la incubación el extracto acuoso de *C. cibarius* es el que sufre la mayor degradación fenólica (32%), seguida por *L. edodes* (29%) y *L. deliciosus* (25%). El extracto acuoso de *L. edodes*, que ha sufrido una degradación fenólica muy elevada con la incubación de 48 h, presenta la mayor reducción de la actividad antioxidante (captadora de ABTS^{•+}) (figura 39 y tabla 14). Sin embargo, *C. cibarius* también con una degradación fenólica elevada, manifiesta una reducción no muy significativa de su capacidad antioxidante después de 48 horas de incubación. Por lo tanto, no se puede demostrar una clara relación entre la oxidación fenólica y la reducción de capacidad antioxidante. Estos hechos pueden tener tres posibles explicaciones: 1) la reducción de la actividad antioxidante observada en algunos hongos puede deberse a reacciones de degradación espontáneas (sin intervención de enzimas); 2) algunos de los compuestos fenólicos pueden ser sustratos de enzimas oxidativas y al activarse estas durante la incubación, pueden ser destruidos perdiendo así sus propiedades antioxidantes. La tercera posibilidad es que en algunas de las especies de hongos ocurra la opción 1), en otras la 2) y en otras la combinación de 1 y 2.

Si la fracción de LMW (sin enzimas oxidativas) se incuba durante 24 horas bajo condiciones similares a los extractos acuosos, la capacidad de captación de ABTS^{•+} no disminuye significativamente (figura 41), sugiriendo que las oxidaciones catalizadas enzimáticamente deben de estar más implicadas en la reducción de la actividad antioxidante que las reacciones espontáneas.

4.1.1.4. Actividad de enzimas oxidativas

Para comprobar si existe algún tipo de correlación entre las enzimas oxidativas y la pérdida observada en la capacidad antioxidante de los extractos acuosos, o determinar si esta pérdida se debe exclusivamente a la destrucción de los compuestos con actividad antioxidante por descomposición u oxidación espontánea, se ha medido la actividad de enzimas tales como peroxidasas y polifenol oxidasas de los extractos acuosos analizados.

Los resultados indican que algunos hongos que presentan una alta actividad enzimática son también algunos de los que mostraron una mayor pérdida de capacidad antioxidante (tabla 17). Así, los extractos acuosos de *L. edodes* que muestran una de las actividades de las lacasas y peroxidasas más altas, muestran también la mayor reducción de capacidad antioxidante cuando los extractos se incuban durante 48 h. Sin embargo, *L. deliciosus* es el hongo que posee una mayor actividad tanto peroxidasa como polifenol oxidasa y la reducción de su actividad antioxidante no ha sido tan acusada como en *L. edodes*, aunque también es cierto que *L. deliciosus* es uno de los hongos con menor capacidad antioxidante. Extractos de *P. ostreatus* y *A. caesarea* también han mostrado actividades lacasa y peroxidasa pero en menor grado. *P. ostreatus* exhibe menor actividad lacasa que las otras especies que con actividades peroxidasas similares: *L. deliciosus*, *L. edodes* y *A. caesarea*.

A. bisporus, seguido de *L. deliciosus* y *A. caesarea*, presentan los niveles más altos de polifenol oxidasas. En cuanto a la tirosinasa, en *A. caesarea* y sobre todo en *A. bisporus* la mayor proporción de este enzima se encuentra en forma latente, mientras que en *L. deliciosus* más de la mitad de este enzima se encuentra en forma activa, indicando la posibilidad de que en este hongo, su capacidad antioxidante sea tan baja porque prácticamente todos los compuestos antioxidantes hayan sido ya oxidados incluso antes de su recolección (siempre y cuando los antioxidantes sean sustrato de estas enzimas). En *A. bisporus* y *A. caesarea*, con tirosinasas latentes, también puede ocurrir que durante la incubación de los extractos acuosos se produzca una activación parcial de las mismas, catalizándose la oxidación fenólica. La mayor especificidad de sustrato de la reacción de la tirosinasa (comparada con peroxidasas o lacasas) y la activación incompleta de su forma latente puede explicar que las peroxidasas y lacasas de *L.*

edodes interfirieran en mayor grado con los compuestos antioxidantes que, por ejemplo, las tirosinasas de *A. bisporus* con mayor cantidad de enzima.

Tabla 17. Actividades enzimáticas en los cuerpos fructíferos seleccionados. Polifenol oxidadas: tirosinasa, en forma activa/latente y tirosinasa total, y lacasa (Lac). Peroxidasas: peroxidasa dependiente de Mn (MnP), independiente de Mn (MiP) y peroxidasa total (TP).

Hongos	Polifenol oxidadas (μkat/g ps)				Peroxidasas (μkat/g ps)			
	Tirosinasa activa	Tirosinasa latente	Tirosinasa total	Lac (L-Dopa)	Lac (DMAB)	MnP	MiP	TP
<i>L. edodes</i>	ND	ND	ND	0,80	0,334	0,179	0,00	0,179
<i>C. cibarius</i>	0,09	ND	0,09	ND	ND	0,005	ND	0,005
<i>L. deliciosus</i>	7,60	1,46	9,06	1,46	ND	ND	ND	ND
<i>P. ostreatus</i>	ND	ND	ND	1,18	0,69	0,070	0,01	0,082
<i>B. edulis</i>	0,09	3,35	3,44	0,09	ND	0,005	ND	0,005
<i>A. bisporus</i>	6,16	216,69	222,85	1,09	ND	0,011	ND	0,011
<i>A. caesarea</i>	2,94	37,54	40,48	ND	ND	0,003	ND	0,003

ND, no detectado.

Como resumen se puede subrayar que la fracción fenólica de los extractos acuosos esta muy relacionada con la actividad antioxidante observada en estos extractos de hongos, pero que además existen otros compuestos (principalmente en la LMW) que también son capaces de mejorar o completar esta actividad. No todos los compuestos fenólicos que tienen capacidad antioxidante son sustratos de las peroxidasas o polifenol oxidadas y la concentración o proporción de uno o de otro tipo de fenol depende de la especie de hongo considerada. Por ejemplo, la capacidad antioxidante observada en *C. cibarius*, es independiente de todos aquellos compuestos fenólicos susceptibles de oxidación enzimática. Por el contrario, en especies como *L. edodes*, los compuestos fenólicos que son sustratos de peroxidasas y polifenol oxidadas juegan un papel importante en la alta capacidad antioxidante observada. Por lo tanto, si el procesado o la manipulación de este hongo (u otros de este tipo) no son los adecuados, se puede producir una rozadura o daño tisular en los cuerpos fructíferos que desencadene la activación de reacciones oxidativas, lo que daría lugar a la pérdida de fenoles y de sus propiedades antioxidantes.

Cuando la fracción de LMW (sin enzimas oxidativas) se incubaba durante 24 horas, la capacidad de captación de ABTS^{•+} no disminuye significativamente (figura 41), con excepción de la fracción de bajo peso molecular de *A. bisporus*, en la cual, después de

24 horas de incubación su actividad antioxidante aumenta aproximadamente un 12%. En este hongo las enzimas oxidativas, particularmente las tirosinasas, también pueden ser las responsables de este hecho, ya que *A. bisporus* es un hongo con importante actividad tirosinasa como se ha visto en este estudio y se ha descrito anteriormente (Soler-Rivas y col., 1999). La oxidación de los difenoles a quinonas es una reacción muy rápida, pudiendo ocurrir en segundos. Incluso cuando únicamente se formen unas pocas quinonas antes de la filtración, al pasar éstas a la fracción LMW, podrían ser capaces de reaccionar espontáneamente con ellas mismas u otros fenoles, generando moléculas como dopacromo, compuestos indólicos, dímeros de catecol y otros polímeros de tamaño un poco mayor, originando por tanto, productos de degradación con capacidad de captación de radicales.

El papel que juega la tirosinasa en las propiedades antioxidantes del *A. bisporus* debe estudiarse con más detenimiento, ya que parece influir de forma importante en varios puntos clave relacionados con el estado oxidativo. Por ejm. se ha observado que sus extractos acuosos y etanólicos ejercen un efecto protector de DNA de plásmidos contra el daño que producen radicales peróxilos o hidróxilos debido a la irradiación con UV (Lee y Jang, 2004). Este efecto genoprotectivo también está asociado con la tirosinasa. El efecto dependía de las dos actividades que cataliza el enzima cuando usa tirosina como sustrato (figura 15). Estos resultados fueron sorprendentes ya que desde siempre la L-Dopa se consideraba tóxica e incluso pro-oxidante por su inestabilidad y su autooxidación a Dopa-quinonas generando de forma espontanea radicales, H₂O₂ y otros compuestos complejos. Sin embargo, (Shi y col., 2002) demostraron que la L-Dopa estimula los mecanismos de defensa antioxidante celular bajo ciertas condiciones.

4.1.2 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los extractos acuosos y metanólicos obtenidos a partir de los hongos comestibles estudiados se ha medido frente a una bacteria gram +, *Staphylococcus aureus*, una bacteria gram -, *Escherichia coli*, y una levadura, *Candida albicans*. Dicha actividad se ha evaluado mediante la determinación de las actividades bactericidas y fungicidad mínimas (MBC y MFC) para cada microorganismo.

4.1.2.1. Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos

Los resultados obtenidos para la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de los hongos se muestran en la tabla 18. Todos los hongos estudiados, excepto *A. caesarea*, muestran una ligera actividad frente a las bacterias, mientras que ninguna es activa frente a *Candida albicans*. En concreto, el crecimiento de *E. coli* se ve afectado sobre todo por el extracto metanólico de *L. edodes* mientras que *St. aureus* es más sensible a los extractos metanólicos de otros hongos, como *C. cibarius* y *L. deliciosus*.

Tabla 18. Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de los hongos. Los valores de MBC y MFC se expresan en mg/mL.

Extractos metanólicos	<i>St. aureus</i> MBC	<i>E. coli</i> MBC	<i>C. albicans</i> MFC
<i>Lentinus edodes</i>	7,5 ± 0,3	6,1 ± 0,7	> 10
<i>Boletus edulis</i>	9,5 ± 0,6	8,0 ± 0,7	> 10
<i>Pleurotus ostreatus</i>	9,2 ± 0,4	9,1 ± 0,8	> 10
<i>Cantharella cibarius</i>	5,3 ± 0,2	9,2 ± 0,9	> 10
<i>Lactarius deliciosus</i>	7,0 ± 0,6	8,2 ± 0,6	> 10
<i>Amanita caesarea</i>	> 10	> 10	> 10
<i>Agaricus bisporus</i>	9,2 ± 0,7	9,3 ± 0,6	> 10

MBC, concentración bactericida mínima; MFC concentración funguicida mínima.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores, donde varios sesquiterpenos aislados de *Lactarius sp.* y dos derivados de ácidos grasos provenientes de *Cantharellus sp.* muestran una débil actividad antibacteriana (Anke y col., 1996); (Luo y col., 2005). Posteriormente, (Barros y col., 2007e) indicaron que los extractos metanólicos de *L. deliciosus* eran muy efectivos frente a dos bacterias gram +, pero no frente a *E. coli*. Estos autores relacionan la actividad antimicrobiana encontrada con el contenido en compuestos fenólicos de dichos extractos metanólicos. Sin embargo, en nuestro caso el contenido en fenoles totales del extracto metanólico de *L. deliciosus* es de 1,55 mg/g de peso seco, un valor menor que el obtenido para *A. bisporus* (4,56 mg/g) (figura 42) mientras que *L. deliciosus* muestra una mayor actividad antimicrobiana que *A. Bisporus*. Por ello, en este caso, no se puede relacionar el contenido en fenoles totales de los extractos metanólicos con su actividad

antimicrobiana. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la actividad antimicrobiana se puede deber también a un sólo compuesto fenólico o un tipo de compuestos fenólicos, que no necesariamente tienen que estar presentes en una cantidad elevada, o incluso con otro tipo de compuestos como sesquiterpenos, péptidos, etc. (Luo y col., 2005; Barros y col., 2007c).

4.1.2.2. Actividad antimicrobiana de los extractos acuosos

Cuando se evalúa la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de los hongos estudiados, solamente los extractos de *L. edodes*, *B. edulis* y *P. ostreatus* presentan actividad antimicrobiana frente a todos los microorganismos ensayados (tabla 19). La actividad de los extractos acuosos de estos 3 hongos es mayor que la observada cuando se emplean sus correspondientes extractos metanólicos. *E. coli* es el microorganismo más sensible al extracto acuoso de *L. edodes* presentando un valor de MBC de 0,4 mg/mL, aunque *St aureus* también presenta una alta sensibilidad a este extracto (MBC de 1 mg/mL). *B. edulis* y *P. ostreatus* también muestran una importante actividad antimicrobiana, pero sólo frente a la bacteria gram +, *St. aureus*, con valores de MBC de 3,8 y 0,5 mg/mL respectivamente.

Tabla 19. Actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de los hongos. Los valores de MBC y MFC se expresan en mg/mL.

Extractos acuosos	<i>St. Aureus</i> MBC	<i>E. coli</i> MBC	<i>C. albicans</i> MFC
<i>Lentinus edodes</i>	1,0 ± 0,20	0,4 ± 0,09	4,4 ± 0,60
<i>Boletus edulis</i>	3,8 ± 0,40	7,8 ± 0,50	6,2 ± 0,60
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,5 ± 0,05	10,1 ± 0,70	9,2 ± 0,60
<i>Cantharella cibarius</i>	> 10	9,2 ± 0,90	> 10
<i>Lactarius deliciosus</i>	10,0 ± 1,20	8,2 ± 0,60	> 10
<i>Amanita caesarea</i>	> 10	> 10	> 10
<i>Agaricus bisporus</i>	> 10	9,3 ± 0,60	> 10

Estos resultados pueden parecer sorprendentes, ya que investigaciones anteriores han determinado que los extractos orgánicos procedentes de hongos eran una fuente de compuestos antimicrobianos mucho más importante que sus extractos acuosos. Así, (Hirasawa y col., 1999) indica que los extractos obtenidos con cloroformo y acetato de

etilo procedentes de los cuerpos fructíferos del *L. edodes* mostraban aproximadamente valores de MBC 10 veces menores que sus extractos acuosos. (Kitzberger y col., 2007) también muestra que extractos orgánicos y obtenidos por fluidos supercríticos procedentes de *L. edodes* presentan una elevada actividad antimicrobiana. Este autor relaciona la actividad encontrada con los principales componentes presentes en esos extractos: lentionina (1, 2, 3, 5, 6- pentatiopano) y un derivado disulfúrico de este compuesto. Como ni la lentionina ni sus derivados se extraen totalmente con agua, la actividad antimicrobiana encontrada en los extractos acuosos de *L. edodes* habría que atribuirlos a otro tipo de compuestos, quizás compuestos fenólicos y/o polisacáridos solubles en agua, cuya actividad antimicrobiana ha sido previamente demostrada (Silva y col., 2006; Mantovani y col., 2008) y están presentes en cantidades importantes en los extractos acuosos de *L. edodes* (Ko y Lin, 2004). (Hatvani, 2001) describe la presencia de un compuesto con capacidad antimicrobiana producido por el micelio de este hongo, soluble en el medio de cultivo (acuoso), estable al calor y con un peso molecular inferior a 10.000 d, compuesto que podría estar también presente en el cuerpo fructífero del hongo.

La actividad antimicrobiana de los extractos acuosos obtenidos a partir de *P. ostreatus* se ha relacionado con la presencia en los mismos de fenoles o determinados péptidos. (Chu y col., 2005) indica que un péptido obtenido de un extracto acuoso de *P. ostreatus* poseía actividad antifúngica y (Lee y col., 1999) menciona la presencia de otro péptido (boletusin) aislado de *Boletus spp.* activo frente a bacterias gram +. En consecuencia, la actividad antimicrobiana encontrada en los extractos acuosos de las cepas de *P. ostreatus* y *Boletus edulis* seleccionadas en este estudio se podría deber a la presencia de estos péptidos.

4.1.2.3. Actividad antimicrobiana de los extractos acuosos en presencia de compuestos inhibidores de las enzimas oxidativas

Cuando se evalúa la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de los hongos, hay que tener en cuenta la presencia en estos extractos de las enzimas oxidativas (peroxidasas y polifenol oxidasas), ya que si los compuestos fenólicos presentes en estos extractos estuvieran relacionados con la actividad antimicrobiana encontrada (como ocurría en el caso de la actividad antioxidante) la actividad de dichas enzimas

podrían degradarlos y hacer que los valores de la actividad antimicrobiana fueran menores que los reales.

Tabla 20. Actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de los diferentes hongos obtenidos en presencia de inhibidores de las enzimas oxidativas.

Hongos	Inhibidor	<i>St. aureus</i> MBC	<i>E. coli</i> MBC	<i>C. albicans</i> MFC
<i>Lentinus edodes</i>	0,01M piro sulfito	1,90 ± 0,40	1,20 ± 0,60	3,9 ± 0,70
	0,1M piro sulfito	1,00 ± 0,40	1,00 ± 0,50	3,5 ± 0,50
	0,01M azida	1,90 ± 0,70	1,30 ± 0,40	4,0 ± 0,70
	0,1M azida	1,80 ± 0,50	0,75 ± 0,20	3,4 ± 0,60
<i>Boletus edulis</i>	0,01M piro sulfito	3,40 ± 0,50	6,70 ± 0,60	5,9 ± 0,50
	0,1M piro sulfito	1,80 ± 0,30	3,50 ± 0,40	3,2 ± 0,30
	0,01M azida	1,20 ± 0,70	2,40 ± 0,80	5,5 ± 0,40
	0,1M azida	0,50 ± 0,10	1,80 ± 0,30	2,9 ± 0,40
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,01M piro sulfito	0,75 ± 0,10	7,20 ± 0,50	3,2 ± 0,70
	0,1M piro sulfito	0,50 ± 0,09	1,30 ± 0,40	1,5 ± 0,30
	0,01M azida	1,00 ± 0,20	3,60 ± 0,60	3,7 ± 0,50
	0,1M azida	0,75 ± 0,09	2,40 ± 0,50	1,4 ± 0,30
<i>Cantharella cibarius</i>	0,01M piro sulfito	2,10 ± 0,40	5,90 ± 0,60	5,4 ± 0,30
	0,1M piro sulfito	0,30 ± 0,05	2,50 ± 0,40	3,1 ± 0,10
	0,01M azida	7,20 ± 0,90	> 10	9,5 ± 0,70
	0,1M azida	5,80 ± 0,70	8,60 ± 0,70	4,8 ± 0,60
<i>Lactarius deliciosus</i>	0,01M piro sulfito	2,50 ± 0,20	5,10 ± 0,40	5,7 ± 0,50
	0,1M piro sulfito	0,40 ± 0,07	2,90 ± 0,60	1,2 ± 0,10
	0,01M azida	0,75 ± 0,10	2,40 ± 0,40	3,5 ± 0,70
	0,1M azida	0,50 ± 0,03	0,75 ± 0,04	1,4 ± 0,40
<i>Amanita caesarea</i>	0,01M piro sulfito	6,30 ± 0,50	> 10	5,1 ± 0,30
	0,1M piro sulfito	1,20 ± 0,10	2,70 ± 0,40	3,6 ± 0,20
	0,01M azida	5,30 ± 0,30	7,20 ± 0,30	5,2 ± 0,40
	0,1M azida	1,00 ± 0,20	1,50 ± 0,40	3,2 ± 0,50
<i>Agaricus bisporus</i>	0,01M piro sulfito	7,20 ± 0,40	> 10	7,1 ± 0,50
	0,1M piro sulfito	1,00 ± 0,04	2,30 ± 0,40	1,3 ± 0,40
	0,01M azida	9,30 ± 0,70	9,50 ± 0,90	7,2 ± 0,50
	0,1M azida	2,30 ± 0,30	3,20 ± 0,40	2,1 ± 0,20

Para valorar el papel de estas enzimas en la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos, se ha adicionado a dichos extractos dos inhibidores de estas enzimas diferentes, el piro sulfito de potasio y la azida de sodio (Tatarko y Bumpus, 1997; Johannes y Majcherczyk, 2000). Como primer paso se ha medido la actividad antimicrobiana de soluciones que contienen 0,01 y 0,1M de piro sulfito de potasio y de azida de sodio, no observándose en ningún caso actividad antimicrobiana frente a los microorganismos seleccionados en este estudio. A partir de estos resultados, las extracciones acuosas de los distintos hongos se han llevado a cabo en presencia de azida o piro sulfito en las dos concentraciones señaladas y se ha evaluado de nuevo la

actividad antimicrobiana de estos extractos acuosos (tabla 20). Los resultados obtenidos difieren de los mostrados en la tabla 15, donde las extracciones se realizan en ausencia de inhibidores. Así, se puede encontrar tres tipos de comportamientos diferentes entre los distintos hongos estudiados, agrupándolos entre los “no afectados” por la adición de inhibidores durante la extracción como el *Lentinus edodes*, “afectados parcialmente” como *Pleurotus ostreatus* y “muy afectados” como el resto de los hongos.

En el caso de *Lentinus edodes*, la presencia de diferentes concentraciones de inhibidores en los extractos acuosos no modifican significativamente sus propiedades antimicrobianas, sugiriendo que los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana, en ese caso, no son sustratos de las enzimas oxidativas presentes en ese hongo. La actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de *P. ostreatus* frente a *St. aureus* no ha sufrido modificaciones con la adición de los inhibidores enzimáticos, pero los valores de MBC obtenidos para *E. coli* y *C. albicans* disminuyen significativamente con la adición de ambos inhibidores a concentraciones de 0,1 M. Este resultado puede sugerir la presencia de más de un tipo de compuestos con capacidad antimicrobiana, de los cuales algunos podrían ser susceptibles a la acción de las enzimas oxidativas y otros no. La adición de inhibidores a los extractos acuosos de *B. edulis* mejora la actividad antimicrobiana de los mismos frente a los 3 microorganismos estudiados. De la misma manera, la adición de estos inhibidores permite observar que extractos acuosos de hongos que no poseían actividad antimicrobiana, ahora sí la presentan. Esta nueva actividad antimicrobiana se relaciona con el grado de inhibición de las enzimas oxidativas, ya que los valores más bajos de MBC se obtienen cuando se añaden las concentraciones de inhibidores más elevadas, 0,1 M. Además, la actividad antimicrobiana no aumenta en la misma proporción cuando se añade piro-sulfato de potasio o azida probablemente debido a que su mecanismo de inactivación enzimática es diferente. Estos datos sugieren la presencia de compuestos con capacidad antimicrobiana, posiblemente fenoles, que son sustrato de las enzimas oxidativas. Así durante el proceso de extracción, la adición de agua facilita la actividad de peroxidasas y polifenol oxidasas que catalizan la inmediata degradación de los sustratos de naturaleza fenólica. Las extracciones acuosas se realizan a partir del polvo liofilizado del hongo, donde las hifas están rotas, las células descompartmentalizadas y las enzimas tienen un completo acceso a los sustratos con posible capacidad antimicrobiana. En consecuencia, la falta de actividad antimicrobiana encontrada en los

extractos acuosos (sin inhibidor) se podría explicar porque los compuestos activos han sido oxidados por las enzimas o pueden haberse visto influenciados indirectamente por estas reacciones de oxidación.

4.1.2.4. Influencia de las enzimas oxidativas: peroxidasas y polifenol oxidasas

Para determinar con mayor precisión la influencia de las enzimas oxidativas, la actividad de las mismas se ha medido en presencia y ausencia de los inhibidores como se menciona anteriormente. Los mecanismos de inhibición enzimática del piro-sulfito de potasio y de la azida de sodio son diferentes. La inactivación de las peroxidasas por el ión azida está causada por una modificación covalente de los grupos prostéticos hemo. Este compuesto se forma por la oxidación de un electrón del ión azida por las peroxidasas mismas (Tatarko y Bumpus, 1997).

Los extractos acuosos de *L. edodes*, *P. ostreatus*, *L. delicious*, *C. cibarius* y *A. caesarea* muestran actividad peroxidasa, aunque con distinta intensidad (tabla 21). Todas las especies de hongos presentan actividad lacasa, mientras que la actividad tirosinasa sólo se detecta en *A. bisporus*, *L. delicious*, *B. edulis* y *A. caesarea* (tabla 22). La adición de piro-sulfito de potasio es capaz de inactivar completamente tanto las peroxidasas como las lacasas cuando se utiliza una concentración de 0,1 M, excepto para la lacasa que proviene de *A. bisporus* cuya actividad se reduce al mínimo. La adición de azida de sodio es menos efectiva que el piro-sulfito, ya que la azida sólo es capaz de inhibir totalmente la actividad de las peroxidasas de *C. cibarius* y *A. caesarea*, probablemente porque la concentración de estas enzimas en estas especies es muy pequeña, ya que en otras especies como *L. delicious* no se inhiben totalmente. También, las lacasas son sólo parcialmente inhibidas por la azida, especialmente las de *A. bisporus* y *L. edodes* reducen muy poco su actividad.

Los extractos acuosos de *L. edodes* poseen actividades peroxidasas y lacasas pero sus niveles enzimáticos son independientes de la actividad antimicrobiana observada ya que sus MBCs no se ven significativamente afectadas por el uso de inhibidores de enzimas oxidativas. Los extractos acuosos de *B. edulis* contienen lacasas y tirosinasas y los de *P. ostreatus* lacasas y peroxidasas dependientes de manganeso y ambos extractos presentan actividad antimicrobiana cuando las enzimas están completamente activas, sugiriendo un comportamiento similar al de los extractos acuosos de *L. edodes*. Sin

embargo, las MBCs establecidas para algunos microorganismos específicos disminuyen con el uso de piro sulfito y azida lo que sugiere la presencia de más de un tipo de compuesto antimicrobiano. Uno (al menos) que puede actuar independiente de la presencia o no de enzimas oxidativas y otro que podría ser oxidado (inhabilitado).

Se ha sugerido que el piro sulfito sigue un mecanismo mixto de inhibición, actuando tanto como antioxidante, como inhibidor verdadero formando complejos enzima-inhibidor (Valero y col., 1992).

A. bisporus no muestra actividad peroxidasa pero tiene un alto nivel de polifenol oxidasas, especialmente tirosinasas. La adición de piro sulfito de potasio (0,1M) supone la inhibición total de la actividad tirosinasa y casi toda la actividad lacasa mientras que la adición de azida sólo reduce parcialmente ambas actividades polifenol oxidasas. Los extractos que contienen piro sulfito también muestran mayor capacidad antimicrobiana contra los tres tipos de patógenos estudiados que los extractos acuosos con azida (Tabla 20). Por lo tanto, en este caso, la inhibición de enzimas oxidativas parece estar relacionado con el aumento de la actividad antimicrobiana.

Las peroxidasas y lacasas de *C. cibarius* se inhiben completamente con la adición de ambos inhibidores, incluso a las concentraciones más bajas estudiadas (0,01M), (tabla 21) sin embargo, la adición de piro sulfito mejoraba bastante sus propiedades antimicrobianas comparadas con la azida (tabla 20). Estas diferencias se podrían explicar por la habilidad extra que tiene el piro sulfito de poder actuar como antioxidante además de su actividad como inhibidor enzimático.

Tabla 21: Actividad de las peroxidadas y lacasas de los extractos acuosos de los hongos en presencia o ausencia de inhibidores enzimáticos. Eficacia de las distintas concentraciones de los inhibidores para inactivar las enzimas.

Hongos	Medio	Actividad enzimas (nkat g ⁻¹)				Inhibición (%)			
		Lac	MnI	MnP	POD	Lac	MnI	MnP	POD
<i>L. edodes</i>	agua	10,39	0,18	1,15	1,34				
	0,01M piro sulfito	5,45	ND	ND	ND	47,50	100	100	100
	0,1M piro sulfito	ND	ND	ND	ND	100	100	100	100
	0,01M azida	7,61	0,01	0,11	0,12	26,70	95	90	91
	0,1M azida	2,85	ND	ND	ND	72,60	100	100	100
<i>B. edulis</i>	agua	ND	ND	ND	ND				
	0,01M piro sulfito	ND	ND	ND	ND	100	100	100	100
	0,1M piro sulfito	ND	ND	ND	ND	100	100	100	100
	0,01M azida	ND	ND	ND	ND	100	100	100	100
	0,1M azida	ND	ND	ND	ND	100	100	100	100
<i>P. ostreatus</i>	agua	3,16	ND	1,22	1,22				
	0,01M piro sulfito	2,44	ND	ND	ND	22,60	100	100	100
	0,1M piro sulfito	ND	ND	ND	ND	100	100	100	100
	0,01M azida	2,79	ND	0,19	0,19	11,50	100	84,50	84,70
	0,1M azida	ND	ND	ND	ND	100	100	100	100
<i>A. bisporus</i>	agua	12,40	ND	ND	ND				
	0,01M piro sulfito	8,78	ND	ND	ND	29,20	100	100	100
	0,1M piro sulfito	1,26	ND	ND	ND	89,80	100	100	100
	0,01M azida	13,82	ND	ND	ND	0,00	100	100	100
	0,1M azida	9,73	ND	ND	ND	21,50	100	100	100
<i>A. caesarea</i>	agua	7,47	1,46	ND	1,46				
	0,01M piro sulfito	4,26	0,72	ND	0,78	43,00	50,60	100	46,70
	0,1M piro sulfito	ND	ND	ND	ND	100	100	100	100
	0,01M azida	6,21	ND	ND	ND	16,80	100	100	100
	0,1M azida	ND	ND	ND	ND	100	100	100	100
<i>C. cibarius</i>	agua	0,38	ND	0,05	0,05				
	0,01M piro sulfito	ND	ND	ND	ND	100	100	100	100
	0,1M piro sulfito	ND	ND	ND	ND	100	100	100	100
	0,01M azida	ND	ND	ND	ND	100	100	100	100
	0,1M azida	ND	ND	ND	ND	100	100	100	100
<i>L. deliciosus</i>	agua	13,48	0,75	1,52	2,27				
	0,01M piro sulfito	1,38	ND	0,75	0,56	89,80	100	50,60	75,30
	0,1M piro sulfito	ND	ND	ND	ND	100	100	100	100
	0,01M azida	4,14	0,21	1,49	1,71	69,30	71,80	1,60	24,80
	0,1M azida	2,10	0,09	0,04	0,39	84,40	88,20	97,50	82,70

Lacasa = lac; Peroxidasa independiente de magnesio = MnI; Peroxidasa dependiente de magnesio = MnP; Peroxidasa total (MnI + MnP) = POD; No detectada = ND.

Tabla 22: Actividad de las tirosinasas de los extractos acuosos de los hongos en presencia o ausencia de inhibidores enzimáticos. Eficacia de las distintas concentraciones de los inhibidores para inactivar las enzimas.

Hongo	Medio	Actividad tirosinasa ($\mu\text{kat/g}$)			Inhibición (%)	
		% activa	Total tir^{asa}	Activa tir^{asa}	Total tir^{asa}	Activa tir^{asa}
<i>L. edodes</i>	agua		ND	ND		
	0,01M piro sulfito		ND	ND	100	100
	0,1M piro sulfito		ND	ND	100	100
	0,01M azida		ND	ND	100	100
	0,1M azida		ND	ND	100	100
<i>B. edulis</i>	agua	52,90%	33,00	18,00		
	0,01M piro sulfito		ND	ND	100	100
	0,1M piro sulfito		ND	ND	100	100
	0,01M azida	23,60%	40,00	9,00	0	45,80
	0,1M azida	13,50%	34,00	5,00	0	73,60
<i>P. ostreatus</i>	agua		ND	ND		
	0,01M piro sulfito		ND	ND	100	100
	0,1M piro sulfito		ND	ND	100	100
	0,01M azida		ND	ND	100	100
	0,1M azida		ND	ND	100	100
<i>A. bisporus</i>	agua	3,90%	63,64	2,50		
	0,01M piro sulfito	0,70%	14,65	0,10	77,00	96,10
	0,1M piro sulfito		ND	ND	100	100
	0,01M azida	4,30%	51,56	2,21	19,00	11,40
	0,1M azida	3,60%	42,83	1,53	32,70	38,80
<i>A. caesarea</i>	agua	14,50%	10,62	1,54		
	0,01M piro sulfito	0,80%	2,60	0,02	75,50	98,60
	0,1M piro sulfito		ND	ND	100	100
	0,01M azida	16,50%	10,18	1,68	4,20	0,0
	0,1M azida	20,20%	5,18	1,45	5,20	0,0
<i>C. cibarius</i>	agua		ND	ND		
	0,01M piro sulfito		ND	ND	100	100
	0,1M piro sulfito		ND	ND	100	100
	0,01M azida		ND	ND	100	100
	0,1M azida		ND	ND	100	100
<i>L. deliciosus</i>	agua	65,10%	32,91	21,42		
	0,01M piro sulfito	32,80%	13,01	4,26	60,50	80,10
	0,1M piro sulfito		ND	ND	100	100
	0,01M azida	64,10%	33,17	21,26	0,00	0,70
	0,1M azida	64,50%	30,91	19,92	6,10	7,00

Tirosinasa total = total tir^{asa} ; Tirosinasa activa = activa tir^{asa} ; porcentaje de tirosinasa activa = % activa; No detectada = ND

L. deliciosus y *A. caesarea* poseen niveles elevados de peroxidasas y polifenol oxidasas pero sus enzimas pueden ser completamente inhibidas por la adición de piro sulfito de

potasio 0,1M. No es así en el caso de la adición de azida de sodio 0,1 M, ya que los extractos acuosos que incluyen este inhibidor aun contienen cierta proporción de lacasas y peroxidasas activas (*L. deliciosus*) y sobretodo ambas especies muestran niveles muy altos de actividad tirosinasa. La MBC frente a *St. aureus* y *C. albicans* son similares en los extractos acuosos que contienen ambos inhibidores. Así que se podría deducir que la actividad antimicrobiana observada en ambos casos debe de estar influida sólo por las reacciones oxidativas llevadas a cabo por las peroxidasas y las lacasas y no por las reacciones catalizadas por las tirosinasas. La actividad tirosinasa no parece que esté involucrada en la oxidación y degradación de compuestos antimicrobianos. Esta observación se puede explicar porque la tirosinasa cataliza principalmente dos reacciones específicas usando monofenoles y difenoles como sustratos, mientras que las peroxidasas y las lacasas son capaces de oxidar un rango mayor de sustratos tanto de origen fenólico como no fenólico. Así pues, la menor actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de *A. bisporus* que contenían azida con respecto a los extractos que contenían piro-sulfito, pudo deberse también a su actividad lacasa ya que este enzima no se inhibe completamente con la adición de azida 0,1M.

En consecuencia, se puede recomendar el uso de inhibidores de las enzimas oxidativas cuando se vaya a proceder a la medida de las propiedades antimicrobianas de los hongos, especialmente si se van a evaluar compuestos solubles en agua.

4.1.3. Actividad antiviral

La evaluación de la actividad antiviral, frente al virus del herpes simple tipo 1, de extractos procedentes de *L. edodes*, *B. edulis* y *P. ostreatus* se ha llevado a cabo utilizando células Vero. Dicha actividad se ha evaluado en distintas etapas del ciclo infectivo del virus, además de realizarse estudios de toxicidad de los distintos extractos utilizados.

4.1.3.1. Ensayos de toxicidad

Antes de llevar a cabo la evaluación de la actividad antiviral de los distintos extractos, se ha medido su efecto citotóxico sobre las células Vero, con el fin de obtener una concentración óptima en la cual los extractos no presenten toxicidad celular. La toxicidad de dichos extractos sobre las células se mide al cabo de 48 h de incubación a

37°C, condiciones empleadas para la realización de los ensayos antivirales. Los resultados se expresan como porcentaje de células vivas respecto a un control al cual no se le ha añadido extracto.

La medida de la toxicidad de los extractos acuosos de los distintos hongos (figura 55b) se ha realizado con las siguientes concentraciones de los extractos: 0,5, 0,25 y 0,12 mg/mL. Los resultados obtenidos indican que a 0,5 mg/mL, los tres hongos presentan una toxicidad elevada, ya que cuando se comparan con el control (medio de cultivo sin extracto), el porcentaje de células vivas ronda el 40%. Para la concentración de 0,25 mg/ml, se observa una disminución de la toxicidad de todos los extractos, con un porcentaje de células viables en torno al 60-70%. Con respecto a 0,12 mg/mL, se puede considerar que nos encontramos ante una concentración que no presenta toxicidad celular, ya que la viabilidad celular está en todos los casos por encima del 90%. A partir de los datos obtenidos se puede concluir que la toxicidad de los extractos acuosos para los tres hongos es bastante similar, siendo los extractos de *P. ostreatus* ligeramente más citotóxicos.

Para la evaluación de la toxicidad celular de los extractos acuosos de los hongos a los cuales se les había añadido un 0,1M de piro-sulfito potásico, se utilizaron en un principio las mismas concentraciones que para los extractos acuosos. Esta medida se ha llevado a cabo a raíz de la influencia que las enzimas oxidativas tienen en la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos. Sin embargo los datos obtenidos (figura 55c) muestran para la concentración de 0,12 mg/mL una toxicidad celular que ronda el 20-30% y por lo tanto en estos ensayos se ha incluido una concentración de 62,5 µg/mL, obteniéndose en este caso una viabilidad celular del 90% para todos los hongos ensayados. Estos resultados indican que la adición a los extractos acuosos de un 0,1M de piro-sulfito produce un aumento de su toxicidad celular.

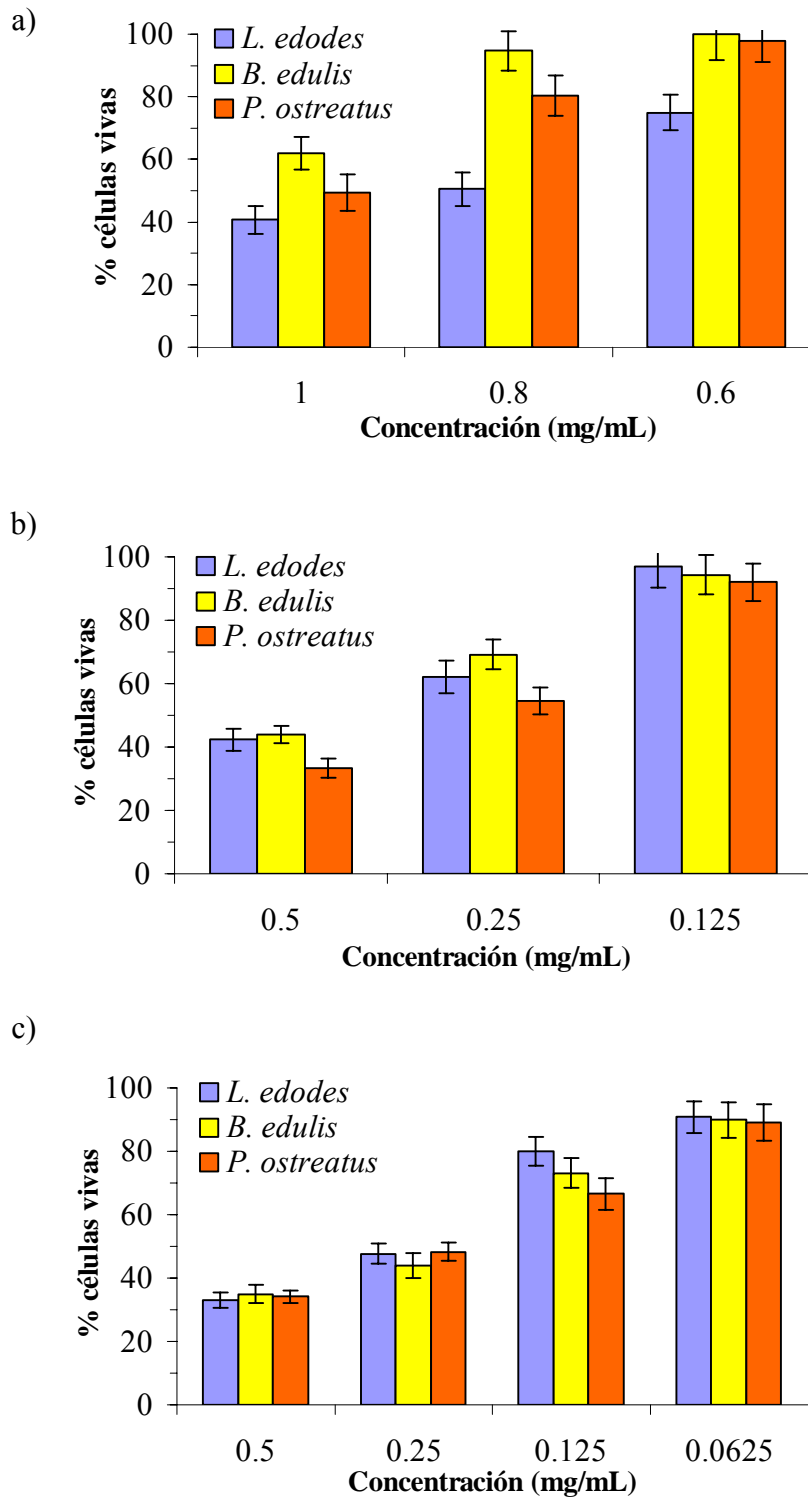


Figura 55. Toxicidad celular de los extractos de los hongos en células Vero al cabo de 48 h de incubación a 37°C. a) metanólicos, b) acuosos y c) acuosos con piro-sulfito potásico 0,1 M.

En la figura 55a, se muestran los resultados obtenidos para los ensayos de toxicidad de los extractos metanólicos, dichos extractos se pueden considerar menos tóxicos que los

acuosos, ya que para una concentración de 0,6 mg/mL la viabilidad celular de los extractos provenientes de *B. edulis* y *P. ostreatus* es del 100%. Los extractos metanólicos de *L. edodes* presentan una toxicidad ligeramente superior, ya que a 0,6 mg/mL, el porcentaje de células viables obtenidas esta en torno al 75%.

4.1.3.2. Evaluación de la actividad antiviral

La actividad antiviral frente al virus del herpes simple tipo 1 de los extractos metanólicos y acuosos obtenidos a partir de polvo liofilizado de *L. edodes*, *B. edulis* y *P. ostreatus* se ha medido utilizando el ensayo de reducción en placa sobre monocapas de células Vero, durante 48 h. Para tratar de identificar el modo en que estos extractos ejercen la acción antiviral, la adición de los mismos se ha llevado a cabo a diferentes tiempos durante el periodo de infección del virus. Así, (1) el virus se ha incubado con el extracto durante 1 h antes de proceder a la infección de las células (viricida), (2) las células se han pretratado con el extracto durante 3 h previa infección con el virus (pretratamiento), (3) el extracto se ha añadido al mismo tiempo que el virus durante el periodo de infección de las células (adsorción) y (4) el extracto se ha añadido a las células inmediatamente después de su infección con el virus (replicación intracelular).

Efecto viricida

Mediante este ensayo se ha evaluado el efecto directo que tienen los extractos obtenidos a partir de los distintos hongos sobre el virus del herpes simple tipo 1. Para ello, se incubó una suspensión del virus en presencia de distintas concentraciones de los extractos durante 1h a 37°C y, previa dilución, estos virus se han utilizado para infectar las monocapas de células Vero. La cantidad de virus capaces de infectar las células que quedan en la suspensión tras estar en contacto con los extractos se ha determinado mediante los ensayos de reducción en placa y se expresa como porcentaje de unidades formadoras de placas obtenido en cada caso comparado con un control. Como control se emplea una suspensión del virus que se incubó durante 1h en ausencia de los extractos (sólo medio de cultivo).

Los resultados obtenidos (figura 56 a y b) indican que la incubación del virus con los extractos procedentes de los hongos reducen la infectividad del virus de una manera proporcional a la concentración de extracto aplicada. Sin embargo, la concentración de

extracto necesaria para reducir en un 50% la infectividad del virus es superior a 3,75 mg/mL para los extractos acuosos y a 18,75 mg/mL para los extractos metanólicos. Estos resultados indican que los extractos metanólicos no tienen prácticamente actividad viricida extracelular y que los extractos acuosos poseen esta actividad en muy pequeña medida.

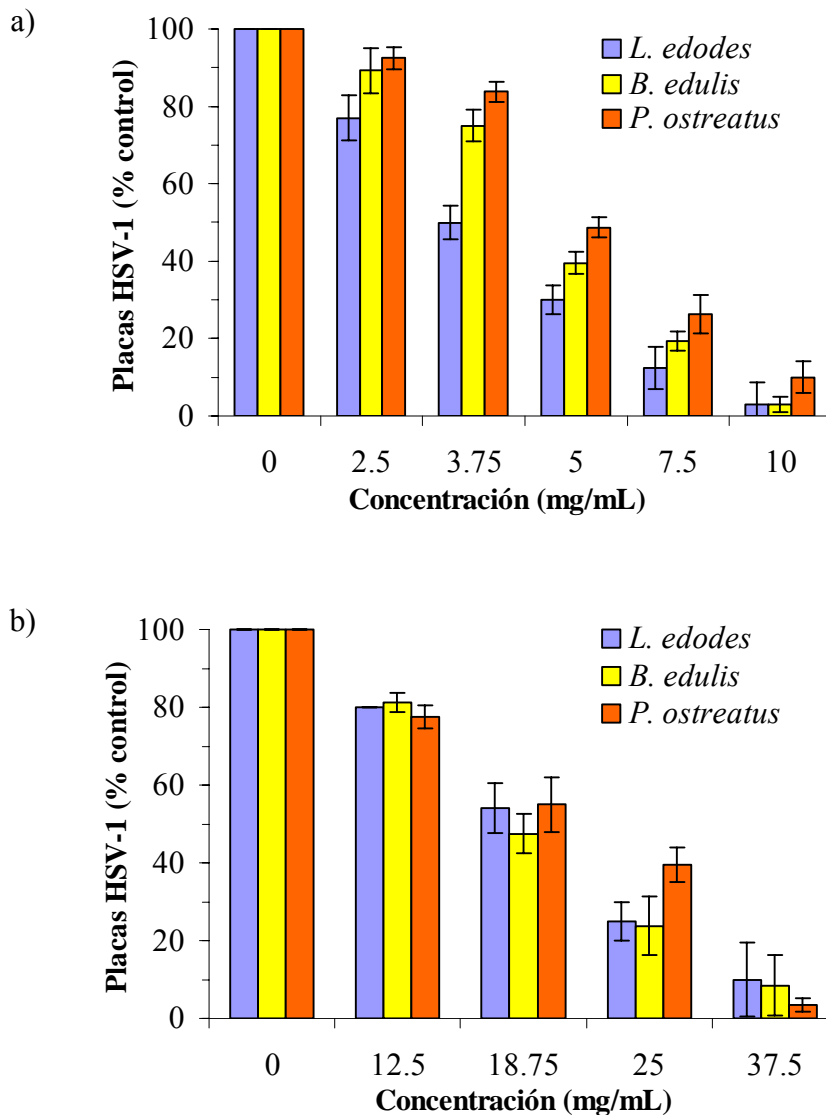


Figura 56. Efecto viricida de (a) extractos acuosos y (b) extractos metanólicos obtenidos a partir de hongos comestibles frente al virus del herpes simple 1.

Cuando se realiza este ensayo con los extractos acuosos que contienen un 0,1M de piro-sulfito sódico añadido, los resultados obtenidos no presentan diferencias significativas con los obtenidos cuando se emplean dichos extractos acuosos sin el inhibidor. Ésto indica que la actividad viricida de los extractos acuosos no está

relacionada con compuestos fenólicos que pueden ser susceptibles de sufrir una oxidación enzimática, luego probablemente son diferentes de los compuestos responsables de las actividades antioxidantes y antimicrobianas descritas en capítulos anteriores.

Influencia del pre-tratamiento con los extractos en el proceso de infección del virus

Con este ensayo se pretende determinar si el pretratamiento, durante 3h, de las células Vero con los extractos obtenidos a partir de los hongos, es capaz de proteger a dichas células de la posterior infección por el virus del herpes simple tipo 1.

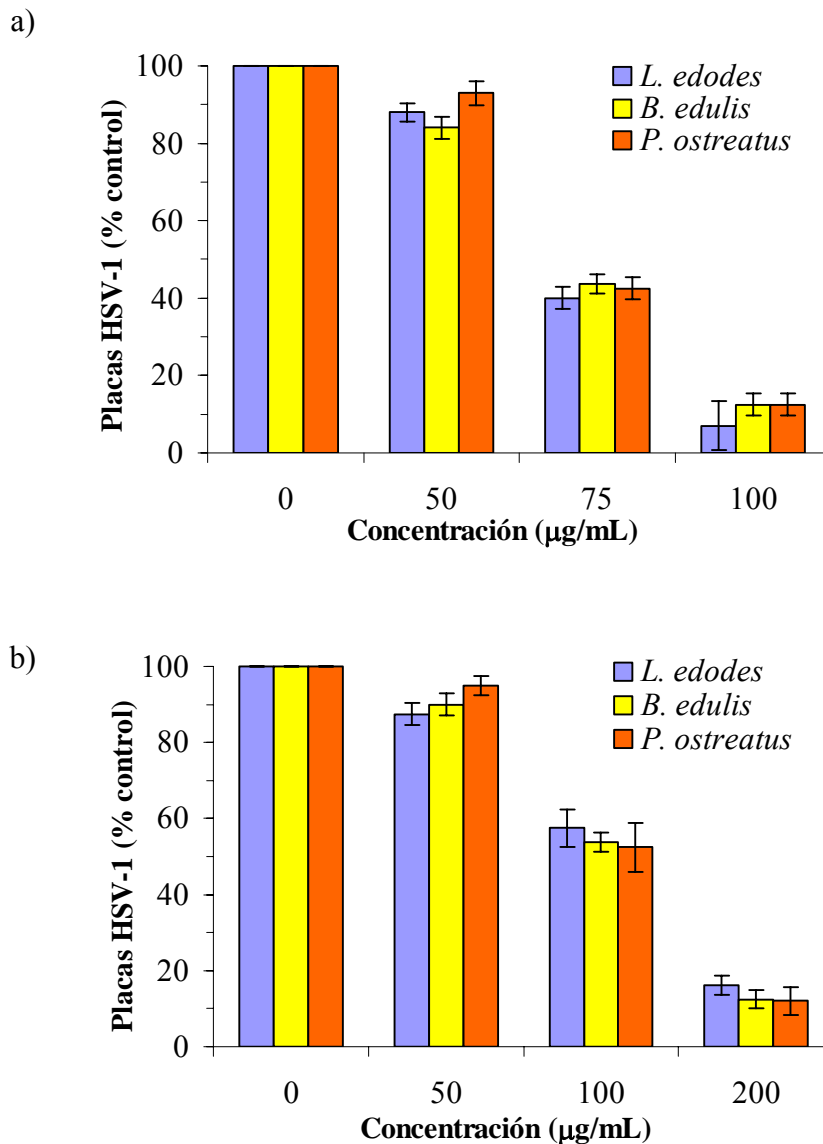


Figura 57. Efecto del pre-tratamiento (3h) de células Vero con (a) extractos acuosos y (b) extractos metanólicos obtenidos a partir de hongos comestibles frente al virus del herpes simple tipo 1.

Los resultados obtenidos (figura 57 a y b) sugieren que cuando se pre-trata a las células durante 3h con 75 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extractos acuosos obtenidos a partir de los hongos, la infectividad del virus se reduce en aproximadamente un 60% y un 90% respectivamente. Sin embargo un pretratamiento con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extractos metanólicos sólo reduce entre un 40-50% la capacidad de infección del virus, indicando que el pre-tratamiento de las células con los extractos acuosos es más efectivo que cuando se emplean los extractos metanólicos. Cuando se comparan los valores obtenidos con cada uno de los tres hongos empleados, no se encuentran diferencias significativas entre ellos. Al realizar este ensayo con los extractos acuosos que contienen un 0,1M de piro sulfito sódico, los resultados obtenidos tampoco, en este caso, son distintos de los indicados para los extractos acuosos.

A partir de estos datos, se puede decir que la acción antiviral de los extractos estudiados, sobre todo los acuosos, se pone de manifiesto en los primeros estadios de la infección de la célula por el virus, posiblemente porque se ve afectada, de alguna manera, la unión del virus a la célula y por tanto su adsorción.

Efecto sobre la adsorción del virus

Para determinar el efecto que tienen los extractos obtenidos sobre el proceso de adsorción del virus en la célula, dichos extractos se han añadido al mismo tiempo que el virus del herpes simple sobre la monocapa de células Vero y se han incubado durante 1h a 37°C. Una vez concluido el periodo de adsorción, se lavan las células con PBS, se incuban durante 48 h y se cuenta el número de unidades formadoras de placas. El efecto sobre la adsorción del virus de los distintos extractos se expresa como el porcentaje de placas obtenido en cada caso respecto al que se obtiene cuando el ensayo se realiza con un control que sólo contiene el virus en medio de cultivo, sin la presencia del extracto.

A partir de los resultados obtenidos en estos ensayos (figura 58 a y b) se observa que cuando se añaden 50 y 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extractos acuosos, durante el periodo de adsorción del virus, la capacidad de infección del mismo disminuye entre un 60% y un 80% aproximadamente. Sin embargo, la adición de 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extractos metanólicos durante el periodo de adsorción del virus sólo reduce su infectividad en un 20%. Así el periodo de adsorción del virus sobre la célula también se ve más

influenciado por los extractos acuosos de los hongos que por los metanólicos. En el caso de los extractos acuosos con un 0,1M de piro sulfito potásico, tampoco en este caso se observan diferencias respecto a los acuosos.

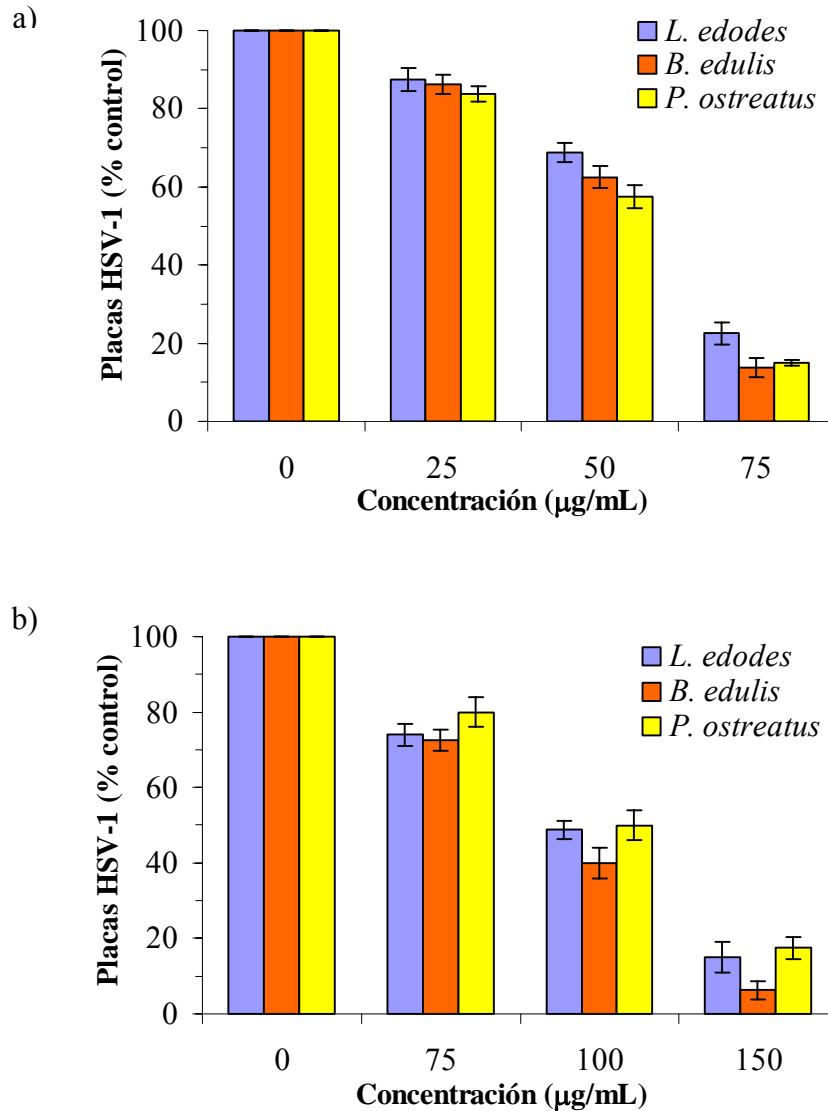


Figura 58. Efecto sobre la adsorción del virus del herpes simple tipo 1 sobre células Vero de (a) extractos acuosos y (b) extractos metanólicos obtenidos a partir de hongos comestibles.

Cuando se comparan estos datos con los obtenidos en los estudios del pretratamiento de las células, se observa que empleando la misma concentración de los extractos acuosos, ejemplo, 75 µg/mL la disminución de la infectividad del virus es de un 60% cuando se añade como pretratamiento y de un 80% cuando se añade durante el periodo de

adsorción del virus. Ésto puede indicar que los extractos obtenidos afectan concretamente a la fase de adsorción del virus en la célula.

Efecto sobre la replicación intracelular del virus

Para evaluar el efecto de los distintos extractos sobre la replicación del virus, dichos extractos se han añadido, una vez concluida la etapa de adsorción del virus, sobre las células. Así, sobre las células infectadas por el virus se añaden distintas concentraciones de los extractos, se incuban durante 48 h a 37°C y se cuenta el número de placas formadas. Los resultados se expresan como IC₅₀ (concentración inhibitoria al 50%). Como control se emplean células infectadas por el virus sobre las que se añade sólo medio de cultivo, sin la presencia del extracto. También se indica el índice de selectividad en cada caso.

Table 23. Actividad antiviral post-infección de extractos obtenidos a partir de hongos comestibles frente al virus del herpes simplex tipo 1.

Hongo	Muestra	CC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	SI
<i>L. edodes</i>	extracto acuoso	384,15 ± 12,26	27,04 ± 1,18	14,21
	extracto metanólico	791,37 ± 21,26	96,44 ± 8,26	8,20
<i>B. edulis</i>	extracto acuoso	490,42 ± 13,78	35,12 ± 2,06	13,96
	extracto metanólico	1142,56 ± 27,45	86,17 ± 9,26	13,25
<i>P. ostreatus</i>	extracto acuoso	404,42 ± 15,36	26,69 ± 1,87	15,15
	extracto metanólico	1004,21 ± 31,04	94,24 ± 7,26	10,65

SI (índice de selectividad): cociente entre CC₅₀/IC₅₀.

A partir de los resultados obtenidos (tabla 23) se puede observar que los extractos acuosos muestran un mayor efecto inhibitorio sobre la replicación del virus en las células Vero que los metanólicos, presentando valores de IC₅₀ desde 26,69 µg/mL a 35,12 µg/mL. Los extractos acuosos de *P. ostreatus* y *L. edodes* muestran un efecto ligeramente mayor que el obtenido para el *B. edulis*, aunque el índice de selectividad es muy parecido en los tres casos, ya que el extracto acuoso de *B. edulis* presenta una menor citotoxicidad que en los otros casos. Con los extractos acuosos con piro sulfito los datos obtenidos tampoco presentan diferencias respecto a los acuosos

Cuando se comparan estos resultados con los obtenidos al añadir los extractos durante el periodo de adsorción del virus, se observa que empleando la misma concentración de los extractos acuosos, ej. en torno a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la disminución de la infectividad del virus es de aproximadamente un 20% cuando se añade durante el periodo de adsorción y de un 50% cuando se añade después de la adsorción del virus. Esto indicaría que los extractos obtenidos actúan preferentemente en la etapa de replicación intracelular del virus, aunque también influyan en la etapa de absorción del virus en la célula.

La mayor actividad antiviral encontrada en los extractos acuosos de los hongos está en consonancia con la bibliografía, donde con frecuencia se relaciona la actividad antiviral de estos extractos con su contenido en polisacáridos solubles en agua. Así, (Zhang y col., 2004) indican una importante actividad antiviral de β -glucanos aislados de la esclerótica del *Pleurotus tuber-regium* y (Kim y col., 2000) también muestran la actividad antiviral de proteínas de naturaleza ácida unidas a polisacáridos aislados de extractos acuosos de los carpóforos de *G. lucidum*. Además, sulfatos del lentinano (β -(1 \rightarrow 3)-D-glucano) procedentes de *L. edodes* presentan una considerable actividad anti-HVI (Lindequist y col., 2005). Por otro lado, la actividad antiviral de los extractos acuosos también se ha relacionado con la presencia de compuestos fenólicos en estos extractos, así, (Awadh Ali y col., 2003) demostró que dos compuestos fenólicos aislados del cuerpo fructífero de *Inonotus hispidus* ejercían una acción antiviral frente a las virus de la influenza tipo A y B. Por lo tanto, para intentar relacionar la actividad antiviral encontrada en los extractos acuosos con algún tipo de compuestos presentes en estos hongos, se ha estudiado la actividad antiviral de dos fracciones distintas. Por un lado se ha aislado una fracción rica en polisacáridos y por otro se ha obtenido la fracción de bajo peso molecular (LMW) que contiene entre otros compuestos fenoles y péptidos.

4.1.3.3. Actividad antiviral de la fracción rica en polisacáridos

Teniendo en cuenta que frecuentemente se relaciona la actividad antiviral encontrada en las muestras acuosas con su contenido en polisacáridos, se ha procedido a la extracción y cuantificación de estos compuestos en los hongos empleados (tabla 24). A partir de estos datos se puede observar que aunque la cantidad de muestra liofilizada obtenida después del proceso de extracción es diferente para cada hongo estudiado, el porcentaje

de carbohidratos, y por tanto de polisacáridos, detectado en las tres muestras es bastante similar.

Para determinar si la actividad antiviral encontrada en las muestras acuosas se debía a los polisacáridos, se ha estudiado la actividad antiviral de estos extractos ricos en polisacáridos en las mismas condiciones que para los extractos acuosos. Como paso previo se ha evaluado la toxicidad de dichas muestras a las 48 h sobre monocapas de células Vero y los resultados obtenidos se muestran como CC_{50} en la tabla 25, observándose que la toxicidad de las muestras que contienen alrededor de un 25% de polisacáridos es menor que la encontrada para los correspondientes extractos acuosos.

Tabla 24. Extracción y cuantificación de polisacáridos en los hongos.

Muestra	mg/g hongo (ps)	% carbohidratos en el liofilizado
<i>Boletus edulis</i>	18,64 ± 1,30	24,76 ± 3,50
<i>Lentinus edodes</i>	8,32 ± 0,64	24,36 ± 2,90
<i>Pleurotus ostreatus</i>	23,04 ± 1,44	23,78 ± 4,10

En este caso no se ha estudiado la actividad viricida de los extractos ricos en polisacáridos, ya que dicha actividad en los extractos acuosos de partida era muy pequeña. Así, con estas muestras sólo se ha estudiado su efecto cuando se aplican como pre-tratamiento, sobre el proceso de adsorción del virus y sobre la replicación intracelular del mismo.

Cuando las muestras que contienen alrededor de un 25% de polisacáridos se aplican como pre-tratamiento a las células Vero, durante 3 h, antes de la infección con el virus, se observa que protegen a las células de la posterior infección por parte del virus del herpes simple (figura 59a). Así, un pretratamiento con 50 µg/mL de los extractos inhibe en un 50% la infectividad del virus, aunque no se encuentran diferencias entre los extractos de polisacáridos procedentes de los distintos hongos. Si se comparan estas muestras con las acuosas, se observa que cuando se pretratan las células con 50 µg/mL de los extractos acuosos, la capacidad infectiva del virus sólo disminuye un 10%, lo que apunta a los polisacáridos como compuestos responsables de esta protección frente al virus.

Los resultados obtenidos en los estudios de adsorción se presentan en la figura 59b, observándose que cuando se aplican 50 $\mu\text{g/mL}$ de los concentrados de polisacáridos durante el proceso de adsorción del virus se reduce la infectividad, comparada con el control, entre un 65-60%. Comparando este resultado con el obtenido con la misma concentración de extracto acuoso (40% de inhibición) se observa que cuando la muestra se enriquece en polisacáridos se potencia la acción antiviral del extracto.

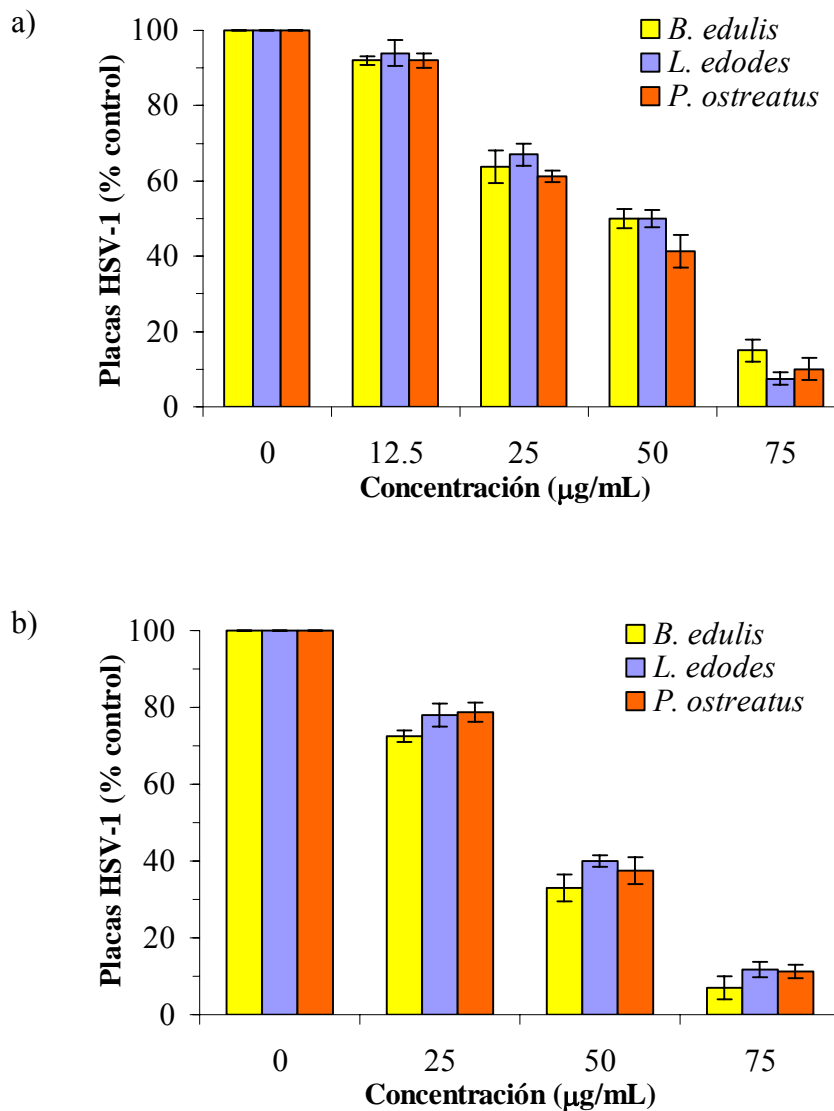


Figura 59: Efecto de extractos enriquecidos en polisacáridos obtenidos a partir de hongos comestibles en células Vero. a) Con pre-tratamiento (3 h) b) sobre la adsorción del virus del herpes simple tipo 1.

Cuando se estudia la acción de los extractos ricos en polisacáridos sobre la replicación intracelular del virus (tabla 25) los valores de IC₅₀ obtenidos muestran una fuerte inhibición de dicha replicación, donde los extractos de *L. edodes* y de *P. ostreatus* presentan valores ligeramente inferiores a los de *B. edulis*. Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos a partir de los extractos acuosos, donde *L. edodes* y *P. ostreatus* también daban lugar a valores de IC₅₀ inferiores a los de *B. edulis*, aunque en los tres casos estos valores eran muy superiores a los obtenidos para los extractos ricos en polisacáridos. También es importante indicar que los valores de los índices de selectividad son muy elevados, lo que indicaría que estos extractos enriquecidos en polisacáridos podrían ser una fuente interesante de compuestos antivirales. Estos datos confirman de nuevo que la actividad antiviral encontrada en los extractos acuosos es debida a los polisacáridos y es la primera vez que se describen los polisacáridos de *B. edulis* como antivirales y que cuando éstos se concentran, aunque sea sólo al 25%, su actividad antiviral es muy elevada. Estos polisacáridos son capaces de incidir sobre la adsorción del virus pero van a inhibir fundamentalmente la replicación del virus en las células. Resultados similares se han descrito previamente para otros hongos como *Agaricus blazei*, cuyos polisacáridos son capaces de inhibir los pasos iniciales de la replicación intracelular del virus de la polio (Faccin y col., 2007).

Tabla 25. Actividad antiviral post-infección de extractos enriquecidos en polisacáridos obtenidos a partir de hongos comestibles frente al virus del herpes simple tipo 1.

Muestra	CC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	SI
Polisacáridos <i>L. edodes</i>	787,83 ± 15,41	4,70 ± 0,48	167,62
Polisacáridos <i>B. edulis</i>	851,47 ± 17,15	5,96 ± 0,61	142,86
Polisacáridos <i>P. ostreatus</i>	784,24 ± 13,72	4,80 ± 0,39	163,38

4.1.3.4. Actividad antiviral de las fracciones de bajo peso molecular (LMW)

Para estudiar una posible correlación entre la actividad antiviral encontrada en los extractos acuosos y otros compuestos solubles en agua, distintos de los polisacáridos, tales como fenoles y/o péptidos, las muestras acuosas se han sometido a una filtración que excluye moléculas cuyo peso molecular sea superior a 10.000 daltons. El contenido en fenoles totales y péptidos de dichas fracciones de bajo peso molecular viene indicado

en la tabla 26, observándose que el contenido en compuestos fenólicos de estas fracciones es bastante elevado, en comparación con el de péptidos.

Tabla 26. Porcentaje de compuestos fenólicos y péptidos ($p < 10.000d$) en las fracciones de bajo peso molecular obtenidas a partir de los extractos acuosos de los hongos.

Extracto acuoso	% Fenoles totales	% Péptidos
<i>Boletus edulis</i>	18,96 ± 0,08	3,33 ± 0,11
<i>Lentinus edodes</i>	33,15 ± 0,92	2,21 ± 0,22
<i>Pleurotus ostreatus</i>	11,36 ± 1,24	3,00 ± 0,34

La actividad antiviral de estas fracciones de bajo peso molecular se ha evaluado en las mismas condiciones que las descritas previamente para los extractos acuosos y la fracción rica en polisacáridos. Sin embargo, ninguna de estas fracciones ha sido capaz de disminuir la capacidad infectiva del virus en ninguna de las situaciones estudiadas (pre-tratamiento, adsorción o replicación intracelular), confirmando que la actividad antiviral encontrada en los extractos acuosos era debida a los polisacáridos de la fracción de HMW.

4.2. Procesado culinario, digestión y biodisponibilidad de los compuestos antioxidantes presentes en hongos

Los hongos comestibles estudiados presentan una buena capacidad antioxidante cuando los ensayos se realizan sobre la materia prima cruda. Sin embargo, antes de su ingesta estos hongos se someten a distintos tratamientos culinarios que pueden provocar cambios no sólo en sus propiedades organolépticas sino también probablemente en las propiedades antioxidantes observadas. Además, los compuestos antioxidantes que resistan a los distintos tratamientos culinarios deberán también superar los procesos degradativos que implica la digestión humana.

La digestión comienza en la boca donde los alimentos se mastican y se mezclan con la saliva para degradar principalmente polisacáridos. El estómago con el movimiento de

sus paredes, la secreción de pepsina y algunas lipasas gástricas y una intensa reducción de pH, produce principalmente la degradación de las proteínas. La presencia de alimentos en el duodeno estimula la secreción de sales biliares, fosfatidilcolina y colesterol de la vesícula biliar y fluidos pancreáticos (que contienen lipasas, colipasas y muchas otras enzimas degradativas) para degradar principalmente compuestos lipídicos. Así pues, la digestión transforma moléculas complejas en estructuras más sencillas y más fácilmente asimilables por los enterocitos intestinales. Además, para que los compuestos antioxidantes lleguen al torrente sanguíneo, éstos tras pasar por el proceso de digestión, deberán ser absorbidos a nivel intestinal.

Por ello, en este capítulo se estudia el efecto del procesado culinario, reproduciendo los tratamientos domésticos más comunes, que tiene en las propiedades antioxidantes de algunos hongos comestibles como el *A. bisporus*, *L. edodes* y *B. edulis*. Después de su cocinado, estos hongos se han sometido a una digestión *in vitro* para estimar los niveles de antioxidantes que quedan después de este tratamiento. Con las fracciones resultantes de la digestión de estos hongos se ha medido la biodisponibilidad *in vitro* de los compuestos antioxidantes, mediante cultivos celulares de Caco-2, colonocitos específicos que bajo ciertas condiciones de cultivo se diferencian desarrollando el característico borde de cepillo de los enterocitos intestinales.

4.2.1 Procesado culinario

En el procesado culinario de los hongos, los dos procesos que más pueden influir en su capacidad antioxidante son el troceado y el cocinado, ya que con el corte se exponen los tejidos internos al oxígeno exterior y el aumento de temperatura, debido a la cocción, fomenta cambios estructurales a nivel molecular.

En este estudio, el corte de los cuerpos fructíferos en pequeños trozos se ha llevado a cabo inmediatamente antes del tratamiento térmico, para evitar que las enzimas oxidativas endógenas presentes en los hongos (polifenol oxidasas y peroxidasas) tengan tiempo suficiente para actuar y degradar los compuestos con actividad antioxidante. Ya que, sólo cuando el troceado es muy intenso (trozos inferiores a aprox. 1 cm³) o cuando transcurre un periodo de tiempo superior a 20 minutos se produce la activación de las tirosinasas y un aumento en la actividad de las polifenol oxidasas y peroxidasas en torno a un 3%, que puede llegar hasta el 4% o más, dependiendo de la especie cuando el

tiempo de exposición al oxígeno es superior a 50 min (Soler-Rivas y *col.*, 1998). En este sentido destacan los hongos con una alta actividad de las enzimas oxidativas como *A. bisporus*, *A. caesarea*, etc.

Para estudiar el efecto que distintos tratamientos térmicos tienen sobre la capacidad antioxidante de los hongos, las muestras no se han calentado durante un tiempo fijo y definido, sino hasta que los hongos mostraron el aspecto característico de un hongo cocinado y listo para consumir (mostrando el pardeado típico de las reacciones de Maillard o la textura esponjosa de los hongos hervidos, figura 60).



Figura 60: Detalle de los cuerpos fructíferos de *L. edodes* troceados a) crudos, b) cocidos en medio acuoso, c) cocinados en medio graso y d) cocinados en seco.

Los tratamientos elegidos han sido como ejemplo de cocción en medio acuoso el hervido, como cocción en medio graso la fritura superficial, como cocción en seco el asado a la parrilla y como otro tipo de cocciones especiales se ha seleccionado la cocción mediante un microondas. Tras las cocciones se han realizado extracciones metanólicas y acuosas para evaluar su actividad antioxidante.

Los resultados obtenidos indican que el hervido, la fritura y la cocción en seco de los cuerpos fructíferos de *A. bisporus* no afectan de forma significativa al nivel de antioxidantes hidrosolubles presentes en el hongo crudo (figura 61a). Sin embargo,

cuando se aplica el tratamiento de cocción en microondas se produce una reducción de la capacidad antioxidante del hongo aunque inferior a la que se observa en los otros dos hongos. Los extractos acuosos obtenidos de los cuerpos fructíferos de *L. edodes* tras los tratamientos térmicos, presentan una disminución de más de la mitad de la actividad antioxidante que tenían cuando estaban crudos (figura 61b). Para este hongo, la cocción en medio acuoso (hervido) es el procedimiento térmico más desfavorable mientras que la cocción en seco, el menos drástico. Los extractos acuosos de *B. edulis* crudo muestran la actividad antioxidante más alta de los tres hongos analizados pero es también el hongo que se ve más afectado por las cocciones (figura 61c). Como ocurre con los extractos acuosos de *L. edodes*, la cocción en seco es el tratamiento térmico menos agresivo y las tecnologías de cocción que suponen su exposición al agua son las más perjudiciales para los antioxidantes hidrosolubles. Únicamente los antioxidantes hidrosolubles de *A. bisporus* parecen ser resistentes a la extracción con agua caliente, lo que sugiere la presencia de antioxidantes hidrosolubles distintos de las otras especies de hongos.

Los compuestos antioxidantes solubles en metanol de *A. bisporus* poseen menor termoresistencia que los solubles en agua (figura 62a), ya que se ven más afectados por los distintos tipos de cocción. En particular, la cocción en agua tanto si se usa una placa eléctrica convencional o un microondas reducen de forma acusada su capacidad de captación del radical DPPH[•]. Estos extractos metanólicos, de manera contraria a lo que se podría esperar, resisten mejor las cocciones en medio graso que los tratamientos térmicos en medios acuosos, lo que podría indicar que tal vez los antioxidantes que se extraen con metanol sólo son solubles parcialmente en las matrices lipídicas. Además, este extracto ha mostrado una ligera capacidad inhibitoria de la oxidación lipídica (tabla 9 la de Pf) lo que sugiere la presencia de dos tipos de compuestos: moléculas hidrosolubles que también son parcialmente solubles en metanol (y más termosensibles que los compuestos de los extractos acuosos) y moléculas como el ergosterol y sus derivados (liposolubles) que según los análisis por TLC son los responsables en una parte importante de la capacidad antioxidante observada en los extractos metanólicos. Los compuestos esteroideos mencionados podrían mostrar interacciones sinérgicas con los fenoles del aceite de oliva, fitoesteroles y tocoferoles previniendo la degradación de los antioxidantes tanto los del aceite como los de los extractos metanólicos de los hongos.

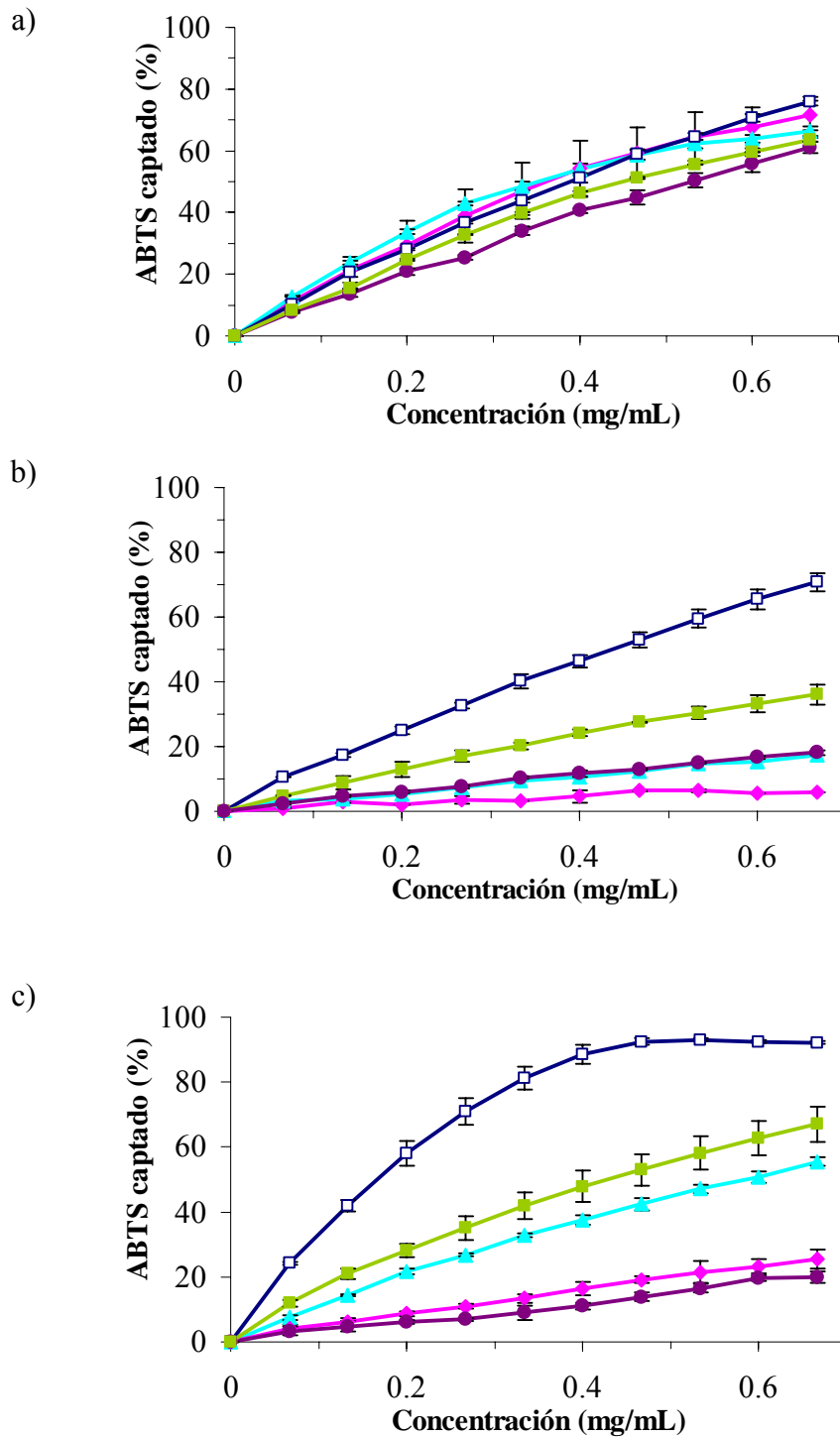


Figura 61: Capacidad de captación del radical $ABTS^{*+}$ de los extractos acuosos de a) *A. bisporus*, b) *L. edodes* y c) *B. edulis* después de someter sus cuerpos fructíferos a distintos tratamientos de cocción. (□) Crudo, (●) Microondas 5 min, (▲) Fritura, (◆) Hervido y (■) Plancha.

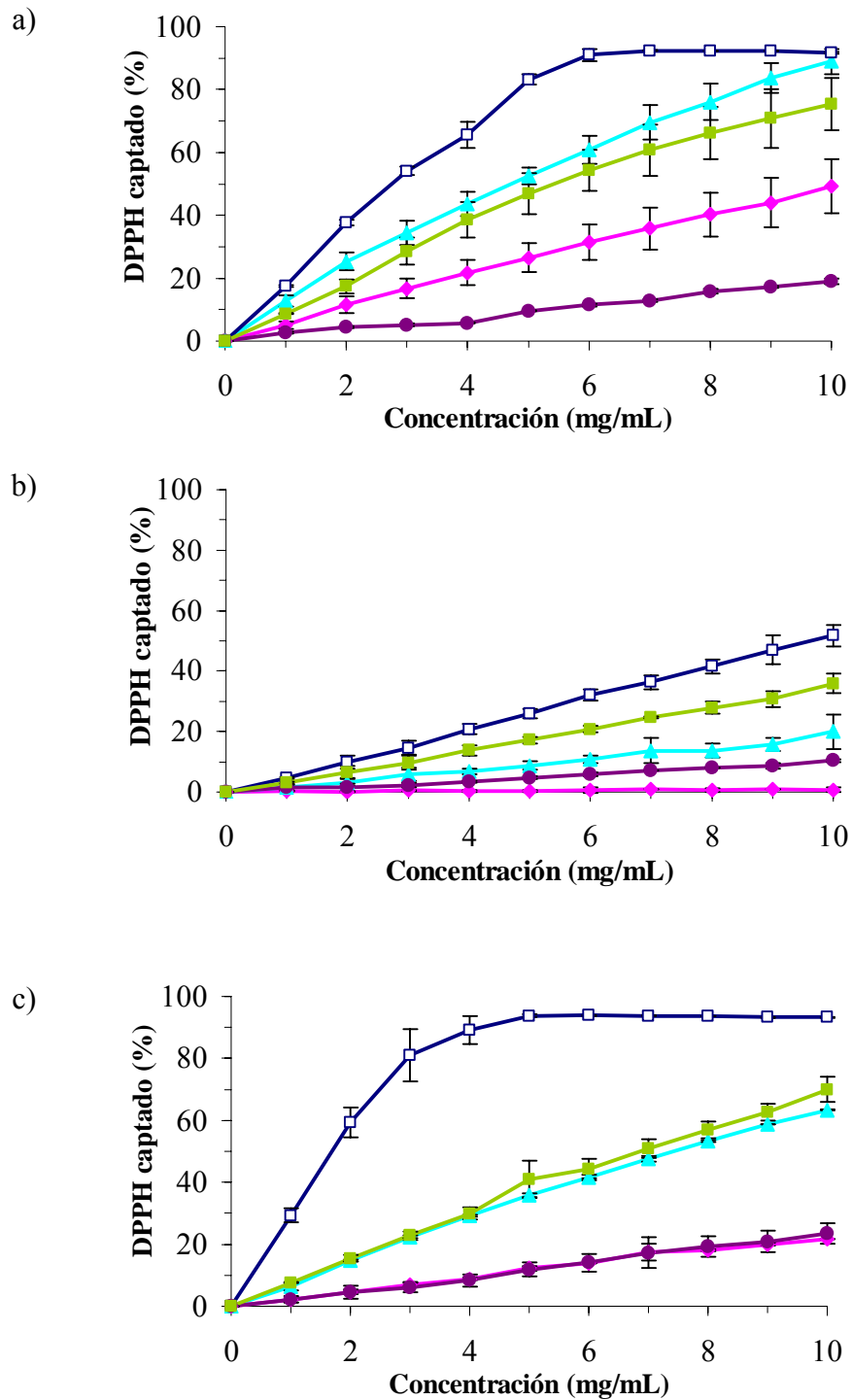


Figura 62: Capacidad de captación del radical DPPH[•] de los extractos metanólicos de a) *A. bisporus*, b) *L. edodes* y c) *B. edulis* después de someter sus cuerpos fructíferos a distintos tratamientos de cocción. (□) Crudo, (●) Microondas 5 min, (▲) Fritura, (◆) Hervido y (■) Plancha.

Al igual que *A. bisporus*, los extractos metanólicos de *L. edodes* y *B. edulis* (figura 62b y c) también se ven más afectados por los tratamientos térmicos acuosos que por la cocción en medio graso y también son capaces de inhibir la oxidación lipídica (tabla 13). Además, estos extractos metanólicos mostraron un patrón de reducción de su capacidad antioxidante similar al de sus extractos acuosos (figura 61b y c), sobre todo en el caso de *B. edulis*. Estos resultados sustentan nuevamente la posibilidad de la presencia de dos tipos de compuestos en los extractos metanólicos.

La influencia de los procesos térmicos en la capacidad antioxidante o en los compuestos antioxidantes se ha evaluado con anterioridad para *L. edodes* y otras especies de hongos. Según (Choi y col., 2006), la cocción aumenta tanto la concentración de fenoles como las propiedades antioxidantes de *L. edodes*. Sin embargo, estos resultados no coinciden con los obtenidos por otros autores (Barros y col., 2007b; Manzi y col., 2004) donde los hongos cocinados pierden actividad antioxidante respecto a cuando están crudos y contienen concentraciones inferiores de nutrientes. Probablemente, las diferencias en los resultados se deban a que Choi y colaboradores no consideraron las pérdidas de humedad y de sólidos solubles, lo que produce la concentración de la muestra por unidad de peso y/o la mayor facilidad con la que se pueden extraer los compuestos de tejidos tratados térmicamente dependiendo del tiempo de calentamiento.

Por lo tanto, se ha evaluado también el efecto del tiempo de cocción seleccionando únicamente un método (por ejemplo, la cocción con microondas) y una variedad de hongo (*L. edodes*).

Tabla 27: Capacidad de captación de los radicales ABTS^{•+} y DPPH[•] de los extractos acuosos y metanólicos obtenidos de los cuerpos fructíferos de *L. edodes* sometidos a la cocción por microondas a distintos tiempos.

Tiempo de cocción (min)	EC ₅₀ (ABTS) (mg/mL)	EC ₅₀ (DPPH) (mg/mL)
0	0,44 ± 0,02	9,50 ± 0,71
1	0,37 ± 0,01	6,55 ± 0,07
2,5	0,62 ± 0,00	11,80 ± 0,06
5	1,88 ± 0,11	47,00 ± 1,41
10	3,35 ± 0,64	> 50

La cocción de los cuerpos fructíferos de *L. edodes* usando un microondas produce, durante los primeros minutos de cocción, un aumento en la capacidad de captación de los radicales tanto en los extractos acuosos como en los metanólicos (tabla 27). La $EC_{50(ABTS)}$ del extracto acuoso disminuye aproximadamente un 16% y la $EC_{50(DPPH)}$ del extracto metanólico un 28% durante el primer minuto de cocción. Transcurrido ese tiempo, si se continua con la cocción del hongo, se produce una reducción de la actividad antioxidante con el aumento del tiempo de cocinado, sobretodo en los extractos metanólicos donde se produce una reducción importante de antioxidantes solubles en metanol. Estos resultados podrían indicar que cuando los hongos son sometidos a un tratamiento térmico, al principio el calor mejora la extracción de los antioxidantes, pero conforme aumenta el tiempo de exposición al calor se van reduciendo sus niveles. En consecuencia, cuanto más prolongado sea el tratamiento térmico aplicado más se reducen las propiedades antioxidantes de los cuerpos fructíferos que se cocinen.

4.2.2 Digestión in vitro de hongos sometidos a cocción en seco

Los modelos de digestión *in vitro* son herramientas que facilitan la evaluación del efecto de la digestión humana sobre ciertos compuestos de interés, pero también se pueden utilizar para evaluar su influencia sobre las propiedades de una matriz alimenticia en su conjunto, como la capacidad antioxidante de los hongos siempre y cuando se usen los controles adecuados. Así, una vez cocinados, los cuerpos fructíferos de los hongos seleccionados se han sometido a una digestión *in vitro* para investigar si la actividad antioxidante medida tras de la cocción, se mantiene después del proceso de masticación y de las digestiones gástricas e intestinales.

Previamente a la realización de los ensayos se ha estudiado el efecto que todos los compuestos adicionados a la muestra durante la digestión tienen en la realización de los ensayos de medida de capacidad antioxidante. Así, la adición de enzimas, sales biliares y otros componentes no supone un cambio importante en la capacidad de captación de ninguno de los dos radicales empleados. Sin embargo, la variación de pH y la adición de bicarbonato sódico si que producen variaciones en la absorbancia en uno de los radicales utilizados.

Cuando se mide la absorbancia del radical $ABTS^{\bullet+}$ usando digestiones control (sin presencia hongo) aplicadas en las mismas concentraciones que las muestras, no se observa ninguna variación significativa de la absorbancia ni a los pHs ácidos del estómago ni cuando posteriormente se utiliza el bicarbonato sódico para neutralizar el pH (figura 63a), por lo que la medida de la capacidad antioxidante tras los distintos pasos de la digestión mediante el ensayo del radical $ABTS^{\bullet+}$ no plantea ningún problema.

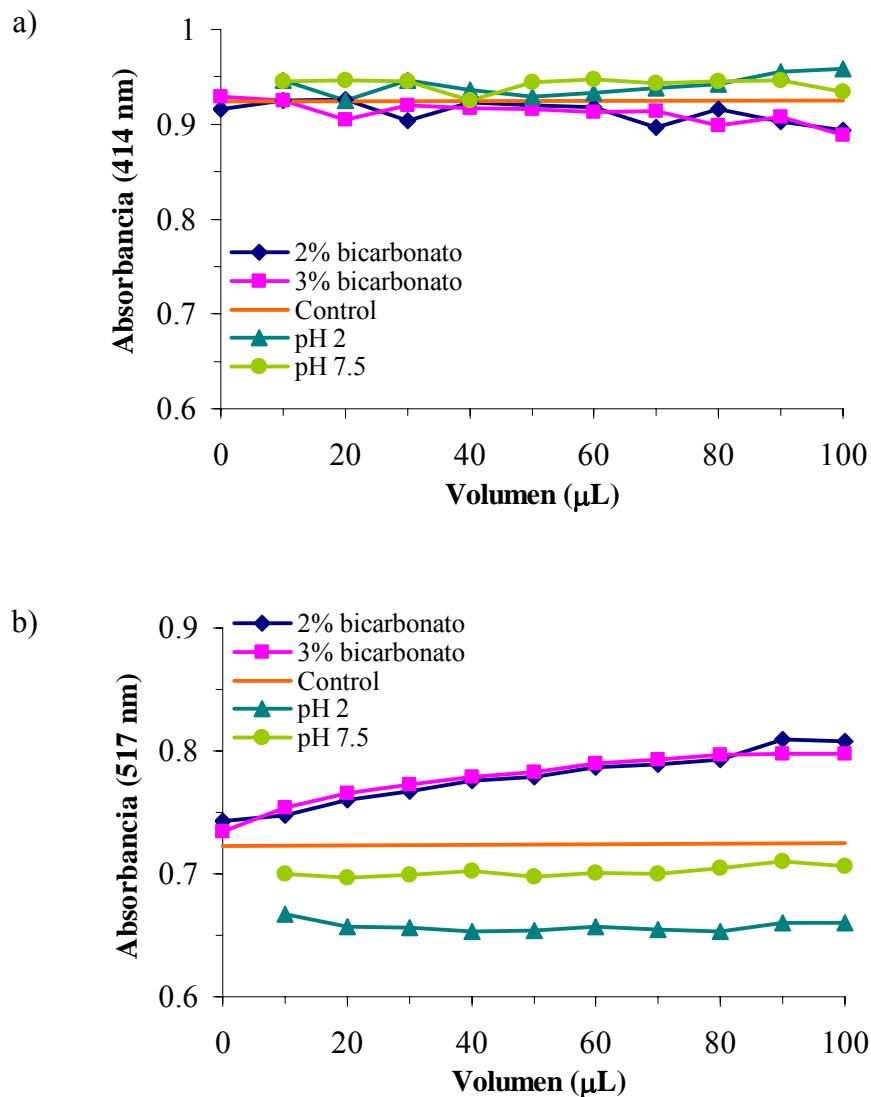


Figura 63: Efecto de la adición del pH y del bicarbonato en la capacidad de captación del radical: a) $ABTS^{\bullet+}$ y b) $DPPH^{\bullet}$.

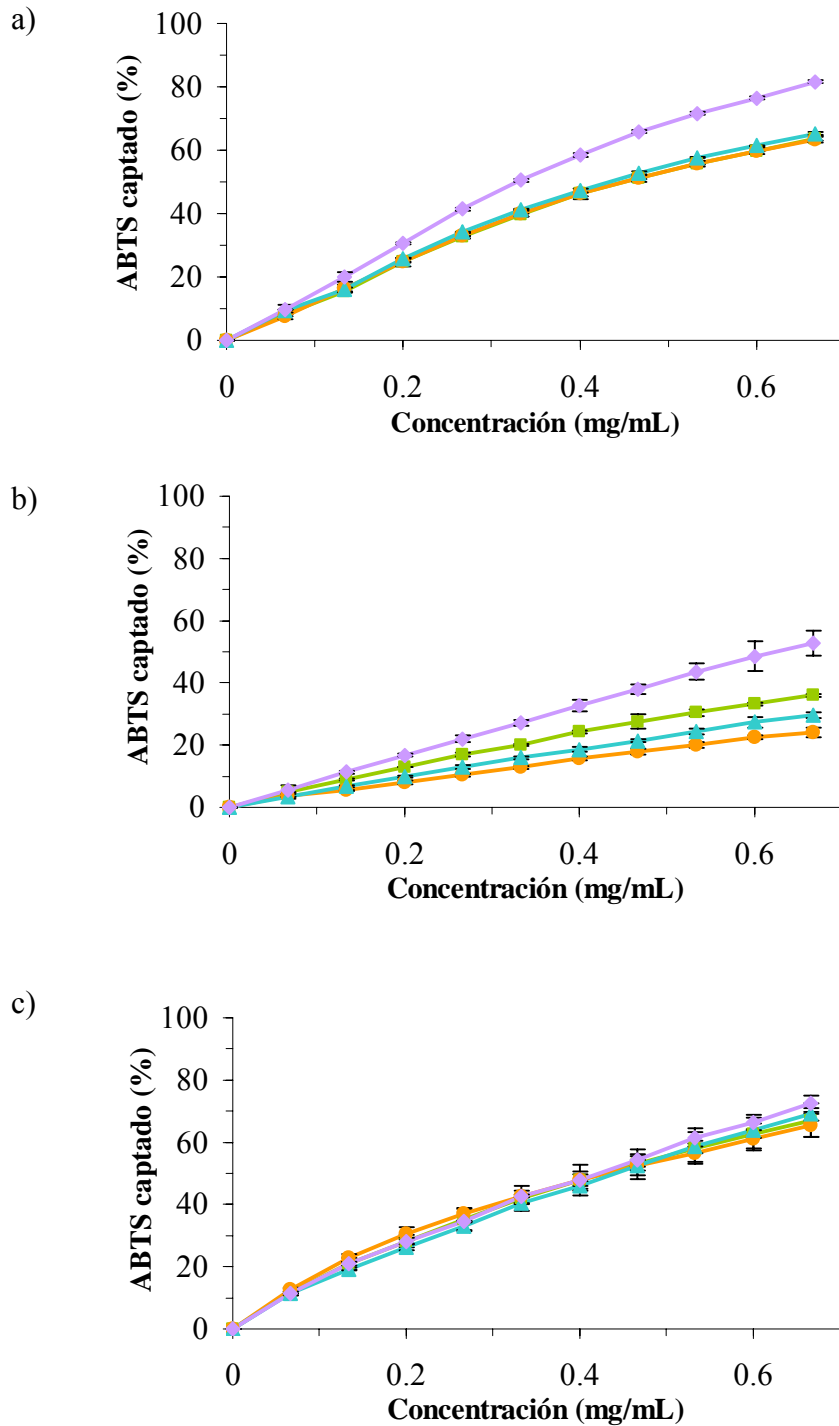


Figura 64: Capacidad de captación del radical $ABTS^{\bullet+}$ de los extractos acuosos de a) *A. bisporus*, b) *L. edodes* y c) *B. edulis* obtenidos después de su cocción en seco y de los distintos pasos de la digestión *in vitro*. (■) Cocción en seco o a la plancha, (●) después de la masticación, (▲) después de la digestión gástrica y (◆) después de la digestión intestinal.

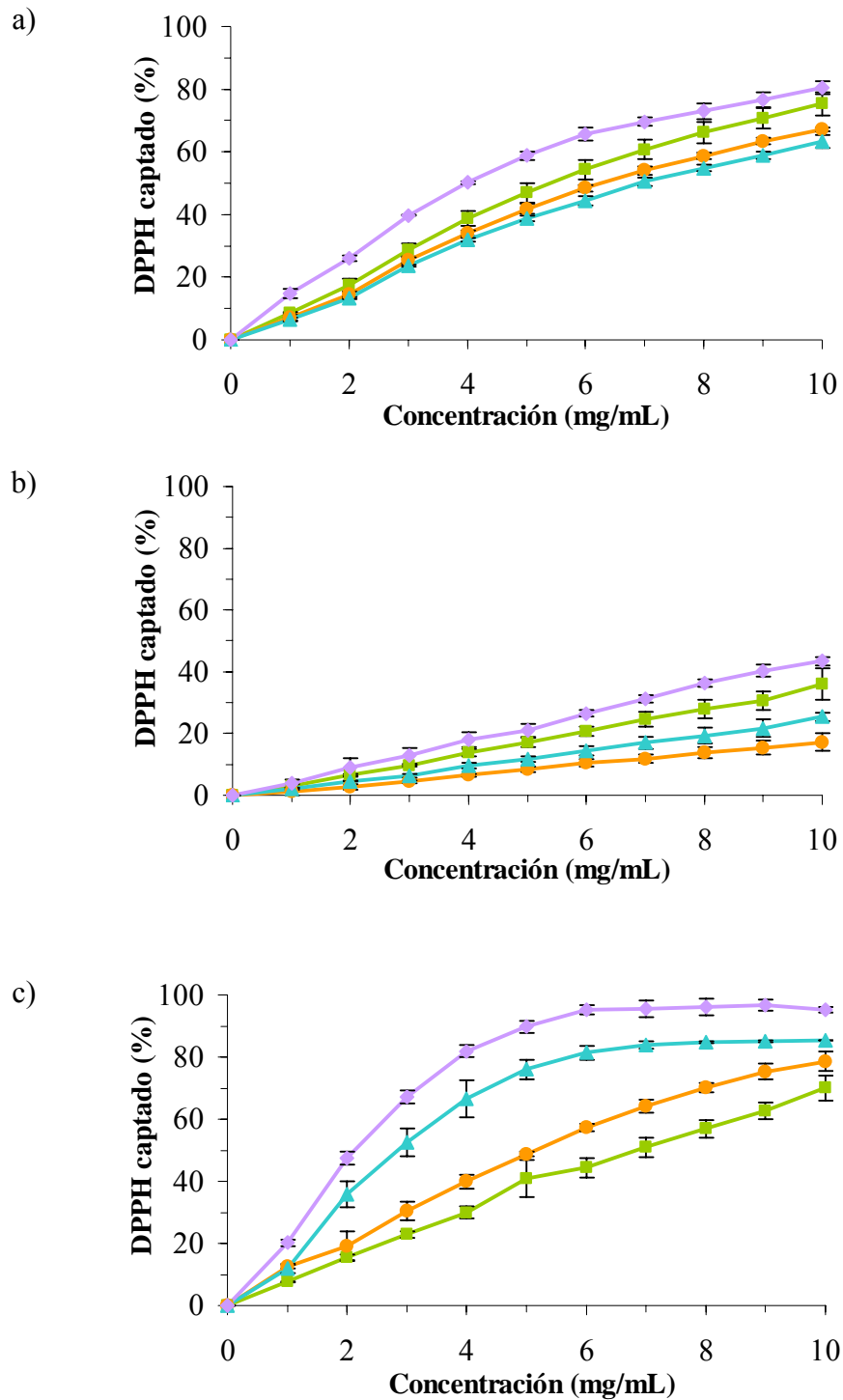


Figura 65: Capacidad de captación del radical DPPH[•] de los extractos metanólicos de a) *A. bisporus*, b) *L. edodes* y c) *B. edulis* obtenidos después de su cocción en seco y de los distintos pasos de la digestión *in vitro*. (■) Cocción en seco o a la plancha, (●) después de la masticación, (▲) después de la digestión gástrica y (◆) después de la digestión intestinal.

Sin embargo, a pHs ácidos se observa una reducción de la absorbancia del radical DPPH• que puede producir falsos positivos, ya que esta reducción supone sobre valorar la capacidad antioxidante de las muestras (Figura 63b). Hecho que es debido a que el espectro de absorción de DPPH• se desplaza unos cuantos nanómetros por efecto del pH. Este efecto ocurre a cualquiera de las concentraciones adicionadas, lo que indica que variaciones muy pequeñas de pH influyen de forma importante en este test. Hay que tener en cuenta entonces que las muestras después de la digestión estomacal deben ser recalculadas y restar el efecto producido por el cambio de pH. La adición de bicarbonato en las concentraciones necesarias para la digestión *in vitro* también modifican la absorbancia del radical DPPH•. En este caso, la interferencia es mayor en aquellas muestras que contienen mayor cantidad de este compuesto. Así que la corrección de este efecto a se ha realizado tomando muestras antes y después de la adición de este compuesto y substrayéndolas. Una vez optimizada la ejecución de estos ensayos se procedió a la realización de los mismos.

Se ha seleccionado la cocción en seco o cocinado a la plancha como método de cocción previo a la digestión *in vitro*, ya que es la técnica donde menores interferencias se producen por la presencia de otros antioxidantes como ocurre durante la fritura con los compuestos fenólicos, los tocoferoles, etc., propios del aceite de oliva y también para evitar las pérdidas debidas a lixiviado de compuestos al medio.

La cocción en seco de los cuerpos fructíferos de *A. bisporus* es un tratamiento más drástico para los antioxidantes hidrosolubles que la masticación o la digestión gástrica, ya que no se encuentran diferencias significativas en la capacidad de captación del radical ABTS^{•+} tras estos tratamientos (figura 64a). Sin embargo, el extracto acuoso obtenido después de la digestión intestinal muestra una mayor actividad antioxidante que las etapas previas de la digestión.

El proceso de masticación de los cuerpos fructíferos a la plancha de *L. edodes* reduce de forma significativa la capacidad de captación del radical de los compuestos hidrosolubles (figura 64b) indicando que los compuestos antioxidantes de esta fracción pueden ser polisacáridos ya que, *L. edodes* contiene un alto nivel de estos compuestos (25%) (tabla 24) y según estudios anteriores, estos compuestos poseen actividad antioxidante (Liu y col., 1997). Además, la degradación de polisacáridos puede

provocar la liberación de antioxidantes unidos a sus estructuras complejas exponiéndolos a medios desfavorables. A pesar de todo, la actividad antioxidante aumenta posteriormente durante las digestiones gástricas e intestinal indicando que las enzimas proteolíticas y pancreáticas y tal vez la variación de pH generan compuestos nuevos con actividad antioxidante más elevada que la muestra original. La actividad antioxidante de los extractos acuosos de *B. edulis* tras la cocción en seco no varía significativamente con la digestión (figura 64c). Los antioxidantes presentes en este hongo pueden ser termolábiles pero resisten los cambios de pH y las degradaciones enzimáticas.

Los resultados obtenidos indican que el proceso de digestión *in vitro* no disminuye la capacidad de captación del radical ABTS^{•+} de los extractos acuosos de las tres variedades de hongos analizados respecto a sus niveles después de la cocción en seco.

Los resultados que se han obtenido indican que los antioxidantes solubles en metanol de *A. bisporus* y *B. edulis* se ven más afectados por la masticación y digestión gástrica que los solubles en agua (figura 65a y c). A pesar de todo, la actividad de captación de DPPH[•] aumenta de nuevo con la digestión intestinal como ocurre con los extractos acuosos. El caso de *B. edulis* es particularmente interesante ya que el aumento en la capacidad antioxidante de este hongo tras la digestión intestinal ha sido muy acusado, alcanzando niveles de $EC_{50} = 2,2$ mg/mL, cercanos a los que presentaba el hongo crudo ($EC_{50} = 1$ mg/mL). Por el contrario, los extractos metanólicos de *L. edodes* muestran un perfil en las curvas de actividad similar a la de los antioxidantes de los extractos acuosos (figura 65b), lo que sugiere una vez más la presencia de compuestos antioxidantes distintos dependiendo de la especie de hongo analizado.

Como conclusión se puede decir que, en general, el proceso de digestión no disminuye de forma importante la capacidad antioxidante ni de los extractos acuosos ni de los metanólicos de los hongos estudiados, siendo el tratamiento culinario un proceso mucho más agresivo para estos antioxidantes.

4.2.3 Biodisponibilidad in vitro de compuestos con capacidad antioxidante

Una vez concluido el proceso de digestión, la fracción potencialmente bioaccesible (FB) se añade a las monocapas de células Caco-2, desarrolladas sobre membranas permeables

en pocillos especiales, que van a permitir investigar la posible absorción *in vitro* de los compuestos antioxidantes.

Antes de realizar los ensayos de absorción *in vitro* es necesario determinar la concentración a la cual se pueden aplicar las fracciones bioaccesibles para que no resulten tóxicas para las células. Según los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad (tabla 28) de las fracciones resultantes de las digestiones de *A. bisporus*, *L. edodes* y *B. edulis* se pueden adicionar hasta un volumen máximo de 60 µl por pocillo para conseguir el 100% de viabilidad, después de las 3h de incubación.

Tabla 28: Toxicidad de las fracciones bioaccesibles de *A. bisporus*, *L. edodes* y *B. edulis* en células Caco-2. Los resultados se expresan como porcentaje de células viables.

Hongo	100 µl (FB)	75 µL (FB)	50 µl (FB)
<i>A. bisporus</i>	52,42%	86,34%	100%
<i>L. edodes</i>	49,58%	83,25%	99,53%
<i>B. edulis</i>	43,35%	77,31%	96,34%

Este volumen de 60 µl se corresponde con una concentración de la fracción bioaccesible aplicada de 1,98, 0,95 y 1,54 mg/mL para *A. bisporus*, *L. edodes* y *B. edulis* respectivamente, por lo que hay que tener en cuenta que las concentraciones aplicadas para llevar a cabo los ensayos de biodisponibilidad no son las mismas. La actividad antioxidante en estos ensayos se ha medido mediante el método del ABTS^{•+}, ya que tanto la fracción bioaccesible obtenida después de la digestión, como el medio de cultivo de las células poseen una naturaleza acuosa. Además, la presencia de proteínas en el medio de cultivo celular hace que al entrar en contacto con el metanol se produzca un precipitado, por lo que el método del DPPH[•] no es válido para determinar la actividad antioxidante de este tipo de muestras.

En cuanto a la capacidad antioxidante de las fracciones aplicadas (figura 66), la fracción de *B. edulis* presenta la mayor capacidad antioxidante, aunque no está aplicada en la mayor concentración, la fracción aplicada de *L. edodes* muestra la menor capacidad

antioxidante de los tres hongos, ya que se ha aplicado en la menor concentración debido a que es el hongo más citotóxico.

Estos ensayos de absorción *in vitro* se han llevado a cabo durante 3 h, y al cabo de ese tiempo se ha recogido el compartimento apical y el basolateral y se ha medido su capacidad antioxidante. Así, la capacidad antioxidante detectada en el compartimento apical se relaciona con los compuestos antioxidantes que no son absorbidos a través de los enterocitos, mientras que la del compartimento basolateral corresponde con los compuestos antioxidantes que son biodisponibles.

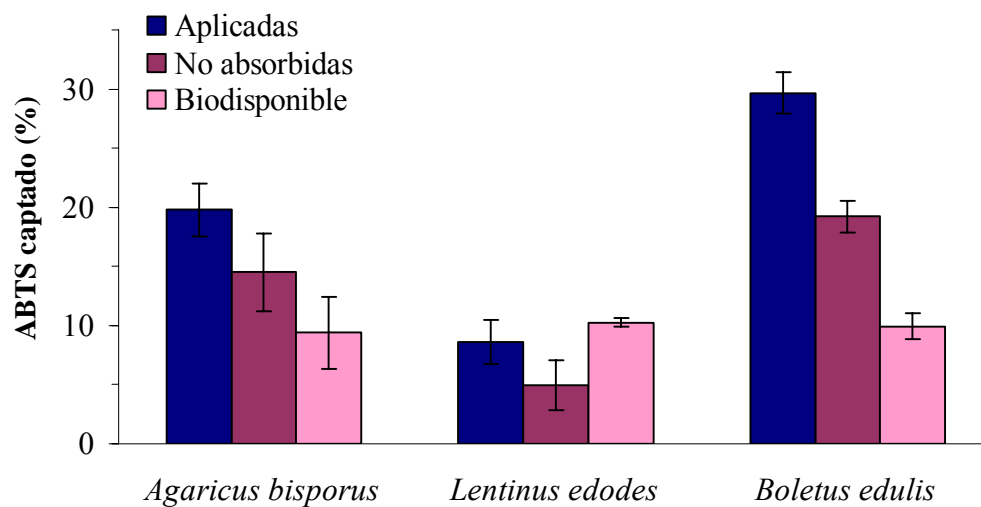


Figura 66: Capacidad de captación del radical ABTS^{•+} de los extractos FB de *A. bisporus*, *L. edodes* y *B. edulis* aplicadas a monocapas de células Caco-2 y su distribución entre los compartimentos apical (fracción no absorbida) y basolateral (fracción biodisponible) en los ensayos de absorción *in vitro*.

Los ensayos de absorción muestran que los compuestos antioxidantes obtenidos de los hongos *A. bisporus* y *B. edulis* son parcialmente biodisponibles ya que el 47,6 y el 33,4% respectivamente de la actividad antioxidante aplicada se ha encontrado en el compartimento basolateral. Sin embargo, la capacidad de captación del radical ABTS^{•+} del compartimento basolateral de *L. edodes* es parecida a la de la muestra inicialmente aplicada, lo que sugiere que durante el paso a través de las células se han producido transformaciones de los compuestos aplicados en otros con mayor actividad antioxidante, ya que no todos los antioxidantes son absorbidos y la suma de la capacidad antioxidante del pocillo apical y basolateral supera a la aplicada. Además, si

se suman las capacidades antioxidantes observadas en la fracción biodisponible y no absorbida de *A. bisporus* el resultado es también mayor que la actividad antioxidante aplicada indicando que también en esta especie, hay posiblemente transformación de los antioxidantes iniciales u otras moléculas presentes en la fracción FB en otros antioxidantes diferentes más potentes.

Posteriormente se han analizado las proteínas totales, fenoles y los productos de degradación obtenidos de la digestión de polisacáridos (medidos como carbohidratos totales) en las fracciones bioaccesibles que se han aplicado a las células Caco2, para tratar de identificar el tipo de compuestos responsables de la actividad antioxidante (figura 67) tras el proceso de digestión. Sin embargo, la misma cuantificación no se ha podido llevar a cabo en los compartimentos apical y basolateral por interferencias de los compuestos del medio, ya que éste es muy rico en aminoácidos.

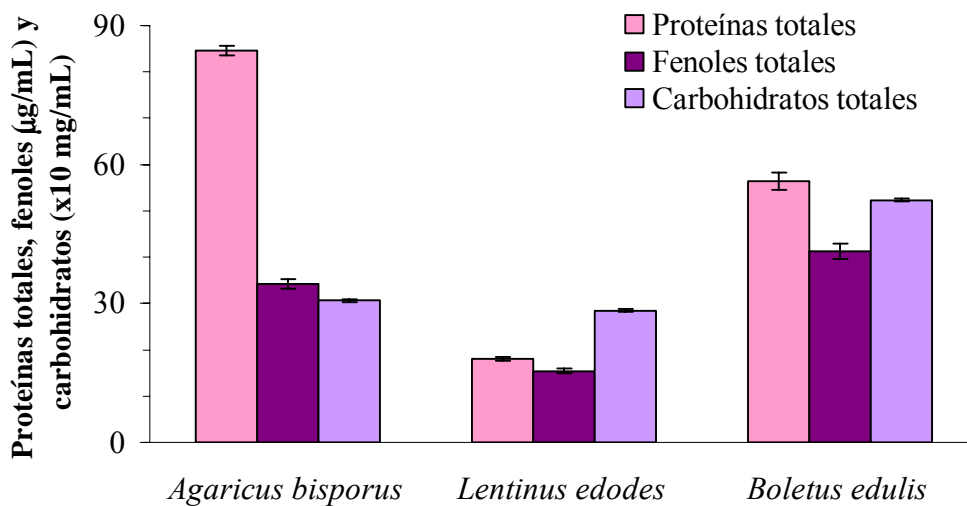


Figura 67: Proteínas totales, fenoles y carbohidratos cuantificados en el extracto FB previo a su aplicación a las pruebas de absorción en monocapas de células Caco-2.

Los extractos bioaccesibles de *A. bisporus* presentan un contenido en proteínas mayor que *B. edulis* pero muestran menor actividad antioxidante, así que probablemente, la cantidad de proteínas no esté relacionada con la capacidad de captación del radical $ABTS^{\bullet+}$. Los productos resultantes de la digestión de los polisacáridos de los hongos pueden también estar involucrados en la actividad observada ya que durante el proceso de masticación se produce una ligera reducción de la capacidad antioxidante en algunos hongos. Pero la concentración de carbohidratos es similar en *A. bisporus* y *L. edodes* mientras que sus actividades antioxidantes observadas son distintas. Sin embargo, los

hongos con mayor actividad antioxidante presentan también el contenido de fenoles totales más elevado lo que sugiere que los compuestos fenólicos pueden ser los principales responsables de la actividad antioxidante adicionada a las células Caco-2, luego es de esperar que sean éstos los compuestos biodisponibles responsables de la actividad antioxidante detectada.

4.3. Alimentos funcionales elaborados con *Boletus edulis* como ingrediente antioxidante

Teniendo en cuenta la elevada actividad antioxidante que presentan algunos hongos como por ejemplo *B. edulis* y que un importante porcentaje de estos compuestos antioxidantes es biodisponible, su uso como ingredientes ricos en antioxidantes para el diseño de alimentos funcionales, es una opción muy interesante.

Así, en este trabajo se ha llevado a cabo el diseño de dos alimentos funcionales diferentes entre sí a base de hongos, concretamente se ha utilizado *B. edulis*. Para ello se han seleccionado alimentos de origen animal ya que los sabores y texturas de los hongos son más parecidos a los de los derivados cárnicos que a los de origen vegetal. Además se han elegido dos productos cuyo proceso de fabricación es muy diferente, un paté de hígado de cerdo y unas croquetas de pollo. Esto nos permitirá conocer si los tratamientos empleados para la fabricación de estos alimentos producen alguna modificación en los compuestos antioxidantes presentes en los hongos.

4.3.1 Paté de hígado de cerdo

El paté de hígado de cerdo es una pasta untada de consumo habitual en España que se comercializó como sustituto más económico del típico “foie-grass” francés, obtenido a partir del hígado de cierto tipo de gansos. Los patés de hígado de cerdo presentan un alto valor nutricional debido a su elevado contenido en hierro, aunque hay que destacar que también presentan un elevado contenido en grasa.

Por este alto contenido en grasa, los patés son muy propensos a sufrir oxidaciones lipídicas por lo que tradicionalmente los fabricantes incluyen en sus formulaciones antioxidantes sintéticos como el BHT o BHA u otros como los dodecil galatos, etc., para evitar que se produzca la oxidación. Debido al rechazo por parte de los

consumidores de este tipo de aditivos, actualmente se están proponiendo alternativas a la utilización de antioxidantes sintéticos en la formulación de patés, como es el uso de aceites esenciales de salvia y romero (Estévez *y col.*, 2007), de origen natural y que presentan una capacidad antioxidante elevada. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la mayoría de los extractos de plantas suelen tener colores y sabores característicos que pueden influir negativamente en el aspecto y sabor del producto final. En este sentido, la adición de *B. edulis* a las formulaciones de patés evitaría este tipo de problemas. Por ello, en este trabajo se han fabricado patés con *B. edulis*, bien con el hongo completo o bien con los extractos acuosos y metanólicos obtenidos del mismo y se ha analizado su actividad antioxidante.

4.3.1.1. Efecto del procesado en la capacidad antioxidante

En la fabricación de un paté hay dos etapas que son especialmente críticas ya que pueden influir en la oxidación de un paté recién preparado. Así, durante el picado y el mezclado de los distintos ingredientes (hígado, tocino, etc.), se aumenta la superficie de reacción y el oxígeno entra en contacto con la mezcla y se pueden producir oxidaciones lipídicas. Otra etapa crítica es el tratamiento térmico aplicado al paté para su conservación, ya que el incremento de la temperatura produce un aumento de la velocidad de las reacciones de oxidación y además en matrices alimentarias ricas en hierro, como es el caso del paté, este metal puede actuar como catalizador e inducir y acelerar aun más estas reacciones.

Sin embargo, al trabajar en este ensayo con cantidades pequeñas, el picado y mezclado de los ingredientes se hace rápidamente, por lo que no hay tiempo suficiente para que se puedan producir oxidaciones durante esta etapa. En este caso, el único proceso que puede aumentar los niveles de oxidación es el calentamiento.

Para estudiar el efecto del tratamiento térmico sobre los niveles de oxidación de los patés, se ha preparado un paté control y otro con un 7,5% de *B. edulis* (figura 68), obteniéndose a partir de los mismos un extracto acuoso y otro metanólico para medir su capacidad antioxidante antes y después de someterlos al tratamiento térmico.

Los resultados obtenidos para el control (tabla 29) indican que el tratamiento térmico reduce la capacidad antioxidante de sus extractos acuosos, ya que la EC_{50} obtenida

aumenta significativamente después del proceso térmico. Sin embargo, cuando el paté se suplementa con polvo de *B. edulis* completo (BC), no se observa una reducción significativa en los antioxidantes hidrosolubles tras el tratamiento térmico. Además, los valores de EC₅₀, tanto de la pasta cruda como del paté con el hongo añadido, han sido significativamente más bajos que los de los controles.

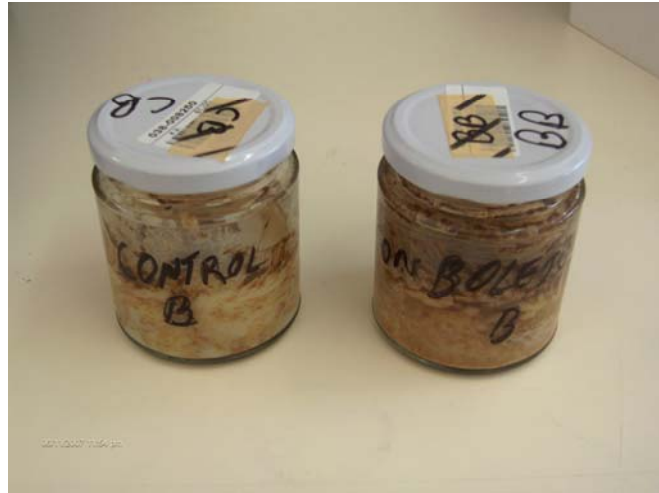


Figura 68: Paté de hígado de cerdo control (izquierda) y suplementado con *B. edulis* (derecha).

Tabla 29: Actividad captadora de radicales ABTS^{•+} y DPPH[•] de extractos acuosos y metanólicos obtenidos a partir de patés con y sin adición de 7,5% (p/p) de *B. edulis*, antes y después del tratamiento térmico.

Muestras	EC ₅₀ (ABTS) mg/mL (compuestos solubles en agua)		EC ₅₀ (DPPH) mg/mL (compuestos solubles en metanol)	
	Antes	Después	Antes	Después
Control	0,28 ± 0,01	0,46 ± 0,02	1,11 ± 0,06	1,18 ± 0,01
7,5% <i>B. edulis</i>	0,12 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,24 ± 0,02

Los resultados también indican que, el calentamiento no afecta de forma significativa a los antioxidantes solubles en metanol, ni en el caso del paté control ni para el suplementado con el hongo pulverizado. Sin embargo, este último presenta mayores propiedades antioxidantes, ya que su EC₅₀ promedio es de 0,2 mg/mL mientras que los patés tradicionales presentan valores de 1,1 mg/mL.

4.3.1.2. Elaboración de un paté funcional con *B. edulis*

La pasta de paté y el hongo en polvo (BC) se han mezclado en diversas concentraciones (1%, 2,5%, 5% y 7,5%) para tratar de diseñar un producto funcional con alta actividad antioxidante, pero también con propiedades organolépticas adecuadas y económicamente asequible. También hay que tener en cuenta que un exceso de compuestos antioxidantes pueden provocar un efecto pro-oxidante, especialmente tratándose de una matriz como el paté de hígado, con una elevada concentración de grasa y hierro (Barlow 1990). En este trabajo, la pasta de paté se ha suplementado con las distintas cantidades de polvo de hongo y tras el tratamiento térmico correspondiente, se le ha realizado una extracción acuosa y otra metanólica, donde se ha medido la capacidad antioxidante.

Los resultados obtenidos indican que la adición de *B. edulis* en concentraciones de hasta el 7,5% (p/p) aumentan la capacidad antioxidante de las fracciones solubles en agua extraídas de los distintos patés (figura 69). El valor de la EC_{50} obtenida para el paté de hígado control disminuyó de 0,46 mg/mL a 0,26 mg/mL con la adición de sólo 1% de *B. edulis*. Si el hongo se adiciona a concentraciones más altas las EC_{50} disminuyen aun más pero hasta un límite, ya que adiciones del 5% y 7,5% del hongo no suponen ningún cambio significativo en las EC_{50} , siendo ambas de 0,15 mg/mL.

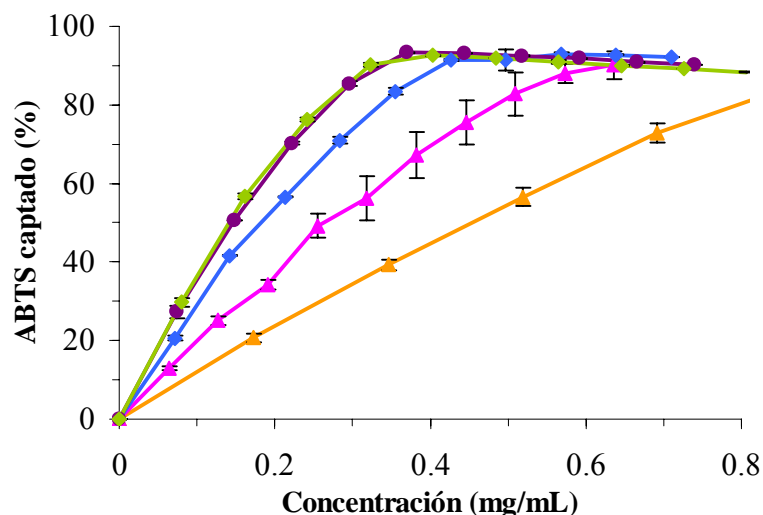


Figura 69: Capacidad de captación de radicales $ABTS^{\bullet+}$ de los extractos acuosos obtenidos de patés suplementados con distintas cantidades de *B. edulis* completo. (▲)Control, (▲)1%, (◆)2,5%, (●)5% y (◆)7,5%.

Antes de proceder al estudio de las actividades antioxidantes de las fracciones solubles en metanol de los patés mencionados anteriormente, ha sido necesario comprobar el método de extracción. Esto se debe a las interferencias que pueden tener lugar cuando se utilizan disolventes orgánicos en matrices con un alto contenido en grasas. Así, se han comparado dos métodos de extracción, uno realizando una extracción directa con metanol y otro que incluye un pretratamiento previo con hexano para eliminar la grasa, midiéndose la actividad de captación de DPPH• en ambos casos. Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencias significativas en la actividad antioxidante de los extractos metanólicos obtenidos con uno u otro procedimiento (tabla 30).

Aparentemente, los resultados son independientes del tipo de muestra (control y suplementadas) y no se ha detectado la existencia de efectos sinérgicos entre los antioxidantes presentes en la fase grasa (solubles en disolventes orgánicos tales como cloroformo, hexano, etc.) y aquéllos extraídos con metanol. Por lo tanto, la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos se ha evaluado sin el pretratamiento con hexano.

Tabla 30: Capacidad de captación del radical DPPH• de extractos metanólicos obtenidos a partir de patés suplementados con diversas concentraciones de *B. edulis* con o sin el pretratamiento con hexano para eliminar las grasas.

Muestras	EC ₅₀ (DPPH) mg/mL	
	Pretratamiento con hexano	Extracción directa con metanol
Control	1,20 ± 0,01	1,18 ± 0,01
1% <i>B. edulis</i>	0,59 ± 0,04	0,62 ± 0,02
2,5% <i>B. edulis</i>	0,30 ± 0,01	0,34 ± 0,03
5% <i>B. edulis</i>	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,00
7,5% <i>B. edulis</i>	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,01

La adición de *B. edulis* a los patés de hígado produce un aumento considerable de la actividad de captación del radical DPPH de la fracción soluble en metanol, incluso cuando sólo se añade al 1% (figura 70). Los valores de las EC₅₀ disminuyen casi a la mitad, desde 1,18 mg/mL en las muestras control, a 0,62 mg/mL en las muestras con un 1%. Al igual que ocurre con los antioxidantes solubles en agua, las EC₅₀ van

disminuyendo conforme aumentan las concentraciones del hongo hasta que con un 5 y 7,5% los valores de la EC_{50} se estabilizan y no disminuyen más.

A partir de los datos obtenidos se puede concluir que la suplementación del paté con una cantidad superior al 5% de *B. edulis*, no aumenta la capacidad antioxidante del mismo. Sin embargo puede producir ciertas modificaciones organolépticas (ligero oscurecimiento) del producto.

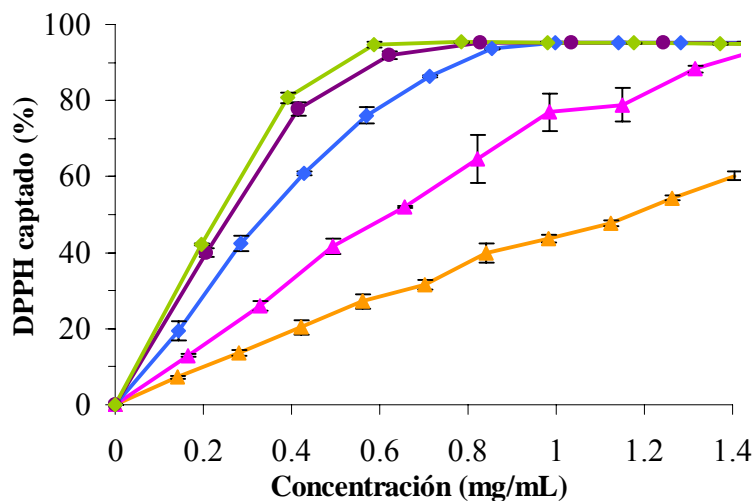


Figura 70: Capacidad de captación de radicales DPPH• de los extractos metanólicos obtenidos de patés suplementados con distintas cantidades de *B. edulis* completo. (▲)Control, (▲)1%, (◆)2,5%, (●)5% y (◆)7,5%.

4.3.1.3. Adición de extractos antioxidantes obtenidos de *B. edulis* al paté

La pasta cruda del paté también se ha suplementado con dos fracciones diferentes obtenidas de *B. edulis*: una es un extracto liofilizado que contiene compuestos hidrosolubles (BWF) obtenido por deshidratación de una extracción acuosa y la otra es un extracto seco de compuestos solubles en metanol (BMF).

Para poder comparar el efecto de la adición de estas dos fracciones con la del cuerpo fructífero completo, las cantidades que se adicionan de las dos fracciones son las que se corresponden con un 1% y un 5% del hongo completo. Así, se añaden al paté un 0,25 y 1,25% de la fracción acuosa y 0,12% y 0,62% de la metanólica, ya que el agua extrae más compuestos que el metanol.

Para la realización de este ensayo, se ha utilizado un lote de hígado y tocino distinto del que se ha usado para los ensayos previos. Los valores obtenidos de la EC_{50} en este caso para el paté control son superiores a los indicados anteriormente. Sin embargo, estos resultados son normales y se deben a la variabilidad natural entre los lotes, en especial de las piezas de hígado y tocino que difieren según su procedencia y el estado del animal. En este caso, el control y las muestras suplementadas se han preparado de la misma pasta de paté para permitir comparaciones. La adición de un 0,25 y 1,25% de BWF disminuye un 13% y 30% respectivamente los valores de EC_{50} determinados para el control. Cuando las muestras se suplementan con el hongo completo (añadido al 1 y 5%) (figura 69) esta disminución es de un 43% y 67% respectivamente.

Table 31: Capacidad de captación del radical $ABTS^{\bullet+}$ de extractos acuosos obtenidos de patés suplementados con preparaciones acuosas de *B. edulis* y la capacidad de captación del radical $DPPH^{\bullet}$ de extractos metanólicos obtenidos a partir de patés suplementados con preparaciones metanolicas de *B. edulis*.

Fracción acuosa (BWF) (% p/p)	EC_{50} (ABTS) (mg/mL)	Fracción metanólica (BMF) (% p/p)	EC_{50} (DPPH) (mg/mL)
0	1,03 ± 0,01	0	1,4 ± 0,02
0,25	0,90 ± 0,00	0,12	1,27 ± 0,01
1,25	0,73 ± 0,01	0,62	0,59 ± 0,00

Cuando se añade la fracción metanólica (BMF) (0,12 y 0,62%) se observa una disminución de un 10% y 58% con respecto al valor de EC_{50} que presenta el control, mientras que concentraciones similares pero incluyendo el hongo completo (1 y 5%) (figura 70) disminuyen un 47% y 78%, respectivamente. Por lo tanto, la adición al paté de las fracciones acuosas o metanólicas, en vez del hongo completo, no mejora la actividad antioxidante del mismo. Esto se puede deber a la existencia de ciertas interacciones sinérgicas entre los compuestos antioxidantes solubles en agua y en metanol o también a que algunos de los compuestos antioxidantes pueden degradarse durante el procedimiento de extracción y concentración utilizado para la obtención de los extractos. Estos resultados indican que la mejor forma de diseñar un paté funcional a base de hongos, es añadir el polvo del hongo en vez de los distintos extractos, lo que simplifica en gran medida la fabricación del alimento.

4.3.1.4. Efecto del almacenamiento en la oxidación lipídica y en la capacidad antioxidante de los patés

Una vez determinada la elevada actividad antioxidante de los patés suplementados con *B. edulis* se ha estudiado como el tiempo de almacenamiento de dichos patés puede afectar tanto a la capacidad antioxidante determinada como a la oxidación lipídica de la muestra.

Primeramente, se ha llevado a cabo la determinación de la oxidación lipídica de los patés suplementados (hongo entero y extractos BWF y BMF) al cabo de 15 días almacenados a 4°C y la medida se ha llevado a cabo mediante el ensayo del tiobarbitúrico (TBARS).

Los resultados obtenidos (figura 71) indican que no existen diferencias significativas entre los valores de TBARS a tiempo 0 y al cabo de 15 días, excepto cuando se adicionan los extractos metanólicos. Sin embargo, si se comparan los valores obtenidos al cabo de 15 días de almacenamiento de las distintas muestras con el control (paté no suplementado) se observa que los valores de TBARS obtenidos para los patés suplementados con los extractos metanólicos así como con un 5% del polvo de hongo, son ligeramente mayores que los obtenidos para el paté control. Estos resultados se pueden explicar porque los compuestos presentes en los extractos metanólicos pueden tener una cierta naturaleza lipídica (ej. presencia de ergosterol) que de lugar a un incremento de los valores de TBARS del producto. Con la adición de un 5% de hongo puede ser que estemos adicionando una cantidad excesiva de antioxidante y podríamos tener un ligero efecto pro-oxidante.

A pesar de todo, los valores de oxidación lipídica son en todos los casos muy bajos e incluso más bajos que otros patés funcionales que contienen otro tipo de extractos procedentes de plantas como el romero y la salvia (Estévez *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta que los patés suplementados con los extractos acuosos y metanólicos presentaban una menor capacidad de captación de radicales que los suplementados con el hongo completo y que además los patés que incluyen a los extractos metanólicos aumentan los niveles de oxidación lipídica del producto, se ha decidido no continuar con el estudio de estabilidad para esta clase de muestras. Así

mismo, se ha decidido no trabajar con los patés suplementados con un 5% del polvo del hongo por su posible efecto pro-oxidante de la grasa a tiempos superiores a 15 d, sino realizar el estudio de estabilidad completo con los patés suplementados con un 2,5% de polvo de *B. edulis*.

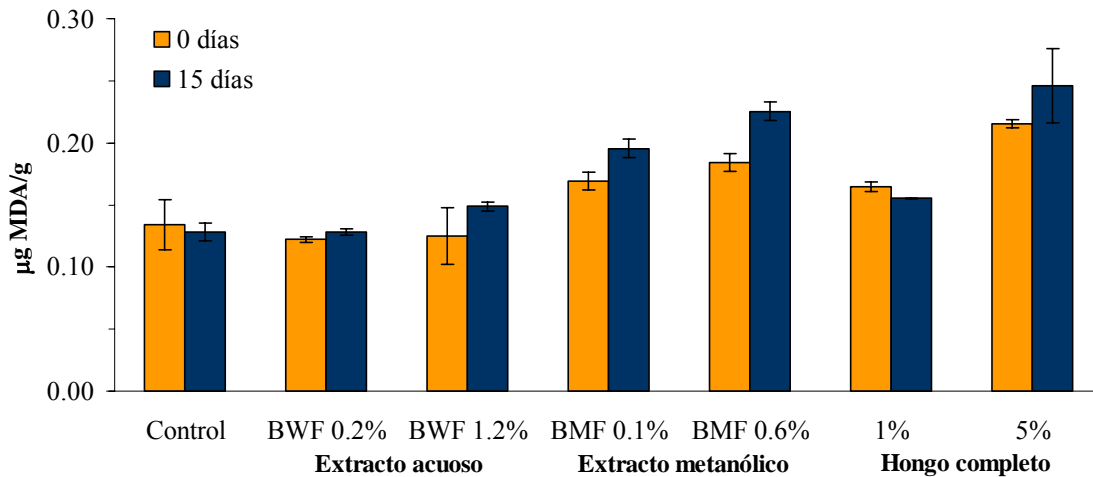


Figura 71: Valores de TBARS de patés control y suplementados con fracciones acuosas (BWF) y metanólicas (BMF) obtenidas de *B. edulis* y con el hongo completo.

Por lo tanto, se han preparado patés control y patés con 2,5% de *B. edulis* y se han almacenado a 4°C durante 60 días para estudiar la oxidación lipídica y la estabilidad de la capacidad antioxidante mostrada durante el almacenamiento.

La capacidad antioxidante de los compuestos hidrosolubles que se encuentran tanto en los patés control como los suplementados con 2,5% de *B. edulis* no se modifica al cabo de 30 días, ya que no se detectan variaciones significativas en la capacidad de captación del radical $ABTS^{\bullet+}$ entre muestras con 0, 15 y 30 días de almacenamiento (figura 72a). Los patés control muestran valores de EC_{50} de 0,3 mg/mL de media, mientras que las muestras suplementadas mantienen su alta actividad antioxidante, con un EC_{50} promedio de 0,17 mg/mL. Sin embargo, al cabo de 60 días se produce una disminución en la capacidad de captación del radical de ambos tipos de paté (control y suplementado), aunque la capacidad antioxidante del paté suplementado sigue siendo más elevada que la del control.

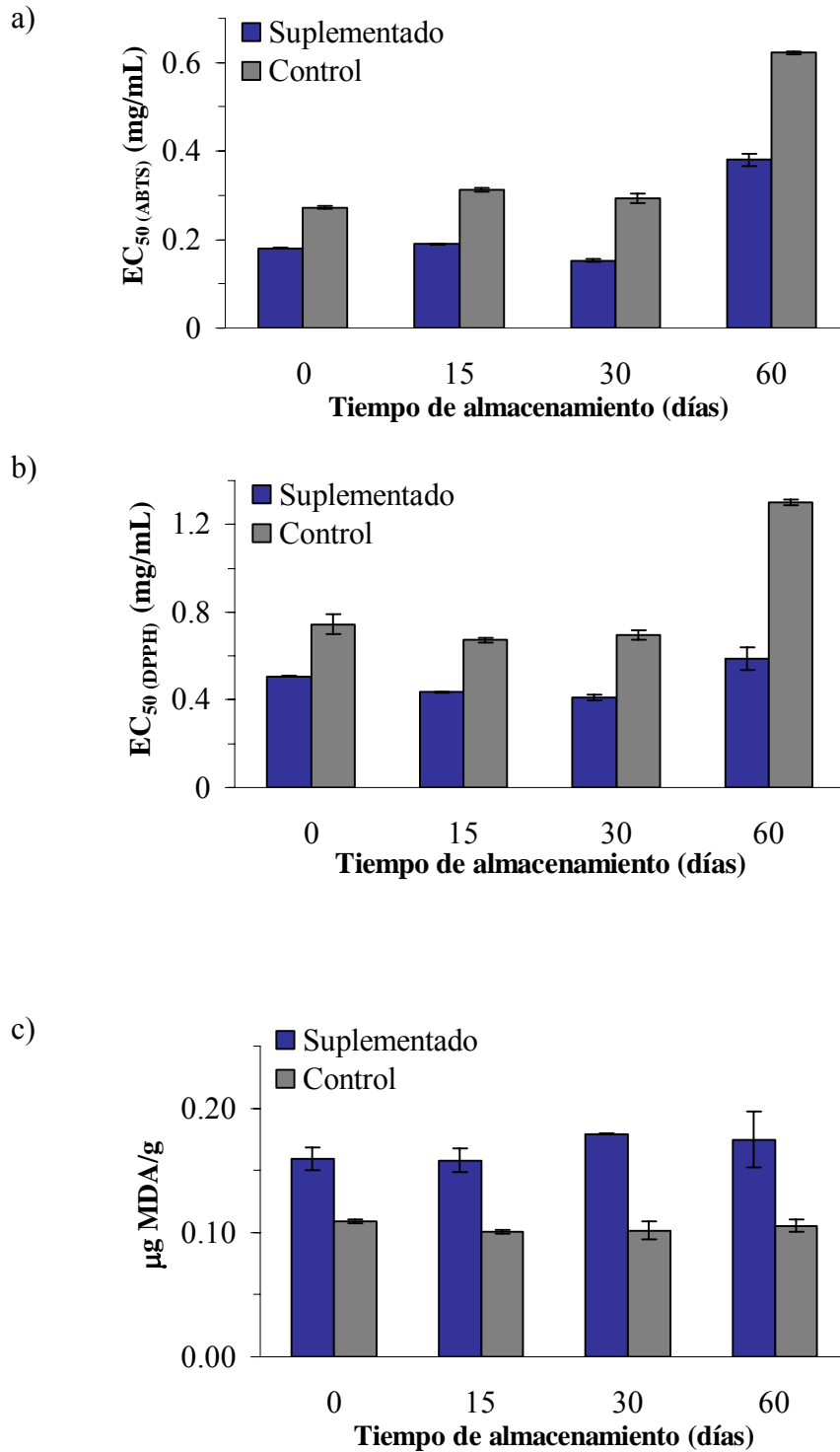


Figura 72. Evolución durante el tiempo de almacenamiento de los valores de a) $EC_{50(ABTS)}$ de los extractos acuosos, b) $EC_{50(DPPH)}$ de los extractos metanólicos y c) TBARS que se obtienen de los patés de hígado con y sin adición de *B. edulis* al 2,5%.

De forma similar se ha determinado que la actividad antioxidante de los compuestos solubles en metanol de los patés con o sin *B. edulis* tampoco varía al cabo de 30 días

(figura 72b), aunque a los 60 días se produce una reducción acusada de la actividad antioxidante en las muestras control mientras que las suplementadas sólo sufren una pequeña reducción en su capacidad de captación del radical DPPH•.

Cuando se determina la oxidación lipídica no se observan diferencias significativas en ninguna de las muestras, control o suplementadas, en los 60 días de almacenamiento. Las muestras suplementadas poseen valores ligeramente más altos que las control, aunque siguen siendo valores muy bajos de TBARS, lo que indica una estabilidad adecuada de la matriz lipídica durante 60 días si los patés se suplementan con *B. edulis* en la proporción seleccionada del 2,5% (p/p).

Aunque la oxidación lipídica de la matriz empleada, paté de hígado de cerdo, sea adecuada al cabo de 60 días, los datos obtenidos de la capacidad antioxidante de los patés suplementados indican un tiempo máximo de almacenamiento de 30 días, ya que a partir de este tiempo la capacidad antioxidante del producto disminuiría (aunque con valores aun superiores a los patés tradicionales).

4.3.2 Croquetas de pollo

Las croquetas son un alimento cuyos ingredientes son muy diferentes a los patés y además tras su elaboración industrial o casera deben someterse a una fritura doméstica. Tanto el proceso de elaboración como la fritura doméstica pueden modificar las propiedades fisicoquímicas del producto y por lo tanto, pueden afectar también a la capacidad antioxidante del producto. Por ésto, se ha estudiado el efecto que la fritura en diferentes aceites tiene sobre la capacidad antioxidante de croquetas con *B. edulis*. A partir de los resultados obtenidos en el diseño de los patés enriquecidos con *B. edulis*, a las croquetas de pollo preparadas se les ha añadido un 2,5% del hongo pulverizado.

Posteriormente, las croquetas se han sometido a una digestión *in vitro* para estudiar cómo afecta dicha digestión a la actividad antioxidante del producto. Tras la digestión, se han llevado a cabo estudios de absorción para evaluar la biodisponibilidad de los compuestos antioxidantes cuando van englobados dentro de una matriz alimentaria rica en hidratos de carbono y proteínas, como las croquetas de pollo.

4.3.2.1. Efecto sobre la capacidad antioxidante de la fritura de las croquetas con diferentes aceites

Según los resultados expuestos anteriormente, las prácticas culinarias son uno de los procesos que más reducen la capacidad antioxidante de los distintos hongos, a veces hasta valores cercanos a la mitad de los que presentan los hongos crudos (dependiendo de la especie de hongo considerada). En este apartado se ha evaluado el efecto de la fritura cuando el hongo se encuentra en forma de polvo y protegido dentro de una mezcla de gluten y proteínas de pollo recubierta por una capa de pan rallado y huevo, es decir, formando parte de los ingredientes constituyentes de una croqueta de pollo.

La cobertura de la croqueta, en contacto con el aceite a temperaturas superiores a los 100°C, sufre una inmediata deshidratación por evaporación del agua de constitución, que en matrices ricas en hidratos de carbono y proteínas da lugar a una reacción característica. Esta reacción ocurre entre los grupos amino de las proteínas y los carbonilos de los azúcares y desencadena una serie de transformaciones conocidas como reacciones de Maillard, que suponen la formación de compuestos de color pardo y sabores especiales y que originan costras crujientes y doradas características de las croquetas recién hechas. Estas coberturas suelen proteger a los ingredientes mas internos del efecto del calor tan intenso que se origina en las capas exteriores e impiden la penetración del medio al interior, evitando la disolución de compuestos en el medio como ocurre en las frituras directas.

Del mismo modo que en los capítulos anteriores, se ha realizado una extracción acuosa y otra metanólica a partir de las croquetas elaboradas y la actividad antioxidante de las muestras se ha medido utilizando dos métodos, debido a la diferente naturaleza de los antioxidantes que se extraen con agua y con metanol. Así pues, la capacidad antioxidante de los extractos acuosos se ha medido utilizando el método del ABTS^{•+} y la de los extractos metanólicos usando el DPPH[•] como radical.

La capacidad antioxidante de los extractos acuosos obtenidos a partir de las croquetas de pollo control, antes de la fritura, es muy pequeña en comparación con la que muestran las croquetas crudas con un 2,5% de *B. edulis* (tabla 32). La fritura de las croquetas control apenas supone variación alguna en sus propiedades de captación del radical, independientemente del aceite utilizado. Sin embargo, la fritura en los distintos

tipos de grasa de las croquetas que contienen el hongo provoca un aumento significativo en la capacidad antioxidante de las muestras, siendo ligeramente mayor cuando la fritura se realiza usando aceite de girasol alto oleico.

Al contrario de lo observado en los extractos acuosos, los extractos metanólicos obtenidos a partir de las croquetas control, antes de la fritura, presentan una cierta actividad captadora del radical DPPH• aunque también en este caso, cuando a las croquetas se les añade un 2,5% de *B. edulis* su capacidad antioxidante es 3,3 veces superior (tabla 32). Posteriormente, el proceso de fritura no afecta de forma significativa a los antioxidantes solubles en metanol presentes tanto en las croquetas control como en las que contienen *B. edulis*, sólo cuando se usa aceite de oliva se observa una ligera mejora de las propiedades antioxidantes en ambos tipos de croqueta debida probablemente a los fenoles propios del aceite.

Tabla 32: Capacidad de captación de ABTS^{•+} de los extractos acuosos obtenidos a partir de las croquetas de pollo (control) o croquetas con *B. edulis* antes y después de ser sometidas al proceso de fritura en diversos aceites o manteca. Valores expresados como EC₅₀ (mg/mL).

Muestra	Fritura	EC ₅₀ (ABTS) (mg/mL)	EC ₅₀ (DPPH) (mg/mL)
Control	Crudo	> 10	> 10
2,5% <i>B. edulis</i>	Crudo	6,8 ± 0,42	3,0 ± 0,08
Control	Oliva	> 10	5,5 ± 0,25
2,5% <i>B. edulis</i>	Oliva	4,6 ± 0,28	2,4 ± 0,01
Control	Alto oleico	> 10	9,3 ± 0,80
2,5% <i>B. edulis</i>	Alto oleico	3,8 ± 0,64	3,3 ± 0,37
Control	Maíz	> 10	> 10
2,5% <i>B. edulis</i>	Maíz	5 ± 0,49	3,5 ± 0,74
Control	Manteca	> 10	> 10
2,5% <i>B. edulis</i>	Manteca	4,6 ± 0,28	3,2 ± 0,52

Si se compara el efecto de la fritura directa de los cuerpos fructíferos troceados de *B. edulis* usando aceite de oliva (figura 61c) o con su fritura pero englobado dentro de la matriz de la croqueta (tabla 32), se puede observar que en la fritura directa se produce

una reducción en la capacidad de captación de ABTS (expresada como EC₅₀) de 0,16 mg/mL crudo a 0,6 mg/mL. En el caso de las croquetas los hongos se adicionaron en concentraciones del 2,5% (p/p), es decir, que contienen 40 veces menos cantidad de hongo y sin embargo, su EC₅₀ después de la fritura es sólo 9 veces menor, lo cual sugiere que los antioxidantes del hongo están más protegidos de las fuertes temperaturas como ingrediente dentro de la masa de la croqueta. Además, parece que la capa de rebozado de la croqueta absorbe más aceite que el tejido del hongo lo que supone un aporte extra de compuestos fenólicos procedentes del aceite y la formación de costra de Maillard (donde se generan compuestos con capacidad antioxidante) potencia el aumento de las propiedades antioxidantes de las croquetas fritas en este medio. La fritura directa de *B. edulis* también supuso una pérdida drástica en sus propiedades de captación de DPPH (figura 62c) ya que el hongo crudo mostraba EC₅₀ de 1,8 mg/mL mientras que frito su EC₅₀ aumentaba hasta 7,6 mg/mL. Sin embargo, cuando el hongo se encuentra incorporado a la masa de la croqueta y en mucha menor concentración los valores de EC₅₀ obtenidos tanto para las croquetas crudas como fritas son similares a las del hongo crudo, lo cual podría indicar algún tipo de sinergia con los antioxidantes provenientes de la masa de la croqueta y/o rebozado, ya que ocurre tanto en las croquetas crudas como en las fritas. El tratamiento térmico posterior mejoraría estas propiedades antioxidantes, aportando los compuestos fenólicos (solubles en metanol) del aceite de oliva y reductonas antioxidantes generadas por la reacción de Maillard, aunque actuarían de forma más acusada en las croquetas control ya que al principio éstas apenas muestran capacidad alguna.

Así se puede concluir que la adición a la pasta de las croquetas de un 2,5% de *B. edulis* supone un gran incremento de la capacidad antioxidante de las mismas, mientras que la fritura de las croquetas en un tipo de grasa u otra influye poco en la capacidad antioxidante de este alimento, exceptuando la fritura en manteca que no se recomienda.

4.3.2.2. Efecto de la digestión *in vitro*

La fritura de croquetas de pollo suplementadas con *B. edulis* es menos perjudicial para los compuestos antioxidantes aportados por el hongo que la fritura directa de *B. edulis*, por lo que se ha decidido estudiar el efecto de la digestión *in vitro* sobre los compuestos antioxidantes incluidos en las croquetas, para averiguar si su efecto era similar o no al que produce cuando se ingiere el cuerpo fructífero de este hongo directamente. Las

muestras que se han frito con aceite de maíz se han descartado debido a que tanto sus extractos acuosos como metanólicos presentaron menor capacidad antioxidante que otras grasas. Sin embargo, las fritas en manteca si se evaluaron para investigar si mejoraban sus propiedades durante la digestión.

Las croquetas fritas en aceite de oliva y girasol alto oleico, así como las sometidas a fritura con manteca se han digerido *in vitro* para valorar si la utilización de uno u otro medio graso afecta a la bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes, ya que se ha descrito que la presencia de lípidos en el duodeno estimula la secreción de sales biliares, fosfatidilcolina y colesterol de la vesícula biliar y fluidos pancreáticos, dependiendo de la cantidad de grasa y la composición de ácidos grasos que tengan los triglicéridos de la grasa (de cadenas largas / cortas o saturados / insaturados) (Porter y *col.*, 2008; Christensen y *col.*, 2004).

Una vez concluido el proceso de digestión, los extractos acuosos obtenidos de las diferentes croquetas muestran una mayor actividad antioxidante que antes de someterse al proceso de digestión y después de su fritura (figura 73). Este efecto se observa tanto en las croquetas control como en las suplementadas con *B. edulis* lo que indica que el efecto se debe a la degradación normal de este alimento. Probablemente, las variaciones de pH junto con la actuación de las enzimas degradativas (amilasas de la saliva, las pepsinas gástricas y las lipasas gastrointestinales) liberan compuestos más simples (péptidos, azúcares, lípidos simples, fenoles etc.) con mayor actividad antioxidante o mejor solubilizados en el medio, lo que les facilita su reactividad con el radical durante la aplicación de método analítico. Es decir, los compuestos antioxidantes presentes o generados son más accesibles, ya que estos compuestos pueden encontrarse atrapados en los polímeros (proteínas, polisacáridos, triglicéridos, etc.) de la matriz alimentaria. El aumento de la actividad antioxidante es más acusado en las croquetas suplementadas con *B. edulis* que en las croquetas control. La utilización de uno u otro tipo de aceite o grasa no influye de forma significativa en la capacidad de captación del radical tras la digestión (figura 73c).

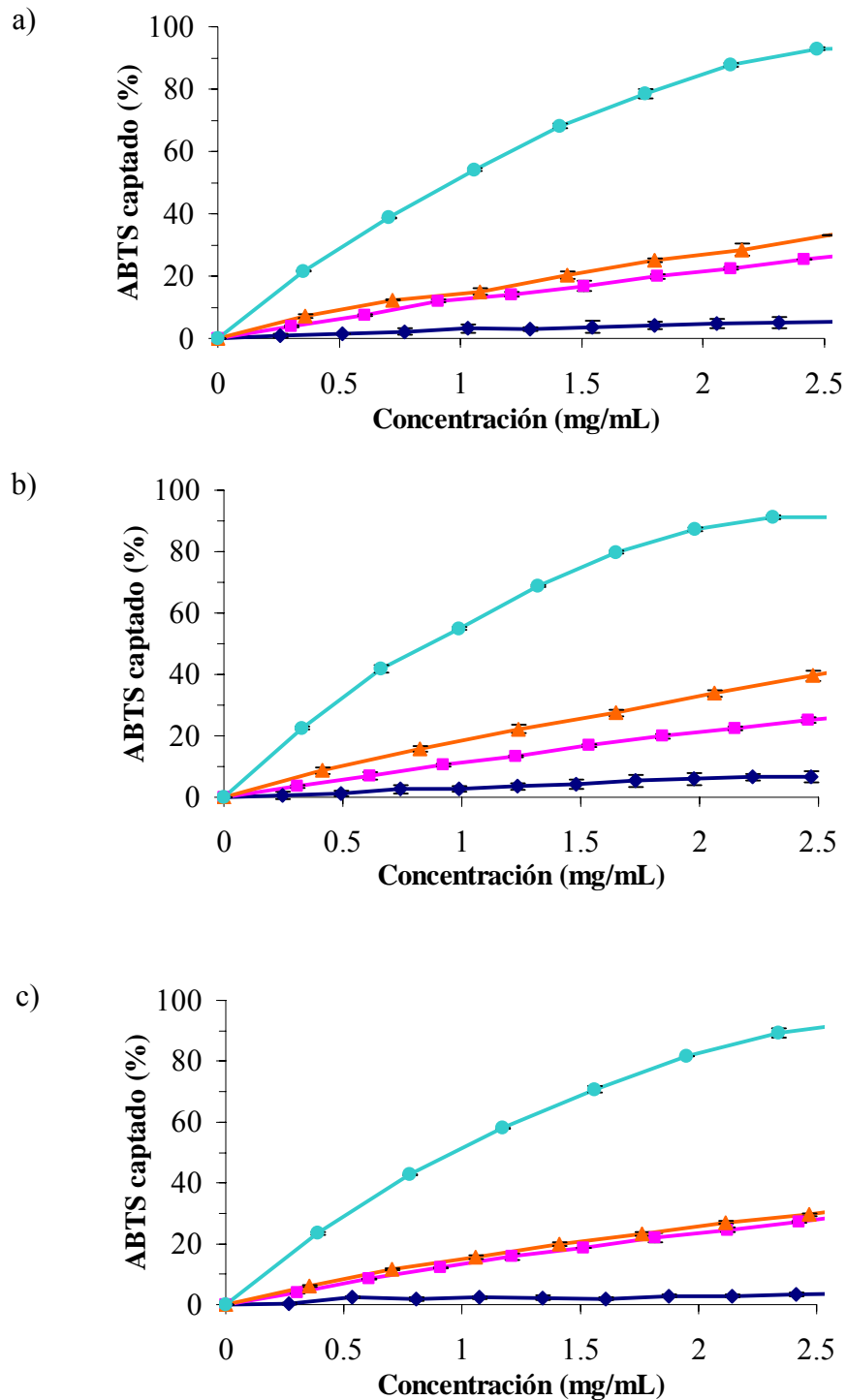


Figura 73: Capacidad de captación del radical ABTS^{•+} de los extractos acuosos de las croquetas de pollo sometidas a fritura y digeridas *in vitro* posteriormente. a) manteca de cerdo, b) aceite de oliva y c) aceite de girasol alto oleico. (◆) Croqueta control frita, (◼) Croqueta con *B. edulis* frita, (▲) Croqueta control frita y digerida, (●) Croqueta con *B. edulis* frita y digerida.

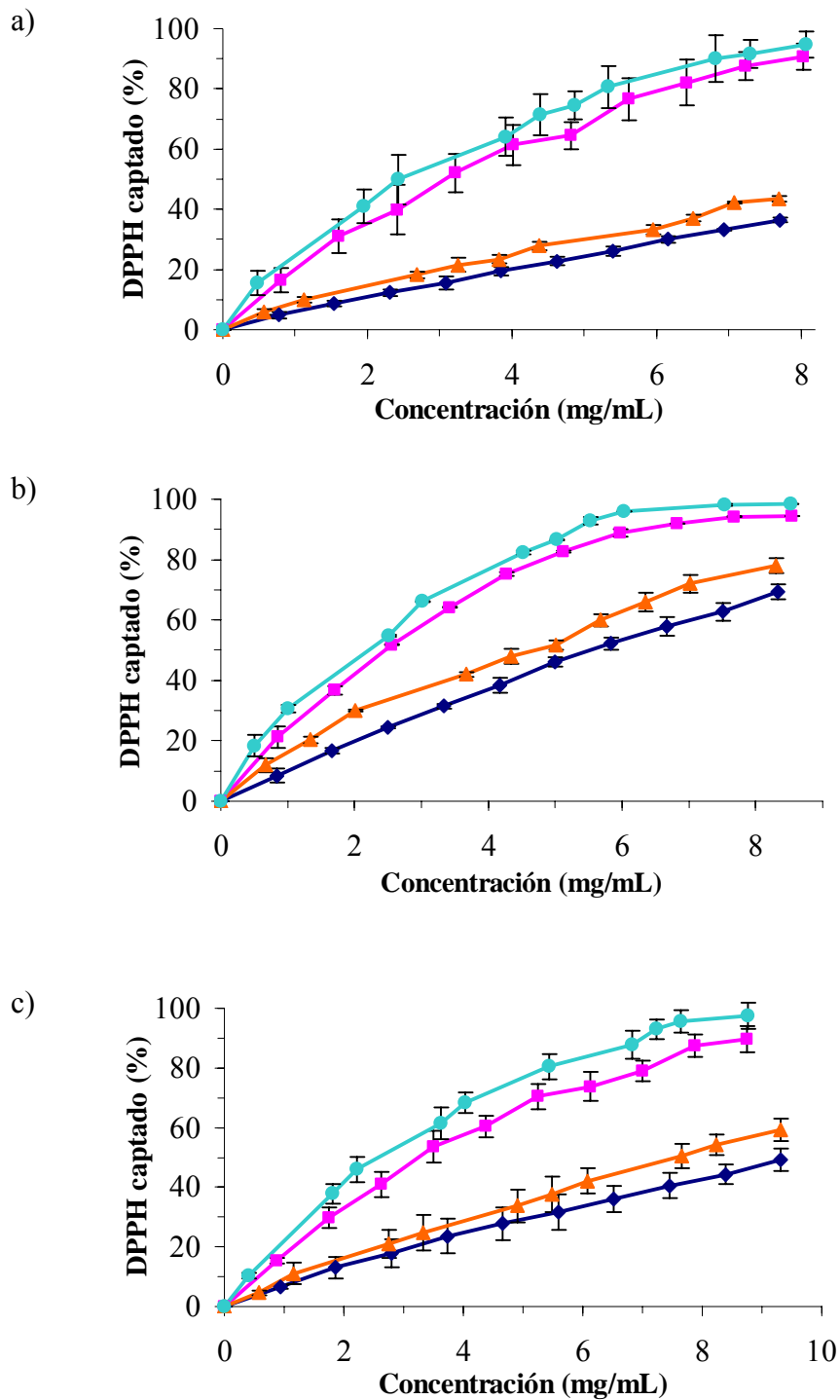


Figura 74: Capacidad de captación del radical DPPH[•] de los extractos metanólicos de las croquetas de pollo sometidas a fritura y digeridas *in vitro* posteriormente. a) manteca de cerdo, b) aceite de oliva y c) aceite de girasol alto oleico. (◆) Croqueta control frita, (■) Croqueta con *B. edulis* frita, (▲) Croqueta control frita y digerida, (●) Croqueta con *B. edulis* frita y digerida.

La digestión *in vitro* influye de forma diferente en los antioxidantes solubles en metanol que en los acuosos (figura 74), ya que, la digestión de las croquetas suplementadas con o sin el hongo y fritas con cualquiera de las grasas utilizadas supone solamente un ligero aumento de la capacidad de captación de DPPH• de los extractos metanólicos respecto a los valores que presentaban tras la fritura (figura 62).

Este aumento de la actividad antioxidante tras el proceso de digestión *in vitro* se ha observado también durante la digestión de cuerpos fructíferos de *B. edulis* que se habían cocinado previamente de forma directa (figuras 64c y 65c). Aunque el proceso de cocción fue diferente, también se observó tanto en las muestras extraídas con agua como con metanol, una liberación o generación de compuestos con capacidad antioxidante. Esta liberación tenía lugar principalmente tras la digestión intestinal.

4.3.2.3. Biodisponibilidad *in vitro* en células Caco2

Una vez concluido el proceso de digestión, se ha aislado la fracción potencialmente bioaccesible (FB) y se ha adicionado a monocapas de células Caco-2 cultivadas en placas Transwell® para estudiar la posible absorción *in vitro* de sus compuestos antioxidantes.

Tabla 33: Toxicidad de las fracciones bioaccesibles obtenidas tras la digestión de las croquetas fritas en las monocapas de células Caco-2. Los resultados se expresan como porcentaje de células viables.

Croquetas	100 µl	75 µl	50 µl
Control fritas en manteca	45,92%	72,62%	91,28%
Control fritas en aceite de oliva	49,02%	84,24%	97,26%
Control fritas en aceite de girasol alto oleico	46,23%	71,42%	96,34%
Suplementadas con <i>B. edulis</i> y fritas en manteca	45,97%	73,27%	93,26%
Suplementadas con <i>B. edulis</i> y fritas en aceite de oliva	42,85%	83,85%	100%
Suplementadas con <i>B. edulis</i> y fritas en aceite de girasol alto oleico	37,53%	70,42%	94,72%

En primer lugar, se han realizado los estudios de toxicidad celular que permiten determinar las concentraciones a las que se deben aplicar estas fracciones para que no

resulten tóxicas para las células. Según los resultados de citotoxicidad (tabla 33), las fracciones resultantes de las digestiones de croquetas control y con *B. edulis*, fritas previamente en diferentes tipos de aceites, se pueden adicionar hasta un máximo de 60 μ l por pocillo para conseguir una viabilidad de entre 90-100%, después de las 3h de incubación.

Calculando las concentraciones a las que corresponden esos volúmenes, se puede indicar que las concentraciones máximas no citotóxicas corresponden a 1,84 mg/mL y son similares para las croquetas control y las que contienen *B. edulis* así que inicialmente, se han aplicado a igual concentración.

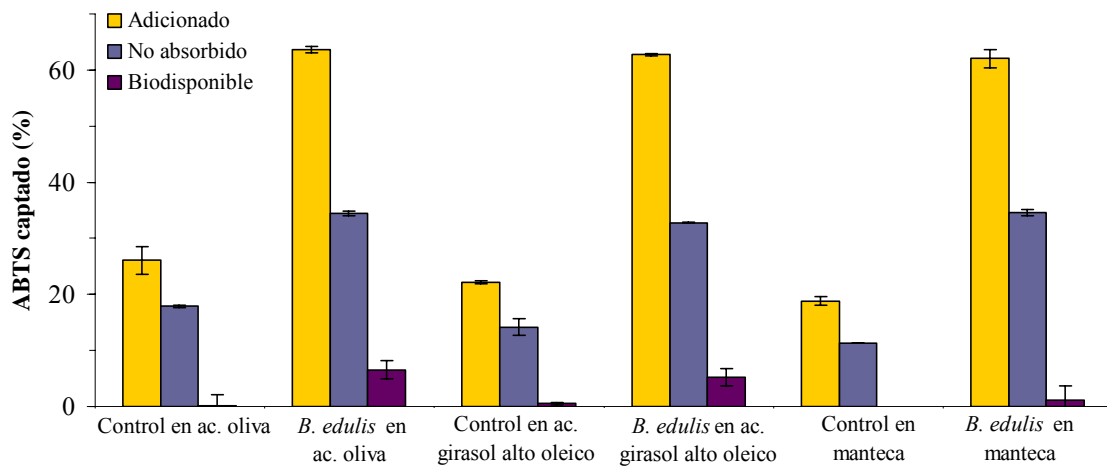


Figura 75: Capacidad de captación del radical $ABTS^{*+}$ de los extractos FB de croquetas control y con *B. edulis* (sometidas previamente a procesos de fritura usando aceites de oliva y girasol alto oleico y manteca) aplicadas a monocapas de células Caco-2 y su distribución entre los compartimentos apical (fracción no absorbida) y basolateral (fracción biodisponible) en las pruebas de absorción *in vitro*.

En los ensayos de absorción, al cabo de 3 h, se ha calculado la capacidad antioxidante de los compartimentos basolaterales (biodisponible) y de los apicales (no absorbida) tanto para las croquetas controles como para las que contienen un 2,5% de *B. edulis*. Los resultados obtenidos (figura 75) indican que aunque la fracción FB de las croquetas control aplicada a las células posee una cierta actividad antioxidante, cualquiera que sea el aceite utilizado para la fritura, ésta no es biodisponible. Sin embargo, los compuestos antioxidantes presentes en la fracción FB de las croquetas con *B. edulis* si son parcialmente biodisponibles, sobre todo en el caso de las fritas con aceite de oliva y

girasol alto oleico. También hay que tener en cuenta que la suma de la capacidad antioxidante de las fracciones biodisponible y no absorbida es menor que la capacidad antioxidante aplicada, lo que sugiere que o bien se ha producido una degradación de compuestos antioxidantes durante las 3 h de incubación de las células con el medio a 37°C o bien las células han transformado a algunos de los compuestos antioxidantes en otros de menor capacidad antioxidante.

Así pues, se puede indicar que el 10,3% de la actividad antioxidante aplicada en el caso de la FB que proviene de las croquetas fritas con aceite de oliva es biodisponible. Si las croquetas provienen de la fritura usando girasol alto oleico este valor es ligeramente inferior, 8,3%. Comparando estos valores con los datos de biodisponibilidad obtenidos tras la digestión *in vitro* y el ensayo de absorción del *B. edulis* completo (figura 66), que indicaban que un 33,4% de actividad antioxidante aplicada era biodisponible y que prácticamente no se destruían compuestos durante su incubación de 3 h con las células, se puede concluir que aunque el proceso de fritura sea más dañino para los hongos solos que cuando éstos están formando parte de una croqueta, tras el proceso de digestión y asimilación, los antioxidantes resultantes son más biodisponibles cuando se obtienen por ingesta directa del hongo en vez de en forma de croqueta. Tal vez, parte de los antioxidantes generados en el digerido de las croquetas se acomplejen con los productos de degradación de polisacáridos o proteínas.

5. Conclusiones

1.- Los extractos acuosos y metanólicos obtenidos a partir de los hongos liofilizados han presentado un rendimiento de extracción mucho mayor que los extraídos con metil *terc*-butil éter.

2.- Dentro de las especies de hongos estudiadas, los extractos metanólicos de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Boletus edulis* son los que muestran una actividad antioxidante más elevada, cuando ésta se mide como capacidad de captación del radical DPPH•, mientras que cuando se evalúa como capacidad para inhibir la formación de peróxidos, los extractos de *A. Bisporus* son mucho más activos que el resto y los de *B. edulis* no presentan actividad. Estos resultados indican que los antioxidantes presentes en los extractos metanólicos de los distintos hongos son de naturaleza diferente y tienen mecanismos de acción distintos.

3.- El análisis de dichos extractos metanólicos indica la presencia en los mismos de compuestos antioxidantes como el ergosterol, algunos tocoferoles y compuestos polares presumiblemente de origen fenólico. Sin embargo el nivel de carotenoides y ácido ascórbico detectados son insignificantes.

4.- Los extractos acuosos de *Boletus edulis*, *Lentinus edodes* y *Amanita caesarea* muestran una elevada actividad antioxidante, medida como captación del radical ABTS•⁺. Si estos extractos se incuban durante 48 horas, la capacidad de captación del radical disminuye, aunque no todas las especies de hongos se ven afectadas en la misma proporción. Este resultado indica una posible implicación de las enzimas oxidativas presentes en los hongos en la actividad antioxidante determinada.

4.- Las fracciones de bajo peso molecular (sin la presencia enzimas oxidativas) obtenidas a partir de los extractos acuosos de los hongos presentan mayor capacidad de captación del radical ABTS•⁺ que las de alto peso molecular. Cuando estas fracciones de bajo peso molecular se incuban en condiciones similares a los extractos acuosos completos, la actividad antioxidante no disminuye significativamente.

5.- El análisis de las fracciones de alto peso molecular procedentes de los extractos acuosos indica que estas fracciones están compuestas principalmente por polisacáridos

(30%) y proteínas (incluyendo a las enzimas oxidativas), mientras que las de bajo peso molecular contienen principalmente compuestos fenólicos. Así la alta capacidad antioxidante de las fracciones de bajo peso molecular se ha correlacionado con su contenido en compuestos fenólicos ($R^2=0.77$).

6.- Todas las especies de hongos estudiadas muestran actividad enzimática oxidativa debida la presencia de peroxidasas y/o polifenol oxidasas en mayor o menor medida. La concentración y actividad de estas enzimas va a influir en la capacidad antioxidante de los extractos acuosos, ya que pueden catalizar reacciones de oxidación de antioxidantes fenólicos. Sin embargo, no todos los compuestos fenólicos presentes en los extractos acuosos y que tienen capacidad antioxidante son sustratos de estas peroxidasas o polifenol oxidasas.

7.- Los extractos acuosos de los distintos hongos presentan en general una actividad antimicrobiana más alta que sus respectivos extractos metanólicos. De todas formas, solo los extractos acuosos de *L. edodes*, *P. ostreatus* y *B. edulis* son activos frente a los tres microorganismos empleados. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de los hongos aumenta, salvo para *L. edodes*, con la adición de distintos inhibidores de las enzimas oxidativas, lo que relaciona dicha actividad con la presencia en estos extractos de determinados compuestos susceptibles de sufrir oxidación por las enzimas presentes en los hongos.

8.- La actividad antiviral frente al virus del herpes simple tipo 1 de los extractos acuosos de *L. edodes*, *B. edulis* y *A. bisporus* es mayor que la que presentan sus extractos metanólicos. Los extractos acuosos de estos tres hongos son capaces de inhibir no solo la replicación intracelular del virus sino su capacidad para infectar las células cuando se añaden como pre-tratamiento o durante el proceso de adsorción del virus. Los polisacáridos presentes en estos hongos han demostrado ser los compuestos responsables de dicha capacidad antiviral.

9.- Cuando se evalúa la influencia que los distintos tratamientos culinarios tienen sobre los compuestos antioxidantes presentes en *A. bisporus*, *L. edodes* y *B. edulis*, se observa que dichos tratamientos afectan de forma significativa al nivel de antioxidantes hidrosolubles presentes, salvo en *A. bisporus*, siendo la cocción en medio acuoso

(hervido) el procedimiento más desfavorable para este tipo de compuestos mientras que la cocción en seco (plancha) es el menos dañino. Los compuestos antioxidantes solubles en metanol de los tres hongos estudiados también se ven más afectados por los tratamientos térmicos en medio acuoso que por la cocción en medio graso o en seco.

10.- El proceso de digestión *in vitro* no disminuye de forma importante la capacidad antioxidante ni de los extractos acuosos ni de los metanólicos de los hongos estudiados, siendo el tratamiento culinario un proceso mucho más agresivo para estos antioxidantes.

11.- Los ensayos de biodisponibilidad *in vitro* muestran que los compuestos antioxidantes procedentes de los hongos *A. bisporus* y *B. edulis* y tras el proceso de digestión *in vitro* son parcialmente biodisponibles ya que el 47,6 y el 33,4% respectivamente de la actividad antioxidante aplicada se ha encontrado en el compartimento basolateral. En el caso de *L. edodes* la capacidad antioxidante encontrada en el compartimento basolateral es parecida a la de la muestra inicialmente aplicada, lo que sugiere que durante el paso a través de las células se han producido transformaciones de los compuestos aplicados en otros con mayor actividad antioxidante.

12.- La adición de un 2,5% (p/p) de *B. edulis* a patés de hígado de cerdo produce un aumento considerable de la capacidad antioxidante de los mismos. Sin embargo, la adición al paté de las fracciones acuosa o metanólica obtenidas de *B. edulis*, en vez del hongo completo, no mejora la actividad antioxidante encontrada. El tratamiento térmico aplicado durante la elaboración de este producto produce una disminución de la capacidad antioxidante tanto de los patés control como los suplementados, mientras que su almacenamiento a 4°C durante 30 días no afecta a dicha capacidad antioxidante.

13.- La adición a la pasta de las croquetas de un 2,5% de *B. edulis* supone un gran incremento de la capacidad antioxidante de las mismas, mientras que la fritura de las croquetas en un tipo de grasa u otra influye muy poco en la capacidad antioxidante de este alimento. Si se comparan estos datos con los obtenidos tras la fritura directa de *B. edulis*, se puede decir que cuando los hongos se encuentran dentro de la masa de las croquetas, el proceso de fritura daña menos su capacidad antioxidante. Ésto puede deberse al efecto protector de la costra producida por las reacciones de Maillard que se forma inmediatamente al añadir las croquetas al aceite. Esta cubierta protege la masa

interior de las altas temperaturas y la aísla de la entrada de aceite evitando el contacto directo de la masa con el medio graso y las altas temperaturas empleadas.

14.- Una vez concluido el proceso de digestión, los extractos acuosos obtenidos de las diferentes croquetas muestran una mayor actividad antioxidante que antes de someterse al proceso de digestión y después de su fritura. Probablemente, las variaciones de pH junto con la actuación de las enzimas liberan compuestos más simples (péptidos, azúcares, lípidos simples, fenoles, etc.) con mayor actividad antioxidante. La biodisponibilidad *in vitro* de los compuestos antioxidantes que sobreviven a la digestión es mucho menor cuando se ingieren en forma de croqueta que si se toman directamente como hongo cocinado.

6. Bibliografia

- Anke, H., Morales, P., and Sterner, O. (1996). Assays of the biological activities of two fatty acid derivatives formed in the edible mushrooms *Cantharellus cibarius* and *C. tubaeformis* as a response to injury. *Planta medica* **62**, 181-183.
- Archibald, F., Bourbonnais, R., Jurasek, L., Paice, M., and Reid, I. (1997). Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology* **53**, 215-236.
- Aruoma, O. I., Spencer, J. P. E., and Mahmood, N. (1999). Protection against oxidative damage and cell death by the natural antioxidant ergothioneine. *Food and Chemical Toxicology* **37**, 1043-1053.
- Arya, S. P., Mahajan, M., and Jain, P. (1998). Photometric methods for determination of vitamin C. *Analytical Sciences* **14**, 889-895.
- Awadh Ali, N. A., Mothana, R. A. A., Lesnau, A., Pilgrim, H., and Lindequist, U. (2003). Antiviral activity of *Inonotus hispidus*. *Fitoterapia* **74**, 483-485.
- Bao, H. N. D., Ushio, H., and Ohshima, T. (2008). Antioxidative activity and antidiscoloration efficacy of ergothioneine in mushroom (*Flammulina velutipes*) extract added to beef and fish meats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 10032-10040.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Casal, S., Oliveira, B., and Ferreira, I. C. F. R. (2007a). Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry* **105**, 140-145.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Sa Morais, J., and Ferreira, I. C. F. R. (2007b). Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 4781-4788.
- Barros, L., Baptista, P., Estevinho, L. M., and Ferreira, I. C. F. R. (2007c). Bioactive properties of the medicinal mushroom *Leucopaxillus giganteus* mycelium obtained in the presence of different nitrogen sources. *Food Chemistry* **105**, 179-186.
- Barros, L., Baptista, P., and Ferreira, I. C. F. R. (2007d). Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food and Chemical Toxicology* **45**, 1731-1737.
- Barros, L., Calhella, R. C., Vaz, J. A., Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., and Estevinho, L. M. (2007e). Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *European Food Research and Technology* **225**, 151-156.
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. M., and Ferreira, I. C. F. R. (2008a). Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 2742-2747.
- Barros, L., Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M., and Ferreira, I. C. F. R. (2008b). Antioxidant activity of *Agaricus sp.* mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry* **111**, 61-66.
- Barros, L., Ferreira, M. J., Queirs, B., Ferreira, I. C. F. R., and Baptista, P. (2007f). Total phenols, ascorbic acid, beta-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry* **103**, 413-419.
- Barros, L., Venturini, B. A., Baptista, P., Estevinho, L. M., and Ferreira, I. C. F. R. (2008c). Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: a comprehensive study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 3856-3862.
- Bauer-Petrovska, B. (2001). Protein fractions in edible Macedonian mushrooms. *European Food Research and Technology* **212**, 469-472.
- Baynes, J. W. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* **40**, 405-412.
- Beaulieu, M., D'Apran, M. B. G., and Lacroix, M. (1999). Dose rate effect of gamma irradiation on phenolic compounds, polyphenol oxidase, and browning of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 2537-2543.
- Beltran-Garcia, M. J., Estarron-Espinosa, M., and Ogura, T. (1997). Volatile compounds secreted by the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and their antibacterial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 4049-4052.
- Benzie, I. F. F., and Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.
- Benzie, I. F. F., and Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity in biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* **299**, 15-27.
- Bestwick, C. S., and Milne, L. (2000). Effects of β -carotene on antioxidant enzyme activity, intracellular reactive oxygen and membrane integrity within post confluent Caco-2 intestinal cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1474**, 47-55.

- Bobek, P., and Galbavy, S. (1999). Hypocholesterolemic and antiatherogenic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rabbits. *Nahrung* **43**, 339-342.
- Bobek, P., and Galbavy, S. (2001). Effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon. *British Journal of Biomedical Science* **58**, 164-168.
- Borchers, A. T., Stern, J. S., Hackman, R. M., Keen, C. L., and Gershwin, E. M. (1999). Mushrooms, tumors, and immunity. *Soc. Exp. Biol. Med.* **221**, 281-293.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Bramley, P. M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F. J., Manios, Y., Roxborough, H. E., Schuch, W., Sheehy, P. J. A., and Wagner, K. H. (2000). Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 913-938.
- Brandt, C. R., and Piraino, F. (2000). Mushrooms antivirals. *Recent Res Dev Antimicrob Agents Chemother* **4**, 11-26.
- Brown, R. K., and Kelly, F. J. (1994). Evidence for increased oxidative damage in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Res* **36**, 487-493.
- Çağlarirmak, N. (2007). The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus species*) and an estimated approach to the volatile compounds. *Food Chemistry* **105**, 1188-1194.
- Çağlarirmak, N. (2009). Determination of nutrients and volatile constituents of *Agaricus bisporus* (brown) at different stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **89**, 634-638.
- Cano, A., Acosta, M., and Arnao, M. B. (2000). A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. *Redox Report* **5**, 365-370.
- Cao, G., Alessio, H. M., and Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radicals Biol. Med.* **14**, 303-311.
- Castillo, M. P., Stenström, J., and Ander, P. (1994). Determination of Manganese Peroxidase activity with 3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone and 3-(Dimethylamino)benzoic acid. *Analytical Biochemistry* **218**, 399-404.
- Cavero-Matías, S. (2003). Obtención de extractos de plantas aromáticas mediante fluidos subcríticos y supercríticos. Caracterización química y funcional. In *Departamento de Química Física Aplicada*, pp. 61. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
- Cerutti, P. A., and Trump, B. F. (1991). Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells* **3**, 1-7.
- 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. *The Journal of nutrition* **121**, 445-453.
- Clifford, M. N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1033-1043.
- Colins, R. A., and Ng, T. B. (1997). Polysaccharopeptide from *Coriolus versicolor* has potential for use against human immunodeficiency virus type 1 infection. *Life Sciences* **60**, PL383-387.
- Colognato, R., Laurenza, I., Fontana, I., Coppedè, F., Siciliano, G., Coecke, S., Aruoma, O. I., Benzi, L., and Migliore, L. (2006). Modulation of hydrogen peroxide-induced DNA damage, MAPKs activation and cell death in PC12 by ergothioneine. *Clinical Nutrition* **25**, 135-145.
- Coppens, P., Fernandes, S. M., and Petmann, S. (2006). European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods. A framework based on safety. *Toxicology* **221**, 59-74.
- Cuvelier, M. E., Berset, C., and Richard, H. (1994). Antioxidant constituents in Sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**, 665-669.
- Cheung, L. M., and Cheung, P. C. K. (2005). Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry* **89**, 403-409.
- Cheung, L. M., Cheung, P. C. K., and Ooi, V. E. C. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry* **81**, 249-255.
- Cheung, P. C. (2008). *Mushrooms as Functional Foods*. John Wiley & Sons.
- Chihara, G. (1992). Immunopharmacology of lentinan, a polysaccharide isolated from *Lentinus edodes*: its application as a host defense potentiator. *International Journal of Oriental Medicine* **17**, 57-77.
- Choi, Y., Lee, S. M., Chun, J., Lee, H. B., and Lee, J. (2006). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry* **99**, 381-387.
- Choi, Y. M., Ku, J. B., Chang, H. B., and Lee, J. (2005). Antioxidant activities and total phenolics of ethanol extracts from several edible mushrooms produced in Korea. *Food Science & Biotechnology* **14**, 700-703.

- Christensen, J. Ø., Schultz, K., Mollgaard, B., Kristensen, H. G., and Mullertz, A. (2004). Solubilisation of poorly water-soluble drugs during in vitro lipolysis of medium- and long-chain triacylglycerols. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **23**, 287-296.
- Chu, K. T., Xia, L., and Ng, T. B. (2005). Pleurostrin, an antifungal peptide from the oyster mushroom. *Peptides* **26**, 2098-2103.
- Chun, L. R., and Cui, F. X. (2002). Analysis of POD and EST isozyme of three *Agaricus* species. *Edible Fungi of China* **21**, 34-36
- Chung, H. Y., Choi, H. R., Park, H. J., Choi, J. S., and Choi, W. C. (2001). Peroxynitrite scavenging and cytoprotective activity of 2,3,6-Tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether from the marine alga *Symphyclocladia latiuscula*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 3614-3621.
- Danell, E., and Eaker, D. (1992). Amino acid and total protein content of the edible mushroom *Cantharellus cibarus* (Fries). *J. Sci. Agric.* **60**, 333-337.
- Davey, M., W., Van Montagu, M., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I. J. J., Strain, J. J., Favell, D., and Fletcher, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 825-860.
- Deiana, M., Rosa, A., Casu, V., Piga, R., Assunta Dessì, M., and Aruoma, O. I. (2004). L-Ergothioneine modulates oxidative damage in the kidney and liver of rats in vivo: studies upon the profile of polyunsaturated fatty acids. *Clinical Nutrition* **23**, 183-193.
- Devcich, D. A., Pedersen, I. K., and Petrie, K. J. (2007). You eat what you are: Modern health worries and the acceptance of natural and synthetic additives in functional foods. *Appetite* **48**, 333-337.
- Dias-Ferreira-Polónia, M. I. d. G. (2003). Evaluation of olive mill waste as substrate to produce *Pleurotus* mushrooms. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto superior de Agronomia. Escola Superior Agrária de Santarém, Portugal.
- Dihal, A. A., Woutersen, R. A., Ommen, B. v., Rietjens, I. M. C. M., and Stierum, R. H. (2006). Modulatory effects of quercetin on proliferation and differentiation of the human colorectal cell line Caco-2. *Cancer Letters* **238**, 248-259.
- Dikeman, C. L., Bauer, L. L., Flickinger, E. A., and Fahey, G. C. (2005). Effects of stage of maturity and cooking on the chemical composition of select mushroom varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1130-1138.
- Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, F. B., and Roberfroid, M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition* **81**, S1-S28.
- Dubost, N. J., Beelman, R. B., Peterson, D., and Royse, D. J. (2006). Identification and quantification of ergothioneine in cultivated mushrooms by liquid chromatography-mass spectrometry. *Int. J. Med. Mushrooms* **8**, 215-222.
- Dubost, N. J., Ou, B., and Beelman, R. B. (2007). Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry* **105**, 727-735.
- Edabi, M., Srinivasan, S. K., and Baxi, M. D. (1996). Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* **48**, 1-19.
- El-Mekkawy, S., Meselhy, M. R., Nakamura, N., Tezuka, Y., Hattori, M., and Kakiuchi, N. (1998). Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* **49**, 1651-1657.
- Elmastas, M., Isildak, O., Turkecul, I., and Temur, N. (2007). Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis* **20**, 337-345.
- Eo, S.-K., Kim, Y.-S., Lee, C.-K., and Han, S.-S. (2000). Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simplex viruses. *Journal of Ethnopharmacology* **72**, 475-481.
- Espín, J. C., Morales, M., García-Ruiz, P. A., Tudela, J., and García-Cánovas, F. (1997). Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 1084-1090.
- Espín, J. C., Soler-Rivas, C., Cantos, E., Tomás-Barberán, F. A., and Wichers, H. J. (2001). Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 1187-1193.
- Espín, J. C., Soler-Rivas, C., and Wichers, H. J. (2000). Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 648-656.

- Estévez, M., Ramírez, R., Ventanas, S., and Cava, R. (2007). Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté. *LWT - Food Science and Technology* **40**, 58-65.
- Ey, J., Schomig, E., and Taubert, D. (2007). Dietary sources and antioxidant effects of ergothioneine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 6466-6474.
- Faccin, L. C., Benati, F., Rincão, V. P., Mantovani, M. S., Soares, S. A., Gonzaga, M. L., Nozawa, C., and Carvalho Linhares, R. E. (2007). Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. *Letters in applied microbiology* **45**, 24-28.
- Falandysz, J. (2008). Selenium in edible mushrooms. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews* **26**, 256-299.
- Fan, L., Soccol, A. T., Pandey, A., and Soccol, C. R. (2007). Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. *LWT - Food Science and Technology* **40**, 30-35.
- Farooq, A., Amer, J., Shahid, I., and Munir, A. S. (2006). Antioxidant activity of various plant extracts under ambient and accelerated storage of sunflower oil. *GRASAS Y ACEITES* **57**, 189-197.
- Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., Vilas-Boas, M., and Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry* **100**, 1511-1516.
- Fidge, N. H. (1993). Fighting high cholesterol levels-lipid lowering drugs. *The Medical Journal of Australia* **159**, 815-819.
- Fox, J. D., and Robyt, J. F. (1991). Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. *Analytical Biochemistry* **195**, 93-96.
- Frankel, E. N., and Meyer, A. S. (2000). Review. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1925-1941.
- Franzoni, F., Colognato, R., Galetta, F., Laurenza, I., Barsotti, M., Di Stefano, R., Bocchetti, R., Regoli, F., Carpi, A., Balbarini, A., Migliore, L., and Santoro, G. (2006). An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **60**, 453-457.
- Fu, H. Y., and Shieh, D. E. (2002). Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *Journal of Food Lipids* **9**, 35-46.
- Fujihara, S., Kasuga, A., Aoyagi, Y., and Sugahara, T. (1995). Nitrogen-to-protein conversion factors for some common edible mushrooms. *J. Food Sci.* **60**, 1045-1047.
- Furlani, R. P. Z., and Godoy, H. T. (2008). Vitamins B₁ and B₂ contents in cultivated mushrooms. *Food Chemistry* **106**, 816-819.
- Ganguli, A., Ghosh, M., and Singh, N. (2006). Antioxidant activities and total phenolics of pickles produced from the edible mushroom, *Agaricus bisporus*. *Journal of Culinary Science & Technology* **5**, 131-142.
- Gao, Y., Tang, W., Gao, H., Chan, E., Lan, J., Li, X., and Zhou, S. (2005). Antimicrobial activity of the medicinal mushroom *Ganoderma*. *Food Reviews International* **21**, 211-229.
- García-Mendoza, C. (2002). El cultivo de los hongos superiores comestibles, un recurso de desarrollo ineludible en el s. XXI. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* **44**, 753-776.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., and Ferro-Luzzi, A. (1995). A fluorescence based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radicals Biol. Med.* **18**, 29-36.
- Gi-Young, K., Moo-Yeol, L., Hee-Jeong, L., Dong-Oh, M., and others. (2005). Effect of water soluble proteoglycan isolated from *Agaricus blazei* on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *International Immunopharmacology* **5**, 1523-1532.
- Glazer, A. N. (1990). Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods Enzymol.* **186**, 161-168.
- Guillén-Sans, R., and Guzmán-Chozas, M. (1998). The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **38**, 315-330.
- Gurr, M. I. (1996). The oxidation hypothesis of coronary heart disease (CHD). *Nut Newslett* **5**, 10-15.
- Hajjaj, H., Macé, C., Roberts, M., Niederberger, P., and Fay, L. B. (2005). Effect of 26-oxygenosterols from *Ganoderma lucidum* and their activity as cholesterol synthesis inhibitors. *Applied and environmental microbiology* **71**, 3653-3658.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radicals Biol. Med.* **18**, 125-126.

- Hammond, J. B. W., Nichols, R. (1975). Changes in respiration and soluble carbohydrates during the post-harvest storage of mushroom (*Agaricus bisporus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **26**, 835-842.
- Han, J., Weng, X. and Bi, K. (2008). Antioxidants from a Chinese medicinal herb – *Lithospermum erythrorhizon*. *Food Chemistry*, **106**, 2-10.
- Harman, D. (1994). Free-radical theory of aging: Increasing the functional life span. *Ann NY Acad Sci* **717**, 1-15.
- Harrowven, D. C., Lucas, M. C., and Howes, P. D. (2001). The first total synthesis of (\pm)-1-desoxyhypnophilin. *Tetrahedron* **57**, 9157-9162.
- Hatvani, N. (2001). Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents* **17**, 71-74.
- Hirasawa, M., Shouji, N., Neta, T., Fukushima, K., and Takada, K. (1999). Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). *International Journal of Antimicrobial Agents* **11**, 151-157.
- Ho, B., and Chen, Q. (1991). Antifertility action of *Auricularia auricula* polysaccharide. *Zhongguo Yacke Daxus Xuebao* **22**, 48-49.
- Hobbs, C. (1995). Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing and culture. In *Botanica Press* Santa Cruz, CA.
- Hollman, P. C. H., and Arts, I. C. W. (2000). Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1081-1093.
- Hu, S. H., Liang, Z. C., Chia, Y. C., Lien, J. L., Chen, K. S., Lee, M. Y., and Wang, J. C. (2006). Antihyperlipidemic and antioxidant effects of extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 2103-2110.
- Hui-Yin, F., and Den-en, S. (2002). Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *Journal of food Lipids* **9**, 35-46.
- Ichimura, T., Watanabe, O., and Maruyama, S. (1998). Inhibition of HIV-1 protease by water-soluble lignin-like substance from an edible mushroom, *Fuscoporia obliqua*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **62**, 575-577.
- Itoh, M., Kawada, S., Yamamoto, N., Endo, K., Hagiwara, M., Harami, A., and Ohmura, T. (1981). Effect of the eritadenine feeding on the plasma and liver lipids in rats. *Eiyo to Shokuryo (J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.)* **34**, 65-69.
- Iwalokun, B. A., Usen, U. A., Otunba, A. A., and Olukoya, D. K. (2007). Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. *African Journal of Biotechnology* **6**, 1732-1739.
- Jacob, R. A. (1995). The integrated antioxidant system. *Nut Res* **15**, 755-766.
- Jaworska, G., and Bernas, E. (2009). The effect of preliminary processing and period of storage on the quality of frozen *Boletus edulis* (Bull. Fr.) mushrooms. *Food Chemistry* **113**, 936-943.
- Jayakumar, T., Thomas, P. A., and Geraldine, P. (2009). In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **10**, 228-234.
- Jeurink, P. V., Noguera, C. L., Savelkoul, H. F. J., and Wichers, H. J. (2008). Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology* **8**, 1124-1133.
- Johannes, C., and Majcherczyk, A. (2000). Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology* **78**, 193-199.
- Johl, P. P., Sodhi, H. S., Dhanda, S., and Kapoor, S. (1995-96). Mushroom as medicine - a review. *J. Plant Sci. Res* **73**, 11-12.
- Jolivet, S., Voiland, A., Pellon, G., and Arpin, N. (1995). Main factors involved in the browning of *Agaricus bisporus*. *Mushroom Science* **XIV**, 695-702.
- Jong, S. C., and Birmingham, J. M. (1992). Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. *Advances in Applied Microbiology* **37**, 101-134.
- Kahn, V., and Andrawis, A. (1985). Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone. *Phytochemistry* **24**, 905-908.
- Kalac, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry* **113**, 9-16.
- Kanda, K., Sato, T., Ishii, S., Enei, H., and Ejiri, S. (1996). Purification and properties of tyrosinase isozymes from the gill of *Lentinus edodes* fruiting body. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **60**, 1273-1278

- Kim, Y.-S., Eo, S.-K., Oh, K.-W., Lee, C.-k., and Han, S.-S. (2000). Antiherpetic activities of acidic protein bound polysacchride isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with interferons. *Journal of Ethnopharmacology* **72**, 451-458.
- Kitzberger, C. S. G., Smânia Jr, A., Pedrosa, R. C., and Ferreira, S. R. S. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering* **80**, 631-638.
- Ko, Y.-T., and Lin, Y.-L. (2004). 1,3-beta-glucan quantification by a fluorescence microassay and analysis of its distribution in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 3313-3318.
- Kobori, M., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama, M., and Shinmoto, H. (2007). Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. *British Journal of Pharmacology* **150**, 209-219.
- Komemushi, S., Yamamoto, Y., and Fujita, T. (1996). Purification and identification of antimicrobial substances produced by *Lentinus edodes*. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents, Japan* **24**, 21-25.
- Kurzman, R. H. (1997). Jr. Nutrition from mushrooms, understading and reconciling available data. *Mycoscience* **38**, 247-253.
- Lankinen, P., Hilden, K., Aro, N., Salkinoja-Salonen, M., and Hatakka, A. (2004). Manganese peroxidase of *Agaricus bisporus*: grain bran-promoted production and gene characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**, 401-407.
- Larumbe, E. (2007). Estrategias push and pull de marketing en el sector de setas y champiñones. *En: Propiedades saludables del consumo de champiñón. Actas de I Jornada sobre champiñón. Logroño, España*, 63-78.
- Lavi, I., Friesem, D., Geresh, S., Hadar, Y., and 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**, 61-70.
- Lee, E. J., and Jang, H. D. (2004). Antioxidant activity and protective effect of five edible mushrooms on oxidative DNA damage. *Food Science and Biotechnology* **13**, 443-449.
- Lee, S. J., Yeo, W. H., Yun, B. S., and Yoo, I. D. (1999). Isolation and sequence analysis of new peptaibol, boletusin, from *Boletus spp.* *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **5**, 374-378.
- Leung, M. Y. K., Fung, K. P., and Choy, Y. M. (1997). The isolation and characterization of an immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*. *Immunopharmacology* **35**, 255-263.
- Li, L., Ng, T. B., Song, M., Yuan, F., Liu, Z. K., Wang, C. L., Jiang, Y., Fu, M., Liu, F. (2007). A polysaccharide-peptide complex from abalone mushroom (*Pleurotus abalonus*) fruiting bodies increases activities and gene expression of antioxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in senescence-accelerated mice. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**, 863-869.
- Lim, H. W., Yoon, J. H., Kim, Y. S., Lee, M. W., Park, S. Y., and Choi, H. K. (2007). Free radical-scavenging and inhibition of nitric oxide production by four grades of pine mushroom (*Tricholoma matsutake* sing.). *Food Chemistry* **103**, 1337-1342.
- Lin, R. I. S. (1995). Phytochemicals and antioxidants. En: Goldberg IE (Ed). In *Functional foods*, pp. 393-441, Chapman and Hall, New York.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T. H. J., and Jülich, W. D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2**, 285-299.
- Liu, F., Ooi, V. E. C., and Chang, S. T. (1997). Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences* **60**, 763-771.
- Liu, G. T. (1999). Recent advances in research of pharmacology and clinical applications of *Ganoderma* (P. Korst.) species (Aphyllorphoromycetidae) in China. *International Journal of Medicinal Mushrooms* **1**, 63-67.
- Luo, D.-Q., Wang, F., Bian, X.-Y., and Liu, J.-K. (2005). Rufuslactone, a new antifungal sesquiterpene from the fruiting bodies of the basidiomycete *Lactarius rufus*. *The Journal of antibiotics* **58**, 456-459.
- Lyras, L., Cairns, N. J., Jenner, A., Jenner, P., and Halliwell, B. (1997). An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* **68**, 2061-2069.
- Madhavi, D. L., Deshpande, S. S., and Salunkhe, D. K. (1996). *Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Mantovani, M. S., Bellini, M. F., Angeli, J. P. F., Oliveira, R. J., Silva, A. F., and Ribeiro, L. R. (2008). β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **658**, 154-161.

- Manzi, P., Aguzzi, A., and Pizzoferrato, L. (2001). Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry* **73**, 321-325.
- Manzi, P., Marconi, S., Aguzzi, A., and Pizzoferrato, L. (2004). Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry* **84**, 201-206.
- Marco, G. J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **45**, 594-598.
- Mata, G., and Savoie, J. M. (1998). Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**, 513-519.
- Mattila, P., Könkö, K., Eurola, M., Pihlava, J. M., Astola, J., Vahteristo, L., Hietaniemi, V., Kumpulainen, J., Valtonen, M., and Piironen, V. (2001). Contents of vitamins, mineral elements and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 2343-2348.
- Mattila, P., Lampi, A. M., Ronkainen, R., Toivo, J., and Piironen, V. (2002a). Sterol and vitamin D₂ contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry* **76**, 293-298.
- Mattila, P., Ronkainen, R., Lehikoinen, K., and Piironen, V. (1999). Effect of household cooking on the Vitamin D content in fish, eggs, and wild mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis* **12**, 153-160.
- Mattila, P., Salo-Väänänen, P., Könkö, K., Aro, H., and Jalava, T. (2002b). Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. *Journal Agricultural of Food Chemistry* **50**, 6419-6422.
- Mattila, P., Suonpää, K., and Piironen, V. (2000). Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition* **16**, 694-696.
- Mau, J.-L., Chao, G.-R., and Wu, K.-T. (2001). Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 5461-5467.
- Mau, J. L., Chang, C. N., Huang, S. J., and Chen, C. C. (2004). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chemistry* **87**, 111-118.
- Mau, J. L., Lin, H. C., and Song, S. F. (2002). Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Research International* **35**, 519-526.
- Mdachi, S. J. M., Nkunya, M. H. H., Nyigo, V. A., and Urasa, I. T. (2004). Amino acid composition of some Tanzanian wild mushrooms. *Food Chemistry* **86**, 179-182.
- Mentel, R., Meinsen, D., Pilgrim, H., Herrmann, B., and Lindequist, U. (1994). In vitro antiviral effect of extracts of *Kuehmeromyces mutabilis* on influenza virus. *Pharmazie* **49**, 859-860.
- Miles, P. G., and Chang, S. T. (1997). Mushroom Biology, Concise Basics and Current Developments
- Miller, D. D., Schrickler, B. R., Rasmussen, R. R., and Campen, D. v. (1981). An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition* **34**, 2248-2256.
- Miller, H. E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **48**, 91-93.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., and Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science (London, England : 1979)* **84**, 407-412.
- Moon, J.-K., and Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 1655-1666.
- Mothana, R. A. A., Awadh, N. A. A., Jansen, R., Wegner, U., Mentel, R., and Lindequist, U. (2003). Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi* BRES. *Fitoterapia* **74**, 177-180.
- Mothana, R. A. A., Jansen, R., Julich, W.-D., and Lindequist, U. (2000). Ganomycins A and B, New antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. *Journal of Natural Products* **63**, 416-418.
- Mueller, L. A., Hinz, U., and Zrýd, J. P. (1996). Characterization of a tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis. *Phytochemistry* **42**, 1511-1515.
- Nayana, J., and Janardhanan, K. K. (2000). Antioxidant and antitumor activity of *Pleurotus florida*. *Current Science* **79**, 941-943.
- Ng, T. B., and Wang, H. X. (2004). A homodimeric laccase with unique characteristics from the yellow mushroom *Cantharellus cibarius*. *Biochem Bioph Res Commun* **313**, 37-41
- Ngai, P. H. K., and Ng, T. B. (2003). Lentin, a novel and potent antifungal protein from shiitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. *Life Sciences* **73**, 3363-3374.

- Nikolovska-Coleska, Z., Dorevski, L., Klisarova, L., and Suturkova-Milosevic, L. (1995). Identification of phenolic constituents isolated from Macedonian propolis. *Bulletin of the Chemist and Technologist of Macedonia* **14**, 13-17.
- Noda, S. (1998). A preparation for kidney treatment possessing antiinflammatory activity, obtained from Basidiomycetes, e.g. *Lentinus*, *Pleurotus*, *Flammulina*, and *Tricholoma*. Patent JPJ 61171428 (1986) JP 85-11888 (1985).
- Noguchi, N., and Niki, E. (1999). Chemistry of active oxygen species and antioxidants. En: Papas AM (Ed.). In *Antioxidant status, diet, nutrition, and health.*, pp. 3-20, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Okamura, M. (1994). Distribution of ascorbic acid analogs and associated glycosides in mushrooms. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **40**, 81-94.
- Okamura, M. (1998). Separative determination of ascorbic acid analogs contained in mushrooms by high-performance liquid chromatography. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **44**, 25-35.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., and Prior, R. L. (2001). Development and validation of a improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **49**, 4619-4626
- Ouzouni, P. K., and Riganakos, K. A. (2007). Nutritional value and metal content of Greek wild edible fungi. *Acta Alimentaria* **36**, 99-110.
- Parthasarathy, S., and Rankin, S. M. (1992). Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Prog Lipid Res* **31**, 127-143.
- Porter, C. J. H., Pouton, C. W., Cuine, J. F., and Charman, W. N. (2008). Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 673-691.
- Prior, R. L., Wu, X., and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agricultural of Food Chemistry* **53**, 4290-4302.
- Pulido-Ferrer, R. (2003). Metodología para la determinación del estado antioxidante. Aplicación al estudio de efectos in vivo de la ingesta de antioxidantes naturales. In *Química Física Aplicada (UAM) y Metabolismo y Nutrición (CSIC)*. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
- Puttaraju, N. G., Venkateshaiah, S. U., Dharmesh, S. M., Urs, S. M. N., and Somasundaram, R. (2006). Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 9764-9772.
- Rajaratnam, S., Shashirekha, M. N. J., and Bano, Z. (1998). Biodegradative and biosynthetic capacities of mushrooms: present and future strategies. *Critical Reviews in Biotechnology* **18**, 91-236.
- Ratcliffe, B., Flurkey, W. H., Kuglin, J., and Dawley, R. (1994). Tyrosinase, laccase, and peroxidase in mushrooms (*Agaricus*, *Crimini*, *Oyster*, and *Shiitake*). *Journal of Food Science* **59**, 824-827
- Ribeiro, B., Lopes, R., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Gonçalves, R. F., Baptista, P., Quelhas, I., and Valentão, P. (2008). Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. *Food Chemistry* **110**, 47-56.
- Ribeiro, B., Rangel, J., Valentão, P., Baptista, P., Seabra, R. M., and Andrade, P. B. (2006). Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried portuguese wild edible mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry* **54**, 8530-8537.
- Rice-Evans, C., and Miller, N. J. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymology* **234**, 279-293.
- Roginsky, V., and Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* **92**, 235-254.
- Rojano, B. A., Gavia, C. A., and Sáez, J. A. (2008). Antioxidant activity determination in a lipidic peroxidation model of butter inhibited by isoosipintanol. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* **15**, 212-218.
- Rowan, N. J., Smith, J. E., and Sullivan, R. (2002). Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. *University Of Strathclyde / Cancer Research UK*, 21-42.
- Ruiz-Rodriguez, A., Marín, F., Ocaña, A., and Soler-Rivas, C. (2008). Effect of domestic processing on bioactive compounds. *Phytochemistry Reviews* **7**, 345-384.
- Saito, M., and Kuwahara, S. (2005). Enantioselective total synthesis of enokipodins A-D antimicrobial sesquiterpenes produced by the mushroom *Flammulina velutipes*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **69**, 374-381.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., and Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* **76**, 270-276.

- Santos-Buelga, C., and Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1094-1117.
- Sarang, I., Ghosh, D., Bhutia, S. K., Mallick, S. K., and Maiti, T. K. (2006). Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *International Immunopharmacology* **6**, 1287-1297.
- Sarikurkcu, C., Tepe, B., and Yamac, M. (2008). Evaluation of the antioxidant activity of four edible mushrooms from the Central Anatolia, Eskisehir - Turkey: *Lactarius deterrimus*, *Suillus collitinus*, *Boletus edulis*, *Xerocomus chrysenteron*. *Bioresource Technology* **99**, 6651-6655.
- Savoie, J. M., Minvielle, N., and Largeteau, M. L. (2008). Radical-scavenging properties of extracts from the white button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88**, 970-975.
- Shamtsyan, M., Konusova, V., Maksimova, Y., Goloshchev, A., Panchenko, A., Simbirtsev, A., Petrishchev, N., and Denisova, N. (2004). Immunomodulating and anti-tumor action of extracts of several mushrooms. *Journal of Biotechnology* **113**, 77-83.
- Shi, Y. L., Benzie, I. F. F., and Buswell, J. A. (2002). Role of tyrosinase in the genoprotective effect of the edible mushroom, *Agaricus bisporus*. *Life Sciences* **70**, 1595-1608.
- Shimada, Y., Morita, T., and Sugiyama, K. (2003). Eritadenine-induced alterations of plasma lipoprotein lipid concentrations and phosphatidylcholine molecular species profile in rats fed cholesterol-free and cholesterol-enriched diets. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **67**, 996-1006.
- Shiuan, C. (2007). Propiedades saludables del consumo del champiñón. Propiedades anticancerígenas de los champiñones, pp. 39, 40.
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* **215**, 213-219.
- Signore, A. d., Romeo, F., and Giaccio, M. (1997). Content of phenolic substances in basidiomycetes. *Mycological Research* **101**, 552-556.
- Silva, J. F. M., Souza, M. C., Matta, S. R., Andrade, M. R., and Vidal, F. V. N. (2006). Correlation analysis between phenolic levels of *Brazilian propolis* extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food chemistry* **99**, 431-435.
- Soares, A. A., Marques de Souza, C. G., Daniel, F. M., Ferrari, G. P., Gomes da Costa, S. M., and Peralta, R. M. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. *Food Chemistry* **112**, 775-781.
- Soler-Rivas, C., Espín, J. C., and Wichers, H. J. (2000). An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis* **11**, 330-338.
- Soler-Rivas, C., Jolivet, S., Arpin, N., Olivier, J. M., and Wichers, H. J. (1999). Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiology Reviews* **23**, 591-614.
- Soler-Rivas, C., Jolivet, S., Yuksel, D., Arpin, N., Olivier, J. M., and Wichers, H. J. (1998). Analysis of *Agaricus bisporus* tyrosinase activation and phenolics utilization during *Pseudomonas tolaasii* or tolaasin-induced discolouration. *Mycological Research* **102**, 1497-1502.
- Soler Rivas, C., Espín, J. C., and Wichers, H. J. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1013-1023.
- Soler Rivas, C., Jolivet, S., Yuksel, D., Arpin, N., Olivier, J. M., and Wichers, H. J. (1998). Analysis of *Agaricus bisporus* tyrosinase activation and phenolics utilization during *Pseudomonas tolaasii* or tolaasin-induced discolouration. *Mycological Research* **102**, 1497-1502.
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., and Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **579**, 200-213.
- Spector, A. (1995). Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action *FASEB J* **9**, 1173-1182.
- Spolar, M. R., Schaffer, E. M., Beelman, R. B., and Milner, J. A. (1999). Selenium-enriched *Agaricus bisporus* mushrooms suppress 7,12-dimethylbenz[a]anthracene bioactivation in mammary tissue. *Cancer letters* **138**, 145-150.
- Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., and Schimper, A. F. (1986). *Tratado de botánica*. Editorial Marín S.A. Barcelona.
- Sugimura, T. (2002). Food and cancer. *Toxicology* **181-182**, 17-21.
- Takazawa, H., Tajima, F., and Miyashita, C. (1982). An antifungal compound from Shiitake (*Lentinus edodes*). *Yakugaku Zasshi* **102**, 489-491.
- Tatarko, M., and Bumpus, J. A. (1997). Further studies on the inactivation by sodium azide of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **339**, 200-209.

- Teichmann, A., Dutta, P. C., Staffas, A., and Jägerstad, M. (2007). Sterol and vitamin D₂ concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effects of UV irradiation. *LWT - Food Science and Technology* **40**, 815-822.
- Tietz, N. W., Rinker, A. D., and Shaw, L. M. (1983). IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes: Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase (orthophosphoric-monoester phosphohydrolase, alkaline optimum, EC 3.1.3.1). *Clinica Chimica Acta* **135**, 339-349.
- Tomás-Barberán, F. A., and Clifford, M. N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1024-1032.
- Tressl, R., Bahri, D., and Engel, K. H. (1982). Formation of eight-carbon and ten-carbon components in mushrooms (*Agaricus campestris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **30**, 89-93.
- Tsai, S.-Y., Huang, S.-J., Lo, S.-H., Wu, T.-P., Lian, P.-Y., and Mau, J.-L. (2009). Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. *Food Chemistry* **113**, 578-584.
- Tsai, S.-Y., Tsai, H.-L., and Mau, J.-L. (2007). Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *LWT - Food Science and Technology* **40**, 1392-1402.
- Tsai, S. Y., Wu, T. P., Huang, S. J., and Mau, J. L. (2008). Antioxidant properties of ethanolic extracts from culinary-medicinal button mushroom *Agaricus bisporus* (J.Lange) Imbach (Agaricomycetidae) harvested at different stages of maturity. *International Journal of Medicinal Mushrooms* **10**, 127-137.
- Turkoglu, A., Duru, M. E., Mercan, N., Kivrak, I., and Gezer, K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry* **101**, 267-273.
- Valero, E., Varon, R., and Garcia-Carmona, F. (1992). Kinetic study of the effect of metabisulfite on polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 904-908.
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F. A., and García-Viguera, C. (2003). Phenolic compound contents in edible parts of broccoli inflorescences after domestic cooking. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**, 1511-1516.
- Van den Berg, H., Faulks, R., Fernando Granado, H., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S., and Stahl, W. (2000). The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 880-912.
- Vattem, D. A., Lin, Y. T., Labbe, R. G., and Shetty, K. (2004). Phenolic antioxidant mobilization in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using food grade fungus *Lentinus edodes* and effect on antimicrobial activity against select food borne pathogens. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **5**, 81-91.
- Vetter, J., and Rimóczi, I. (1993). Crude, digestible and indigestible fruit body proteins in oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **197**, 427-428.
- Wachtel-Galor, S., Tomlinson, B., and Benzie, I. F. F. (2004). *Ganoderma lucidum* ("Lingzhi"), a Chinese medicinal mushroom: biomarker responses in a controlled human supplementation study. *British Journal of Nutrition* **91**, 263-269.
- Wang, H., and Ng, T. B. (2004). Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides* **25**, 1-5.
- Wang, H. X., and Ng, T. B. (2000). Isolation of a novel ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostreatus* mushroom with Anti-Human Immunodeficiency Virus, Translation-Inhibitory, and Ribonuclease Activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **276**, 587-593.
- Wang, H. X., and Ng, T. B. (2001). Isolation and characterization of velutin, a novel low-molecular-weight ribosome-inactivating protein from winter mushroom (*Flammulina velutipes*) fruiting bodies. *Life Sciences* **68**, 2151-2158.
- Wang, S. Y., Hsu, M. L., Hsu, H. C., Tzeng, C. H., Lee, S. S., Shiao, M. S., and Ho, C. K. (1997). The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *International Journal of Cancer* **70**, 699-705.
- Wasser, S. P., and Weis, A. L. (1999a). Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms* **1**, 31-62.
- Wasser, S. P., and Weis, A. L. (1999b). Therapeutic effect of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit. Rev. Immunol.* **19**, 65-96.
- Wichers, H. J., Recourt, K., Hendriks, M., Ebbelaar, C. E. M., Biancone, G., Hoeberichts, F. A., Mooibroek, H., and Soler-Rivas, C. (2003). Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**, 336-341.

- Wiseman, H. (1993). Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS Letters* **326**, 285-288.
- Wong, C. K., Leung, K. N., Fung, K. P., and Choy, Y. M. (1994a). Effects of *Pseudostellaria heterophylla* on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **16**, 71-84.
- Wong, C. K., Leung, K. N., Fung, K. P., and Choy, Y. M. (1994b). Immunomodulatory and anti-tumor polysaccharides from medicinal plants. *J. Int. Med. Res.* **22**, 299-312.
- Wong, C. K., Leung, K. N., Fung, K. P., and Choy, Y. M. (1994c). The induction of cytokine gene expression in murine peritoneal macrophages by *Pseudostellaria heterophylla*. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **16**, 347-357.
- Wong, J. W., Hashimoto, K., and Shibamoto, T. (1995). Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and Vitamin E in a model meat system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 2707-2712.
- Yamaguchi, M., Hwang, P. M., and Campbell, J. D. (1970). Latent *o*-diphenol oxidase in mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Can J Biochem* **48**, 198-202.
- Yang, J. H., Lin, H. C., and Mau, J. L. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* **77**, 229-235.
- Yen, M.-T., Tseng, Y.-H., Li, R.-C., and Mau, J.-L. (2007). Antioxidant properties of fungal chitosan from shiitake stipes. *LWT - Food Science and Technology* **40**, 255-261.
- Yoon, S. Y., Eo, S. K., Kim, Y. S., Lee, C. K., and Han, S. S. (1994). Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics. *Archives of pharmacal research* **17**, 438-442.
- Yoshida, M., Kato, S., Oguri, S., and Nagata, Y. (1994). Purification and properties of lectins from a mushroom *Pleurotus cornucopiae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **58**, 498-501.
- Yu, Z. H., Yin, L. H., Yang, Q., and Liu, Y. (2009). Effect of *Lentinus edodes* polysaccharide on oxidative stress, immunity activity and oral ulceration of rats stimulated by phenol. *Carbohydrate Polymers* **75**, 115-118.
- Zhang, M., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C., and Zhang, L. (2004). Evaluation of sulfated fungal β -glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent. *Carbohydrate Research* **339**, 2297-2301.
- Zhao, H., Kalivendi, S., Zhang, H., Joseph, J., Nithipatikom, K., and Vasquez-Vivar, J. (1999). Dose rate effect of γ irradiation on phenolic compounds, polyphenol oxidase, and browning of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 2537-2543.
- Zheng, R., Jie, S., Hanchuan, D., and Moucheng, W. (2005). Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *International Immunopharmacology* **5**, 811-820.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., and Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* **64**, 555-559.
- Zhou, K., and Yu, L. (2006). Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado. *LWT - Food Science and Technology* **39**, 1155-1162.
- Zhuang, C., and Mizuno, T. (1999). Biological responses from *Grifola frondosa* (Dick.: Fr. (S.F. Gray-Maitake (Aphylophoromycetidae)). *International Journal of Medicinal Mushrooms* **1**, 317-324.

**Anexo I. Publicaciones a las
que ha dado lugar esta tesis**

1. A.C. Ramírez-Anguiano, S. Santoyo, G. Reglero, C. Soler-Rivas. (2007). Radical scavenging activities, endogenous oxidative enzymes and total phenols in edible mushrooms commonly consumed in Europe. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87, 2272-2278.
2. S. Santoyo, A.C. Ramírez-Anguiano, G. Reglero, C. Soler-Rivas. (2009). Improvement of the antimicrobial activity of edible mushrooms extracts by inhibition of oxidative enzymes. *International Journal of Food Science and Technology*. “en prensa”.
3. C. Soler-Rivas, A.C. Ramírez-Anguiano, G. Reglero, S. Santoyo. Enhancing antioxidant activities of liver pâté by *Boletus edulis* supplementation. *Journal of Food Biochemistry*. (aceptada).
4. S. Santoyo, A.C. Ramírez-Anguiano, G. Reglero, C. Soler-Rivas. Antiviral activities of methanol and water extracts obtained from *Boletus edulis*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes* fruiting bodies against Herpes simplex virus type 1. *Phytotherapy research* (enviada).
5. C. Soler-Rivas, A.C. Ramírez-Anguiano, G. Reglero, S. Santoyo. Effect of cooking, *in vitro* digestion and Caco-2 cells absorption on the radical scavenging activities of edible mushrooms. *International Journal of Food Science and Technology*. (enviada).