# Influencia del procesado y de la matriz alimentaria en la bioaccesibilidad de un extracto hipocolesterolémico obtenido de la seta Shiitake *(Lentinula edodes)*

Huimin He

Máster en Nuevos Alimentos

MÁSTERES
DE LA UAM
2018 - 2019

Facultad de Ciencias

UAM Universidad Autónoma de Madrid

# Máster en Nuevos Alimentos

## Influencia del procesado y de la matriz alimentaria en la bioaccesibilidad de un extracto hipocolesterolémico obtenido de la seta Shiitake (*Lentinula edodes*)

Huimin He

**Directora: Cristina Soler Rivas**

**Instituto de Investigación en Ciencia de la Alimentación (CIAL)**

Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo Fin de Máster. Curso 2018-2019

# ÍNDICE


**1. INTRODUCCIÓN** ..... 1

1.1 *Lentinula edodes* (Shiitake) ..... 4

1.1.1 Cultivo de shiitake ..... 5

1.1.2 Compuestos hipocolesterolémicos de *Lentinula edodes* ..... 5

1.2 Formulación de alimentos funcionales hipocolesterolémicos ..... 10

1.2.1 Integración del ingrediente funcional en matrices alimentarias ..... 11

1.2.2 Efectos del tratamiento térmico en los compuestos bioactivos ..... 15

1.3 Transformaciones del alimento funcional por la digestión humana ..... 18

1.3.1 Etapas de la digestión humana ..... 18

1.3.2 Efecto de la digestión en los compuestos bioactivos de los hongos ..... 19

**2. OBJETIVOS** ..... 19

**3. PLAN DE TRABAJO** ..... 20

**4. MATERIALES Y MÉTODOS** ..... 20

4.1 Material biológico ..... 20

4.2 Disolventes y reactivos ..... 21

4.3 Formulación de los alimentos funcionales con adición del extracto durante el procesado del alimento 21

4.4 Formulación de alimentos funcionales con adición del extracto después del procesado del alimento 23

4.5 Digestión *in vitro* ..... 23

4.6 Determinación de ergosterol ..... 24

4.7 Determinación de la eritadenina ..... 25

4.8 Determinación de los β-glucanos ..... 26

4.9 Análisis estadístico ..... 28

**5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN** ..... 28

5.1 Efecto de las diferentes formulaciones en el contenido de ergosterol ..... 28

5.2 Efecto de las diferentes formulaciones en el contenido de eritadenina ..... 33

5.3 Efecto de las diferentes formulaciones en el contenido de β-glucanos ..... 37

**6. CONCLUSIÓN** ..... 42

**7. BIBIOGRAFÍA** ..... 43

**Abstract**

*Lentinula edodes* (shiitake), the species of mushrooms that has the potential to be developed into funtional foods for their high nutritional value and their bioactive compounds with relevant medicinal uses, such as cholesterol reduction, immunomodulatory, anti-tumor and anti-inflammatory effects. In the present work, the most convenient method for the incorporation of a hypocholesterolemic extract obtained from Shiitake fungus has been determined. For this purpose, the results showed that, in the one hand, the incorporation of the extract into a liquid and/or semi-liquid vegetable food is indifferent whether it is before or after processing. On the other hand, this incorporation improved the bioaccessibility of bioactive compounds: ergosterol, ertadenine and β-glucans. In addition, both pasteurization and sterilization treatments did not affect the content of these functional compounds.

**Resumen**

*Lentinula edodes* (shiitake) es la especie de hongos que tiene potencial para el desarrollo de alimentos funcionales por su alto valor nutricional y sus compuestos bioactivos con relevantes usos medicinales, como reducción de colesterol, inmunomoduladora, efecto antitumoral y antiinflamatorio. En el presente trabajo se han determinado el método más conveniente para la incorporación de un extracto hipocolesterolémico obtenido a partir de hongo Shiitake. Con este objetivo, los resultados mostraron que, por un lado, la incorporación del extracto a un alimento vegetal líquido y/o semilíquido es indiferente que sea antes o después del procesado. Por otro, esa incorporación mejoró la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos: ergosterol, eritadenina y β-glucanos. Además, tanto los tratamientos de pasteurización como de esterilización no afectaron al contenido de esos compuestos funcionales.

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, las enfermedades cardiovasculares (ECV) son una de las causas de muerte más frecuente en el mundo occidental (Gil-Ramírez *et al.*, 2018). En España, según el reciente informe del Instituto Nacional de Estadística (INE) sobre las causas de defunción del año 2017, las enfermedades cardiovasculares siguen siendo la primera causa de muerte representando el 28,3% del total de fallecimientos, lo que se sitúan por encima del cáncer (27,9%) y de las enfermedades del sistema respiratorio (11,9%). Los problemas cardiovasculares tienen un origen complejo y se deben a muchos factores, por ejemplo, los niveles altos de colesterol plasmático establecen un importante indicador de riesgo para el desarrollo de esta patología (Saini *et al.*, 2004). Por lo tanto, es esencial una adecuada regulación de la homeostasis del colesterol y es controlado principalmente por el hígado (Gil-Ramírez *et al.*, 2011).

El colesterol (Figura 1) presente en nuestro organismo puede proceder de dos vías: aquel que procede de la dieta (vía exógena) o es sintetizado por las células hepáticas (vía endógena). Los niveles de colesterol en sangre dependen de ambas vías (Gil-Ramírez *et al.*, 2011). El marcador más útil para riesgo de ECV es la concentración de colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad) en suero sanguíneo, uno de los principales complejos de transporte de colesterol y constituye el 60-70% del colesterol sérico total (Saavedra *et al.*, 2012).

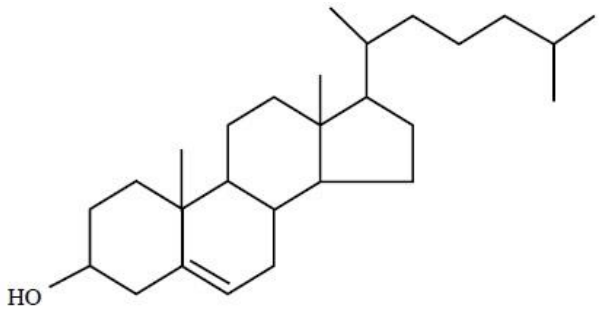



**Figura 1:** Estructura del colesterol (Ballantyne *et al.*, 2002)

La síntesis de colesterol es regulada por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGCR), cuya actividad es controlada por el flujo de colesterol intestinal hacia el hígado. La inhibición de esta enzima y de la absorción de colesterol a nivel intestinal, mediante estatinas y ezetimiba, respectivamente, disminuyen el nivel de colesterol, relacionado con una reducción de las complicaciones cardiovasculares (Ballantyne *et al.*, 2002).

La investigación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) destaca la importancia de la acumulación excesiva de colesterol en nuestros tejidos y altas concentraciones en sangre (> 200 mg/dL) pueden causar graves problemas cardiovasculares en la población. El informe sobre la salud mundial en el 2002 estimó que aproximadamente 8% de todas las enfermedades en los países desarrollados es causada por el colesterol alto en la sangre (Nichols *et al.,* 2012).

Según un informe de European Cardiovascular Disease Statistics de 2012, el 56,1% de los españoles de más de 25 años (58,9% de hombres y 52,9% de mujeres) tiene el colesterol elevado (> 5,0 mmol/L o 200 mg/dL) y también revelaba que el 16,4% de los españoles (17,1% de hombres y 15,4% de mujeres) tiene valores considerados muy altos, por encima de 6,2 mmol/L o 240 mg/dL. Las tasas más altas de niveles elevados de colesterol se observaron en los países de altos ingresos del norte y oeste de Europa, mientras que las tasas más bajas se observaron en los países de la antigua Unión Soviética (Nichols *et al.,* 2012).

Tradicionalmente, las setas comestibles se han recomendado en la medicina tradicional oriental debido a sus efectos hipocolesterolémicos. Hoy en día, la ciencia ha reconocido que su ingesta podría reducir el riesgo cardiovascular, debido a la presencia de sustancias específicas beneficiosas y otros compuestos bioactivos (Guillamón *et al.,* 2010).

Las setas son los cuerpos fructíferos de los hongos que forman un reino propio denominado “reino fúngico”, muchos de los cuales pueden desempeñar papeles muy beneficiosos en el ecosistema forestal. Muchos de estos hongos tienen habilidades únicas para descomponer madera, hojas, otra materia orgánica y reciclar nutrientes en el sistema (Alemu *et al.*, 2015).

En general, la composición de los hongos comestibles es el agua (90%), proporcionan proteínas (2-40%) de alta calidad, rica en fibra (3-32%), carbohidratos (1-55%), ceniza (8-10%) y bajo contenido de grasas (2-8%) (Firenzuoli *et al*., 2008), con alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados en relación con el total contenido de ácidos grasos (Alemu *et al*., 2015). Además, muchos de los hongos comestibles son importantes fuentes naturales de compuestos hipocolesterolémicos (Morales *et al*., 2018a). También se han descubierto relevantes propiedades medicinales en estos hongos (anticancerígenas, antidiabéticas, etc.), por lo que promueve su consumo (Martínez-Carrera *et al*., 2007).

Actualmente, la producción mundial supera los 10 millones de toneladas de hongos comestibles cultivados por año (Tabla 1), y según los datos de FAOStat (2017), en España, la producción de los hongos y trufas es casi 160 mil toneladas por año, y la importación es alrededor de 4000 toneladas/año (FAOStat, 2016) y la exportación es sobre 5000 toneladas/año (FAOStat, 2016). Además, el desarrollo de la producción mundial de hongos y trufas se puede observar que alguno de los países es considerado como mayor productor (China), y excepcionalmente, otros países como Francia, Bélgica y Japón se han disminuido la producción. Sin embargo, la producción mundial se ha incrementado casi el doble en los últimos 10 años.

**Tabla 1:** Evolución de la producción (toneladas) de hongos y trufas durante 2007-2017 documentado por FAO (Hongos y trufas: producción, 1961-2017; United Nations, FAO, FAOStat).

| País | 2007 | 2017 |
|---|---|---|
| **Mundo (total)** | 5914206 | 10242541 |
| **China** | 4068518 | 7868782 |
| **Japón** | 67000 | 65428 |
| **Estados Unidos** | 359630 | 421208 |
| **Reino Unido** | 71500 | 99652 |
| **España** | 131974 | 159018 |
| **Francia** | 131825 | 99096 |
| **Alemania** | 55000 | 73454 |
| **Bélgica** | 40168 | 28000 |

A nivel mundial, *Lentinula edodes* es el segundo hongo con mayor producción, inmediatamente después del champiñón (*Agaricus bisporus*), y principalmente se debe a que es uno de los más cultivados en China (Chang *et al*., 1999).

### 1.1 *Lentinula edodes* (Shiitake)

La seta shiitake también conocida como *Lentinula edodes* (Figura 2), se han cultivado durante muchos siglos en China y Japón (Chang y Miles *et al*., 1987) y actualmente se cultivan a nivel comercial en todo el mundo. Antiguamente, las poblaciones silvestres de hongos shiitake se extendían desde el límite norte en Japón y el Lejano Oriente ruso, hasta sudeste de Asia y Oceanía (incluyendo Nueva Guinea, Australia, Tasmania y Nueva Zelanda), y al oeste hasta Nepal e India, en las estribaciones de la Himalaya. En la actualidad, la seta shiitake se cultiva también en la región de la Costa del Golfo de América del Norte, el Caribe, América Central y el norte de América del Sur (Hibbett *et al*., 2001).

**Figura 2:** Hongo *Lentinula edodes* (Shiitake)

*Lentinula edodes* es el primer macrohongo medicinal que entra en el campo de la biotecnología moderna, y además de atribuir un valor nutricional, también es un posible material biológico potencial para usos terapéuticos. Estas setas shiitake se usan con fines medicinales en la medicina tradicional china para enfermedades relacionadas con la función inmune deprimida (incluido el SIDA), cáncer, alergias ambientales, infección por hongos, gripe y resfriados frecuentes, inflamación bronquial, enfermedades cardíacas, hiperlipidemia (incluido el colesterol alto en sangre), hipertensión, enfermedades infecciosas, diabetes, hepatitis e inconsistencias urinarias reguladoras. Algunas de esas propiedades se han detectado hoy en día, con métodos científicos que efectivamente reducen el riesgo de padecerlas o pueden ayudar a terapias modernas como adyuvantes (Bisen *et al*., 2010). Por lo tanto, se podría utilizar como ingredientes bioactivos para la elaboración de alimentos funcionales.

### 1.1.1 Cultivo de shiitake

*Lentinula edodes* crece de forma natural en el tronco seco de madera muerta de muchas especies de árboles que pertenece a la familia *Fagaceae* en diferentes condiciones climáticas. Pero la mayoría de los hongos que se consumen son cultivados por el hombre. Para su cultivo se necesita partir de un micelio madre que suministran compañías especializadas. Después se siembra en semilla de algún cereal tipo trigo, salvado o mijo y cuando esa semilla está totalmente colonizada por el micelio del hongo se utiliza como inóculo para inocular bloques esterilizados de mijo, serrín y otros materiales lignocelulósicos que se incuban a unas temperaturas de unos 24ºC. Cuando el bloque está prácticamente colonizado por el micelio se cambian las condiciones de luz, humedad y la temperatura se baja a 18 grados y a los pocos días aparecen los cuerpos fructíferos que se recolectan en varias floradas, aunque nacen de forma más dispersa que el champiñón (Chang y Miles *et al*., 2004).

**Figura 3:** a) Dong-gu fresco y seco y b) Shiangshyuhn fresco y seco.

Por ejemplo, para el hongo fresco, la recolección se realiza cuando el 50-60% del bloque tiene cuerpos fructíferos, y para los hongos secos, la recolección se realiza cuando el bloque contiene el 70-80% de su superficie con cuerpos fructíferos (Figura 3) (Chang y Miles *et al.*, 2004).

### 1.1.2 Compuestos hipocolesterolémicos de *Lentinula edodes*

Las setas shiitake secas contienen 58-60% de carbohidratos, 20-23% de proteínas (digestibilidad del 80-87%), 9-10 de fibras, 3-4% de lípidos y 4-5% de cenizas. Este hongo es una buena fuente de vitaminas, pero no tiene mucha vitamina D, solo se obtiene cuando se somete a una irradiación. Por ejemplo, de ergosterol, porque bajo la luz ultravioleta (UV) se transforma en ergocalciferol (vitamina D2). También contiene otras vitaminas como B1, B2, B5 y B12 y minerales como hierro, zinc, magnesio, calcio, etc. Los polisacáridos hidrosolubles representan del 1-5% del peso seco del hongo, particularmente los β-glucanos, que son fibras dietéticas solubles en agua (Wasser *et al*., 2005). Sin embargo, los β-glucanos insolubles, considerados como fibras dietéticas constituyen

casi el 36-40% de su peso junto con las quitinas que suelen ser el 9% (Morales *et al.*, 2019a). Pero también, cabe destacar que el hongo shiitake es una fuente natural beneficiosa de compuestos hipocolesterolémicos, como el ergosterol y sus derivados, los β-glucanos, y la eritadenina (Morales, *et al*., 2018a).

**Ergosterol**

*Lentinula edodes* (*L. edodes*) contiene cantidades significativas de ergosterol (ergosta-5, 7, 22-trien-3β-ol) (Tabla 2) y otros esteroles en menor concentración, que son compuestos estructuralmente similares a los fitoesteroles vegetales. El ergosterol se consideró como un potente competidor para el receptor X del hígado (un factor implicado en la regulación de la homeostasis del colesterol) y como un inductor de la expresión de los transportadores ABC (unos promotores del flujo activo de colesterol y esteroles vegetales del enterocito a la luz intestinal para su excreción). Además, se señaló como un potente inhibidor de la reductasa C24, una enzima que cataliza la reducción del doble enlace en C24 en la biosíntesis de colesterol (Calpe-Berdiel *et al.*, 2009).

**Tabla 2:** Concentración de ergosterol (mg/g de hongo en peso seco) en varias especies de hongos (Gil-Ramirez *et al.*, 2011).

| Especie de hongos | Ergosterol (ergosta-5, 7, 22-trien-3β-ol) |
|---|---|
| ***Boletus edulis*** | 5,69 |
| ***Lentinula edodes*** | 5,51 |
| ***Agrocybe aegerita*** | 5,11 |
| ***Pleurotus ostreatus*** | 3,75 |
| ***Agaricus bisporus*** | 3,06 |
| ***Agaricus blazeii*** | 1,73 |
| ***Pleurotus eryngii*** | 1,40 |
| ***Ganoderma lucidum*** | 0,69 |

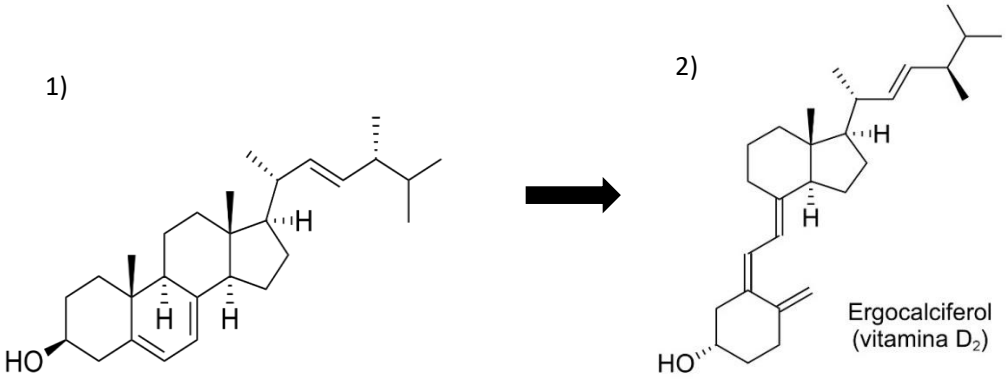



**Figura 4:** Estructura química del 1) ergosterol y 2) ergocalciferol.

Además, el ergosterol es el precursor de la vitamina D, un compuesto fundamental en la nutrición humana como un regulador del metabolismo del calcio y fosfato, que promueve la absorción de calcio e influye el proceso de mineralización ósea (Mau *et al.*, 1998). El ergosterol puede ser convertido a vitamina D2 mediante la acción de los rayos ultravioleta (UV) que produce la ruptura del anillo B (Figura 4) (Rajakumar *et al*., 2007).

**Eritadenina**

La eritadenina (Figura 5), 2 (R), el ácido 3 (R) dihidroxi-4- (9-adenil) butanoico), es un alcaloide hidrosoluble (Morales *et al.,* 2018a) que fue aislado del hongo *L. edodes* por primera vez e identificado por Chibata *et al*., 1969 y por Rokujo *et al*., 1970. Este compuesto es un metabolito secundario producido principalmente por el hongo shiitake y es capaz de reducir el nivel de colesterol en sangre. (Saito *et al*., 1975). Las setas shiitake contienen un nivel de eritadenina bastante significativa comparando con otros hongos comestibles (Tabla 3), como otra especie de la misma familia, *Marasmius oreades*, o como otras que pertenecen al mismo orden (*Agaricales*), *Amanita caesarea*, *Lyophyllum shimeji*, *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*. Sin embargo, aunque otros hongos como *Boletus edulis*, *Morchella conica* y *Lactarius deliciosus* también contenían ciertas concentraciones de eritadenina (0,2 mg/g peso seco), la presencia del compuesto en mayores concentraciones solo pueden atribuirse al género *Lentinula* (Morales *et al*., 2018b).

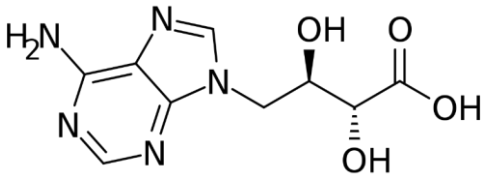


**Figura 5:** Estructura química de eritadenina

**Tabla 3:** Concentración de eritadenina (mg/g de hongo en peso seco) en varias especies de hongos (Morales *et al.* 2018b).

| Especie de hongos | Eritadenina |
|---|---|
| ***Lentinula edodes*** | 1,4 |
| ***Marasmius oreades*** | 0,7 |
| ***Amanita caesarea*** | 0,6 |
| ***Lyophyllum shimeji, Agaricus bisporus, Pleurotus ostreatus*** | 0,2 |
| ***Boletus edulis, Morchella conica, Lactarius deliciosus*** | 0,2 |

Actualmente, no está definido claramente el mecanismo de acción de la eritadenina en la reducción del colesterol. Sin embargo, varios estudios demostraron que la actividad hipocolesterolémica de la eritadenina en ratones y ratas estaba relacionada con su capacidad de inhibir la enzima S-adenosil-l-homocisteína hidrolasa (SAHH), que es capaz de modular el metabolismo de los fosfolípidos hepáticos causando una disminución de la proporción de fosfatidilcolina (PC) / fosfatidiletanolmanina (PE) y por eso puede aumentar la captación o disminuir la liberación de colesterol (Enman *et al.*, 2007).

**β-glucanos**

Los β-glucanos son unos polímeros de glucosa unidos por enlaces glucosídicos, que se encuentran en niveles altos en la pared celular de hongos, levaduras, avena y cebada (Morales *et al*., 2019a). De tal modo, sus propiedades biológicas parecen estar relacionadas con su estructura química, peso molecular y características reológicas, las cuales pueden variar según fuente de origen (Tabla 4)

(Volman *et al.*, 2010). Existe una gran variedad de β-glucanos, pueden llegar a formar grandes moléculas compuestas por más de 250000 unidades de glucosa (Vannuci *et al*., 2013).

**Tabla 4:** Estructuras de los β-glucanos según su fuente de origen (Volman *et al*., 2008).

| Tipo de β-glucano | Estructura | Descripción |
|---|---|---|
| **Bacteria** | | Glucano lineal β-1,3 (ej: Curdlan) |
| **Hongo** | | Glucano ramificaciones cortas β-1,6 y β-1,3 (ej: Esquizofilano) |
| **Levadura** | | Glucano ramificaciones largas β-1,6 y β-1,3 (ej: β-glucano WGP, betafectina ) |
| **Cereal** |  | Glucano lineal β-1,3/1,4 (ej: avena, cebada, centeno) |

En concreto, los β-glucanos de los hongos varían estructuralmente, se han aislado β-glucanos lineales y β-glucanos ramificados.

- β-glucanos lineales: suelen ser más solubles en agua que los ramificados, ya que están formados por cadenas simples de β (1-3)-D-glucosa como las setas *Termitomyces eurhizus* y *Laetiporus sulphureus*. O también las cadenas lineales de β (1-6)-D-glucosa en *Agaricus bisporius*, *Agaricus basiliensis* y *Coprinus comatus* (Ruthes *et al*., 2015).
- β-glucanos ramificados: consiste en una cadena principal formada por β (1-3)-D-glucanos con ramificaciones de β (1-6)-D-glucosa, y se ha visto que es la estructura más estudiada en los hongos y es la más activa sobre el sistema inmune y se encuentra en shiitake (Giavasis *et al*., 2014).

Las concentraciones de los β-glucanos en distintas especies de hongos son muy variados (Figura 6). Según Gil-Ramírez *et al.*, 2011, *Ganoderma lucidum* es la especie que contenía una mayor concentración de este compuesto (alrededor de 65 mg/100g peso seco), seguido de *Pleurotus ostreatus* (alrededor de 45 mg/g peso seco) que pertenece al mismo orden (*Agaricales*) que *L. edodes* (alrededor de 22 mg/g peso seco), pero supone el doble de concentración que este último.

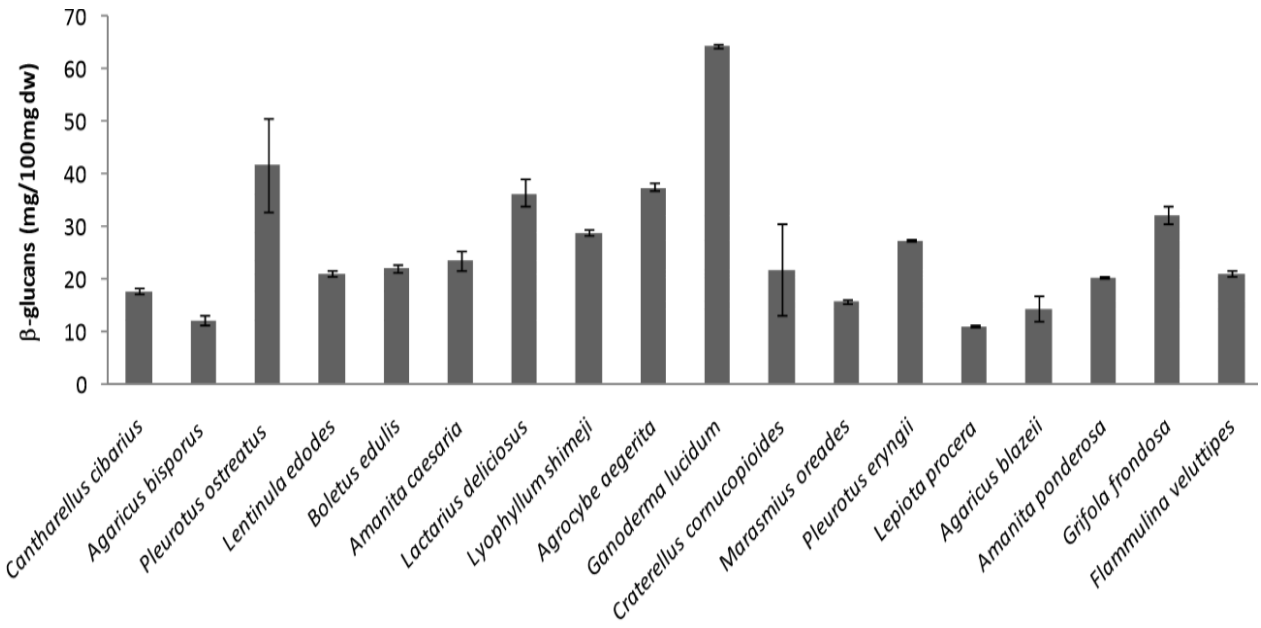



**Figura 6:** Concentración de β-glucanos (mg/100g de hongo en peso seco) en varias especies de hongos (Gil-Ramírez *et al.*, 2011).

Por lo tanto, los hongos comestibles también poseen β-glucanos específicos como el lentinano de shiitake, el grifolano de setas maitake, etc. y algunos de ellos pudieron reducir eficazmente los niveles de colesterol en sangre en ensayos *in vitro*. Aparentemente, las propiedades viscosas y formadoras de gel de estos compuestos podrían reducir la absorción de colesterol al inhibir la formación de micela en el intestino delgado y acaso también podrían interactuar con los ácidos biliares, incrementando la conversión hepática del colesterol en ácidos biliares y aumentando la excreción fecal de estos últimos (Gil-Ramírez *et al.*, 2011).

### 1.2 Formulación de alimentos funcionales hipocolesterolémicos

Para la utilización de extractos fúngicos como ingredientes funcionales hay que optimizar varios puntos: la matriz alimentaria en la que se incorporan, el tratamiento térmico necesario para su comercialización segura y estudiar el efecto que estos tienen en los compuestos bioactivos, los que son componentes nutritivos que típicamente presentan en pequeñas cantidades en los alimentos y ejercen un beneficio funcional en la salud (Kris-Etherton *et al.*, 2002).

### 1.2.1 Integración del ingrediente funcional en matrices alimentarias

Los ingredientes funcionales se suelen vehiculizar en matrices alimentarias de fácil consumo, como por ejemplo los fitoesteroles se adicionan a margarinas o yogures para que al consumidor sea más agradable su ingesta que si fuera directamente una pastilla o cápsula. Sin embargo, esta inclusión puede modificar la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de los compuestos beneficiosos para la salud.

Por ejemplo, se sabe que la adición de fitosteroles a las margarinas disminuye la asimilación de otros compuestos ligeramente como la de los β-carotenos (Weststrate y Meijer *et al.*, 1998). También se sabe que la eritadenina de los hongos se asimila mejor si se encuentra en una matriz proteica como puede ser una gelatina mezclada con hongo pulverizado que si se adiciona a otras preparaciones de moda en la gastronomía molecular como es el agar agar o el alginato (Morales *et al.*, 2018b). También se conoce que el ácido fítico y algunos polifenoles presentes en las legumbres interfieren en la asimilación de micronutrientes como hierro, magnesio, etc. porque los secuestran en su estructura y son eliminados.

La utilización de cremas o preparaciones semi-líquidas para adicionar ingredientes funcionales no ha sido muy estudiada, la ventaja de usar cremas es que son compuestos homogéneos fáciles de comer para personas mayores que suelen ser los que tienen niveles de colesterol más elevados. Así mismo, este tipo de alimentos ofrece una forma rápida, nutritiva y cómoda de consumir hortalizas y aporta componentes beneficiosos para la salud como, fibras, vitaminas, antioxidantes y minerales. Además, si se incorporan en su formulación niveles bajos en grasa, resultan muy convenientes para personas con complicaciones cardiovasculares, obesidad, etc. Y más aún, su contenido en fibra contribuye a un correcto tránsito intestinal además de equilibrar los niveles de colesterol, prevenir el cáncer de colon y controlar las subidas de glucosa en sangre (Lattimer y Haub *et al.*, 2010). Sin embargo, los que más problemáticos pueden ser son las matrices con grandes cantidades de polisacáridos porque suelen secuestrar en su estructura moléculas pequeñas como podría ser las vitaminas.

#### 1.2.1.1 Gazpacho

El gazpacho (Figura 7) es uno de los alimentos más relevantes en la dieta mediterránea, y que podría utilizarse como matriz alimenticia para la incorporación de ingredientes funcionales debido a que se consume en forma semi-líquida, los ¨grumos¨ son aceptables puesto que tiene muchos

sólidos en suspensión. Además, proporciona una buena composición de ingredientes saludables y beneficiosos contra las enfermedades cardiovasculares (Torija-Isasa *et al.*, 2007).

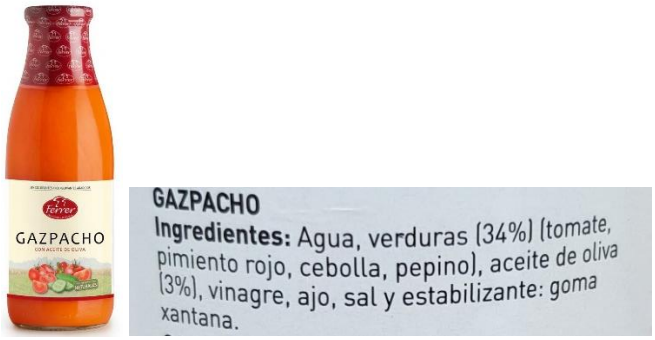



**Figura 7:** Gazpacho (marca Ferrer)

El "gazpacho andaluz", una sopa fría preparada con tomates, junto con otras verduras, agua, pan, sal, vinagre y aceite de oliva (Torija-Isasa *et al.*, 2007). Esta "sopa" tiene una alta proporción de agua, entonces tiene un gran poder hidratante. La mezcla de todos los ingredientes supone una gran cantidad de vegetales, lo que aporta además de proteínas y algunas vitaminas y minerales en cantidades considerables, carbohidratos y fibras (Martín-Moreno y Gorgojo *et al.*, 2002).

Las fibras vegetales que aportan son celulosas, hemicelulosas y pectinas procedentes de las paredes de las células vegetales como de los tomates (1,5g/100g de porción comestible), pimientos rojos (1g/100g) y pepinos (0,5g/100g) (Moreiras *et al.*, 2013). Las celulosas y hemicelulosas son fibras dietéticas insolubles capaces de retener el agua en su matriz estructural formando mezclas de baja viscosidad, y produce un aumento de la masa fecal que acelera el tránsito intestinal (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2006). La estructura de la celulosa (Figura 8a) está formada por la unión de moléculas de β-glucosas mediante enlaces β-1,4-glucosídico, puede ser lineal o ramificada, en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, lo que hace que sea insoluble en agua, así aporta rigidez a la pared celular de los vegetales. Y las hemicelulosas (Figura 8b) son polisacáridos con grupos heterogéneos, son insolubles en agua, pero se disuelven en medio alcalino. La estructura está constituida por unión glucosídica de distintos monosacáridos, como arabinosa, xilosa, glucosa, manosa, galactosa, galacturónico, glucurónico y algunos desoxiazúcares (Dergal *et al.*, 2006).

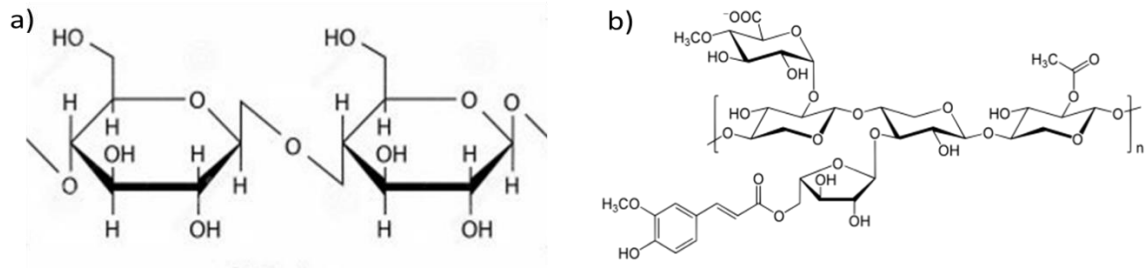



**Figura 8**: Estructura química de a) celulosa y b) hemicelulosa.

Además de estos polisacáridos, los gazpachos comerciales pueden contener otros que actúan de espesantes. Los que suelen adicionar son pan, es decir almidón, que mejora la viscosidad y la estabilidad del gazpacho. La estructura del almidón está formada por amilosa (Figura 9a) (cadena lineal) unidas entre ellas por enlaces α (1-4) y amilopectina (Figura 9b) como cadenas ramificadas debidas a enlaces α (1-6). La amilosa es responsable de la estructura gelificada y la amilopectina produce en los líquidos una mayor viscosidad (Castells *et al.*, 2009).

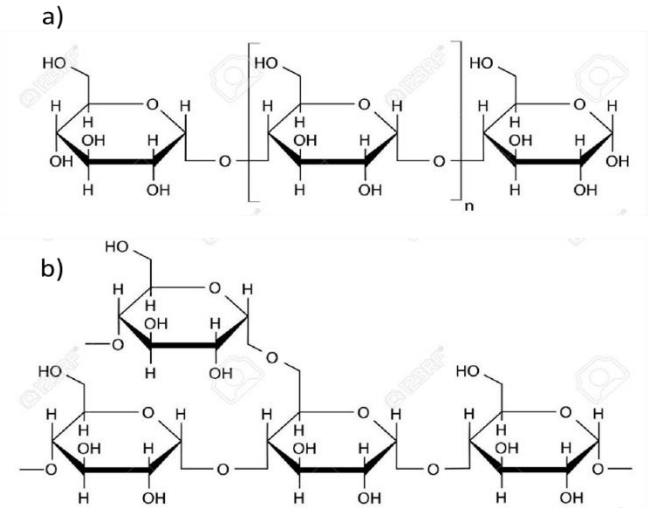



**Figura 9:** Estructura química de a) amilosa y b) amilopectina.

Otro posible estabilizante que se encuentra frecuentemente en gazpachos comerciales es la goma xantana (Figura 10), este polisacárido se obtiene por la fermentación de carbohidratos por la bacteria *Xanthomonas campestris* y está constituido por unidades repetitivas de pentasacárido, que consisten de dos unidades de D-glucopiranosilo, dos D-manopiranosilo y un ácido D-glucopiranosilurónico. Y su estructura es un esqueleto de unidades de D-glucosa unidas entre sí por enlaces β (1-4), una de cada dos glucosas se encuentra unida por un enlace a 1-3 a una cadena

lateral formada por dos manosas con un ácido glucurónico entre ellas. Alrededor de la mitad de las manosas terminales de la cadena lateral están unidas a un grupo de piruvato, y el 90% de las manosas más próximas a la cadena central están acetiladas en el carbono 6 (García-Ochoa *et al.*, 2000).

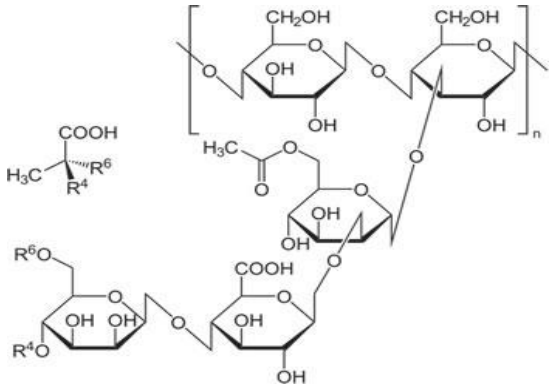


**Figura 10:** Estructura química de goma xantana

La goma xantana es completamente soluble en agua caliente o fría, se hidrata rápidamente y proporciona unas soluciones de alta viscosidad. Su comportamiento reológico permite contribuir a buenas propiedades sensoriales (sensación en la boca, liberación de sabor, etc.) y además contribuye una estabilidad frente a las variaciones de pH, a un mayor rango de temperatura (tanto congelación y ebullición) y resistente a algunas enzimas comunes, por tanto, se ha convertido en uno de los mejores espesantes y estabilizantes en la industria alimentaria (Katzbauer *et al.*, 1998).

El gazpacho casero se consume sin calentar así que se conservan las vitaminas hidrosolubles inestables, como la vitamina C proveniente del pimiento y del tomate (Verde-Méndez *et al*., 2011). Los gazpachos que se venden en el supermercado son pasteurizados o tratados con altas presiones, esta tecnología es una alternativa de los métodos de conservación para alimentos a diferencia de los tratamientos térmicos tradicionales (Plaza *et al.*, 2006).

#### 1.2.1.2 Crema de verduras

Otra forma de vehiculización del ingrediente funcional podría ser una crema de verduras, no hay muchas cremas funcionales, pero si se utilizan cremas pasteurizadas la cantidad de vitaminas y otros compuestos interesantes se mantienen según describe Rodríguez-verástegui *et al.*, 2016.

Las cremas, como por ejemplo de espárragos (Figura 11a) (1g fibra/100g porción comestible) o calabacín (Figura 11b) (1,3g/100g) (Moreiras *et al.* 2013) aportan fibras celulosas, hemicelulosas y pectinas principalmente procedentes de sus paredes celulares (Álvarez y Sánchez *et al.*, 2006).

**Figura 11:** a) crema de espárrago y b) crema de calabacín (marca Ferrer)

Las cremas comerciales al igual que indicado para el gazpacho también llevan espesantes y estabilizante como la goma xantana mencionada en la elaboración de gazpacho, o almidón de maíz y de patata. Actualmente, el uso de almidón se extiende mucho más allá de su diseño original como fuente de energía biológica, se usa para controlar o influir la textura, la consistencia, la humedad y la estabilidad de un alimento. Sin embargo, los almidones nativos de diferentes fuentes botánicas presentaban ciertas deficiencias como la pérdida de viscosidad, el poder espesante, las características de retrogradación, etc. Por lo tanto, aparecieron los almidones modificados para superar esas deficiencias (Tharanathan *et al.,* 2005) y existe diferentes tipos de modificaciones como, físicas, químicas, enzimáticas y biológica. Las modificaciones químicas son las más empleadas (Daramola y Osanyinlusi *et al.,* 2006), y las más comunes son la oxidación, la esterificación, la hidroxipropilación y la reticulación, etc. que influyen las propiedades fisicoquímicas, morfológicas, térmicas y reológicas de los almidones de diferentes fuentes botánicas. Además, los factores que afectan la eficiencia de la modificación son la fuente de almidón, la relación de amilosa y amilopectina, la morfología de los gránulos y el tipo y la concentración del reactivo modificador (Singh *et al.,* 2006).

### 1.2.2 Efectos del tratamiento térmico en los compuestos bioactivos

Generalmente, durante la preparación del alimento funcional una vez incorporado en la matriz alimentaria hay que someterlo a un tratamiento térmico para que sean seguro. Estos tratamientos

pueden destruir a los compuestos beneficiosos incorporados. Los tratamientos más utilizados por la industria alimentaria son la pasteurización y la esterilización.

#### 1.2.2.1 La pasteurización

La pasteurización, la usan en la industria alimentaria, consiste usar una temperatura alta en tiempo corto y normalmente se utiliza para inactivar las bacterias patógenas y extender la vida útil del alimento durante un par de semana. Sin embargo, este tratamiento no inactiva todos los microorganismos y las esporas resistentes al calor, dependiendo de las condiciones de almacenamiento, el crecimiento de bacterias puede acelerarse (Cánovas y Aguirre a *et al.*, 2010). Por ejemplo, el efecto que produce sobre la leche de vaca pasteurizada, el compuesto más afectado es la vitamina C con una pérdida alrededor de un 20%, también la tiamina y vitamina B12 que pierden como un 10% en la pasteurización y otras vitaminas son bastante estables. Además, la proteína en la leche de vaca pasteurizada se desnaturalizó ligeramente (5-15%). Se trata de mantener los alimentos durante 5 minutos a 90ºC y se puede hace al baño maría de modo casero y en la industria lo hace mediante unos equipos denominados pasteurizadores (Fellows *et al.*, 1988).

#### 1.2.2.2 La esterilización

La esterilización es un tratamiento térmico más severo que utiliza temperaturas alrededor de 121ºC durante 15 minutos e inactivas esporas, extiende la vida útil del producto por varios meses (Cánovas y Aguirre a *et al.*, 2010). Es más drástico, pero más corto con lo cual afecta destruyendo las vitaminas termolábiles como, la tiamina se destruye en un 30%, la vitamina C en un 50% y casi toda la vitamina B12 y los restos de vitaminas son bastante termoestables (Fellows *et al.*, 1988).

#### 1.2.2.3 Otras tecnologías de esterilización

En caso de los tratamientos tradicionales con calor, la funcionalidad de nutrientes en algunos alimentos se ve afectado negativamente debido a la sensibilidad térmica. Entonces es de gran interés desarrollar nuevas tecnologías “no térmicas” para disminuir o evitar ese inconveniente y a la vez mantener la seguridad microbiológica del alimento. Por ejemplo, como el tratamiento con altas presiones (HP), se caracteriza por tres parámetros de procesamiento: temperatura, presión y tiempo y se ha demostrado científicamente que HP puede producir productos de mejor calidad y microbiológicamente estables y seguros. (Dhiman *et al.*, 2012). Esta tecnología “no térmica” retuvo más contenido de ácido ascórbico que el procesamiento térmico, por ejemplo, en la conservación de puré de verduras, retuvo un 90% de ácido ascórbico y no afectan su contenido de compuestos

fenólicos (Patras *et al.,* 2009). Otras tecnologías como la alta presión hidrostática, por ejemplo, según Barra *et al.,* 2010 retiene más ácidos ascórbico en bebidas vegetales que los tratamientos térmicos tradicionales.

#### 1.2.2.4 Efecto de calor en los compuestos bioactivos de los hongos

Actualmente, se ha visto que el procesamiento térmico puede afectar el contenido y la funcionalidad de algunos compuestos bioactivos. Por ejemplo, en el mercado actual se puede encontrar productos como setas enlatadas de consumo directo, entonces es necesario un proceso térmico para eliminar los microorganismos patógenos. El proceso se denomina como el enlatado que consiste en, envasar las setas frescas en un recipiente de hojalata o vidrio y posteriormente se somete a un proceso de calentamiento o esterilización con el fin de eliminar las bacterias presentes. Sin embargo, se ha observado que el proceso de enlatado influye notablemente en el contenido de los nutrientes de hongos. Por ejemplo, durante el enlatado, el contenido de las vitaminas (como vitaminas B1 y B2) se reducían bastante y el contenido total de aminoácidos libres, polioles y azúcares solubles también se perdieron. Además, el contenido de proteínas se disminuyó en varias especies de setas y produjo una pérdida significativa del contenido de compuestos fenólicos totales y algunos minerales. Las pérdidas podrían deberse de que algunos compuestos son térmicamente inestables y tiene una alta tendencia a sufrir oxidación y polimerización, y además por el proceso de blanqueamiento (Xue *et al.,* 2016).

El blanqueado es un proceso previo al enlatado que consiste en escaldar un alimento durante unos minutos en agua u otras soluciones acuáticas, con el fin de reducir las cargas microbianas y el pardeamiento enzimático (Vullioud *et al*., 2011), pero este proceso puede causar unos efectos negativos como, la extracción de compuestos solubles de bajo peso molecular (algunas vitaminas, proteínas, compuestos fenólicos y minerales). Sin embargo, aunque el tratamiento térmico mostró una ligera disminución en el contenido de nutrientes, es un método bastante relevante para almacenar el hongo durante un largo período (Xue *et al.,* 2016).

En cuando a los compuestos bioactivos de los hongos, el enlatado es posible reducir el contenido de algunos polisacáridos solubles en agua (Xue *et al.,* 2016) y por ejemplo también la concentración de la eritadenina, ya que también es un compuesto que tiende a solubilizar durante el proceso de blanqueado (Morales *et al.,* 2018a).

## 1.3 Transformaciones del alimento funcional por la digestión humana

Posteriormente, los componentes bioactivos que sobreviven a los tratamientos culinarios podrían variarse aún más durante la masticación, las digestiones gástricas y/o intestinales que influyen en sus niveles de absorción en el intestino humano (Gil-Ramírez *et al*., 2014).

### 1.3.1 Etapas de la digestión humana

Según Boticario y Cascales *et al.,* 2012, en la masticación las enzimas amilasas de la saliva se mezclan con el alimento ingerido, formándose el bolo alimenticio y degradan principalmente polisacáridos como el almidón. Y las grasas permanecen sin digerir hasta que llega al estómago.

En la digestión estomacal, el bolo alimenticio llega hasta el estómago y se degradan principalmente proteínas en péptidos pequeños y el bolo alimenticio se transforma en quimo. Aunque algunas enzimas degradadas en lípidos también son activas en este paso (Gil-Ramírez *et al*., 2018)

En la intestinal, el quimo llega al duodeno estimulando la liberación de jugos pancreáticos del páncreas y bilis del hígado, el organismo utiliza la bilis como detergente para disolver las grasas y formando micelas, pequeñas gotas de grasa que favorecen la absorción de vitaminas liposolubles (A, D, E y K) y colesterol. Las fibras dietéticas no suelen digerirse y pasan al colon donde está la microbiota, que fermenta esas fibras produciendo la fermentación colónica, obteniendo nutrientes para las células del colon y muchas funciones del organismo (Boticario y Cascales *et al.,* 2012).

En cuando a la biodisponibilidad de los nutrientes, los que son biodisponibles pasa a través de los enterocitos y son absorbidos en el plasma. Después se distribuye al sitio de acción donde ejerce un efecto al organismo (Martínez *et al.,* 1999). Cuando las sustancias son absorbidas en el tracto gastroduodenal, el hígado ejerce su función de distinguir las toxinas y otras moléculas extrañas y convertirlas en moléculas fácilmente eliminables por la orina o por las heces. Por ejemplo, este órgano es importante para el metabolismo de las grasas, donde se sintetiza y se elimina el colesterol de la sangre, en forma de ácidos biliares (Boticario y Cascales *et al.,* 2012).

### 1.3.2 Efecto de la digestión en los compuestos bioactivos de los hongos

La digestión de un alimento influye tanto el contenido como las propiedades de una serie de compuestos bioactivos. Según Morales et al., 2018b se ha visto que tras la digestión, el contenido de la eritadenina se redujo como un 73 %. Además, hay reducción de las propiedades antioxidantes en la digestión bucal, lo que sugiere que los compuestos antioxidantes podrían estar relacionados con los polisacáridos de las setas, porque cuando se degradan (Boticario y Cascales *et al.*, 2012) podría liberar antioxidantes unidos a sus estructuras complejas exponiéndolos a medios desfavorables (Soler-Rivas *et al*., 2009).

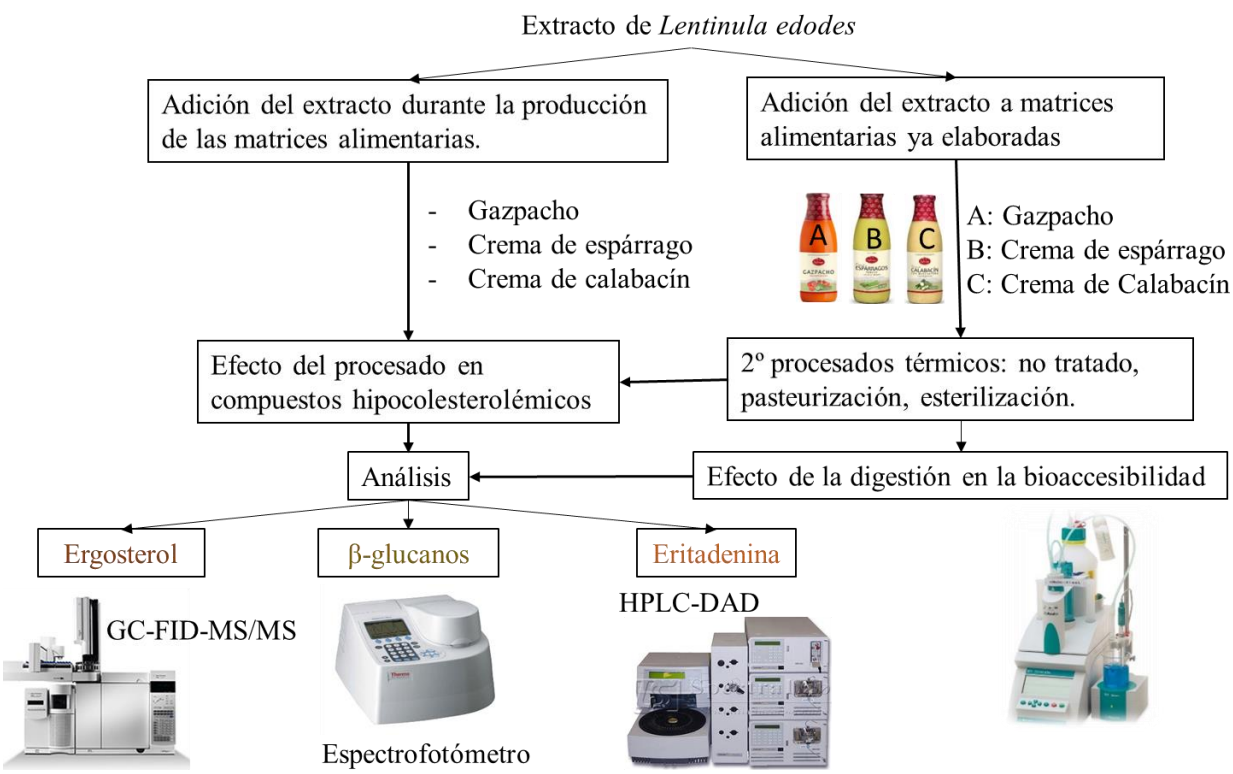
## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue el de estudiar el método de procesado más conveniente para la adición de un extracto hipocolesterolémico (obtenido de shiitake) a la matriz alimenticia más adecuada, como parte del diseño previo a la formulación de un alimento funcional, que posteriormente será utilizado en un ensayo clínico.

El extracto hipocolesterolémico se debía adicionar a matrices alimentarias producidas por la empresa Conserves Ferrer S.A. que formaba parte del proyecto AGL2014-56211-R así que se estudiaron los siguientes aspectos:

- Determinación de la matriz alimentaria más adecuada para adicionar el extracto de entre una crema de espárrago, una de calabacín y un gazpacho estudiando el efecto de la misma en el contenido de los compuestos hipocolesterolémicos incluidos en el ingrediente funcional (ergosterol, eritadenina y β-glucanos).
- Evaluar el momento de incorporación del extracto a la matriz, o bien durante su producción y posterior tratamiento con calor o bien una vez que la matriz alimentaria está producida someterlo a otro tratamiento térmico tras la incorporación del ingrediente.
- Determinar la influencia de la matriz o el tratamiento térmico en la bioaccesibilidad de los compuestos hipocolesterolémicos tras su digestión usando un modelo de digestión *in vitro*.

## 3. PLAN DE TRABAJO




## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Material biológico

El extracto hipocolesterolémico (Figura 12) fue una mezcla de fracciones específicas obtenidas con diferentes métodos de la seta shiitake (*Lentinula edodes*, Berkeley) según se describe en Morales *et al.*, 2019a.

El extracto llamado BGE (enriquecido en β-glucanos) consistía en una mezcla de 2,5% β-glucanos solubles en agua (Morales *et al.*, 2018a), 26% de un concentrado de β-glucanos solubles en agua caliente (Morales *et al.*, 2019a) y un 71,5% de una fracción que contiene quitinas y β-glucanos insolubles (Morales *et al.*, 2019a). La mezcla liofilizada se almacenó a -20ºC hasta su uso contenía en total un 33.5% (p / p peso seco) de β-glucanos, 21,3% de proteínas, 6,8% de quitina, 0,27% de eridatenina y 0,23% de ergosterol (Morales *et al.*, 2019a).

**Figura 12:** Extracto de *Lentinula edodes*

Se utilizaron 3 productos de la empresa Conserves Ferrer, su crema de espárrago, de calabacín y gazpacho que fueron suministrados por la propia empresa para su utilización en el estudio clínico.

Además, se compraron tomate, pepino, pimiento rojo, cebolla, ajo, calabacín, patata y espárrago frescos de un supermercado local.

### 4.2 Disolventes y reactivos

Los disolventes y reactivos empleados en los diversos análisis y procesos fueron los siguientes: pepsina, extracto biliar, lecitina de huevo, pancreatina, trizma, maleico, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, cloruro sódico, ácido ascórbico, BHT (2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metilfenol), ácido clohídrico (37%), ácido trifruoroacético (TFA) procedentes de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Tanto cloroformo (grado HPLC) y metanol (grado HPLC) fueron suministrados por LAB-SCAN Analytical Science (Gliwice, Polonia), y cloruro cálcico y etanol de Panreac (Barcelona, España). Además, el hexano suministrado por Macron (Gliwice, Polonia).

### 4.3 Formulación de los alimentos funcionales con adición del extracto durante el procesado del alimento

Se reprodujeron en el laboratorio el gazpacho y las cremas producidas por la empresa en escala más pequeña y sin la adición de los estabilizantes (goma xantana) ni espesantes (almidón modificado) pero manteniendo sus proporciones (Figura 13).

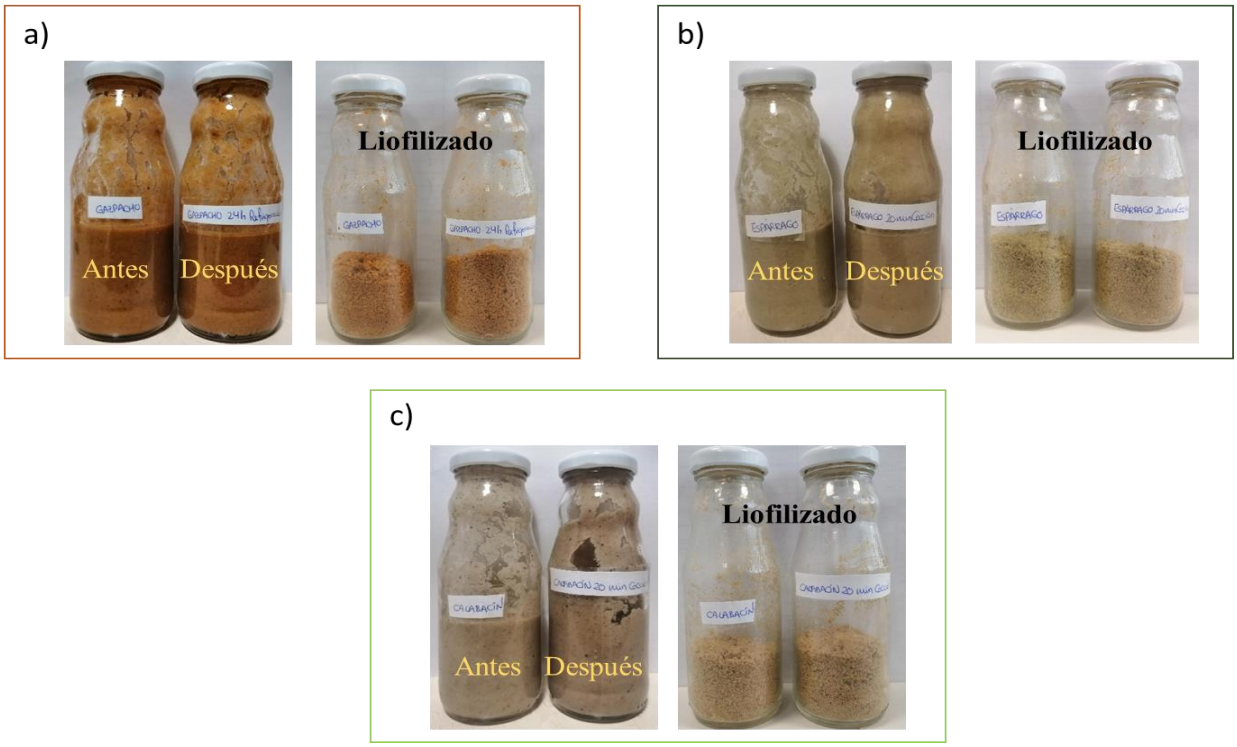



**Figura 13:** Aspecto de las preparaciones antes y después de refrigeración / cocción y tras su liofilización: a) gazpacho, b) crema de espárrago, c) crema de calabacín.

Para la preparación del gazpacho se mezclaron 20 g de tomate con 7 g de pimiento rojo, 5 g de cebolla, 2 g de pepino, 1g de ajo, 1 g de vinagre, 3 g de aceite de oliva, 0,88 g de sal y 4,5 g de extracto BGE por cada 100 g de gazpacho. Después se trituró todo en una batidora casera (marca Mandine), se tomó una alícuota y se congeló, y el resto se dejó en refrigeración durante 24 horas y posteriormente también se congeló. Ambos gazpachos congelados fueron liofilizados (Telstar LyoQuest) y almacenados a -20ºC hasta su análisis.

Para la preparación de la crema de espárrago se agregaron 15 g de espárrago triguero, 10 g de cebolla, 4 g de aceite de oliva, 1 g de ajo, 2 g de vino blanco, 1 g de maicena, 0,6 g de sal y 4,5 g de extracto BGE por cada 100 g de crema. Más tarde, se trituraron todos los ingredientes, se tomó una alícuota que se congeló y el resto de la crema se sometió a una cocción de 20 minutos a 100ºC. Después, la crema también se congeló y liofilizó como se ha indicado para el gazpacho.

Para la preparación de la crema de calabacín se utilizaron 36,1 g de calabacín, 5 g de cebolla, 3,6 g de aceite de oliva, 10 g de patata, 0,56 g de sal y 4,5 g de extracto BGE por cada 100 g de crema. Posteriormente, se mezcló todo y se trituró en la batidora. Y posteriormente se tomó una alícuota

antes y después del tratamiento térmico que fue igual al indicado para la crema de espárragos. Finalmente, también se congeló y liofilizó como se ha indicado para la crema anterior.

### 4.4 Formulación de alimentos funcionales con adición del extracto después del procesado del alimento

La incorporación del extracto BGE (10,4 g) a matrices alimentarias comerciales (230 g de cada matriz: gazpacho, crema de espárrago y crema de calabacín) de marca Ferrer. Tras el mezclado usando se realizaron dos tratamientos térmicos, la pasteurización y la esterilización y uno control sin tratamiento térmico.

**Figura 14:** Mezclas de a) espárrago, b) gazpacho, c) calabacín tras su liofilización.

Para la pasteurización, las mezclas se colocaron a un baño maría durante 1 hora a 100ºC. Y para llevar a cabo la esterilización, 240 g de cada alimento se introdujeron en un autoclave durante 20 minutos a 120ºC. Después, se sometieron al proceso de liofilización y se almacenaron hasta su posterior análisis (Figura 14).

### 4.5 Digestión *in vitro*

Los alimentos funcionales preparados como se describe en el apartado 4.4 fueron siguiendo el procedimiento descrito por Morales *et al.*, 2018b con modificaciones. El proceso de digestión consta de tres fases: la oral, la gástrica y la intestinal. En primer lugar, para la fase oral, se obtuvo 5 mL de saliva humana que se mezcló con 5 mL de agua MiliQ. Después se añadió los 20 mL del alimento funcionalizado con el extracto BGE y otros 34 mL de agua MiliQ, y se transfirió al vaso de precipitado con agitación suave durante 2 minutos. El contenido del recipiente se acidificó con ácido clohídrico (HCl) de 6 M (ajustando el pH a 2) y también se incorporó 275 mg de pepsina.

Posteriormente, fue incubado a 37ºC en un titulador (Figura 15) (Titrino plus, Metrohm, Herisau, Suiza) con agitación durante 1 hora simulando la digestión gástrica. La digestión intestinal comenzó añadiendo 1 mL de $CaCl_2$ 325 mM y 3 mL de NaCl 3,25 M, y se ajustó el pH a 6 mediante adición de NaOH 0,5 M. Luego, se agregó una solución pancreática que contiene 633mg de extracto biliar, 228 mg de lecitina de huevo, 20 mg de pancreatina y 6 mL de buffer trizma-maleato 50 mM, pH 7,5. Finalmente subió el pH hasta 7,5 y se mantuvo a 37ºC con agitación durante 2 h para simular a la digestión intestinal.

**Figura 15:** Titrino plus para la simulación de la digestión.

Después del proceso de digestión, las muestras digeridas se sometieron a centrifugación (7000 rpm durante 15 minutos) para separar el sobrenadante (que simularía la fracción bioaccesible) y el precipitado no soluble que simularía la fracción no bioaccesible. Ambas fracciones se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido y obtuvieron muestras secas para el análisis de los compuestos bioactivos mediante la liofilización.

### 4.6 Determinación de ergosterol

La extracción de ergosterol se realizó por el método de saponificación descrito por Gil-Ramírez *et al.*, 2013 con pequeñas modificaciones: se adicionaron muestras liofilizadas (500 mg) en una botella de vidrio con una imán magnética y 15 mL de KOH 11,5% (p/v) en etanol:agua (45:55 v/v) con un 300 mg de ácido ascórbico como un antioxidante hidrosoluble. Esta mezcla se llevó a un baño de 80ºC con agitación magnética durante 15 minutos para que se produjese la saponificación. Una vez que se detuvo la reacción enfriando rápidamente la botella bajo el agua frío, se añadieron 10 mL de hexano con BHT 0,01% (p/v), un antioxidante liposoluble, se agitaron 2 minutos en un agitador magnético y se dejaron reposar durante 5 minutos para que se provocara una separación de dos fases. Se recogió la fase insaponificable y se agregaron otros 5 mL de solución de BHT a la

fase acuosa para una segunda extracción. Finalmente, se juntaron ambas fracciones insaponificables en un matraz, se evaporaron con una corriente de nitrógeno y se obtuvo la fracción insaponificable seca.

Las fases insaponificables obtenidas se analizaron por cromatografía de gases (Figura 16) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU, modelo 7890) acoplada a espectrometría de masa en tándem (GC-MS/MS) modelo 5975C para identificar y cuantificar el compuesto de interés: ergosterol. El análisis se realizó siguiendo el protocolo descrito por Gil-Ramírez *et al.*, 2013, las muestras se inyectaron a una concentración de 6 mg/mL con un auto inyector modelo G4513A en una columna capilar Agilent de 30 metros (0,25 mm de diámetro interno y 0,25 mm de espesor de fase).

**Figura 16:** Cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 7890A

La temperatura del inyector se fijó en 260ºC, la del detector en 350ºC y el programa de temperatura del horno se siguió el método descrito por Gil-Ramírez *et al.*, 2013, que comenzó a 60ºC, aumentando 40ºC/min hasta los 310ºC mantenida durante 15 minutos. El gas de arrastre fue helio, a un flujo de 29,4 mL/min y una presión de entrada de 0,19 MPa.

Para poder identificar y cuantificar el ergosterol en las muestras, primero se realizó una recta de calibrado utilizando el patrón de ergosterol y hexadecano (10% v/v en cloroformo:metanol 2:1), entonces se identificó que ese compuesto aparece a los 12,2 minutos como tiempo de retención en el cromatograma.

### 4.7 Determinación de la eritadenina

La extracción de eritadenina se siguió al método descrito por Morales *et al.*, 2018b consistió en incorporar 10 mL de etanol 60% a 1 g de muestras liofilizadas y se homogenizaron agitando 2

minutos en un vórtex. Después se centrifugó a 7000 rpm durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante (fase orgánica). Se realizó una segunda extracción repitiendo los pasos anteriores, juntando los sobrenadantes y se filtraron al vacío. Tras la filtración, se traspasaron a un matraz aforado para eliminar el etanol en un rotavapor Buchi B480 con vacío a 60ºC. Finalmente, se congelaron y liofilizaron para eliminar el agua.

**Figura 17:** HPLC-DAD

Las muestras liofilizadas se analizaron mediante cromatografía de líquido (HPLC) (Pro-Star 330, Varian, Madrid, España) acoplado a un detector de PDA (Pro-Star modelo 363, Varian, Madrid, España) (Figura 17). Las muestras secas se disolvieron en la fase móvil (20 mg/mL), se inyectaron (10 µL) en la columna C18 Spherisorb ODS2 (4 x 250 mm, 5 µm, Waters, Missisagua Ontario, Canada) desarrolladas a un flujo de 0,5 mL/min con agua:acetonitrilo (98:2, 1% v/v TFA). La eritadenina se cuantificó a 260 nm utilizando estándar comercial (0,004-0,25 mg/mL). El compuesto se eludió después de 10,5 minutos, donde mostró el espectro UV característico de la eritadenina. El programa fue seguido al método descrito por Morales *et al.*, 2018b con ligeras modificaciones.

### 4.8 Determinación de los β-glucanos

La determinación del contenido de β-glucanos se llevó a cabo mediante un kit enzimático específico para setas y levaduras (Megazyme, Biocom, Barcelona, España) (Figura 18). Para esa determinación, por un lado, se realizó la solubilización e hidrólisis parcial de los glucanos totales y otros azúcares, y por otro, la de los α-glucanos y otros azúcares.

Para determinar el contenido de los glucanos totales, además de la D-glucosa presente en oligosacáridos y sacarosa y la D-glucosa libre, se añadieron 750 µL de HCl 37% a las muestras (50 mg) en los tubos de ensayos, se agitó en vórtex y se incubó en un baño (Memmert GmbH + Co,

Schwabach, Alemania) a 30ºC durante 45 minutos. Al finalizar, se agregaron 5 mL de agua miliQ, se agitaron y se incubaron durante 2 horas en baño a 100ºC. Cuando transcurrió 2 horas, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 5 mL de KOH 2M. Después se transfirió el contenido de los tubos a un matraz aforado de 50 mL y se enrasó con tampón acetato de sodio 200 mM pH 5. De los matraces se tomó una alícuota de 2 mL y se centrifugó en una micro-centrífuga MiniSpin Plus (Eppendorf Ibérica, Madrid, España) a 10000 rpm durante 10 minutos. Se tomaron 100 µL por duplicado del sobrenadante de las muestras centrifugadas, se añadieron 100 µL de exo-1,3-beta-glucanasa (20 U/mL) y betaglucosidasa (4 U/mL), se agitaron y se incubaron en el baño a 40ºC durante 60 minutos. Posteriormente se agregaron 3 mL de GOPOD (mezcla de glucosa oxidasa/peroxidasa) y se incubaron a 40ºC durante 20 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia a 510 nm en el espectrofotómetro Genesys UV (Thermo Fisher Scientific, España).

Y para determinar el contenido de los α-glucanos, D-glucosa presente en sacarosa y la D-glucosa libre, se añadieron 1 mL de KOH 2M a las muestras (50 mg) en los tubos de ensayos con un imán y se incubó 20 minutos en un baño de hielo y agua con agitación magnética. Al terminar, se añadieron 4 mL de tampón acetato de sodio 1,2 M pH 3,8 e inmediatamente después 100 µL de amiloglucosidasa (1360 U/mL) con invertasa (500 U/mL) e incubar en un baño (Memmert GmbH + Co, Schwabach, Alemania) a 40ºC durante 30 minutos. Posteriormente, se sometió a centrifugación en una micro-centrífuga MiniSpin Plus (Eppendorf Ibérica, Madrid, España) a 4000 rpm durante 10 minutos. Se tomaron 100 µL por duplicado del sobrenadante, se añadieron 100 µL de tampón acetato de sodio 200 mM pH 5 y 3 mL de GOPOD (mezcla de glucosa oxidasa/peroxidasa) para incubar a 40ºC durante 20 minutos. Por último, se midió la absorbancia a 510 nm en el espectrofotómetro Genesys UV (Thermo Fisher Scientific, España).

**Figura 18:** kit enzimático específico para setas y levaduras de Megazyme

El contenido de los β-glucanos se calcularon siguiendo las instrucciones del kit y se indican como: [β-glucanos] = [glucanos totales + otros azúcares] – [α-glucanos + otros azúcares].

### 4.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un test ANOVA y un post-test de Tukey, que permitió agrupar los datos en función de si fueron significativamente distintos o no, teniendo un nivel significancia de $p<0,05$. A su vez, los gráficos de los datos procesados fueron las medias obtenidas con barras de error correspondiente a su desviación estándar muestral.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes de realizar un estudio clínico se debe de asegurar que el ingrediente funcional que se desea probar no se destruya con el tratamiento de incorporación del mismo en la matriz alimentaria vehicular y que dicha incorporación no reduzca su biodisponibilidad. Por ello, se realizaron diversas pruebas para poder elegir la matriz alimentaria más efectiva para su incorporación y su forma de incorporarlo, ya que el tratamiento térmico posterior necesario para que sea seguro su envasado puede alterar la concentración de los compuestos bioactivos. Además, como la matriz alimentaria donde se incorpore puede también modificar su bioaccesibilidad, se realizaron pruebas para determinar si con la digestión seguirían estando asequibles los principales compuestos hipocolesterolémicos descritos en el extracto BGE (extracto enriquecido en β-glucanos, β-glucan enriched extract) (Morales *et al*., 2019a).

### 5.1 Efecto de las diferentes formulaciones en el contenido de ergosterol

En primer lugar, se estudió el efecto de la adición de la mezcla BGE simultáneamente con la preparación de los alimentos (gazpacho y cremas de calabacín y espárragos) en las concentraciones de ergosterol que procedían del extracto fúngico (Figura 19a). El BGE contenía 2,3 mg ergosterol/g alimento (Morales *et al.*, 2018a) lo que equivalía a una concentración de 2,45 mg/g alimento teniendo en cuenta las concentraciones en las que fue adicionado a las diferentes matrices alimentarias. Tras su incorporación y mezclado con los ingredientes del gazpacho o de las cremas no se observaron variaciones significativas en su contenido.

El gazpacho como es un producto fresco que se consume sin calentar se probó su posible deterioro durante el proceso de conservación de 24h en el frigorífico. Los resultados indicaron que el ergosterol era estable ya que sus valores fueron los mismos que inmediatamente después de su preparación.

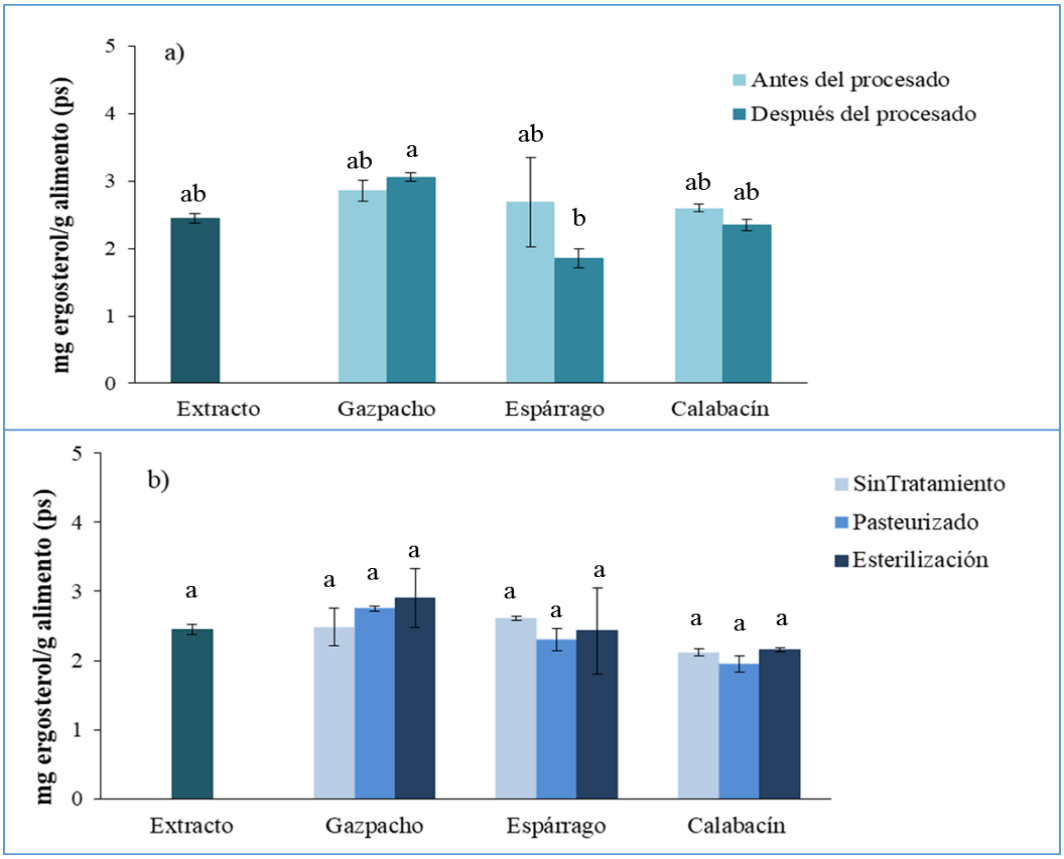



**Figura 19:** Concentración de ergosterol en a) un gazpacho, una crema de espárrago y una de calabacín suplementados con un extracto de shiitake (BGE) durante su elaboración y b) suplementados una vez los productos estaban ya elaborados siendo necesaria un segundo tratamiento térmico para su conservación (pasteurización, esterilización y control sin tratamiento térmico). Las letras (a-b) indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

Sin embargo, a la empresa suministradora de los productos alimenticios le era más conveniente mezclar el ingrediente funcional a posteriori, cuando sus productos estaban ya elaborados puesto que así garantizaba que habían seguido sus procedimientos estandarizados y mantenían los parámetros de calidad. Además, no podía desviar una línea de producción a la incorporación de un extracto que había sido obtenido en un laboratorio sin certificación ni maquinaria específica para la manipulación de alimentos. Por lo cual se decidió probar el efecto que supondría la adición del extracto BGE tras la elaboración de la matriz alimenticia, incluso cuando esto suponía la necesidad de someter a la mezcla resultante a un segundo tratamiento térmico para poder ser envasado y conservado con seguridad. Así, se mezclaron las cremas y el gazpacho comercial con el extracto de shiitake y tras el segundo tratamiento térmico no se notaron diferencias significativas respecto

a sus niveles de ergosterol (Figura 19b) cuando se incorporaron en gazpacho y crema de esparrago y una ligera disminución pero significativa cuando se adicionó a la crema de calabacín. Posteriormente, ni la pasteurización de los alimentos funcionalizados ni su esterilización supusieron pérdidas importantes en este metabolito comparadas con el control no sometido a tratamiento térmico y comparadas también con los valores obtenidos cuando la adición del extracto se produjo al mismo tiempo que la producción de las cremas o del gazpacho, indicando que la adición a posteriori no era ningún problema para mantener intactos los niveles de ergosterol en los alimentos funcionales.

Estos resultados no fueron muy sorprendentes porque el ergosterol es un compuesto termoestable según indicaron Morales *et al.*, 2018a. Además, los niveles también fueron similares en los tres tipos de alimentos probados indicando que cualquiera de ellos podría servir como matriz para la incorporación del ingrediente respecto a los niveles de ergosterol. Pero, la matriz alimentaria donde se incorpora un alimento puede también influir en su asimilación posterior. Durante la digestión pueden haber compuestos procedentes de esta matriz que dificulten o faciliten la liberación de estos compuestos bioactivos de la integridad del alimento modificando su bioaccesibilidad, es decir, impidiendo o mejorando la solubilidad de los compuestos funcionales en los líquidos fisiológicos para que puedan ser asimilados por los enterocitos de las paredes intestinales. Por ello se estudió también el efecto que producía en los niveles de ergosterol la digestión *in vitro* de las 3 matrices alimentarias funcionalizadas con el extracto BGE.

Los resultados indicaron que la incorporación del extracto dentro de una matriz como el gazpacho (Figura 20a) favorecía la bioaccesibilidad del ergosterol porque cuando el extracto se digería directamente (sin estar incorporado en ningún alimento) la fracción supuestamente bioaccesible mostraba concentraciones muy bajas de este metabolito. Además, era más fácilmente destruido por las enzimas o el pH estomacal ya que se reducía aproximadamente un 14% su concentración comparada con los niveles de ergosterol antes de la digestión. Incorporado en el gazpacho e independientemente del tratamiento con calor dado a posteriori, el ergosterol parecía encontrarse en mayores concentraciones en la fracción supuestamente bioaccesible indicando que la incorporación del extracto en esta matriz era incluso aconsejable para una mejor asimilación del metabolito hipocolesterolémico. La manera de dar el tratamiento térmico tras la incorporación del extracto BGE tampoco parecía influir demasiado en la posterior bioaccesibilidad, tal vez el

pasteurizado interfería ligeramente en la concentración de ergosterol en la fracción bioaccesible mientras que el control sin tratamiento tenía mejores concentraciones de este metabolito pero porque se había destruido menos durante su digestión.

Según Boileau *et al.,* 2002, el licopeno del tomate y otros compuestos facilitan el que se formen micelas en presencia de aceite de oliva u otros aceites vegetales que incorporan al ergosterol, porque al ser una molécula lipídica solo puede encontrarse en fluidos acuosos y se encuentra encapsulado en micelas de digestión mixtas según Gil-Ramírez *et al.,* 2014. Por tanto, la bioaccesibilidad de ergosterol en el gazpacho podría ser mayor, debido a que la absorción del compuesto aumentó gracias a la estimulación de la formación de micelas (Boileau *et al.*, 2002).

Cuando el exacto se incorporó en la crema de espárrago (Figura 20b) sin tratamiento térmico posterior se detectaron también mayores concentraciones de ergosterol en la fracción supuestamente bioaccesible comparada con la digestión del extracto digerido sin ninguna matriz. También se detectó una mayor destrucción que en el gazpacho entre antes y después de la digestión, sobretodo en aquel que no fue tratado con calor (aproximadamente 14% menos en el gazpacho y 30% menos en la crema). Una vez más, el tratamiento con pasteurización fue el menos adecuado para garantizar una mejor resistencia a la digestión y bioaccesibilidad del compuesto probablemente el tratamiento durante 1 hora fue excesivo, aunque la temperatura fuera más baja que durante la esterilización. Podría deberse a que, aunque el metabolito es bastante resistente al calor, algún otro compuesto se modificó facilitando la degradación del ergosterol durante la digestión. De todas formas la diferencia con respecto a la fracción bioaccesible conseguida sin tratamiento o con esterilización no es muy elevada.

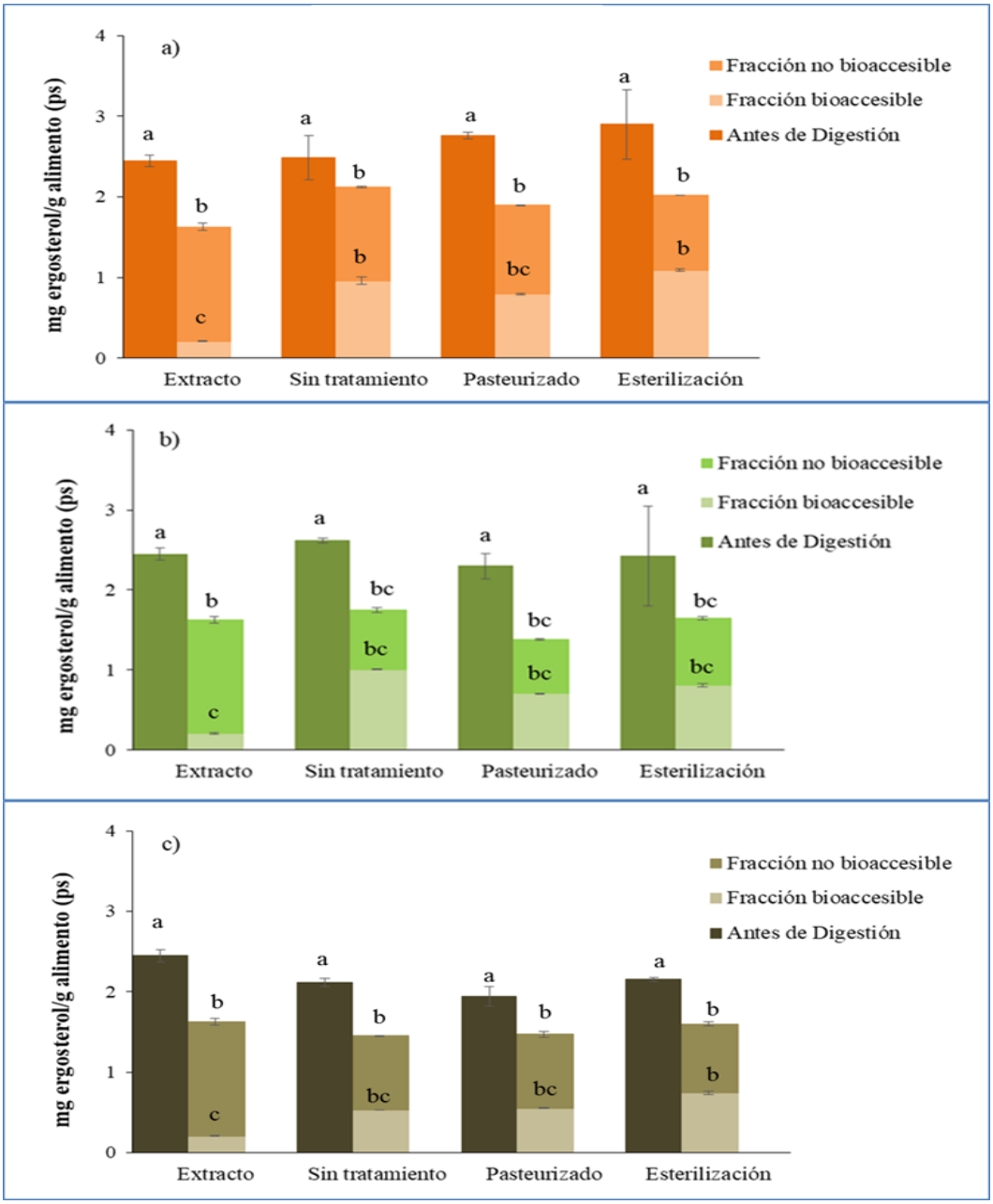



**Figura 20:** Concentración de ergosterol antes y después de someter a un modelo de digestión *in vitro* a) un gazpacho, b) una crema de espárrago y c) una crema de calabacín suplementadas con un extracto de shiitake (BGE) (una vez que la matriz alimentaria estaba ya preparada) y sometidas a un segundo tratamiento térmico. Las letras (a-c) indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

Cuando el extracto se incorporó a la crema de calabacín (Figura 20c) además de poder detectar menores concentraciones de ergosterol que en las otras dos matrices alimentarias también se pudo

notar degradaciones con la digestión del compuesto ligeramente mayores (33%) comparadas con las otras dos matrices (14% y 30%). indicando que esta matriz protege ligeramente menos de la digestión que las otras dos. Además, el contenido en ergosterol de la fracción supuestamente bioaccesible (36%) es menor que el gazpacho (45%) y la crema de espárrago (57%) en la muestra sin tratar y también en las otras dos tratadas.

Estas diferencias de bioaccesibilidad entre las cremas pueden deberse a la diferente cantidad de fibra dietética que contienen las diferentes matrices. Ninguna de las dos protege al ergosterol totalmente de su digestión (la degradación es bastante similar en cualquiera de las matrices comparadas con el extracto solo y con los diferentes tratamientos térmicos) pero posteriormente, permiten una mejor incorporación en la fase bioaccesible. La ligera diferencia de bioaccesibilidad entre las cremas de calabacín y de espárragos podría deberse a que la de calabacín contiene más fibra dietética (aproximadamente 2,4g/100g) que la de espárragos (0.92 g/100g) lo que tendería a secuestrar un poco más de ergosterol en su estructura arrastrándolo a la fracción no bioaccesible.

### 5.2 Efecto de las diferentes formulaciones en el contenido de eritadenina

Otro de los compuestos potencialmente hipocolesterolémico del shiitake es la eritadenina por lo cual también se estudió el efecto de la adición de la mezcla BGE simultáneamente con la preparación de los alimentos, a posteriori y el efecto de la digestión en la bioaccesibilidad.

Según los resultados analíticos el extracto BGE contenía una concentración de 2,7mg/g de eritadenina (Morales *et al.* 2018a). Niveles superiores al hongo (1,43 mg /g, tabla 3) porque el extracto se preparó para tener concentraciones elevadas de β-glucanos y de este compuesto. Aun así la concentración de eritadenina en el alimento funcionalizado fue 0,44 mg de eritadenina/g alimento.

Cuando se realizó la incorporación del extracto de shiitake al gazpacho no se observaron variaciones significativas en los niveles de eritadenina con respecto al extracto control. La refrigeración durante 24h no modificó tampoco sus niveles (Figura 21a). Sorprendentemente, cuando se determinó la concentración del metabolito en las cremas se observaron niveles más altos del compuesto, más incluso que el extracto de partida. Este aumento podría haberse debido a que algún compuesto presente en las cremas coeluía con la eritadenina durante su determinación por

HPLC, pero el espectro de absorción correspondía al de la eritadenina con un máximo de 260nm y cuando se analizaron las cremas comerciales no se detectaron estos niveles tan elevados (Figura 21b). Por lo que podría deberse a que las cremas contuvieran algún enzima que durante el mezclado fuera capaz de modificar algún precursor de este compuesto transformándolo en eritadenina. Eritadenina se puede encontrar unida a azúcares formando compuestos glucosilados y a otros alcaloides formando estructuras más complejas (Do y Cormier *et al.*, 1991). En las cremas comerciales estas enzimas estarían inactivadas con lo cual no se produciría esta liberación de la estructura característica de la eritadenina. No obstante, no se ha encontrado ninguna bibliografía referente a la posible transformación de otros compuestos en eritadenina puesto que su biosíntesis ha sido poco investigada, así que es un resultado que para explicarlo necesitaría de más investigación. De todos modos, los resultados demostraron que la eritadenina era termoestable ya que no se observaron variaciones significativas entre antes y después de someter a un tratamiento con temperatura.

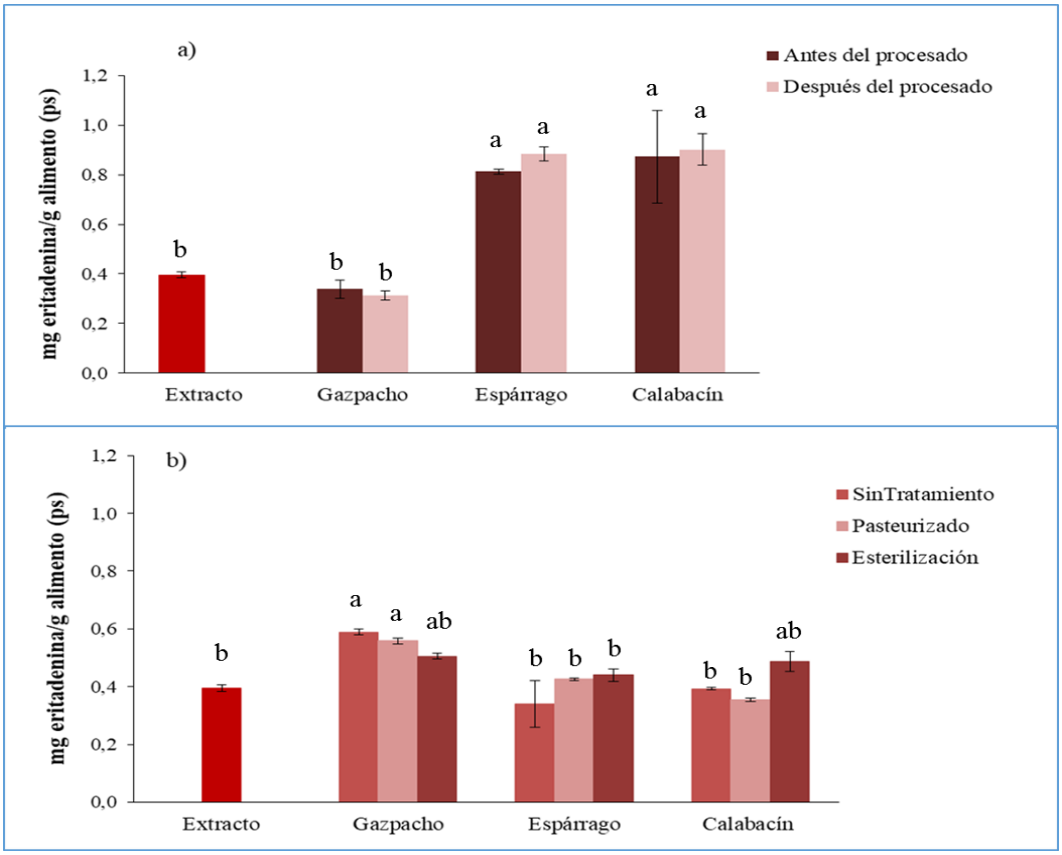



**Figura 21:** Concentración de eritadenina en a) un gazpacho, una crema de espárrago y una crema de calabacín suplementados con un extracto de shiitake (BGE) durante el proceso de elaboración

de la matriz alimentaria y b) suplementados una vez los productos estaban ya elaborados siendo necesaria un segundo tratamiento térmico para su conservación (pasteurización, esterilización y control sin tratamiento térmico). Las letras (a-b) indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

En cuando a las mezclas del extracto BGE con el gazpacho y las cremas ya elaboradas y que incluso se sometieron a un segundo tratamiento térmico, tampoco se notaron diferencias significativas respecto a los niveles de eritadenina (Figura 21b). Ni la pasteurización ni la esterilización supusieron pérdidas importantes en este compuesto comparando con el control no sometido a tratamiento térmico.

Estos resultados son similares a los de Sánchez-Minutti *et al.*, 2019, mostraron que en tratamiento con baño de agua caliente (pasteurización) o con autoclave (esterilización), la concentración de eritadenina se mantuvo, mientras que con el tratamiento de tostado y fritura, la concentración de ese compuesto se disminuyó. Entonces, podemos deducir que, la presencia de agua durante el tratamiento a altas temperaturas mostró un efecto positivo en la preservación de eritadenina (Sánchez-Minutti *et al.*, 2019).

Además, como mostraron también que es más conveniente para la empresa alimentaria incorporar el ingrediente funcional a posteriori y las concentraciones de eritadenina también fueron similares en los tres tipos de alimentos probados indicando que cualquiera de ellos podría servir como matriz para la incorporación del ingrediente respecto a los niveles de eritadenina.

Sin embargo, durante la digestión puede haber compuestos procedentes de esta matriz que influyen en la integridad de estos compuestos bioactivos del alimento modificando su bioaccesibilidad. Por ello se estudió también el efecto que producía la digestión *in vitro* de las 3 matrices alimentarias funcionalizadas con el extracto BGE en el contenido de eritadenina.

Los resultados indicaron que la incorporación del extracto dentro de una matriz como el gazpacho (Figura 22a) favorecía la bioaccesibilidad de la eritadenina comparando con el extracto control, porque cuando el extracto se digería directamente la fracción bioaccesible mostraba concentraciones muy bajas de este metabolito. Aparentemente era fácilmente destruido por las enzimas o el pH estomacal ya que, tiene una alta solubilidad en agua, por tanto se reducía aproximadamente un 84 % su concentración comparada con los niveles de eritadenina antes de la

digestión. Incorporado en el gazpacho, la concentración de la eritadenina después de la digestión disminuyó solo ligeramente, si la adición se realizaba sin tratamiento térmico posterior. Y la mayor parte de la eritadenina se encontraba en la fracción supuestamente bioaccesible indicando que la incorporación del extracto en esta matriz mejora la asimilación de ese compuesto hipocolesterolémico. Sin embargo, si posteriormente se esterilizaba o particularmente se pasteurizaba se producía una mayor destrucción de la eritadenina durante la digestión dejando menos compuesto bioaccesible.

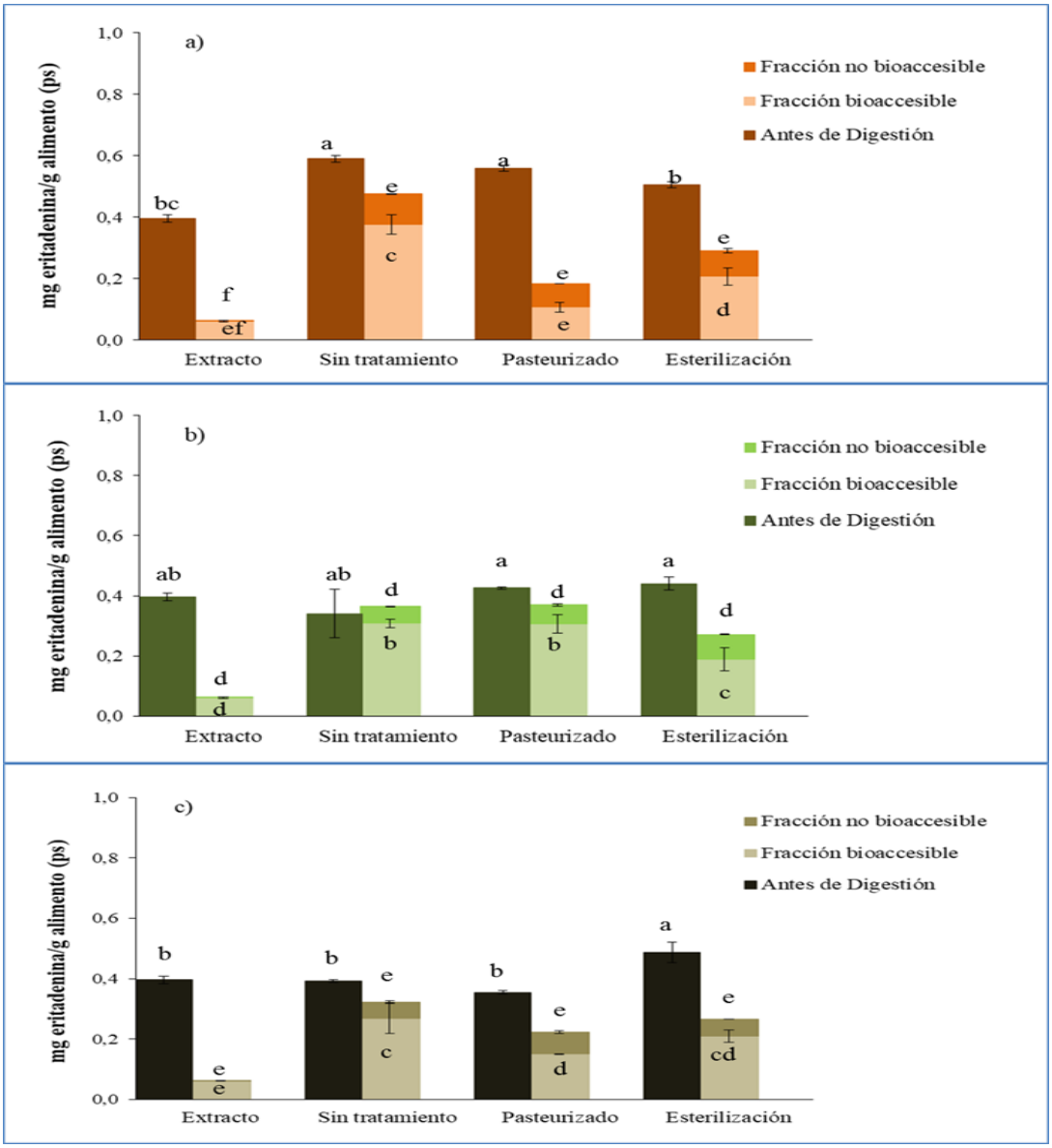



**Figura 22:** Concentración de eritadenina antes y después de someter a un modelo de digestión *in vitro* a) un gazpacho, b) una crema de espárrago y c) una crema de calabacín suplementadas con

un extracto de shiitake (BGE) (una vez que la matriz alimentaria estaba ya preparada) y sometidas a un segundo tratamiento térmico. Las letras (a-f) indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

Cuando el exacto se incorporó en la crema de espárrago (Figura 22b) no se detectaron degradación del compuesto (0%) y mayores concentraciones de eritadenina en la fracción supuestamente bioaccesible comparada con la digestión del extracto digerido sin ninguna matriz (84%). Excepto cuando la crema fue sometida posteriormente a un proceso de esterilización donde se producía una mayor pérdida durante la digestión y menor cantidad de eritadenina en la fase bioaccesible. Comparado con el gazpacho, parece que si no se trata con calor es mejor adicionarlo al gazpacho puesto que la fracción bioaccesible es mayor, pero si se va a pasteurizar el producto es mejor adicionarlo a la crema de espárragos.

Cuando el extracto se incorporó a la crema de calabacín (Figura 22c) se detectó también una mayor bioaccesibilidad que la digestión del extracto control. La degradación debido a la digestión en el producto sin calentamiento fue mínima mientras que el uso de algún tratamiento térmico suponía mayores pérdidas de eritadenina en la fase bioaccesible debida principalmente a la disminución producida por la digestión. Comparada con las otras dos matrices, los valores sin calentamiento previo fueron parecidos y el pasteurizado fue negativo al igual que se notó para el gazpacho. Según Morales *et al.*, 2018b, los tratamientos térmicos como fritura, a la parrilla, hervidor, cocinar en microondas, etc., reducían los niveles de eritadenina, así que aparentemente la integración del extracto en una matriz protege al compuesto parcialmente de esa degradación térmica ya que en el trabajo citado se utilizaron directamente cuerpos fructíferos de shiitake. Sin embargo, de alguna manera sí que condiciona al alimento de alguna manera de forma que durante la digestión se produce una mayor degradación que si no se le somete al tratamiento térmico.

### 5.3 Efecto de las diferentes formulaciones en el contenido de β-glucanos

Finalmente se estudió el efecto de la adición de la mezcla BGE simultáneamente con la preparación de los alimentos (gazpacho y cremas de calabacín y espárragos) en las concentraciones de β-glucanos que procedían del extracto fúngico. La adición del BGE a un alimento suponía enriquecerlo en β-glucanos fúngicos hasta alcanzar un contenido de 12,8 mg/100g alimento (Figura

23a). Tras su mezclado con los ingredientes del gazpacho o de las cremas no se observaron variaciones significativas en su contenido con respecto al control sin matriz.

Además, los resultados indicaron que el tratamiento con calor no afectaba a los niveles de β-glucanos, porque la mayoría de los β-glucanos del extracto de shiitake son insolubles en agua caliente y estos polisacáridos son resistentes a las altas temperaturas como las que tienen lugar durante las cocciones culinarias (Morales *et al.*, 2019a).

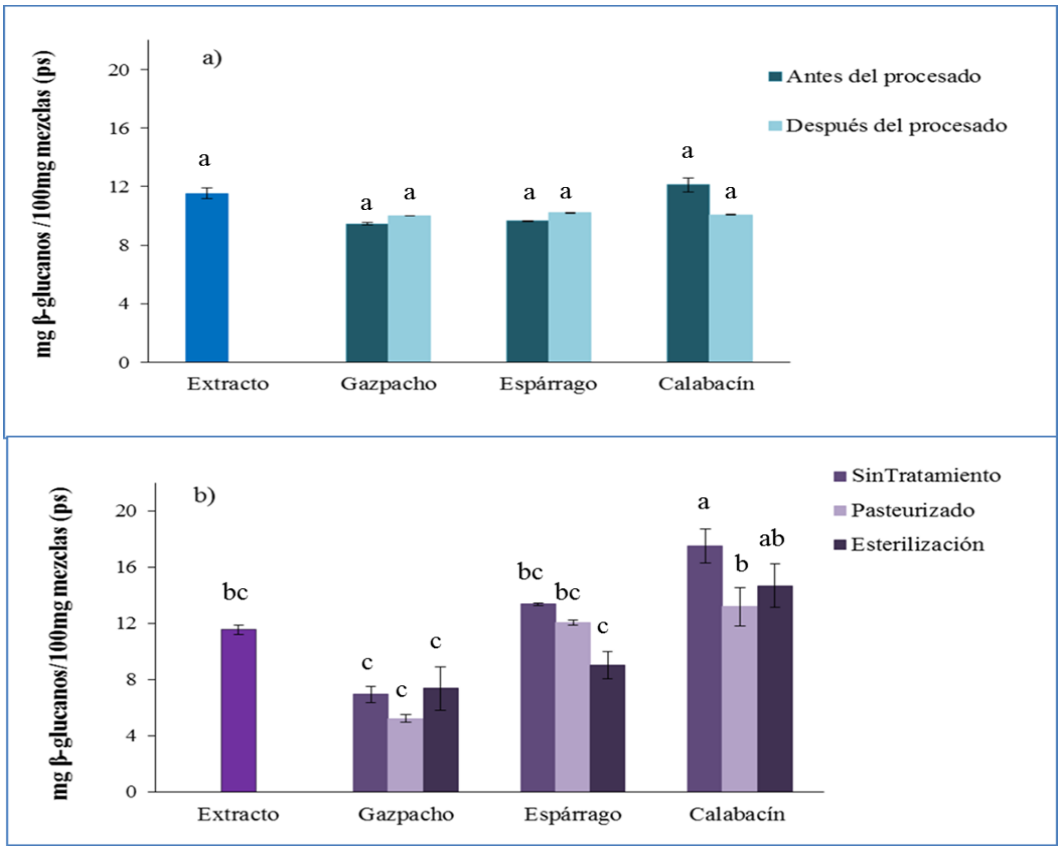



**Figura 23:** Concentración de β-glucanos en a) un gazpacho, una crema de espárrago y una crema de calabacín suplementados con un extracto de shiitake (BGE) durante el proceso de elaboración de la matriz alimentaria y b) suplementados una vez los productos estaban ya elaborados siendo necesaria un segundo tratamiento térmico para su conservación (pasteurización, esterilización y control sin tratamiento térmico). Las letras (a-c) indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

En cuanto a las mezclas del extracto BGE con el gazpacho y las cremas comerciales sometidos a un segundo tratamiento térmico, mostraron que con la crema de calabacín obtuvo un nivel de β-

glucanos mayor que otras dos matrices (Figura 23b). Esta crema era la que mayor contenido en fibra dietética presentaba luego los niveles tan elevados, superiores incluso a los del extracto control, pudieron deberse a que como la determinación de β-glucanos se realiza mediante un kit colorimétrico, aunque sea específico para hongos, podría haber cierta interferencia con los β-glucanos propios del producto, sobre todo por la gran concentración que presentaba. Aun así, se pudo observar que ni la pasteurización ni la esterilización supusieron pérdidas importantes en este compuesto comparando con el control no sometido a tratamiento con calor. Sin embargo, estos tratamientos sí fueron perjudiciales si el extracto se adicionaba a la crema de espárragos, puesto que sobre todo la esterilización supuso una disminución de aproximadamente 33% de los β-glucanos comparado con el alimento no tratado con calor. El gazpacho presentó menores niveles de β-glucanos que los otros dos productos. Podría deberse a que la mayor cantidad de grasa de este producto interfiriera con la extracción o el uso del kit ya que no hay una respuesta clara que justifique esta observación. En los métodos colorimétricos hay mayor posibilidad de error o interferencias que si se utilizan tecnologías más avanzadas como RMN etc. A pesar de eso, los tratamientos térmicos secundarios no modificaron significativamente los niveles de β-glucanos detectados.

Cuando se estudió también el efecto que producía la digestión *in vitro* de las 3 matrices alimentarias funcionalizadas con el extracto BGE en el contenido de β-glucanos, los resultados indicaron que la incorporación del extracto dentro de una matriz como el gazpacho, la digestión debía de facilitar la extractabilidad de los β-glucanos puesto que se detectaban mayores concentraciones que antes de su digestión (Figura 24a). Luego el kit colorimétrico utilizado no era capaz de determinar de forma precisa la concentración real de los β-glucanos de la mezcla. Esta observación también coincide con lo detectado por otras publicaciones (Morales *et al.*, 2019b) (Moreiras *et al*., 2013) y constituye el inconveniente de estas determinaciones indirectas. Sin embrago, también podría estar ocurriendo que, como se indicó en el apartado anterior, debido a la grasa o a otros compuestos presentes se hubiera infravalorado el nivel de β-glucanos presente en estas muestras (antes de digestión). Una vez digerido, la determinación de β-glucanos volvería entonces a ser la correcta y parecería un aumento en los niveles de este metabolito. De todas maneras, los resultados indicaron que la incorporación del BGE en el gazpacho aumentaba la concentración de los mismos en la fracción supuestamente bioaccesible comparando con el extracto control, porque cuando el extracto se digería directamente la fracción bioaccesible mostraba concentraciones muy bajas de

este metabolito. Además aumentaron también los niveles de β-glucanos bioaccesibles tras la digestión hasta aproximadamente un 50% cuando el tratamiento térmico era la esterilización.

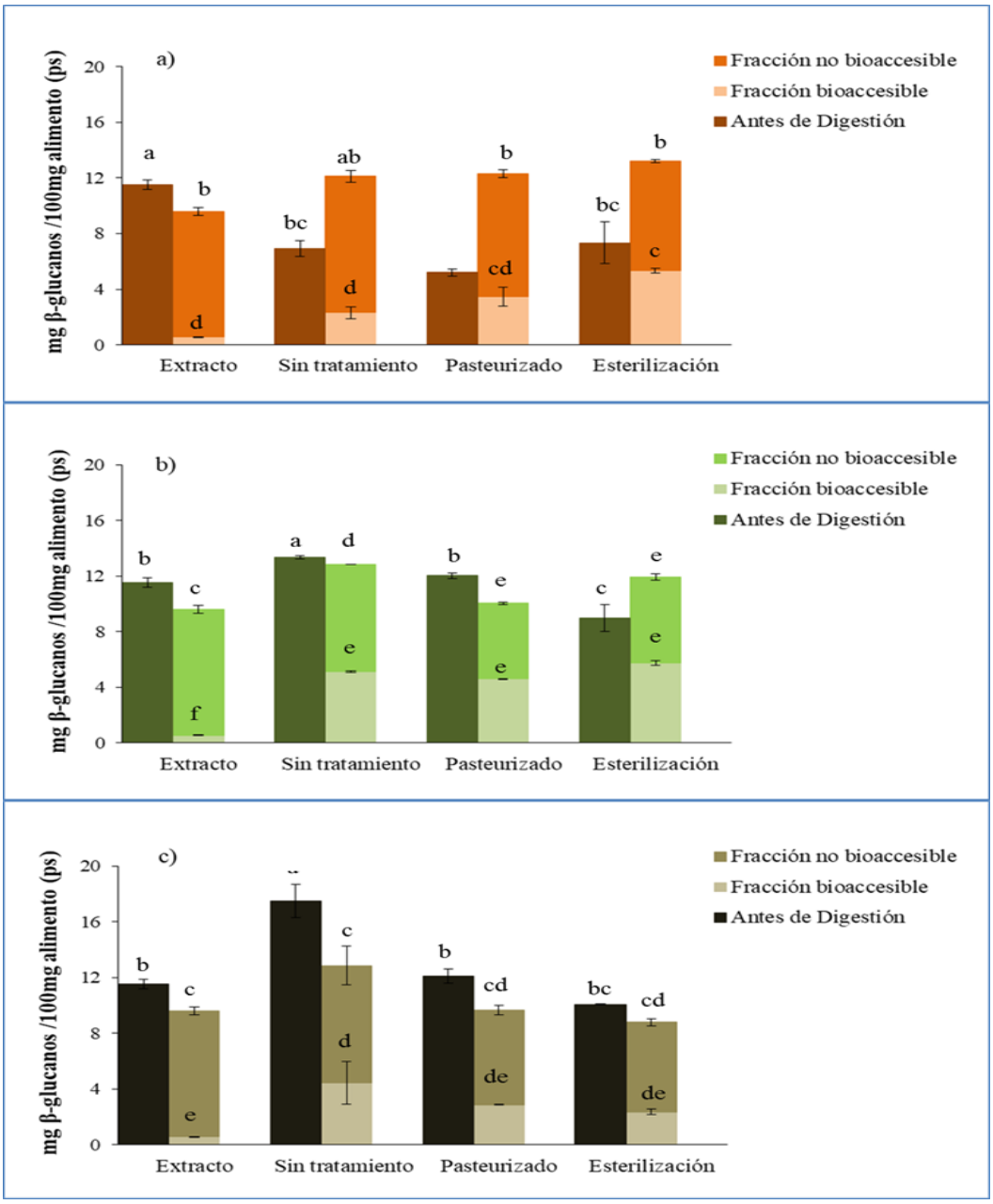



**Figura 24:** Concentración de β-glucanos antes y después de someter a un modelo de digestión *in vitro* a) un gazpacho, b) una crema de espárrago y c) una crema de calabacín suplementadas con un extracto de shiitake (BGE) (una vez que la matriz alimentaria estaba ya preparada) y sometidas a un segundo tratamiento térmico. Las letras (a-f) indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

Sin embargo, los β-glucanos fúngicos no son bioaccesibles y normalmente no son asimilados por los enterocitos sino que pasan al colon donde son fermentados por el microbioma del colon por lo que son considerados como fibra dietética. Aparentemente, actúan como compuestos hipocolesterolémicos porque secuestran en su estructura al colesterol y sales biliares, luego en principio, que disminuya la proporción de β-glucanos en la fracción no bioaccesible podría significar que disminuiría su capacidad como agentes hipocolesterolémicos. Pero, podría no ser del todo un efecto negativo puesto que los β-glucanos son compuestos que también presentan actividades inmunomodulatorias y según los estudios (Theuwissen y Mensink *et al.*, 2008) parece que son los β-glucanos solubles en agua son parcialmente bioaccesibles consiguiendo atravesar la barrera intestinal por las llamadas células M (Chan *et al.*, 2009) donde ejercerían su función reguladora del sistema inmune.

Cuando el exacto se incorporó en la crema de espárrago (Figura 24b) no se detectaron diferencias de valores tan significativas entre antes y después de la digestión como las notadas en el gazpacho por lo que probablemente, las diferencias notadas en el gazpacho se debieron a una infravaloración de los niveles de β-glucanos en las muestras de antes de la digestión (debidas a la limitación de realizar la determinación con un kit antes indicadas). La digestión prácticamente no modificó los valores de los β-glucanos, solo los disminuyó ligeramente en la pasteurización pero probablemente no sea significativo debido a la limitación del kit usado para su detección al igual que tampoco se cree que sea significativo el ligero aumento detectado en la esterilización. Lo que sí se pudo comprobar es que la digestión cortaba las cadenas de los polisacáridos haciéndolos más solubles en agua y por lo tanto más bioaccesibles de igual forma a lo que se observó con el gazpacho, disminuyendo la posibilidad de que estos compuestos llegaran al colon ya que pasaban a formar parte de la fracción supuestamente bioaccesible.

Cuando el extracto se incorporó a la crema de calabacín (Figura 24c) se detectó una ligera disminución de los niveles de β-glucanos con la digestión lo que requiere de más estudios con determinaciones más complejas que el kit para saber si son debidas a interferencias o a que realmente la digestión supuso una ligera destrucción de β-glucanos fúngicos. Pero lo que sí se pudo observar es que con esta matriz la fracción accesible contenía ligeramente menos β-glucanos que el gazpacho sobre todo en la muestra que fue sometida posteriormente a esterilización. Indicando que para mantener los β-glucanos hipocolesterolémicos, la mezcla con gazpacho sin tratamiento

térmico era la más recomendada pero si se deseaba también que hubiera β-glucanos solubles con potencial actividad inmunomodulatoria, la mezcla más recomendada debía ser la de la crema de espárragos sin tratamiento (la esterilizada también podría recomendarse pero disminuye ligeramente la proporción de β-glucanos hipocolesterolémicos).

## 6. CONCLUSIÓN

En este trabajo, se ha evaluado el método de procesado más conveniente para la adición de un extracto hipocolesterolémico (*L. edodes*) a la matriz alimenticia más adecuada para mantener las propiedades beneficiosas del extracto y según los resultados obtenidos se puede concluir que:

- La incorporación del extracto de *L. edodes* a los alimentos vegetales seleccionados se podría llevar a cabo tanto durante el procesado como a posteriori porque no suponía pérdidas importantes en ergosterol, eritadenina y β-glucanos pero era ligeramente preferible no someterlos a un tratamiento térmico secundario.
- Las tres matrices seleccionadas podían ser utilizadas como portadoras puesto que las diferencias entre los niveles de los metabolitos estudiados eran similares teniendo cierta ventaja el uso del gazpacho en dos de los metabolitos estudiados, en los niveles de β-glucanos dependerá de si se desea estimular su nivel en polisacáridos potencialmente hipocolesterolémicos o incorporar también posibles β-glucanos potencialmente inmunomoduladores.
- La incorporación del extracto en las matrices alimentarias es muy recomendable porque ayuda a que los compuestos bioactivos sean menos destruidos durante la digestión más bioaccesibles.

Por todo ello, en el ensayo clínico realizado, el extracto BGE fue administrado a los tres alimentos comerciales (y así se conseguía diversificar la dieta de los voluntarios) y su mezcla se realizó justo antes de su ingesta evitando las ligeras disminuciones notadas en alguno de los procedimientos térmicos secundarios estudiados para un metabolito concreto. Si el producto posteriormente se comercializa podría ser sometido a un tratamiento secundario (preferiblemente una esterilización) sin que los niveles de los metabolitos de interés se vieran modificados drásticamente.

## 7. BIBIOGRAFÍA

Almun, F. (2015). Cultivation of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*) on Coffee Husk at Dilla University, Ethiopia. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 3(2): 64-70.

Álvarez, E.E. y Sánchez, P.G. (2006). La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria*, 21(2): 61-72.

Ballantyne, C.M. (2002). Ezetimibe: efficacy and safety in clinical trials. *European Heart Journal Supplements*, 4: 5-15.

Barra, F.J., Esteve, M.J. y Frigola, A. (2010). Ascorbic Acid is the only bioactive that is better preserved by high hydrostatic pressure than by thermal treatment of a vegetable beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 10070-10075.

Bisen, P.S., Baghel, R.K., Sanodiya, B.S., Thakur, G.S. y Prasad, G.B.K.S. (2010). *Lentinula edodes*: a macrofungus with pharmacological activities. *Current Medicinal Chemistry*, 17(22): 2419-2430.

Boileu, T.W., Boileu, A.C. y Erdman, J.W. Jr. (2002). Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene. *Experimental Biology and medicine*, 227(10): 914-919.

Boticario, C. y Cascales, A. (2012). Digestión y metabolismo energético de los nutrientes. *UNED*, 1-383.

Calpe-Berdiel, L., Escola-Gil, J.C. y Blanco-Vaca, F. (2009). New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis*, 203: 18–31.

Cánovas, G.B. y Aguirre, D.B. (2010). Procesamiento no térmico de alimentos. *Scientia Agropecuaria*, 1(1): 81-93.

Castells, P. (2009). El almidón. *Investigación y Ciencia*, 41.

Chan, G.G.F., Chan, W.K. y Sze, D.M.Y. (2009). The effects of β-glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology and Oncology*, 25: 1-12.

Chang, S.T. (1999). World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. in China. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1: 387–409.

Chang, S.T. y Miles, P.G. (1987). Historical record of the early cultivation of *Lentinus* in China. *Mushroom Journal of Tropics*, 7: 31-37

Chang, S.T. y Miles, P.G. (2004). Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. *CRC Press*, 2ºed: 1-451.

Chibata, I., Okumura, K., Takeyama, S. y Kotera, K. (1969). Lentinacin: A new hypocholesterolemic substance in *Lentinus edodes*. *Experientia*, 25.

Daramola, B. y Osanyinlusi, S. A. (2006). Investigation on modification of cassava starch using active components of ginger roots (*Zingiber officinale Roscoe*). *African journal of Biotechnology*, 5(10): 917-920.

Dergal, S.B. (2006). Química de los alimentos. *Pearson Educación*, 4ªed: 1-736.

Dhiman, K., Gupta, A., Sharma, D.K., Gill, N.S. y Goyal, A. (2012). A review on the medicinally important plants of the family *Cucurbitaceae*. *Asian Journal of Clinical Nutrition*, 4(1): 16-26.

Do, C.B. y Cormier, F. (1991). Effect of low nitrate and high sugar concentrations on anthocyanin content and composition of grape (Vitis vinifera L.) cell suspension. *Plant Cell Reports*, 9(9): 500-504.

Enman, J., Rova, U. y Berglund, K.A. (2007). Quantification of the bioactive compound eritadenine in selected strains of Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 1177-1180.

FAOStat (2016), Hongos y trufas: exportación e importación, FAO, United Nations.

FAOStat (2017), Hongos y trufas: producción, FAO, United Nations.

FAOStat (2007-2017), Hongos y trufas: producción, FAO, United Nations.

Fellows, P. (1998). Food processing technology. *CRC Press*, 1ºEd: 1-591.

Firenzuoli, F., Gori, L. y Lombardo, G. (2008). The medicinal mushroom *Agaricus blazei Murrill*: Review of literature and pharmaco-toxicological problems. *eCAM*, 5(1): 3-15.

García-Ochoa, F., Santos, V.E., Casas, J.A. y Gómez, E. (2000). Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18: 549-579.

Giavasis, I. (2014). Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, 26: 162-173.

Gil-Ramírez, A., Clavijo, C., Palanisamy, M., Soler-Rivas, C., Ruiz-Rodríguez, A., Marín, F. R. y Pérez, M. (2011). Edible mushrooms as potential sources of new hypocholesterolemic compounds. *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, 2: 110-119.

Gil-Ramírez, A., Aldars-García, L., Palanisamy, M., Jiverdeanu, R.M., Ruiz-Rodríguez, A., Marín, F.R., Reglero, G. y Soler-Rivas, C. (2013). Sterols enriched fractions obtained from *Agariucus bisporus* fruiting bodies and by-products by compressed fluid technologies (PLE and SFE). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 18: 101-107.

Gil-Ramírez, A., Ruiz-Rodríguez, A., Marín, F.R., Reglero, G. y Soler-Rivas, C. (2014). Effect of ergosterol-enriched extract obtained from *Agaricus bisporus* on cholesterol absorption using an in vitro digestion model. *Journal of Functional Foods*, 11: 589-597.

Gil-Ramírez, A., Morales, D. y Soler-Rivas, C. (2018). Molecular actions of hypocholesterolemic compounds from edible mushrooms. *Food and Function*, 9: 53-69.

Guillamón, E., García-Lafuente, A., Lozano, M., D`Arrigo, M., Rostagno, M.A., Villares, A. y Martínez, J.A. (2010). Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, 81(7): 715-723.

Hibbett, D.S. (2001). Shiitake mushrooms and molecular clocks: historical biogeography of *Lentinula*. *Journal of Biogeography*, 28: 231-241.

Instituto Nacional de Estadística (INE) (2017). Defunciones según la Causa de Muerte 2017: tasas estandarizadas de mortalidad por causa de muerte.

Katzbauer, B. (1998). Properties and applications of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability*, 59: 81-84.

Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E. y Etherton, T.D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113 (9): 71-88.

Lattimer, J.M. y Haub, M.D. (2010). Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients*, 2(12): 1266-1289.

Martín-Moreno, J.M. y Gorgojo, L. (2002). Licopeno y salud: a propósito del tomate y de algunas virtudes del gazpacho, del "pa amb tomaquet" y otros productos de nuestra gastronomía. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 9: 17-26.

Martínez, C., Ros, G., Periago, M.J. y López, G. (1999). Biodisponibilidad del hierro de los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 49(2): 106-113.

Martínez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M. y Martínez, W. (2007). México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. *ECOSUR-CONACYT*, 6: 1-20.

Mau, J.L., Chen, P.R., y Yang, J.H. (1998). Ultraviolet irradiation increased vitamin D2 content in edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 5269-5272.

Morales, D., Jiménez-Piris, A., Ruiz-Rodríguez, A., Prodanov, M. y Soler-Rivas, C. (2018a). Extraction of bioactive compounds against cardiovascular diseases from *Lentinula edodes* using a sequential extraction method. *Biotechnology Progress*, 34(3): 746-755.

Morales, D., Tabernero, M., Largo, G., Polo, G., Jiménez-Piris, A.y Soler-Rivas, C. (2018b). Effect of traditional and modern culinary processing, bioaccessibility, biosafety and bioavailability of eritadenine, a hypocholesterolemic compound from edible mushrooms. *Food and Function*, 9: 6360-6368.

Morales, D., Ribeiro-Smiderle, F., Jiménez-Piris, A., Soler-Rivas, C. y Prodanov, M. (2019a). Production of a β-D-glucan-rich extract from shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) by an extraction/microfiltration/reverse osmosis (nanofiltration) process. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 51: 80-90.

Morales, D., Ribeiro-Smiderle, F., Marisol, Villalva, Abreu, H., Rico, C., Santoyo, S., Lacomini, M. y Soler-Rivas, C. (2019b). Testing the effect of combining innovative extraction technologies on the biological activities of obtained β-glucan-enriched fractions from *Lentinula edodes*. *Journal of Functional Foods*, 60: 1-11.

Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L. y Cuadrado, C. (2013). Tabla de composición de alimentos. Pirámide, 16ºed: 1-139.

Nichols, M., Townsend, N., Scarborough, P., Rayner, M. Leal, J., Luengo-Fernández, R. y Gray, A. (2012). European cardiovascular disease statistics. *European Hear Network and European Society of Cardiology*, 1-125.

Patras, A., Brunton, N., Da Pieve, S., Butler, F. y Downey, G. (2009). Effect of thermal and high pressure porcessing on antioxidant activity and instrumental color of tomato and carrot purées. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(1): 16-22.

Plaza, L., Sánchez-Moreno, C. De Ancos, B. y Cano, M.P. (2006). Carotenoid content and antioxidant capacity of Mediterranean vegetable soup (gazpacho) treated by high-pressure/temperature during refrigerated storage. *European Food Research and Technology*, 223(2): 210-215.

Rajakumar, K., Greenspan, S.L., Thomas, S.B. y Holick, M.F. (2007). Solar ultraviolet radiation and vitamin D: a historical perspective. *American Journal of Public Health*, 97(10): 1746-1754.

Rodríguez-Verástegui, L.L., Martínez-Hernández, G.B., Castillejo, N., Gómez, P.A., Artés, F. y Artés-Hernández, F. (2016). Bioactive compounds and enzymatic activity of red vegetable smoothies during storage. *Food and Bioprocess Technology*, 9(1): 137-146.

Rokujo, T., Kikuchi, H., Tensho, A., Tsukitani, Y., Takenawa, T., Yoshida, K. y Kamiya, T. (1970). Lentysine: a new hypolipidemic agent from a mushroom. *Life Sciences*, 9: 379-385.

Ruthes, A.C., Smiderle, F.R. y Lacomini, M. (2015). D-glucans from edible mushrooms: a review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate Polymers*, 117: 753-761.

Saavedra, O.M., Sánchez, I.R., Sánchez, J.R.G., Reyes, G.M.C. y Bolaina, E.M. (2012). Colesterol: función biológica e implicaciones médicas. *Revista mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(2): 7-22.

Saini, H.K., Arneja, A.S. y Dhalla, N.S. (2004). Role of cholesterol in cardiovascular dysfunction. Canadian Journal of Cardiology, 20: 333-346.

Saito, M., Yamashita, T. y Kaneda, T. (1975). Quantitative analysis of eritadenine in Shiitake mushroom and other edible fungi. *Journal of Japan Society of Nutrition and Food Science*, 28: 503-513.

Sánchez-Minutti, L., López-Valdez, F., Rosales-Pérez, M. y Luna-Suárez, S. (2019). Effect of heat treatments of *Lentinula edodes* mushroom on eritadenine. *LWT- Food Science and Technology*, 102: 364-371.

Singh, J., Kaur, L. y McCarthy, O.J. (2006). Factors influencing the physico-chemical morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications. *Food Hydrocolloids*, 21(1): 1-22.

Soler-Rivas, C., Ramírez-Anguiano, A.C., Reglero, G. y Santoyo, S. (2009). 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*, 44: 2189-2197.

Tharanathan, R.N. (2005). Starch - Value addition by modification. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(5): 371-384.

Theuwissen, E. y Mensink, R.P. (2008). Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease. *Physiology and Behavior*, 94(2): 285-292.

Torija-Isasa, M.E., Matallana-González, M.C., Sánchez-Mata, M.C., Verde-Méndez, C.M., Rodríguez-Rodríguez, E.M. y Díaz-Romero, C. (2007). El gazpacho andaluz y su interés nutritivo. *Schironia*, 6: 22-27.

Vannuci, L., Krizan, J., Sima, P., Stakheev, D., Caja, F. y Rajsiglova, L. (2013). Inmunostimulatory properties and antitumor activities of glucans (Review), *International Journal of Oncology*, 43(2): 357-364.

Verde-Méndez, C.M., Rodríguez-Rodríguez, E.M., Díaz-Romero, C., Sánchez-Mata, M.C., Matallana-González M.C., Torija-Isasa, M.E. (2011). Vitamin C and organic acid contents in Spanish "Gazpacho" soup related to the vegetables used for its elaboration process. *CYTA-Journal of Food*, 9(1): 71-76.

Volman, J.J., Ramakers, J.D. y Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune function by β-glucans. *Physiology and Behavior*, 94(2): 276-284.

Volman, J.J., Mensink, R.P., Ramakers, J.D., Winther, M.P., Carlsen, H. y Blomhoff, R. (2010). Dietary (1→3), (1→4)-β-D-glucans from oat activate nuclear factor-κB in intestinal leukocytes and enterocytes from mice. *Nutrition Research*, 30(1): 40-48.

Vullioud, M.B., Rusalen, R. y De Michelis, A. (2011). Blanching process of oyster mushrooms (*Peutotus ostreatus*) and its effect on parameters of technological interest in Argentina. *Micología Aplicada Internacional*, 23(2): 47-53.

Wasser, S.P. (2005). Shiitake (*Lentinula edodes*). *Encyclopedia of Dietary Supplements*, 653-664.

Weststrate, J.A. y Meijer, G.W. (1998). Plat sterol-enriched margarine and reduction of plasma total and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52: 334-343.

Xue, Z.H., Hao, J.F., Yu, W.C. y Kou, X.H. (2016). Effects of processing and storage preservation technologies on nutritional quality and biological activities of edible fungi: a review. *Journal of Food Process Engineering*, 40: 1-13.