

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri”



Estudio de la composición nutricional, la concentración de metales pesados y la actividad antioxidante de *Pleurocollybia cibaria* Singer expandida en Cusco

Luis Alberto Armas Muñoz

Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología

Lima - Perú

2021

Asesor:

MSc. León F. Villegas Vílchez.

Co-asesora:

Dra. Rebeca M. Pavlich Herrera.

A mis padres, Juana Muñoz y Alberto Armas.

Agradecimientos

Al apoyo incondicional que me brindaron mis padres. Sin su formación, consejos y ayuda no lo hubiera logrado. A mi tía Nazaria Armas, sé que ansiaba mucho este momento.

A la Dra. Magdalena Pavlich quien me brindó la idea de realizar este trabajo de investigación, por el tiempo que dedicó en asistirme y asesorarme. Asimismo, al Mg. León Villegas y a Sr. Elvis por su asesoría.

A mi buen amigo el Dr. Ivan Velasquez por sus consejos y asesoría. Además, a mis amigos del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales Stephanie Mendieta, Andrea Esquerre, Bruno Cortijo y Wendy Chincha.

Contenido

I.	Introducción	1
I.1	Marco teórico	5
I.1.1	Nutrientes	5
I.1.1.1	Macronutrientes	6
I.1.1.2	Micronutrientes	8
I.1.2	Metales pesados en setas comestibles	11
I.1.3	Actividad antioxidante en setas comestibles	12
I.1.4	<i>Pleurocollybia cibaria</i> Singer	13
I.1.4.1	Clasificación taxonómica de <i>P. cibaria</i> Singer	13
I.1.4.2	Descripción morfológica de <i>P. cibaria</i> Singer	13
I.1.4.3	Hábitat de <i>P. cibaria</i> Singer	15
I.1.4.4	Ecología	16
I.1.4.5	Ciclo biológico	17
I.1.4.6	Composición nutricional de <i>P. cibaria</i> Singer	18
I.1.4.7	Metales pesados en <i>P. cibaria</i> Singer	19
II.	Pregunta de investigación y objetivos	19
II.1	Pregunta de investigación	19
II.2	Objetivo general	19
II.3	Objetivos específicos	19
III.	Materiales y métodos	20
III.1	Diseño del estudio	20
III.3	Tratamiento de la muestra	21
III.4	Composición nutricional	21
III.4.1	Análisis proximal	21
III.4.1.1	Humedad	21
III.4.1.2	Proteínas	22
III.4.1.3	Grasas totales	24
III.4.1.4	Fibra	25
III.4.1.5	Cenizas	26
III.4.1.6	Determinación de carbohidratos	27
III.4.2	Valor calórico	28
III.4.3	Ácido ascórbico	28
III.4.4	Minerales	31

III.5	Análisis de metales	35
III.6	Actividad antioxidante	35
III.7	Análisis estadístico	37
III.8	Consideraciones éticas	37
IV.	Resultados	37
IV.1	Composición nutricional	37
IV.1.1	Análisis proximal y valor calórico	37
IV.1.2	Ácido ascórbico	38
IV.1.3	Minerales	38
IV.2	Metales pesados	40
IV.3	Actividad antioxidante	40
V.	Discusión	41
VI.	Conclusiones	48
VII.	Referencias bibliográficas	49

Lista de figuras

Figura 1.	Morfología de <i>P. cibaria</i> Singer.....	15
Figura 2.	Ciclo biológico típico de un hongo basidiomiceto	18
Figura 3.	Detección de elementos en <i>P. cibaria</i> Singer por ESEM.	39

Lista de tablas

Tabla 1. Nivel máximo de ingesta tolerable (UL) de elementos minerales.	11
Tabla 2. Límites máximos permitidos de 4 metales pesados (mg/Kg base fresca) establecidos por 3 entidades diferentes.	12
Tabla 3. Composición proximal (%) de <i>P. cibaria</i> Singer.....	18
Tabla 4. Concentración de minerales (mg/100 g base seca) en <i>P. cibaria</i> Singer.....	19
Tabla 5. Concentración de metales pesados (ppm/peso seco) en <i>P. cibaria</i> Singer.	19
Tabla 6. Composición proximal (%) y valor calórico (kcal/100 g base seca) de <i>P. cibaria</i> Singer.	38
Tabla 7. Concentración de minerales (mg/100 g base seca) en <i>P. cibaria</i> Singer.....	39
Tabla 8. Concentración de metales pesados (mg/kg base seca) en <i>P. cibaria</i> Singer.....	40
Tabla 9. Porcentaje de neutralización de radicales DPPH (%) de diferentes concentraciones del extracto metanólico de <i>P. cibaria</i> Singer (mg/mL).	41
Tabla 10. Porcentaje de neutralización de radicales DPPH (%) de diferentes concentraciones del extracto metanólico de ácido ascórbico (mg/mL).	41

Resumen

Pleurocollybia cibaria Singer es una seta comestible nativa de Cusco que goza de mucha popularidad. Se expende en la fiesta de “Q’oncha Raymi” y en los mercados de la ciudad durante la época de lluvia. Su composición nutricional aún es poco conocida y no se ha profundizado sobre su composición de minerales, vitaminas y alguna propiedad funcional, cómo su actividad antioxidante. Las setas tienen la capacidad de acumular trazas de metales, resultando en un peligro potencial para la salud de los consumidores. Por estas razones, se reportó la composición nutricional, la concentración de metales pesados y la actividad antioxidante *in vitro* de *P. cibaria* Singer. Respecto a la composición nutricional, la muestra fresca contenía una alta proporción de humedad (79.48%) y deshidratada, un alto contenido de carbohidratos (44.44%), proteínas (23.83%), fibra (12.73%) y de los minerales Fe (30.41 mg/100 g base seca), F (2.37 mg/100 g base seca), Zn (6.77 mg/100 g base seca) y I (2.02 mg/100 g base seca). Asimismo, la muestra deshidratada tuvo un bajo contenido de grasas (1.53%), ácido ascórbico (3.27 mg/100 g base seca) y del mineral Ca (75.99 mg/100 g base seca). Además, la muestra contenía bajas concentraciones de Ar (< 0.002 mg/kg base seca), Pb (< 0.002 mg/kg base seca), Hg (< 0.001 mg/kg base seca) y Cd (< 0.0001 mg/kg base seca). Finalmente, *P. cibaria* Singer presentó una actividad antioxidante *in vitro* eficiente (IC50 < 0.0025 mg/mL), de tal manera que puede ser considerado un alimento funcional. Nuestro estudio aporta nueva información sobre la composición nutricional, la inocuidad y la propiedad funcional de *P. cibaria* Singer para que se continúe promoviendo su consumo.

Palabras claves: *Pleurocollybia cibaria* Singer, hongos, composición nutricional, metales pesados, actividad antioxidante.

Abstract

Pleurocollybia cibaria Singer is a wild popular edible mushroom from Cusco. It is expended at the “Q'oncha Raymi” festival and in the markets of the city of Cusco in the rainy season. Its nutritional composition is little known and its composition of minerals, vitamins and some functional property, such as its antioxidant activity, as well. Mushrooms accumulate traces of metals that are potential health hazard for consumers. For these reasons, the nutritional composition, the concentration of heavy metals and the *in vitro* antioxidant activity of *P. cibaria* Singer were reported. Regarding the nutritional composition, fresh sample contained a high proportion of moisture (79.48%) and dehydrated, a high content of carbohydrates (44.44%), proteins (23.83%), and fiber (12.73%), and of minerals Fe (30.41 mg / 100 g dry basis), F (2.37 mg / 100 g dry basis), Zn (6.77 mg / 100 g dry basis) and I (2.02 mg / 100 g dry basis). Dehydrated sample had a low content of fat (1.53%), ascorbic acid (3.27 mg / 100 g dry base) and of the mineral Ca (75.99 mg / 100 g dry base). In addition, the sample contained low concentrations of Ar (< 0.002 mg / kg dry basis), Pb (< 0.002 mg/kg dry basis), Hg (<0.001 mg / kg dry basis) and Cd (< 0.0001 mg / kg dry basis). Finally, *P. cibaria* Singer had an efficient *in vitro* antioxidant activity (IC₅₀ < 0.0025 mg/mL) so it can be considered a functional food. Our study provides new information on the nutritional composition, safety and functional property of *P. cibaria* Singer to its consumption continue to be promoted.

Keywords: *Pleurocollybia cibaria* Singer, mushrooms, nutritional composition, heavy metals, antioxidant activity.

I. Introducción

Los macro hongos o setas se han usado con fines alimenticios, medicinales y espirituales durante la época prehispánica [1]. De esta manera, han formado parte de la identidad de diversas culturas peruanas, tales como: Cupisnique (1200-200 AC), Paracas (800-100 AC), Moche o Mochica (100 AC-800 DC), Chimú (900-1470 DC), Pukará (1200 AC-400 DC), Wari (700 - 1100 DC) e inca (1200-1532 DC). Por consiguiente, representaron las especies *Amanita muscaria*, *Calvatia cyathiformis*, *Morchella elata*, *Morchella esculenta* y las del género *Psilocybe*; en cerámicas, tejidos, esculturas y aleaciones. Esta actividad desapareció gradualmente en la época colonial. A pesar de ello, el uso y conocimientos sobre las setas nativas aún se conservan escasamente en algunas regiones del Perú como Cusco y Puno [1].

La fiesta de “Q’oncha Raymi” es un festival de setas andinas que se lleva a cabo cada año el último domingo de enero desde el año 2005, en el Centro Poblado de Conchacalla, distrito y provincia de Anta, departamento de Cusco. El objetivo de este festival es conservar y transmitir el conocimiento ancestral sobre el uso de las setas en la alimentación [2]. *Pleurocollybia cibaria* Singer, también llamada “q’oncha” (vocablo quechua que significa seta) o “seta cusqueña” es la especie más importante y vendida en este festival por ser nativa de Cusco [3-5]. A su vez, se expende en diferentes mercados de dicha región. En ambos casos, solo se venden en los meses lluviosos, es decir, entre diciembre y marzo, porque solo en este periodo las condiciones de humedad favorecen su desarrollo [3]. A comparación de otras setas, *P. cibaria* Singer es la más valorada y consumida por los cusqueños no solo por su importancia cultural, sino debido a su delicioso sabor; mas no; por un efecto medicinal o nutracéutico. Por ello, solo es empleada como materia prima para preparar distintos platos y bebidas, como: salsa picante, capchi, rocoto relleno, jugo, licor, entre otros [2, 6].

Se ha evaluado la composición nutricional de diversas especies de setas comestibles silvestres debido a su importancia alimentaria en distintas comunidades en el mundo [7-10]. Es así como se ha evidenciado que aportan aminoácidos esenciales (AAEs), proteínas, carbohidratos, fibra, ácidos grasos, vitaminas, minerales y metabolitos secundarios con actividades funcionales; en cantidades suficientes como para ser un

recurso esencial en la dieta [11]. En Turquía, se ha identificado setas silvestres como *Agaricus arvensis*, *Boletus edulis*, entre otras que proporcionan todos los AAEs en cantidades adecuadas para infantes entre los 2 y 5 años de edad [12]. Mientras que en Macedonia se han reportado setas silvestres con un alto porcentaje de proteínas (materia seca), como *Calvatia caelata* y *Tricholoma georgii* que presentaron el mayor porcentaje con 52.06 y 48.81%, respectivamente [13].

La tendencia de setas con un aporte adecuado de proteínas se repite en otros estudios [7-10], por lo que su consumo permitiría cumplir los requerimientos diarios de AAEs y proteínas. Por el contrario, una alimentación deficiente en AAEs limita el uso de los aminoácidos (AAs) adquiridos en la dieta que finalmente son degradados al no ser utilizados, en consecuencia, se incrementa la deficiencia de AAs y proteínas [14]. Mientras tanto, las proteínas son necesarias para una adecuada digestión y absorción de otros nutrientes provenientes de la dieta, en el transporte de moléculas (vitamina A, hierro, ácidos grasos de cadena larga, colesterol en sangre), en la oxidación de nutrientes, ácidos grasos y glucosa, entre otros [14].

Los carbohidratos son un macronutriente que generalmente se encuentra en mayor proporción en las setas nativas y su porcentaje varía según la especie y su lugar de procedencia (64.14 - 80.17%, base seca) [8]. También, proveen una cantidad importante de fibra alimentaria (3.05 - 6.29%, base seca) y aporte energético (381.34 – 391.88 Kcal/100 g base seca) [8]. Por el contrario, su concentración de grasas es baja (0.82 - 2.93%, base seca) [8]. Respecto a los micronutrientes, las setas son una fuente alta en hierro (Fe), calcio (Ca), zinc (Zn), potasio (K) y vitaminas como el ácido ascórbico, niacina, tiamina, riboflavina, entre otros [7, 10].

Las setas tienen la capacidad de acumular altas concentraciones de metales pesados como el arsénico (As), plomo (Pb), mercurio (Hg) y cadmio (Cd) que resultan peligrosos para la salud [15, 16]. Por ello, la concentración de estos metales está regulada en los alimentos [17]. Es así como se han reportado algunas setas con altas concentraciones de estos metales pesados, entre ellas: *Tuber indicum* Cooke et Massee (11.86 mg/kg de As, base seca y 35.68 mg/kg de Cu, base seca), *Russula vinosa* Lindbl (10.18 mg/kg de Pb, base seca), *Tricholoma matsutake* (2.88 mg/kg de Cd, base seca) y *Boletus edulis* (6.11 mg/kg de Hg, base seca) en diferentes provincias de China [15, 16].

Las setas poseen moléculas bioactivas, entre ellas: compuestos fenólicos (0.33 - 1.89 g/100 g, base seca), flavonoides (0.7 - 20.2 mg/100 g, peso fresco) y ácido ascórbico (0.1 - 1.8 mg/100 g, peso fresco) que ejercen una acción antioxidante, es decir, neutralizan las especies reactivas de oxígeno (ROS) [18, 19, 20]. Las ROS son moléculas que tienen uno o más electrones libres en su orbital molecular y se sintetizan a través del proceso oxidativo para la producción de energía y la función inmune [18]. Aunque las ROS son necesarias para el buen funcionamiento celular, son potencialmente peligrosas en altas concentraciones porque dañan las células e inducen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, enfermedades hepáticas, insuficiencia renal, cáncer, envejecimiento prematuro, alzhéimer, párkinson, entre otras [18, 21]. Además, una dieta desequilibrada, las toxinas ambientales, la luz ultravioleta, la radiación y los quimioterapéuticos son algunos factores que generan grandes cantidades de ROS (estrés oxidativo) [21]. Frente a este problema, los hongos comestibles son una alternativa ideal para contribuir a disminuir las ROS porque poseen una actividad antioxidante adecuada incluso similar o mayor que las frutas y verduras [18].

Planteamiento del problema

La composición nutricional de *P. cibaria* Singer ha sido poco investigada porque en los estudios realizados solo se ha analizado su composición proximal y la concentración de algunos elementos minerales. Hasta el momento, son cuatro los estudios publicados [5, 22, 23, 24]. Mientras tanto, aún resta por conocer la presencia de alguna vitamina y si posee algún beneficio para la salud (propiedad funcional). Debido a la poca información disponible, aún se limita su inclusión en una dieta establecida que ayude a satisfacer los requerimientos diarios de macromoléculas, minerales, vitaminas y si otorga cierto beneficio a la salud.

Las deposiciones atmosféricas e intervenciones directas a causa de la urbanización e industrialización generan la acumulación de contaminantes como metales pesados que impactan negativamente los suelos [25, 26]. Las setas pueden acumular estos metales según las condiciones ambientales y la capacidad que tiene cada especie para absorberlos [15]. En este sentido, las áreas donde crece *P. cibaria* Singer podrían estar contaminadas y podrían tener la capacidad de absorber metales pesados como el arsénico (As), plomo (Pb), mercurio (Hg) y cadmio (Cd). El Ar provoca desequilibrios en la respiración celular,

mitosis y es altamente cancerígeno; el Pb, genera estrés oxidativo y provoca daños neurológicos; el Hg, afecta la transcripción y traducción celular, genera daños neurológicos y renales; y el Cd, induce a la deficiencia de hierro, estrés oxidativo y se acumula en el tejido renal provocando nefrotoxicidad [27]. A todo ello, se incluye la gran popularidad y el consumo extensivo de esta seta. Por consiguiente, representa un peligro potencial para la salud de los pobladores.

Justificación

El estudio de la composición nutricional de *P. cibaria* Singer abarca un análisis de la concentración de humedad, proteínas, grasas, carbohidratos, minerales, fibra y vitamina C. Es de considerar que, aunque ya existen estudios de la composición proximal y de algunos minerales en *P. cibaria* Singer, estos resultados varían entre un estudio y otro porque la cantidad de estos componentes es influenciada por las condiciones ambientales del área donde crecen, por lo tanto, nuestros resultados podrían brindarnos información de la variación de la concentración de estos componentes en *P. cibaria* Singer [28]. Por consiguiente, un análisis proximal, mineral y de la vitamina C nos permitirá profundizar sobre la calidad nutricional de *P. cibaria* Singer.

El estudio de la actividad antioxidante *in vitro* de *P. cibaria* Singer es una oportunidad para investigar su posible valor funcional y medicinal que nos permita considerarla una seta nutracéutica. Esto sería una oportunidad para iniciar otros estudios donde no solo se analicen los compuestos que le otorga dicha actividad, sino también, determinar su actividad biológica antioxidante en modelos animales y analizar la presencia de otros metabolitos secundarios como terpenos, alcaloides, entre otros.

P. cibaria Singer es muy consumida por su agradable sabor e importancia cultural. Por ello, su gran demanda ha provocado que algunos pobladores las recolecten para consumirlas y/o venderlas en los mercados de la ciudad de Cusco y en el festival de “Q’oncha Raymi” con el objetivo de obtener ingresos económicos. En consecuencia, no existen controles que regulen la presencia de contaminantes como metales pesados. Por lo tanto, determinar la concentración de metales pesados en *P. cibaria* Singer es una manera de asegurar la inocuidad de este alimento y salvaguardar la salud de los pobladores.

Por último, nuestros resultados podrían dar un valor agregado a *P. cibaria* Singer, lo cual, incentivaría su cultivo artesanal, tal como ha ocurrido con las setas *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus djamor* que son cultivadas por las comunidades campesinas en los distritos de Huayllay, Harin y San Nicolás de Bari en Cusco [28]. De esta manera, la producción de *P. cibaria* Singer sería permanente y mejoraría la calidad de vida de los pobladores porque podrían consumirla con mayor frecuencia e incrementar sus ingresos económicos en caso decidan venderlas. Asimismo, se reduciría el impacto negativo de la recolección indiscriminada que pone en riesgo la perpetuidad de esta especie.

I.1 Marco teórico

I.1.1 Nutrientes

Los nutrientes son moléculas o minerales esenciales y no esenciales presentes en los alimentos que al ingerirlos son utilizados por las células del organismo para completar diversas funciones que se traducen en la capacidad de respirar, la actividad muscular, la regulación térmica, entre otros [29, 30].

Los nutrientes se pueden clasificar según las cantidades que son requeridas por el humano, en macronutrientes y micronutrientes [30]. Por otra parte, existe otro componente como la fibra que no es considerado un nutriente porque no es esencial para las necesidades celulares o tisulares, pero es importante por su propiedad digestiva, antioxidante, anticancerígena, etc. [29, 30].

Debido a la importancia de estos nutrientes, la Junta de Alimentos y Nutrición del Instituto de Medicina de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos quien establece los principios y pautas para una dieta adecuada, emitió la ingesta dietética de referencia (DRIs) de nutrientes para satisfacer las necesidades nutricionales de la población. Asimismo, ha publicado los niveles máximos de ingesta tolerable de los micronutrientes (UL) [31].

Por otra parte, la FAO promulgó en el Codex Alimentarius las Directrices para el uso de declaraciones nutricionales y saludables en el etiquetado donde se establecen los parámetros para indicar si un alimento tiene un alto contenido de

proteínas, fibra, vitaminas y minerales. A su vez, si un alimento es bajo en grasas y en aporte calórico [32].

I.1.1.1 Macronutrientes

Los macronutrientes son aquellos nutrientes que se requieren en grandes proporciones, entre ellos están los carbohidratos, lípidos y proteínas. Estos proveen la energía celular necesaria para que nuestro cuerpo cumpla sus funciones básicas [30]. Además, el agua es considerado un macronutriente porque se requiere en grandes cantidades, sin embargo, no aporta energía [30, 33].

a. Carbohidratos

Son moléculas compuestas por carbono, hidrógeno y oxígeno. Según el número de cada uno de estos componentes se clasifican en monosacáridos, disacáridos y polisacáridos [30]. Según la DRIs, un adulto promedio debe consumir 130 g/día de carbohidratos y alrededor del 45-65% de las calorías deben provenir de los carbohidratos porque son fáciles de metabolizar [31]. Todas nuestras células y tejidos pueden usar la glucosa como energía, pero también son almacenados en el músculo y en el hígado.

La fibra es un carbohidrato que no se hidroliza por las enzimas del intestino delgado humano y se clasifica como soluble e insoluble en agua [34].

La fibra soluble forma una solución viscosa que incrementa el tiempo de tránsito del bolo alimenticio del estómago hacia el intestino otorgando mayor tiempo de saciedad porque retrasa el vaciado gástrico [34, 35]. Cuando la fibra llega al colon es fermentado por la microbiota intestinal y se generan ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como propionato, butirato y acetato [36]. Entre los beneficios de los AGCC están los siguientes: disminución del pH del colon para mantener una población bacteriana beneficiosa e inhibir el desarrollo de bacterias enteropatógenas como *Salmonella Spp.* y *Escherichia coli*, el propionato incrementa la saciedad y la tolerancia a la glucosa, y el butirato induce a la muerte de las

células cancerosas en el colon [36]. Por el contrario, la fibra insoluble no forma geles y no es fermentada por las bacterias intestinales en el colon porque incrementa el volumen fecal, disminuye el tiempo del tránsito intestinal teniendo un efecto laxante e interviene en la eliminación de ácidos biliares [34, 35].

La ingesta dietética recomendada de fibra es 25 y 38 mg/día para mujeres y varones adultos, respectivamente [31]. Además, un alimento tendrá un buen aporte de fibra si cubre al menos el 10% del requerimiento diario y su aporte será alto si cubre el 20% [32].

Los hongos comestibles son fuente de fibra, los más comunes son la quitina, el betaglucano y el manano [37], de los cuales los dos primeros son los que más se han estudiado en los últimos años. La quitina es una fibra insoluble que forma parte del 8-43% de la pared celular de los hongos [38, 39], tiene propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas [40], inmunomoduladoras, antitumoral y es usado por la microbiota intestinal humana (prebiótico) [41]. El betaglucano es una fibra soluble prebiótica con actividad inmunomoduladora, antitumoral [41], antioxidante e hipoglucémico [37, 42].

b. Proteínas

Las proteínas son moléculas formadas por unidades de aminoácidos y cumplen una función estructural y energética en células y tejidos [30]. Según la DRIs, alrededor del 10% y el 35% de las calorías en adultos deben provenir de las proteínas. En este sentido, sugieren que una mujer adulta debería consumir 46 g/día de proteínas y un varón adulto 56 g/día [31]. Frente a ello, las directrices para el uso de declaraciones nutricionales y saludables consideran que un alimento será una fuente adecuada de proteínas si cubre el 10% del requerimiento diario por cada 100 g de alimento sólido. En cambio, si cubre el 20% del requerimiento diario, el alimento (sólido) será considerado con un alto contenido de proteínas [32].

c. Grasas

Las grasas son moléculas compuestas por carbono, hidrógeno y oxígeno, pero a diferencia de los carbohidratos no son solubles en agua [30]. Según la DRIs, sugiere que el 20% - 35% de las calorías en adultos deben provenir de las grasas. Las grasas son necesarias para el mantenimiento de las membranas celulares, provee una mayor cantidad de energía que los carbohidratos y permite absorber algunas vitaminas como A, D, E y K [34 (43)]. Sin embargo, su consumo debe ser moderado, en consecuencia, las directrices para el uso de declaraciones nutricionales y saludables indica que un alimento (sólido) está exento de grasas si es menor o igual a 0,5 g por 100 g y tendrá un bajo contenido si es menor o igual a 3 g/100 g de alimento (sólido) [32].

d. Agua

El agua es una molécula que constituye cerca del 60% del peso corporal en varones y del 50% en mujeres y conforma alrededor de dos terceras partes del peso total. Para ejemplificar; una persona de 68 kg tiene alrededor de 38 L de agua, de los cuales aproximadamente entre 23 y 26 L están en el interior de las células, 7.5 L en el espacio intercelular y 4 L en la sangre [33]. Según la DRIs un varón adulto debe consumir 3.7 litros/día de agua, mientras que una mujer adulta 2.7 litros/día [31]. El agua es importante para el transporte de nutrientes a las células, la termorregulación y es el medio donde ocurre las reacciones químicas del organismo, entre otros [33].

I.1.1.2 Micronutrientes

Los micronutrientes son una clase de nutrientes que se requieren en bajas concentraciones y son esenciales para la vida humana, entre ellos, se incluyen a las vitaminas y minerales [29].

a. Vitaminas

Las vitaminas son moléculas orgánicas que participan en distintos procesos metabólicos del organismo, pero no aportan energía. Son 13 las vitaminas que requiere el ser humano y según su solubilidad en agua se clasifican en solubles (ácido ascórbico y el complejo de vitaminas B) e insolubles (A, D, E, K) [44]. El ácido ascórbico o vitamina C es muy valorada por su actividad antioxidante, mejora la absorción de hierro presente en los alimentos, interviene en el buen funcionamiento del sistema inmune y en la biosíntesis de colágeno [45].

Según DRIs, un varón y una mujer adultos requieren 90 y 75 mg/día de vitamina C, respectivamente, pero los requerimientos diarios de vitamina C variará según la edad de la persona. Asimismo, la DRIs establece que el UL es 2000 mg/día [31]. Por otro lado, su deficiencia o una ingesta menor a 10 mg/día por varias semanas podría provocar el desarrollo de escorbuto, lo cual se traduce en encías inflamadas, dolores articulares, manchas rojizas en la piel, mala cicatrización, aflojamiento de dientes o caída de los dientes [45]. Los alimentos con un buen aporte de ácido ascórbico son aquellos que cubren el 15% del requerimiento diario y si cubre el 30% es considerado un alimento con un alto contenido de vitamina C [32].

b. Minerales

Los minerales son elementos inorgánicos que cumplen diferentes funciones metabólicas y se requieren en pequeñas cantidades según el sexo y la edad de la persona [44]. Si un alimento (sólido) cubre al menos el 15% del DRIs de un mineral significa que tiene un buen aporte de ese mineral y si el contenido se duplica, aporta un alto contenido de ese mineral [32].

Según la FAO; el Ca, Fe, I, F y Zn son los elementos más importantes porque los otros minerales tienen una alta disponibilidad o se absorben más rápido [46]. A continuación, se detallan los requerimientos diarios de cada uno y su importancia.

- **Calcio:** Interviene en el mantenimiento de la salud de los huesos y dientes, la coagulación de la sangre, la contracción muscular y la transmisión nerviosa [30, 44]. El requerimiento diario de Ca para un adulto (varón y mujer) es 1000 mg/día [31]. El déficit de Ca no se evidencia a corto plazo porque el organismo lo toma de los huesos, pero se evidencia a largo plazo en el desarrollo de osteoporosis, las fracturas y reducción de la masa ósea (osteopenia) [47].
- **Hierro:** Es un componente importante de la hemoglobina cuyo déficit provoca anemia, interviene en la síntesis de ADN, la respiración celular y la oxidación de ácidos grasos [30, 44]. El requerimiento diario de Fe para un varón adulto es 8 mg/día y para una mujer adulta, 18 mg/día [31].
- **Yodo:** Es necesario para el crecimiento y desarrollo mental de los niños y participa en la producción de las hormonas tiroideas triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) [46, 48]. El requerimiento diario de I para un adulto (varón y mujer) es 0.15 mg/día [31]. Su déficit causa bocio y cretinismo en el feto [46].
- **Flúor:** Previene la incidencia de caries en un 60-70% y fortalece los huesos de los adultos mayores evitando el desarrollo de osteoporosis [44, 46]. El requerimiento diario de F para varones adultos es 4 mg/día y para mujeres, 3 mg/día [31].
- **Zinc:** Interviene en la cicatrización de heridas, la síntesis de ADN y proteínas [30]. El requerimiento diario de Zn para un varón adulto es 11 mg/día y en mujeres, 8 mg/día [31]. Su déficit genera lesiones en piel y ojos, diarrea, falta de apetito, pérdida de cabello, dificultad en la cicatrización, y reducción del ritmo de crecimiento en bebés y niños [49].

Se ha establecido el UL para cada uno de los minerales anteriormente descritos (Tabla 1) porque su consumo excesivo a largo plazo podría causar algunas enfermedades [31].

Tabla 1. Nivel máximo de ingesta tolerable (UL) de elementos minerales.

Componente	Varón y mujer (mg/día)
Calcio	2500
Hierro	45
Zinc	40
Flúor	10
Yodo	1.1

I.1.2 Metales pesados en setas comestibles

Las setas tienen un mecanismo muy efectivo para absorber ciertos metales pesados, incluso en concentraciones considerablemente superiores que las plantas [50]. En este sentido, distintas setas silvestres comestibles acumulan concentraciones tóxicas de As, Pb, Cd y Hg [15, 16]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incluido a estos metales pesados dentro de las diez sustancias químicas que constituyen una preocupación para la salud pública [51] que se caracterizan por provocar los siguientes daños:

- As: Los efectos adversos tardan en manifestarse, entre ellos; diabetes, anomalías neuroconductuales, lesiones en la piel, trastornos cardiovasculares, mortalidad fetal, parto prematuro y cáncer [51, 52].
- Cd: Es carcinógeno, induce al desarrollo de diabetes y daña los riñones, el sistema respiratorio y óseo [51, 52].
- Hg: Genera daño cardiovascular, pulmonar, digestivo, renal, en el sistema inmunitario, nervioso, endocrino y en el desarrollo fetal [51, 52].
- Pb: Causa daño neurológico, renal, en el sistema nervioso y reproductivo [51, 53].

Distintas organizaciones o gobiernos como la FAO, la Unión Europea y la República Popular de China establecieron la concentración máxima permisible de estos cuatro metales pesados en setas comestibles (Tabla 2).

Tabla 2. Límites máximos permitidos de 4 metales pesados (mg/Kg base fresca) establecidos por 3 entidades diferentes.

Entidad	Arsénico	Plomo	Mercurio	Cadmio
FAO (Codex Alimentarius) [17]	ND	0.3	ND	ND
Unión Europea [54]	ND	0.1	ND	0.05
República popular de China [55]	0.5	1	0.1	0.2

*ND: No determinado

I.1.3 Actividad antioxidante en setas comestibles

Las ROS son moléculas que tienen uno o más electrones desapareados en su orbital molecular y se generan a partir de fuentes endógenas como en las reacciones redox cuando las células utilizan el oxígeno a nivel mitocondrial para la síntesis de ATP. En bajas concentraciones son necesarias para mantener las funciones normales de la célula y del sistema inmune. Además, el cuerpo humano sintetiza glutatión, ubiquinol y ácido úrico que tienen actividad antioxidante, es decir, moléculas que donan sus electrones a los radicales libres para estabilizarlos y evitar efectos dañinos [18, 56].

Cuando las ROS se sintetizan en concentraciones excesivas ocurre un estrés oxidativo debido a un desequilibrio entre su formación y neutralización dañando las membranas, proteínas, lípidos, lipoproteínas y ADN en las células [18, 56]. Si esta situación no se regula provoca diferentes patologías como cáncer, enfermedad cardiovascular, pulmonar, neuronal, artritis reumatoides, etc. En este sentido, los antioxidantes exógenos como aquellos que provienen de los alimentos cumplen una actividad importante que contribuyen a contrarrestar este desequilibrio [18, 56].

Las setas comestibles se caracterizan por poseer componentes antioxidantes como polisacáridos, tocoferoles, carotenoides, flavonoides, ácido gálico, ácido ascórbico, entre otros [18]. En este sentido, *Agaricus bisporus* posee grandes cantidades de betaglucanos (58.2 g/100 g, base seca) que es un tipo de polisacárido [57], *Ganoderma lucidum* contiene ácido gálico (63.51 mg ácido gálico/g de extracto) [58], *Lentinula edodes* y *Pleurotus ostreatus* tienen 6.27 mg y 15.7 mg

de tocoferoles/g base seca, respectivamente [59]. Por consiguiente, las setas comestibles son una fuente importante de antioxidantes que contribuyen a mantener un buen estado de salud.

I.1.4 *Pleurocollybia cibaria* Singer

I.1.4.1 Clasificación taxonómica de *P. cibaria* Singer

La clasificación taxonómica de *P. cibaria* Singer es la siguiente:

Reino: Fungi
Phylum: Basidiomycota
Subphylum: Agaricomycotina
Clase: Agaricomycetes
Subclase: Agaricomycetidae
Orden: Agaricales
Familia: Callistosporiaceae
Género: *Pleurocollybia*
Especie: *Pleurocollybia cibaria* Singer

Fuentes: Index Fungorum [60]

I.1.4.2 Descripción morfológica de *P. cibaria* Singer

P. cibaria Singer al igual que otros hongos filamentosos que pertenecen al phylum Basidiomycota tiene como unidad estructural a las hifas que son filamentos tubulares producto de la agrupación de células fúngicas [61]. El conjunto de hifas se denomina micelio y se extiende de forma subterránea para tomar los nutrientes necesarios y sobrevivir [62]. El micelio subterráneo emerge sobre la superficie para desarrollar estructuras macroscópicas reproductivas llamadas setas, cuerpos fructíferos o carpóforos. En el caso de *P. cibaria* Singer los carpóforos se denominan basidiocarpos porque esta seta pertenece al phylum Basidiomycota [62].

Los basidiocarpos de *P. cibaria* Singer están constituidos por hifas generativas, es decir, poseen paredes delgadas, septos y ramificaciones [22, 61] (Anexo 1). Sus

hifas son incoloras (hialinas) y poseen dos núcleos haploides en cada compartimento que se divide por la presencia de los septos (micelio dicariótico) [22].

Respecto a la estructura del basidiocarpo de *P. cibaria* Singer (figura 1) se distinguen las siguientes partes:

- **Píleo:** su diámetro oscila de 3 a 5 cm y raras veces hasta 7 cm o más. Su forma es convexa de borde principalmente entero y raras veces lobulado, margen decurbado con superficie glabra (ausencia de pelos o cualquier otra ornamentación) de aspecto húmedo, brillante o lustroso de color crema o castaño oscuro y tonalidad homogénea (Anexo 2) [22, 63].
- **Lamelas:** color marfil, su relación de unión con el estípite es libre, es decir, se encuentra muy cerca del estípite, pero no lo toca. El distanciamiento entre las lamelas es apretado y su margen es entero (Anexo 3) [22, 63].
- **Estípite:** su longitud oscila entre 3.5 a 7 cm con un diámetro entre 1 y 1.3 cm, de color blanco o crema. Su inserción al píleo es central con forma cilíndrica y recta, aunque algunos tienen pequeñas variaciones, de tal manera que pueden ser curvos como un cayado o con forma de tapón y pocas veces achatados en uno de los lados. Su superficie es lisa y no presenta estructuras adicionales como volva o anillo (Anexo 4) [22].



Figura 1. Morfología de *P. cibaria* Singer. (A) El basidiocarpo de *P. cibaria* Singer está constituido por (B) el píleo, (C) las lamelas y (D) el estípite. La parte subterránea de *P. cibaria* Singer se denomina (E) micelio vegetativo.

Fuente: Propia.

I.1.4.3 Hábitat de *P. cibaria* Singer

P. cibaria Singer se desarrolla en áreas topográficas de la Puna entre los 3 400 y 3 800 m.s.n.m. [63], aunque recientemente se ha reportado su presencia en altitudes de hasta 4100 m.s.n.m [23]. El suelo en estas áreas se caracteriza por ser humoso, esto significa que es rico en materia orgánica, en consecuencia, es muy fértil [63]. Otra característica de los suelos de estas áreas es que tiene un pH de 6.15, por lo que al encontrarse muy cerca de un pH neutro beneficia al buen funcionamiento celular del hongo, ya que la permeabilidad celular se altera a diferentes grados de acidez y alcalinidad [61, 62].

Los basidiocarpos de *P. cibaria* Singer solo crecen durante el periodo de lluvias, es decir, entre los meses de noviembre y abril [3, 22, 23]. Es así como se conoce que, en el distrito de Oropesa, Provincia de Quispicanchis, Cusco donde se encontraron carpóforos de *P. cibaria* Singer la humedad ambiental osciló entre 71

y 97% y la humedad del suelo entre 77 y 80% [22]. Los hongos requieren al menos 70% de humedad ambiental para cumplir algunas funciones fisiológicas, entre ellas: liberar al medio circundante enzimas que degradan polímeros como fuente de alimento, ingresar nutrientes a la célula, mantener en condiciones óptimas el citoplasma y el agua es fuente de oxígeno e hidrógeno [61].

Por otro lado, los carpóforos soportan cambios de temperatura muy drásticos durante las épocas de lluvias. Se tienen antecedentes que, en el distrito de Oropesa, Provincia de Quispicanchis en Cusco la temperatura varió algunos días entre 3.7°C en las noches hasta 20.5°C en el mediodía [22].

Respecto a su distribución, se tiene evidencias que se desarrolla solo en la región de Cusco [64]. Por ello, es una seta nativa de esta región y recibe el nombre común de "seta cusqueña" [3, 5, 23].

I.1.4.4 Ecología

P. cibaria Singer es un hongo saprófito, es decir, degrada la materia orgánica muerta para obtener los compuestos necesarios y cumplir sus necesidades nutricionales [22, 61]. Crece acompañado de musgos, líquenes y principalmente de la especie *Stipa ichu* (ichu o paja brava) que cubre a los carpóforos con sus tallos y hojas. De esta manera, genera un microclima que protege a *P. cibaria* Singer de las fluctuaciones de temperatura, de la radiación directa del sol, de las intensas lluvias, de los depredadores y le otorga mayor disponibilidad de oxígeno [22].

Por otra parte, *P. cibaria* Singer libera dióxido de carbono (CO₂) e incrementa la disponibilidad de este compuesto para ser usado por *S. ichu* y las otras especies vegetales. Además, *P. cibaria* Singer degrada la materia orgánica muerta proveniente de las hojas y tallos de *S. ichu* convirtiéndolos en minerales y elementos más sencillos que pueden ser utilizados por *S. ichu*, por las demás plantas y por la propia seta *P. cibaria* Singer [22].

Si bien *P. cibaria* es un hongo saprófito, se podría decir que tiene una relación de simbiosis con *S. ichu* porque ambos se benefician a partir de su estrecha relación.

No obstante, también compiten temporalmente de manera interespecífica por los nutrientes, la humedad y el espacio [22].

I.1.4.5 Ciclo biológico

El ciclo biológico de *P. cibaria* Singer es típico de un hongo del Phylum Basidiomycota (Figura 2). (a) En las lamelas de los basidiocarpos en crecimiento van desarrollando células reproductivas en las lamelas cuyo conjunto se denomina himenio. (b) Los basidios en formación poseen dos núcleos haploides al igual que todo el micelio del hongo (micelio dicariótico). (c) Sin embargo, durante este proceso ambos núcleos compatibles se unen (cariogamia) generando un único núcleo diploide. (d) A continuación, el núcleo diploide sufre una meiosis originando 4 núcleos haploides. (e) Mientras tanto, el basidio en formación continua su desarrollo hasta originar 4 basidiosporas sostenida cada una por un esterigma unidas al basidio. Luego, cada núcleo migra a su respectiva basidiospora a través de los esterigmas. De esta manera, el basidiocarpo alcanza su madurez [61].

(f) Las basidiosporas se desprenden de los esterigmas y se diseminan con el viento, el agua, los animales, los insectos, entre otros. (g) La basidiospora germinará originando un micelio monocariótico o primario al entrar en contacto con el suelo, pero esto ocurrirá sólo si la superficie cumple con la temperatura, el pH y la humedad adecuada. (i) El micelio primario entrará en contacto con otro micelio monocariótico y si existe una compatibilidad sexual ambos se unirán formando un micelio secundario o dicariótico. (j-k) Cuando las condiciones ambientales son las adecuadas el micelio dicariótico sufre una diferenciación para iniciar el desarrollo de un nuevo basidiocarpo o primordios el cual tendrá que llegar una vez más a la madurez para iniciar un nuevo ciclo biológico [61].

Aunque no se tiene evidencias sobre la reproducción asexual de *P. cibaria* Singer, (h) existe hongos basidiomicetes cuyo micelio primario se fragmenta en pequeñas estructuras (oídios) para que luego se desarrollen como un micelio primario y luego el ciclo continúe tal cuál como fue explicado anteriormente [61].

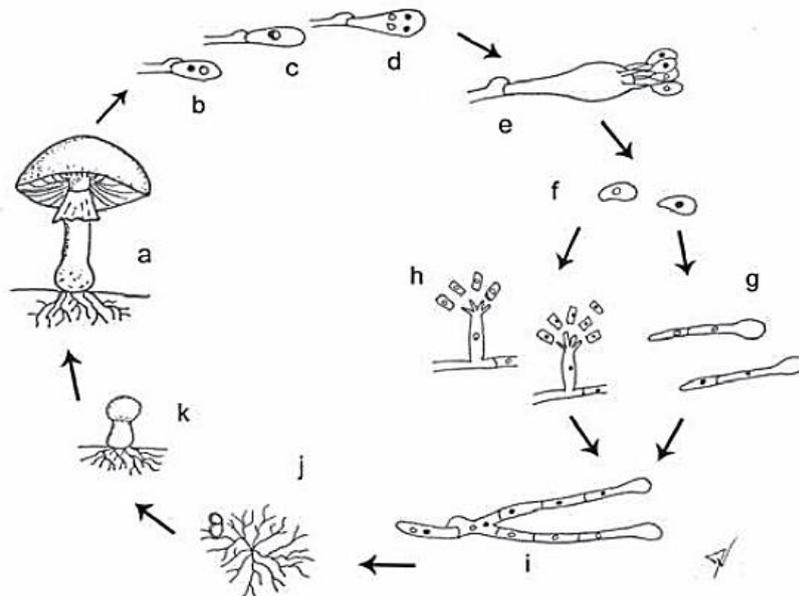


Figura 2. Ciclo biológico típico de un hongo basidiomiceto. (a) Basidiocarpo en desarrollo, (b-e) desarrollo del basidio: (b) basidio en formación dicariótico, (c) cariogamia, (d) meiosis, (e) basidio desarrollado con basidiosporas; (f) basidiosporas desprendidas, (g) micelio primario, (h) oídios, (i) micelio secundario, (j-k) micelio vegetativo con primordios.

Fuente: Cepero de García et al. 2012 [61].

I.1.4.6 Composición nutricional de *P. cibaria* Singer

P. cibaria Singer es una seta ampliamente consumida por los pobladores cusqueños durante la época de lluvias. Por esta razón, se ha investigado su composición nutricional para conocer los nutrientes que aporta su consumo (Tabla 3 y 4) [5, 22, 23, 24].

Tabla 3. Composición proximal (%) de *P. cibaria* Singer. (a) Base húmeda, (b) base seca excepto el análisis de humedad, (c, d) base seca.

Referencia	Humedad	Proteínas	Grasas	Carbohidratos	Cenizas	Fibra
Barreto et al. [22](a)	92.03	3.42	0.74	3.18	0.63	1.97
Laura et al. [24](b)	90.28	4.53	1.99	74.09	4.24	15.15
Simoni et al. [5](c)	17.60	18.10	2.33	56.01	5.96	11.20
Quispe et al. [23] (d)	-	34.15	4.16	53.64	8.05	8.30

Tabla 4. Concentración de minerales (mg/100 g base seca) en *P. cibaria* Singer.

Referencia	Calcio	Magnesio	Fósforo	Hierro	Zinc
Barreto <i>et al.</i> [22]	8.81	23.74	88.33	1.03	0.77
Quispe <i>et al.</i> [23]	32.50	94.10	967.20	12.20	10.40

I.1.4.7 Metales pesados en *P. cibaria* Singer

Simoni *et al.* analizó complementariamente la concentración de metales pesados en *P. cibaria* Singer y se identificó plomo, cadmio y cobre, pero no cromo (Tabla 5) [5].

Tabla 5. Concentración de metales pesados (ppm/peso seco) en *P. cibaria* Singer.

Referencia	Plomo	Cadmio	Cobre	Cromo
Simoni <i>et al.</i> [5]	4.45	0.69	68	0.00

II. Pregunta de investigación y objetivos

II.1 Pregunta de investigación

- ¿Cuál es la composición nutricional, la concentración de metales pesados y la actividad antioxidante *in vitro* de *P. cibaria* Singer expendida en Cusco?

II.2 Objetivo general

- Analizar la composición nutricional, la concentración de metales pesados y la actividad antioxidante *in vitro* de *P. cibaria* Singer expendida en Cusco.

II.3 Objetivos específicos

- Evaluar la composición química proximal (humedad, proteínas, grasas totales, fibra alimentaria, cenizas y carbohidratos) y el valor calórico de *P. cibaria* Singer.

- Determinar la concentración de ácido ascórbico de *P. cibaria* Singer por el método indofenol.
- Evaluar la presencia de minerales (Ca, Fe, I, F y Zn) en *P. cibaria* Singer con un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM) y cuantificar el contenido de Ca, Fe y Zn por espectrometría de masas (ICP-MS), de F por cromatografía iónica y de I por yodometría.
- Evaluar la presencia de metales pesados (As, Pb, Hg y Cd) en *P. cibaria* Singer con un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM) y cuantificarlos por espectrometría de masas (ICP-MS).
- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de *P. cibaria* Singer por el método DPPH.

III. Materiales y métodos

III.1 Diseño del estudio

Estudio básico exploratorio para determinar la composición nutricional, la concentración de metales pesados y la actividad antioxidante *in vitro* de *P. cibaria* Singer expendida en Cusco.

El estudio de la composición nutricional de *P. cibaria* Singer se basó en un análisis proximal (humedad, proteínas, grasas, fibra, cenizas y carbohidratos), el cálculo del valor calórico, determinación de la concentración de vitamina C por el método indofenol, identificación de Fe, Ca, Zn, F y I con un ESEM. Además, la cuantificación de la concentración de Fe, Ca y Zn por ICP-MS, F por cromatografía iónica y I por yodometría.

Respecto al análisis de los metales pesados As, Pb, Hg y Cd se identificaron a través de un ESEM y se cuantificaron por el método ICP-MS. Por último, se determinó la actividad antioxidante *in vitro* a través del método DPPH (Anexo 5).

III.2 Identificación y colección de la muestra

La unidad de estudio fue *P. cibaria* Singer. Se recolectó carpóforos de esta seta en el mercado Vinocanchon de San Jerónimo y en la feria de Q'oncha Raymi en la ciudad de Cusco. Cabe señalar que la Dra. Magdalena Pavlich quien es especialista en micología fue la responsable de la identificación y autenticación de la muestra antes de ser colectada (Anexo 6).

III.3 Tratamiento de la muestra

La muestra de *P. cibaria* Singer tuvo un peso total de 186.544 g y se distribuyó en platos descartables que fueron cubiertos con plástico film. Los platos se colocaron en un cooler y se trasladaron al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales en la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Los carpóforos se limpiaron con pincel y agua, y se desecaron en un horno (Thelco, modelo 16) a 30°C durante 1 semana. Luego de este tiempo, la muestra se pesó y se volvió a secar hasta que el peso sea constante para tener un control de la humedad perdida. Por último, la muestra se molió y fue guardada en una bolsa ziploc que fue guardada en un desecador hasta su análisis (Anexo 7).

III.4 Composición nutricional

III.4.1 Análisis proximal

El análisis proximal se desarrolló en base a los procedimientos establecidos por la AOAC INTERNATIONAL [65] con algunas modificaciones como se describe a continuación. Los resultados se expresaron en base seca.

III.4.1.1 Humedad

El contenido de humedad se determinó a través de la pérdida de peso de la muestra sometida a un calentamiento controlado según el método AOAC m930.15 [65].

Como se detalló en la sección III.3, se determinó el peso de la muestra mientras se encontraba fresca y luego fue deshidratada en un horno a 30°C durante una semana. En base a ello, ambos valores fueron reemplazados en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad A} = \frac{(\text{Peso muestra fresca} - \text{Peso muestra seca})}{\text{Peso muestra seca}} \times 100\%$$

Posteriormente, se utilizó un analizador de humedad. Este proceso se desarrolló por duplicado. Primero, se colocó 1 g de muestra en el analizador de humedad (RADWAG, MA 50.R). Luego de unos minutos, automáticamente el equipo mostró el porcentaje de humedad de la muestra, además, su peso inicial y final (Anexo 8-A).

Por último, el porcentaje de humedad se calculó a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \% \text{ Humedad A} + \% \text{ Humedad B}$$

Dónde:

- %Humedad A: Humedad calculada al desecar la muestra en el horno a 30°C.
- %Humedad B: Humedad calculada al desecar la muestra en el analizador de humedad.

III.4.1.2 Proteínas

Se determinó el porcentaje de proteínas en *P. cibaria* Singer a partir del contenido de nitrógeno según el método AOAC m984.13 [65], utilizando el método Kjeldahl. Este método determina volumétricamente el nitrógeno total que posee el alimento y luego se usa un factor de conversión de nitrógeno proteico para determinar la cantidad total de proteína bruta. En el análisis de proteínas en setas comestibles se usa comúnmente 4.38 como el factor de conversión del nitrógeno proteico [8, 10].

El factor de conversión que se usa para los alimentos en general es 6.25 basado en la suposición que las proteínas tienen un 16% de nitrógeno y se considera que el 100% de las proteínas es digerible, así la relación 100:16 es igual a 6.25. No obstante, se ha determinado que la digestibilidad proteica de las setas es alrededor del 70% debido a la alta cantidad de nitrógeno no proteico en forma de glucosamina en la quitina de la pared celular de los hongos. Por consiguiente, la relación de 70:16 es igual a 4.38 y se usa este valor como el factor de nitrógeno proteico de las setas [66].

Este método tuvo 3 etapas; digestión, destilación y titulación. La muestra se digirió con el calor, el ácido sulfúrico y los catalizadores convirtiendo el nitrógeno de la muestra en sulfato de amonio. Luego, la muestra fue tratada con el álcali NaOH 40% y catalizadores para descomponer el sulfato de amonio en amoniaco. El amoniaco por ser volátil fue

destilado por arrastre de vapor y recogido en un Erlenmeyer que contenía el indicador verde de bromocresol y solución etanólica de ácido bórico que al reaccionar con el amoníaco formó borato de amonio. Por último, se tituló o valorizó el borato de amonio usando una solución de ácido clorhídrico (HCl) estandarizado hasta que la solución viró de color azul a amarillo transparente [67].

Procedimiento

- a. **Digestión:** Se colocó 1 g de muestra deshidratada y molida en un balón de Kjeldahl, se adicionó 4 g de mezcla de sulfato de cobre (0.37 g) y sulfato de sodio (3.63 g), luego se agregó 14 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Todo lo anterior se realizó por duplicado. Por otro lado, se realizó un “Blanco”, el cual contenía todos los reactivos mencionados anteriormente, excepto la muestra de *P. cibaria* Singer.

Los balones se colocaron inclinados en la hornilla del sistema múltiple de digestión Kjeldahl. Seguidamente, se encendió el sistema múltiple de digestión y el proceso culminó cuando la solución contenida en el balón tuvo una coloración verde clara, con excepción del blanco que no se observó ningún cambio de color. El proceso de digestión llevó alrededor de 2.5 horas. Al acabar esta etapa, se dejó enfriar los balones.

- b. **Destilación:** Se agregó 150 mL de agua destilada, se adicionó lentamente 30 mL de solución NaOH al 40% y se añadió 3 trozos de granallas de zinc en los balones ya enfriados. Cada balón se colocó en una hornilla del destilador y se conectó al tubo condensador mediante un bulbo de seguridad.

Por otra parte, en un matraz de Erlenmeyer de 100 mL de capacidad se agregó 40 mL de ácido bórico (H_3BO_3) al 4% y 3 gotas del indicador verde de bromocresol. Todo lo anterior se realizó por triplicado. Luego, cada matraz se colocó en la parte inferior de cada tubo condensador para la destilación del blanco y de las dos soluciones donde estaba la muestra. Cada tubo condensador quedó sumergido en la solución de H_3BO_3 . Se encendió el sistema y se hizo circular agua fría potable por el depósito del

condensador del sistema. La destilación se llevó a cabo hasta que se obtuvo 150 mL del destilado.

- c. **Titulación:** El contenido de cada matraz se tituló con solución de HCl 0.1N hasta que viró de color azul a amarillo.

El procedimiento descrito se encuentra resumido en el Anexo 8-B.

Los resultados se expresaron en porcentaje de nitrógeno proteico a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Proteinas} = \frac{14 \times V \times N \times Fp}{\text{Peso de la muestra (mg)}} \times 100$$

Donde:

V= mL de HCl utilizados para titular

N= Normalidad de HCl

Fp= Factor proteico (4.38)

III.4.1.3 Grasas totales

El contenido de grasa en *P. cibaria* Singer se determinó como extracto etéreo según el método AOAC m920.39 [65] utilizando un extractor Soxhlet. Este método emplea un solvente orgánico apolar como el éter de petróleo para extraer grasa de la muestra a través del sistema continuo de Soxhlet hasta agotar la grasa en la muestra [67].

Procedimiento

Se colocó 2 g de muestra deshidratada en un cartucho de papel filtro y se introdujo en el cuerpo intermedio del extractor Soxhlet. Se pesó un matraz redondo de fondo plano y se conectó al sistema Soxhlet. Luego de tener el sistema armado, se agregó aproximadamente 100 mL de éter de petróleo por la parte superior del sistema hasta la mitad del cuerpo intermedio. A continuación, se hizo circular agua fría por el refrigerante del sistema, se encendió la campana extractora y la estufa del sistema para iniciar la extracción hasta agotamiento de la muestra. La extracción se realizó por 4 horas, durante este tiempo la grasa fue extraída por el éter hacia el matraz. Transcurrido el tiempo, se

retiró el matraz y se colocó en baño maría a 40° C para evaporar el éter residual. Por último, se puso el matraz en un desecador, luego se pesó en una balanza analítica. El matraz continuó en el desecador hasta que el peso fue constante. Este ensayo se realizó por duplicado (Anexo 8-C).

El porcentaje de grasas se determina con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Grasas} = \frac{(\text{Peso balón con extracto graso} - \text{Peso balón vacío})}{\text{Peso muestra seca}} \times 100\%$$

III.4.1.4 Fibra

La determinación de la cantidad de fibra se determinó a través de una doble digestión según el método AOAC m962.09 [65]. La primera fue una digestión ácida con ácido sulfúrico (H₂SO₄) para extraer azúcares y almidón. La segunda, una digestión alcalina con hidróxido de sodio (NaOH) para extraer pectinas, celulosa, hemicelulosa, lignina, entre otros [68].

Procedimiento

- a. Digestión ácida:** En un matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad se mezcló 1 g de muestra desengrasada con 100 mL de H₂SO₄ al 1.25%. Luego se calentó sobre una hornilla durante 30 minutos hasta su ebullición, mientras tanto, se agitó y se repuso con agua destilada las pérdidas de volumen durante la ebullición. Transcurrido el tiempo, se filtró la solución usando un papel filtro previamente pesado. Se usó agua destilada caliente para lavar el recipiente para que todos los restos de la muestra cayeran sobre el papel filtro.

- b. Digestión alcalina:** Se trasvasó todo el precipitado retenido en el papel filtro hacia un matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 100 mL de agua destilada caliente. Enseguida se agregó 50 ml de NaOH al 2.5% en el matraz y se hirvió durante 30 minutos. Se repuso con agua destilada las pérdidas de volumen durante la ebullición. Después de este tiempo, se filtró el líquido usando el mismo papel filtro utilizado en la digestión ácida. Además, se utilizó agua destilada caliente para lavar el recipiente y extraer

los residuos adheridos al matraz. El lavado se realizó con agua destilada hasta que no exista reacción alcalina (se usó tiras indicadoras de pH).

Se transfirió el filtrado del papel a un crisol previamente pesado y se colocó en una estufa a 130 °C por 2 horas, se dejó enfriar en el desecador y se pesó. Por último, se colocó el crisol en la mufla a 500 °C por 2 horas, se dejó enfriar y se pesó.

El análisis se llevó a cabo por duplicado.

El cálculo del porcentaje de fibra se a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Fibras} = \frac{(A - B)}{C} \times 100\%$$

A = Peso del crisol con el residuo seco (g)

B = Peso del crisol con la ceniza (g)

C = Peso de la muestra (g)

III.4.1.5 Cenizas

El contenido de cenizas se determinó gravimétricamente por incineración según el método AOAC m942.05 [65]. La incineración de la muestra provoca que pierda agua y demás componentes volátiles en forma de vapores, mientras que los constituyentes orgánicos son transformados en dióxido de carbono y óxido de nitrógeno al ser expuestos a 600 °C. De esta manera, al final del proceso sólo permanecen los minerales en forma de óxidos, fosfatos, sulfatos, silicatos y cloruros [67].

Procedimiento

- a. Pre incineración de la muestra:** Se colocó 1 g de muestra desengrasada en un crisol de porcelana previamente pesado. Luego, dentro de la campana extractora, se colocó el crisol sobre una hornilla hasta que la muestra estuvo completamente carbonizada.
- b. Incineración de la muestra:** la muestra carbonizada se colocó dentro de una mufla a 600°C por 12 h. Posteriormente, se dejó enfriar en un

dsecador por 30 min. e inmediatamente después se pesó la ceniza en una balanza analítica.

El análisis se realizó por duplicado (Anexo 8-E).

Los resultados obtenidos se reemplazaron en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(Pf - Pi)}{Pm} \times 100\%$$

Donde:

Pf= Peso de la cápsula con las cenizas.

Pi= Peso de la cápsula vacía.

Pm= Peso de la muestra

III.4.1.6 Determinación de carbohidratos

El porcentaje de carbohidratos se determinó restando del 100% la suma del contenido de cada componente proximal (humedad, proteínas, grasas, fibra y cenizas) [8, 19].

Se sumó el porcentaje de cada componente proximal considerado como ensayo 1 y 2 por separado para obtener dos porcentajes de carbohidratos y así obtener un promedio y una desviación estándar.

A continuación, se presenta la ecuación utilizada:

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100 - (P + F + G + C)$$

Donde:

P= Proteínas

F= Fibra

G= Grasas

C= Cenizas

III.4.2 Valor calórico

La determinación del valor calórico tiene como objetivo determinar el aporte energético de *P. cibaria* Singer. Para ello, se aplicó el equivalente energético en kilocalorías (kcal) de cada macronutriente y fibra [69].

Equivalentes energéticos:

- 1 g de grasas al quemarse en el organismo produce 9 kcal.
- 1 g de proteínas al quemarse en el organismo produce 4 kcal.
- 1 g de carbohidratos al quemarse en el organismo produce 4 kcal.
- 1 g de fibra al quemarse en el organismo produce 2 kcal.

La determinación del valor calórico se realizó por duplicado a partir de los dos cálculos obtenidos de cada macronutriente y de la fibra. El aporte calórico de *P. cibaria* Singer se expresó en base seca y fresca. Para este último, se convirtió a base fresca el contenido de proteínas, grasas, carbohidratos y fibra (Anexo 8).

Para determinar el valor calórico, reemplazamos los resultados anteriores en la siguiente ecuación:

$$\text{Valor calórico} \left(\frac{\text{Kcal}}{100\text{g}} \text{ de alimento} \right) = (\%P \times 4) + (\%G \times 9) + (\%C \times 4) + (\%F \times 2)$$

Donde:

P= Proteínas

G= Grasas

C= Carbohidratos

F= Fibra

III.4.3 Ácido ascórbico

Se determinó el contenido de vitamina C según el método indofenol descrito por Nielsen *et. al* a partir de la AOAC m967.21 [70]. Esta técnica se basa en el uso de una solución de indofenol y ácido metafosfórico - ácido acético. La solución de indofenol es un colorante azul que se reduce a una solución incolora en presencia de ácido ascórbico, pero cuando el total del ácido ascórbico se ha oxidado el exceso de tinte sin reducir es de color

rosa en la solución ácida. Antes de titular el extracto problema es necesario determinar el título del tinte. Para ello, se usa una solución estándar de ácido ascórbico y una solución blanco [70].

Cabe indicar que el ensayo se realizó por duplicado para asegurar la repetitividad del análisis (Anexo 9).

Procedimiento

- a. Estandarización del tinte:** En un Erlenmeyer de 50 mL se mezcló 5 mL de la solución ácido metafosfórico-ácido acético con 2 mL de la solución estándar de ácido ascórbico. Por otro lado, se llenó una bureta con la solución de indofenol (tinte) y se colocó el matraz Erlenmeyer debajo de la punta de la bureta. Enseguida se agregó lentamente la solución de indofenol hasta que tomó un color rosa claro durante más de 5 segundos, el matraz se agitó mientras se agregaba la solución de indofenol.

- b. Estandarización del blanco:** Se pipeteó 7 mL de la solución de ácido metafosfórico-ácido acético en un matraz Erlenmeyer de 50 mL. Luego se agregó al matraz un volumen de agua destilada igual al volumen promedio del tinte usado anteriormente para valorar las dos muestras estándar. Inmediatamente se colocó el matraz Erlenmeyer debajo de la punta de la bureta y se agregó lentamente la solución de indofenol al blanco hasta que tomó un color rosa claro durante más de 5 segundos, en tanto, se agitó el matraz mientras se agregaba la solución de indofenol.

Los resultados obtenidos hasta ese momento se reemplazaron en la siguiente ecuación:

$$F = \frac{C}{S - B} * 100$$

Dónde:

F= Estandarización del tinte

C= mg de ácido ascórbico en volumen de solución estándar titulada

S= mL del tinte promedio utilizado para la titulación de la solución estándar

B= mL del tinte promedio utilizado para la titulación del blanco

- c. Análisis de la muestra:** Se mezcló 5 mL de la solución de ácido metafosfórico-ácido acético con 2 mL del extracto metanólico 0.2 g/mL de *P. cibaria* Singer en un matraz Erlenmeyer de 50 mL. Enseguida, se colocó el matraz Erlenmeyer debajo de la punta de la bureta y se agregó lentamente la solución de indofenol a la solución estándar de ácido ascórbico, mientras tanto, se agitó el matraz hasta que tomó un color rosa claro durante más de 5 segundos.

Los resultados obtenidos se reemplazaron en la siguiente ecuación.

$$mg \text{ ácido ascórbico/mL extracto metanólico} = (X - B) \times (F/E) \times (V/Y)$$

Dónde:

X= mL de titulación usado para la muestra

B= mL promedio usado para la titulación del blanco

F= Estandarización del tinte

E= mL de la muestra usada en el ensayo

V= Volumen de la solución de ensayo inicial

Y= Volumen de la alícuota de la muestra titulada

El análisis se realizó a partir de un extracto metanólico de *P. cibaria* Singer, en consecuencia, el anterior resultado se reemplazó en la siguiente ecuación para determinar la concentración de ácido ascórbico en 100 g de muestra.

$$mg \text{ ácido ascórbico/100 g de muestra} = \frac{mg \text{ ácido ascórbico}}{mL \text{ extracto metanólico}} \times \frac{1 mL}{0.2 g} \times 100g$$

III.4.4 Minerales

a. Microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM)

Se empleó un ESEM marca FEI Quanta 200 para la identificación química de calcio, hierro, zinc, flúor y yodo en los basidiocarpos de *P. cibaria* Singer. El ESEM fue operado por la Dra. Gladys Ocharán en la Universidad Nacional Agraria La Molina.

El sistema del ESEM emite un haz de electrones a través del calentamiento de un filamento de tungsteno y bombardea a la muestra que está en una cámara de vacío. Producto de la interacción entre los electrones y la muestra se emiten 3 tipos de señales: electrones secundarios (LFD), electrones electro dispersados (SSD) y rayos X. Para ello, el equipo cuenta con detectores para cada una de estas señales [71].

Los LFD permiten obtener imágenes en tres dimensiones de la morfología superficial de la muestra. Los SSD solo permiten obtener imágenes en dos dimensiones y se obtiene información sobre la composición química de la muestra. Mientras que los rayos x generan un espectrograma y permite conocer los elementos químicos de la muestra [71].

Procedimiento

Se colocó 1 g de muestra deshidratada y molida en un pequeño recipiente de aluminio. Luego, el recipiente se colocó en la platina del microscopio (anexo 10) y las imágenes fueron tomadas en modo de bajo vacío y con un voltaje de 30 kv. La imagen tomada para obtener el espectrograma tuvo una magnificación de 100x (Anexo 10).

Los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje del peso (Wt %) de cada elemento químico identificado del total de elementos en la muestra y esto se grafica en un espectrograma. También se muestra el porcentaje atómico (At%), esto significa el porcentaje del número de átomos de un elemento respecto al total del número de átomos presentes en toda la muestra [72].

b. Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

La determinación de la concentración de Ca, Fe y Zn en los basidiocarpos de *P. cibaria* Singer se realizó por ICP-MS. Este ensayo fue realizado por el Sistema de Servicios y Análisis Químicos S.A.C. SLab. Usaron un ICP-MS Perkin Elmer NEXION 300.

La ICP-MS es una técnica analítica que permite identificar y cuantificar múltiples elementos químicos a partir de un bajo volumen de muestra, en corto tiempo de análisis y con un límite de detección muy sensible [73].

El fundamento de esta técnica es la combinación de dos métodos, el primero es generar iones a través del plasma acoplado inductivamente. Luego, los iones son separados, identificados y medidos en el espectrómetro de masas [74].

El procedimiento del análisis fue el siguiente:

- Digestión de la muestra

Se pesó 1 g de la muestra deshidratada y molida de *P. cibaria* Singer en un tubo de digestión. El análisis de la muestra se realizó por duplicado. Además, se incluyó un blanco y una muestra de referencia fortificada con 2 mL de solución para fortificar.

Se agregó 25 mL de HNO₃ a las muestras y se agitó manualmente para homogeneizar. Se colocó los tapones en los tubos de digestión con los refrigerantes y se digirieron a 80 °C durante 4 horas. Luego de este tiempo, se incrementó la temperatura de digestión a 120 °C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se removieron los refrigerantes, se enfriaron y mezclaron los tubos de digestión. Se calentaron las muestras, el blanco y la muestra de referencia fortificada a 140 °C hasta que quede un volumen de 5 mL. Al llegar a este volumen se enfriaron a menos de 60°C. A continuación, se agregó 5 mL de HClO₄, se colocó otra vez los refrigerantes y se

dirigieron a 220°C durante 30 minutos. Posteriormente, se enfriaron los tubos de digestión y se lavaron las paredes de los tubos con agua. Finalmente, se filtraron y se enrasaron con agua hasta tener un volumen de 100 mL.

- Lectura de la muestra

Se midió la concentración de metales de las muestras (duplicado), el blanco y los estándares en el equipo ICP-MS.

Se realizaron los cálculos respectivos de acuerdo a la curva de calibración leída. El cálculo de la concentración de calcio, hierro y zinc se utilizó la siguiente ecuación:

$$M \left(\frac{mg}{kg} \right) = \frac{(A - B) * D * V}{W}$$

Dónde:

- M: Concentración del elemento de la muestra en base seca.
- A: Concentración en mg/L leída en la muestra digerida.
- B: Concentración en mg/L del blanco del método.
- D: Factor de dilución si corresponde.
- V: Volumen en mL de digerido.
- W: Masa en g de muestra usada en la digestión.

c. Cromatografía iónica

La determinación de la concentración de F se realizó por cromatografía iónica. Este ensayo se llevó a cabo por el Sistema de Servicios y Análisis Químicos S.A.C. SLab y se realizó por duplicado. Usaron un cromatógrafo iónico Thermo Scientific ICS-90.

La cromatografía iónica es un método utilizado para separar iones a través de la afinidad que poseen con una columna de resina (fase estacionaria) y un eluyente (fase móvil). Se mezcla la muestra con el eluyente y es inyectado al sistema. Los iones con mayor afinidad a la columna se

moverán más lento a través de la columna, mientras que los de menor afinidad se moverán más rápido. El sistema cuenta con un detector de conductividad eléctrica que produce un cromatograma de la conductividad frente al tiempo. En el cromatograma se observan picos que representan los iones identificados y la altura de cada uno es la concentración relativa de cada ion. Cabe resaltar que el sistema cuenta con un supresor para reducir la conductancia de los iones en la fase móvil y no alterar la conductancia de los iones de interés [75, 76].

d. Yodometría

La determinación de la concentración de I se realizó por el ensayo de yodometría. Este ensayo fue realizado por el Sistema de Servicios y Análisis Químicos S.A.C. SLab y se realizó por duplicado.

Este método consiste en extraer el I usando una solución de yoduro de potasio. El I libre es titulado con una solución de tiosulfato de sodio 0.005 N hasta que la solución quede con un ligero color amarillo. Luego, se agrega una solución indicadora de 1% almidón y la titulación continua hasta que desaparezca el color azul.

El procedimiento del análisis fue el siguiente:

Se pesó 5 g de muestra deshidratada y se disolvió en agua destilada. Se transfirió la sal a un matraz aforado de 25 mL y se aforó la solución a 25 mL. Se filtró aproximadamente 10 mL de la solución de sal con un papel filtro y se transfirió 5 mL de la solución preparada anteriormente a un Erlenmeyer de 50 mL. Se agregó 1 mL de la solución ácido sulfúrico 2N y 3 mL de la solución al 10% de yoduro de potasio. Se tituló el yodo libre con la solución 0.005N de tiosulfato de sodio hasta que la solución quedó con un ligero color amarillo. Por último, se añadió 3 gotas de solución de 1% de almidón como indicador y se completó la titulación hasta que desaparezca el color azul.

Los valores obtenidos se reemplazaron en la siguiente ecuación:

$$I \left(\frac{mg}{kg} \right) = \frac{V * N * 21.167 * Vtotal * 1000}{Valic * W}$$

Dónde:

- I: Contenido de yodo (mg/kg) en la muestra.
- V: Volumen de solución de tiosulfato de sodio empleado (mL) en la titulación.
- N: Normalidad exacta de la solución de tiosulfato de sodio.
- Vtotal: Volumen total (mL) a la que se llevó la muestra.
- Valic: Volumen de alícuota (mL) a la que se llevó la muestra.
- M: Peso de la muestra (g).

III.5 Análisis de metales

El análisis de la concentración de As, Pb, Hg y Cd se realizó por ICP-MS. Los detalles del fundamento y metodología se encuentran en el punto 3.5.4 b. Ya que el análisis de estos metales se realizó conjuntamente con el análisis de los minerales. Además, se realizó por duplicado (Anexo 11).

III.6 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante *in vitro* de *P. cibaria* Singer se evaluó por el método de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH •) en base a la metodología aplicada por Sarikurkcu *et al.* [77] con algunas modificaciones.

El DPPH es un compuesto de radicales libres cromógenos púrpura que cambia de color al reducirse en presencia de compuestos capaces de donar un átomo de hidrógeno para estabilizar el DPPH (antioxidantes/reductores) [18]. El DPPH inestable es de color morado y tiene un pico máximo de absorbancia a 517 nm, pero se reduce y cambia de color al interactuar con antioxidantes, de tal manera que la absorbancia será menor [77]. En caso la actividad antioxidante sea muy alta el cambio de color será perceptible y virará

a amarillo, sin embargo, si la actividad antioxidante es baja el cambio de color no será perceptible, pero será medible a través de un espectrofotómetro.

En el ensayo se utilizó el ácido ascórbico como un control positivo y comparar su actividad antioxidante *in vitro* con la del extracto metanólico de *P. cibaria* Singer.

Procedimiento

Para el análisis de la actividad antioxidante *in vitro* de *P. cibaria* Singer se prepararon 6 extractos metanólicos de diferentes concentraciones: 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 8 mg/mL. A continuación, se mezcló 1 mL de cada extracto metanólico de *P. cibaria* Singer con 1 mL de una solución metanólica 0.2 mM de DPPH en 6 diferentes tubos de ensayo y se dejó reposar a temperatura ambiente bajo oscuridad durante 30 minutos. Mientras transcurría el tiempo, se agregó 2 mL de cada extracto metanólico de *P. cibaria* Singer en otros 6 tubos de ensayo para utilizarlos como un control de la muestra y en otro tubo de ensayo se agregó 2 mL de la solución metanólica 2 mM de DPPH para utilizarlo como un control de DPPH. Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia a 517 nm las mezclas del extracto metanólico de *P. cibaria* Singer con el DPPH, del control de los extractos metanólicos de *P. cibaria* Singer y el control de la solución metanólica 2 mM de DPPH frente a un blanco que fue el metanol utilizado para hacer las diluciones. Para ello, se utilizó un espectrofotómetro Hewlett Packard, modelo 8453.

De manera análoga, se analizó la actividad antioxidante *in vitro* del ácido ascórbico como un control positivo. Se prepararon 6 extractos metanólicos de ácido ascórbico de diferentes concentraciones: 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 ug/mL. Posteriormente, se mezcló 1 mL de cada solución metanólica de vitamina C con 1 mL de la solución metanólica 0.2 mM de DPPH y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente bajo oscuridad. Mientras tanto, se agregó 2 mL de cada solución metanólica de vitamina C en otros 6 tubos de ensayo para utilizarlos como un control de la vitamina C. Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia a 517 nm de la solución metanólica de la vitamina C-DPPH y de las soluciones del control de la vitamina C en el espectrofotómetro.

Cabe resaltar que el ensayo se realizó por duplicado y la incubación de las mezclas del extracto metanólico de *P. cibaria* Singer y ácido ascórbico con la solución de DPPH se

cronometró 30 minutos para cada una de manera independiente, de esta manera, se midió su absorbancia exactamente luego de media hora. Por otro lado, los volúmenes, mezclas realizadas y un diagrama del ensayo se resumen en el Anexo 12.

Finalmente, el promedio de las absorbancias de los diferentes extractos se reemplazó en la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad antioxidante in vitro (\%)} = \left[\frac{AC - (AM - AB)}{AC} \right] * 100$$

Dónde:

- AC: Absorbancia de la solución DPPH.
- AM: Absorbancia del extracto con la solución DPPH.
- AB: Absorbancia de la solución metanólica.

III.7 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Por lo tanto, los resultados descriptivos se expresaron como valores medios con desviación estándar (DE). Se utilizó Microsoft Excel 2016 para realizar los cálculos de la media con DE.

III.8 Consideraciones éticas

El proyecto de tesis empleó una muestra pequeña de la seta comestible *P. cibaria* Singer que se expenden en el mercado Vinocanchon y en la feria de Q'oncha Raymi en la ciudad de Cusco. En este sentido, no hubo necesidad de extraerlas de su estado nativo. Además, no se encuentra en peligro de extinción y su venta está popularizada.

IV. Resultados

IV.1 Composición nutricional

IV.1.1 Análisis proximal y valor calórico

La composición nutricional y el aporte energético de *P. cibaria* Singer por cada 100 g de muestra deshidratada se resumen en la tabla 6.

La humedad fue el componente que se encontró en mayor concentración por cada 100 g de muestra fresca. Sin embargo, el carbohidrato fue el componente más abundante por cada 100 g de muestra deshidratada (base seca). Asimismo, las grasas representaron el componente más escaso en base seca.

Tabla 6. Composición proximal (%) y valor calórico (kcal/100 g base seca) de *P. cibaria* Singer.

Humedad	Proteínas	Grasas	Carbohidratos	Cenizas	Fibra
79.48 ±0.46	23.83 ±0.30	1.53 ±0.18	44.44 ±1.73	17.47 ±0.03	12.73 ±1.57

* Cada valor se expresa como media ± desviación estándar de un ensayo por duplicado.

Respecto al valor calórico, se obtuvo 312.34 ± 4.14 kcal/100 g base seca y 64.12 ± 2.31 kcal/100 g base fresca. Al comparar estos resultados se observa que cada 100 g de la muestra deshidratada tiene un aporte energético mucho mayor que cada 100 g de la muestra fresca.

IV.1.2 Ácido ascórbico

El contenido de ácido ascórbico se determinó a partir del método indofenol. Se obtuvo que cada 100 g de muestra deshidratada de *P. cibaria* Singer contenía 3.27 ± 0 mg de ácido ascórbico.

IV.1.3 Minerales

A través del ensayo de ESEM, de los 5 elementos de interés (Ca, Fe, Zn, F y I) solo se detectó la presencia de Ca, Fe y Zn. Sin embargo, también se identificó otros elementos necesarios en la alimentación, tales como: magnesio (Mg), aluminio (Al), silicio (Si), fósforo (P), azufre (S) y potasio (K).

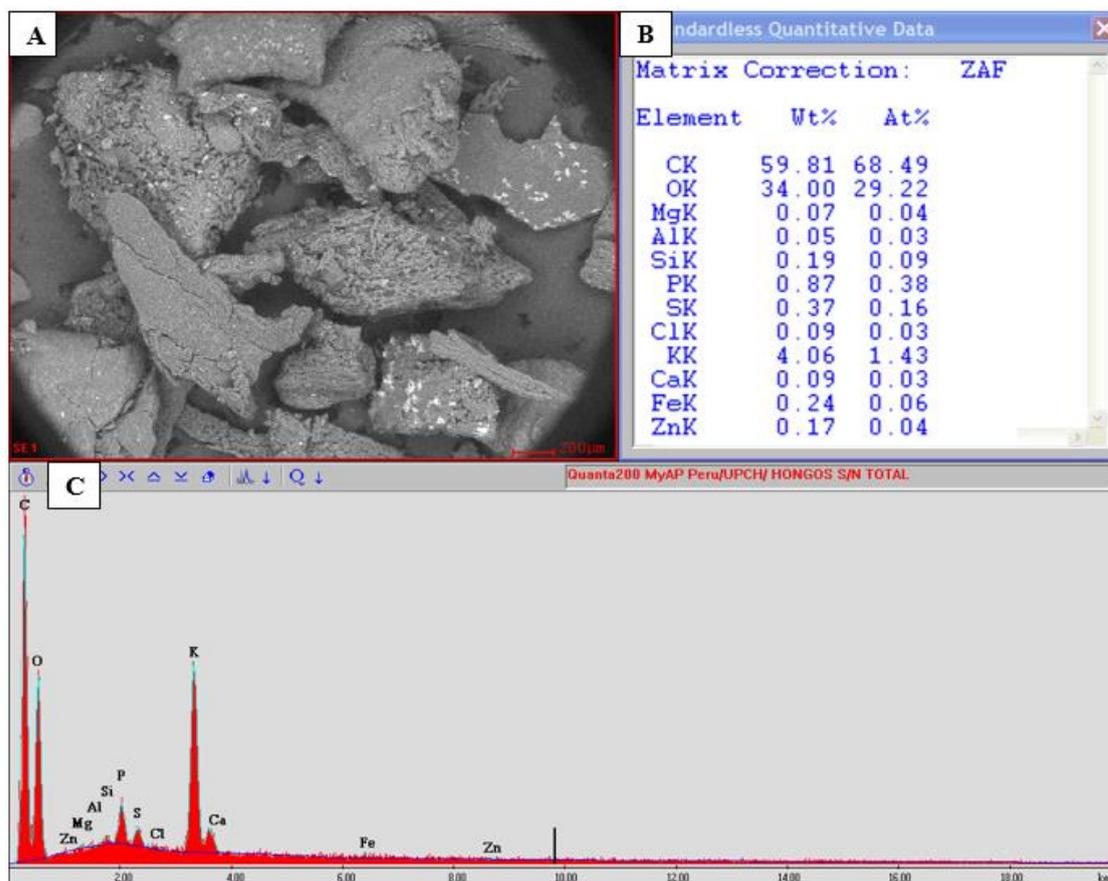


Figura 3. Detección de elementos en *P. cibaria* Singer por ESEM. (A) Micrografía de la superficie de la muestra con una aproximación de 100x. (B) Lista de elementos identificados. (C) Espectro de análisis de elementos en *P. cibaria* Singer.

Luego, se cuantificó la concentración de los 5 elementos de interés. El análisis de Ca, Fe y Zn se realizó por ICP-MS, el F por cromatografía iónica y el I por yodometría.

La concentración de los 5 elementos químicos por cada kg de *P. cibaria* Singer deshidratada se muestra en la tabla 7.

El calcio fue el elemento más abundante, mientras que el yodo fue el de menor concentración.

Tabla 7. Concentración de minerales (mg/100 g base seca) en *P. cibaria* Singer.

Calcio	Hierro	Zinc	Flúor	Yodo
75.99 ± 0.85	30.41 ± 0.53	6.77 ± 0.85	2.37 ± 1.52	2.02 ± 0.18

* Cada valor se expresa como media ± desviación estándar de un ensayo por duplicado.

IV.2 Metales pesados

No se detectó la presencia de Ar, Pb, Hg y Cd en *P. cibaria* Singer a través del ensayo de ESEM (Fig.3).

En adición a lo anterior, se cuantificó la concentración de Ar, Pb, Hg y Cd en *P. cibaria* Singer a través del ensayo de ICP-MS. La concentración de los cuatro metales pesados en *P. cibaria* Singer se muestran en la tabla 8.

Se detectó la presencia de los cuatro metales pesados, pero en concentraciones muy bajas.

Tabla 8. Concentración de metales pesados (mg/kg base seca) en *P. cibaria* Singer.

Arsénico	Plomo	Mercurio	Cadmio
< 0.002 ± 0	< 0.002 ± 0	< 0.001 ± 0	< 0.0001 ± 0

* Cada valor se expresa como media ± desviación estándar de un ensayo por duplicado.

IV.3 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante *in vitro* de las concentraciones de los extractos metanólicos de *P. cibaria* Singer y del ácido ascórbico como control positivo se muestran en la tabla 9 y 10, respectivamente. La actividad antioxidante *in vitro* se expresó como el porcentaje de neutralización de radicales libres DPPH.

En la tabla 9 se aprecia que el porcentaje de neutralización de los radicales libres DPPH se incrementa a medida que se aumenta la concentración del extracto metanólico de *P. cibaria* Singer. Este mismo patrón se repite para los extractos metanólicos de ácido ascórbico (tabla 10) sólo que en este caso se utilizó extractos de menor concentración. Por esta razón, para que los extractos metanólicos de *P. cibaria* Singer neutralicen el 50% de los radicales libres DPPH (IC50) se requirió una concentración menor a 0.25 mg/mL, mientras que en el caso del control positivo solo se requirió una concentración menor a 0.0025 mg/mL.

Tabla 9. Porcentaje de neutralización de radicales DPPH (%) de diferentes concentraciones del extracto metanólico de *P. cibaria* Singer (mg/mL).

Concentración (mg/mL)	Neutralización de radicales DPPH (%)
0.25	51.36 ± 0.69
0.5	52.98 ± 0.32
1	54.68 ± 0.59
2	58.24 ± 0.58
4	65.61 ± 0.25
8	77.28 ± 0.31

* Cada valor se expresa como media ± desviación estándar de un ensayo por duplicado.

Tabla 10. Porcentaje de neutralización de radicales DPPH (%) de diferentes concentraciones del extracto metanólico de ácido ascórbico (mg/mL).

Concentración (mg/mL)	Neutralización de radicales DPPH (%)
0.0025	50.33
0.005	54.62
0.01	68.15
0.02	91.20
0.04	95.45
0.08	96.65

V. Discusión

En el presente estudio, se enfatizó en la composición nutricional, la concentración de metales pesados y la actividad antioxidante *in vitro* de *P. cibaria* Singer. Los resultados de estos 3 puntos se discuten a continuación.

El estudio de la composición nutricional comprendió el análisis proximal (humedad, carbohidratos, fibra, proteínas, grasas y cenizas), el cálculo del valor calórico, determinación de la concentración de ácido ascórbico y análisis de la concentración de minerales (Ca, Fe, Zn, F y I).

El agua fue el componente principal de *P. cibaria* Singer (79.48%) al estar fresca. Este resultado es corroborado por Barreto *et al.* 2011 y Laura *et al.* 2012 quienes también obtuvieron un alto contenido de humedad (92.03% y 90.28%, respectivamente) al analizar los basidiocarpos de *P. cibaria* Singer [22, 24]. Los carpóforos de los hongos comestibles están compuestos generalmente entre un 80-90% de agua [20, 78, 79]. El elevado

porcentaje de humedad favorece el desarrollo de microorganismos contaminantes que aceleran la perecibilidad y reducen el tiempo de vida del alimento [80-82]. Por esta razón, se recomienda refrigerarlos o deshidratarlos para mejorar sus condiciones de almacenamiento [9, 37]. En tal sentido, podemos afirmar que el agua constituye el componente de mayor proporción en los carpóforos frescos de *P. cibaria* Singer.

La muestra deshidratada de *P. cibaria* Singer contenía 44.44% de carbohidratos y fue el componente más abundante por cada 100 g de muestra deshidratada. De esta manera, nuestro resultado guarda relación con Laura *et al.* (74.09%) [24], Simoni *et al.* (56.01%) [5] y Quispe *et al.* (53.64%) [23]. Se han identificado otras setas que también tienen un alto contenido de carbohidratos, es así como siete setas silvestres en Ghana contenían entre 64.14 - 80.17% de carbohidratos [8] y en Rumania la seta silvestre *Polyporus squamosus*, 74.22% [83]. Analizando nuestros resultados, los basidiocarpos de *P. cibaria* Singer deshidratados se componen principalmente de carbohidratos al igual que otras setas silvestres.

La muestra deshidratada de *P. cibaria* Singer contenía 12.73% de fibra. Esto significa que tiene un alto contenido de fibra porque cubre al menos el 20% del requerimiento diario [32]. En este caso cubrió el 33.5% y el 50.9% de la ingesta diaria recomendada para un varón (38 g/día) y una mujer (25 g/día) adulto, respectivamente [31]. Del mismo modo, Laura *et al.* (15.15%) [24], Simoni *et al.* (11.20%) [5] y Quispe *et al.* (8.30%) [23] obtuvieron una alta concentración de fibra porque cubría el 20% del requerimiento diario para un adulto. De esta manera, *P. cibaria* Singer deshidratada tiene un alto aporte de fibra.

La muestra deshidratada de *P. cibaria* Singer estaba compuesta de 23.83% de proteínas y fue el componente en mayor proporción después de los carbohidratos. Esta cantidad representa más del 20% del requerimiento diario de proteínas para una mujer (46 g/día) y un varón (56 g/día) adulto [31]. Por esta razón, *P. cibaria* Singer tuvo un alto contenido de proteínas [32]. Este resultado tiene relación con Simoni *et al.* (18.10%) [5] y Quispe *et al.* (34.15%) [23] porque la concentración de proteínas en *P. cibaria* Singer cubría más del 20% del requerimiento diario de un adulto. Sin embargo, Laura *et al.* solo obtuvo 4.53% de proteínas en *P. cibaria* Singer a pesar que usó la misma metodología empleada en el presente estudio [24]. Se evidencia que si bien *P. cibaria* Singer tuvo un alto

contenido de proteínas, también se podría encontrar carpóforos con bajas concentraciones de proteínas.

Los carpóforos deshidratados de *P. cibaria* Singer contenían 1.53% de grasas, fue el componente en menor proporción y tuvo un bajo contenido de grasas [32]. De igual manera, Laura *et al.* (1.99%) [24] y Simoni *et al.* (2.33%) [5] reportaron bajas concentraciones de grasas en *P. cibaria* Singer. Excepto Quispe *et al.* quien obtuvo 4.16% de grasas [23]. Este patrón es común en setas, por ello siete setas silvestres en Ghana tenían entre 0.82 y 2.93 g/100 g (base seca) de grasas [8] y otra seta silvestre en Rumanía, *Polyporus squamosus* contenía 1.46 g/100 g (base seca) de grasas [83]. Analizando nuestros resultados y los demás, se puede declarar que *P. cibaria* Singer tiene un bajo contenido de grasas, siendo ideal para una dieta con un bajo contenido de lípidos [84].

El análisis de cenizas representa el contenido total de minerales. Se obtuvo que los carpóforos deshidratados de *P. cibaria* Singer contenían 17.47% de minerales totales y fue el componente en mayor proporción después de los carbohidratos y proteínas. Este resultado no guarda relación con Laura *et al.* (4.24%) [24], Simoni *et al.* (5.96%) [5] y Quispe *et al.* (8.05%) [23] quienes obtuvieron un porcentaje de minerales totales menor a comparación de nuestro resultado. Se puede decir que el contenido de minerales totales en *P. cibaria* Singer es variable.

Respecto al análisis proximal, existen diferencias entre nuestros resultados con los de Simoni *et al.* [5], Barreto *et al.* [22], Quispe *et al.* [23] y Laura *et al.* [24]. En general, estas variaciones pueden deberse a las condiciones ambientales en la que crecieron, las condiciones de almacenamiento, el tratamiento de la muestra (deshidratación y molienda), la edad del carpóforo y las pequeñas variaciones en los protocolos de análisis [10]. Se ha visto que el contenido de agua en las setas será mayor en zonas con mayor humedad [10] y luego de alcanzar la madurez comenzarán a disminuir su contenido de humedad [81]. Respecto a la edad del carpóforo, se ha observado en la seta cultivada *Volvariella Volvacea* consumido en Filipinas incrementa su contenido de proteínas y lípidos al llegar a la madurez, pero su concentración de carbohidratos disminuye [85].

Algunos carpóforos de nuestra muestra de *P. cibaria* Singer contenían gusanos. Al igual como ocurrió en China con la seta comestible *Gomphidius rutilus* que contenía un tipo de gusano y se analizó su contenido nutricional sin gusanos (GW), con pocos gusanos (GS;

< 50% del área afectada) y con gran cantidad de gusanos (GL; >50% del área afectada). Se concluyó que GW presentó el mejor sabor, GL contenía la mayor cantidad de nutrientes, pero GW tuvo la mejor textura [86] y se comprobó que los carpóforos de *G. rutilus* infectados con gusanos no eran perjudiciales para la salud [86, 87]. También se analizó la composición de insectos plagas como *Tenebrio molitor* (gusano de harina) y se ha comprobado que posee una alta cantidad de proteínas que oscila entre 14-25 g/100 g peso fresco [88] y en un estudio más reciente en África, cada 100 g de peso fresco de *T. molitor* contenía 20% de proteínas, 13% de grasas, 2 % de fibra, 62% de humedad [89]. En consecuencia, los gusanos que se encontraron en *P. cibaria* Singer al parecer no resultarían un peligro para la salud y más bien podrían incrementar la composición nutricional de *P. cibaria* Singer y ser un factor que influye en la variación de la composición nutricional entre nuestros resultados con los estudios previos.

P. cibaria Singer tuvo un valor energético de 312.34 kcal/100 g en base seca y 64.12 kcal/100 g en base fresca. En ambos casos, *P. cibaria* Singer no tiene un bajo aporte calórico porque supera las 40 Kcal/100 g del alimento [32] y esto se debe a su alto contenido de proteínas y carbohidratos. Por otro lado, la muestra fresca tiene un bajo aporte calórico a comparación de la muestra deshidratada porque en la muestra fresca aproximadamente solo el 20% representa el contenido de macronutrientes, fibra y minerales. Al comparar el aporte calórico de *P. cibaria* Singer deshidratada se observa una similitud con otras 5 setas silvestres en Uganda donde el aporte calórico osciló entre 220.75 - 250.62 [10]. En este sentido, *P. cibaria* Singer al igual que otras setas silvestres, si bien no tiene un bajo aporte calórico cubren aproximadamente el 3.21% (base fresca) y el 15.62% (base seca) del requerimiento diario para una persona adulta promedio (2000 kcal/día) [10], lo cual contribuye a cubrir parte del requerimiento energético diario para mantener una dieta equilibrada.

P. cibaria Singer contenía 3.27 mg de ácido ascórbico por cada 100 g de muestra deshidratada. Esto significa que tiene un bajo contenido de ácido ascórbico porque esta cantidad representa el 3.63 y 4.36 % del requerimiento diario de un varón (90 mg/día) y mujer (75 mg/día) adultos, respectivamente. De esta manera, no cubre al menos el 15% del requerimiento diario para ser considerado alto en ácido ascórbico [32]. Por el contrario, usando la misma metodología de titulación se determinó que setas silvestres en Meghalaya tenían un buen aporte de ácido ascórbico porque su concentración oscilaba

entre 14.9-41.9 mg/100 g base seca [7] y en la seta silvestre *Agaricus sylvaticus* cultivada en Brasil también, con 12.65 mg de ácido ascórbico/100 g base seca [90].

El ácido ascórbico es sensible a la luz, temperatura, oxígeno [91] y su concentración disminuye durante el tiempo de almacenamiento [92]. Por esta razón, el procesamiento de secado, la exposición a la luz, al oxígeno y el tiempo de almacenamiento pudieron haber disminuido la concentración de ácido ascórbico en la muestra de *P. cibaria* Singer. Cabe la posibilidad de fortificar los basidiocarpos de *P. cibaria* Singer con ácido ascórbico, tal como se intentó hacer con la seta *Pleurotus ostreatus* en Colombia para darle un valor agregado [92]. Se puede afirmar que la muestra analizada tuvo un bajo contenido de ácido ascórbico y podría deberse a los factores ambientales y al procesamiento que provocaron la disminución de esta vitamina, pero frente a ello existe la posibilidad de fortificarlo con ácido ascórbico.

La concentración de Ca en *P. cibaria* Singer fue 75.99 mg/100 g. Esto representa el 7.6% del requerimiento diario de un adulto (1000 mg/día) [31]. Por ello, *P. cibaria* Singer tiene un bajo contenido de Ca porque no cubre al menos el 15% del requerimiento diario [32]. Este resultado guarda relación con dos estudios anteriores donde *P. cibaria* Singer contenía 8.81 mg de Ca/100 g [22] y 32.50 mg de Ca/100 g [23] porque representan cantidades bajas de Ca. En este sentido, *P. cibaria* Singer presenta bajas concentraciones de Ca y se recomienda complementar su consumo con otros alimentos ricos en Ca.

La concentración de Fe en *P. cibaria* Singer fue 30.41 mg/100 g. Esta concentración superó el requerimiento diario de una mujer (18 mg/día) y varón adulto (8 mg/día) [31]. A pesar de ello no sobrepasó el nivel superior de ingesta tolerable (45 mg/día) [31]. De esta manera, *P. cibaria* Singer aporta un alto contenido de Fe porque cubre más del 30% del requerimiento diario [32]. Este resultado coincide parcialmente con Quispe *et al.* 2020 (12.20 mg Fe/100 g) porque superó el requerimiento de un varón adulto, pero no de una mujer [23]. Por el contrario, no coinciden con Barreto *et al.* 2011 (1.03 mg de Fe/100 g) [22] porque no cubre el 15% del requerimiento diario para un adulto [32]. Por este motivo, aunque la muestra analizada es una fuente rica en Fe cabe la posibilidad de encontrar carpóforos que no lo sean.

La concentración de Zn en *P. cibaria* Singer fue de 6.77 mg/100 g. Esta concentración representa el 61.54% y el 84.625% del requerimiento de un varón (11 mg/día) y mujer (8

mg/día) adulto, respectivamente [31]. Por esta razón, *P. cibaria* Singer aporta un alto contenido de Zn porque cubre más del 30% del requerimiento diario [32]. Este resultado es corroborado por Quispe *et al.* 2020 (10.40 mg Zn/100 g) [23] porque cubrió más del 30% del requerimiento diario. En cambio, no coincide con Barreto *et al.* 2011 (0.77 mg Zn/100 g) [22]. De acuerdo a estas comparaciones, se puede encontrar carpóforos con altas concentraciones de Zn tal como ocurrió con nuestra muestra, pero también pueden encontrarse en bajas concentraciones.

La concentración de F en *P. cibaria* Singer fue de 2.37 mg/100 g y cubría el 59.25% y el 79% del requerimiento diario de un varón (4 mg/día) y mujer adulta (3 mg/día) [31]. De esta manera, *P. cibaria* Singer tiene un alto aporte de F porque cubre más del 30% del requerimiento diario [32]. Del mismo modo, el análisis de setas (no se especificó las especies) que expandidas en supermercados de la isla de Tenerife - Canarias, España obtuvieron altas concentraciones de flúor (1.28 mg/Kg peso seco) [93]. En tal sentido, *P. cibaria* Singer aporta un alto porcentaje de F al igual que otras setas como las que se vendían en España.

P. cibaria Singer tuvo una concentración de yodo de 2.02 mg/100 g. Esta concentración superó el requerimiento diario de un adulto (0.15 mg/día) y el nivel superior de ingesta tolerable (1.1 mg/día) [31]. Por el contrario, el análisis de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* consumidas en Amaifeke, Estado de Imo en Nigeria contenían altas concentraciones de yodo; 0.376 y 0.425 mg/100 g base seca, respectivamente, pero no superaron el nivel máximo tolerable [94]. De acuerdo a nuestros resultados, aunque el contenido de I en *P. cibaria* Singer excede el nivel superior de ingesta tolerable según la DRIs, es poco probable que cause efectos dañinos en la salud [31]. En adición a ello, es poco común que la población consuma alrededor de 100 g de *P. cibaria* Singer deshidratada.

P. cibaria Singer tuvo una baja cantidad de Ar (<0.002 mg/kg base seca), Pb (<0.002 mg/kg base seca), Hg (<0.001 mg/kg base seca) y Cd (<0.0001 mg/kg base seca). La norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos establece sólo la concentración permitida de Pb (0.3 mg/kg), en este sentido, la concentración de Pb en *P. cibaria* Singer está dentro de este parámetro [17]. Además, las concentraciones de todos los elementos analizados están por debajo del 1% m/m, por lo

tanto, se cumple lo indicado en la norma general para los hongos comestibles y sus productos [95]. Nuestros resultados están dentro de los límites permisibles de contaminantes en los alimentos establecidos por la FAO [17], la Legislación de la Unión Europea (Tabla 2) [55] y los límites máximos estipulados por la República Popular de China (tabla 2) [56]. Por otro lado, nuestros resultados no guardan relación con Barreto *et al.* 2011 quien reportó 4.45 mg/Kg de Pb y 0.69 mg/Kg de Cd [22], por lo que superan los niveles máximos de estos dos contaminantes y resultan un peligro para la salud. Al analizar nuestros resultados podemos decir que *P. cibaria* Singer si es apto para el consumo humano porque la concentración de los 4 metales pesados analizados está dentro del rango permitido. Sin embargo, algunos carpóforos de *P. cibaria* Singer podrían tener concentraciones tóxicas de Pb y Cd, tal como ya se ha descrito.

En el análisis de la actividad antioxidante *in vitro* de *P. cibaria* Singer se determinó que tiene un IC₅₀ alrededor de 0.25 mg/ mL (base seca) y el ácido ascórbico (control positivo) a una concentración menor de 0.0025 mg/mL (base seca). Esto significa que aproximadamente se requeriría 100 veces más concentración del extracto metanólico de *P. cibaria* Singer para tener una actividad antioxidante comparada con el ácido ascórbico. Además, el IC₅₀ de *P. cibaria* Singer es menor a 10 mg/mL, por esta razón el extracto tiene una actividad antioxidante *in vitro* efectiva [96]. Por otro lado, aunque no existen antecedentes sobre su actividad antioxidante, esta es mayor que del extracto metanólico de *Lentinula edodes* (shiitake) de Portugal (6.43 mg/mL) [97] y de Malasia (4.44 mg/mL) [98], mayor al extracto metanólico de *Pleurotus ostreatus* de Portugal (6.54 mg/mL) [97], mayor al extracto metanólico de *Agaricus bisporus* (Champiñón) de Portugal (3.13 y 9.61 mg/mL) [97] y mayor al extracto metanólico de *Ganoderma lucidum* de la India (0.953 mg/mL) [99]. Existen diferentes componentes que le podrían estar otorgando la capacidad antioxidante a *P. cibaria* Singer, entre ellos: compuestos fenólicos, betaglucanos, tocoferoles, carotenoides, ergosterol, ácido ascórbico y demás [18].

Por otro lado, existen factores que pueden alterar la actividad antioxidante de las setas. En este sentido, se ha observado que las setas a medida que continúan su desarrollo su capacidad antioxidante *in vitro* aumentó significativamente en *Pleurotus ostreatus* cultivados en el Laboratorio en Estados Unidos [100]. En Brasil, se determinó que la actividad antioxidante *in vitro* de *Pleurotus ostreatus* disminuyó significativamente en sustratos de café enriquecidos con Fe, Zn y Li [101]. Por otro lado, se determinó que los

carpóforos de *G. rutilus* contaminados con pocos gusanos (< 50% del área afectada) tuvieron una mayor actividad antioxidante *in vitro* que los carpóforos sin gusanos [87]. Conforme a lo descrito anteriormente, la actividad antioxidante *in vitro* de *P. cibaria* Singer es efectiva y superior a otras setas comunes. A su vez, la actividad antioxidante podría verse afectada por el estadio de desarrollo en la que fue analizado, la riqueza mineral del sustrato donde se desarrolla y por la presencia de gusanos.

VI. Conclusiones

- *P. cibaria* Singer presentó un alto contenido de humedad (79.48%) al estar fresca pero un alto contenido de carbohidratos (44.44%), proteínas (23.83%) y fibra (12.73%) al estar deshidratada. En consecuencia, su consumo contribuiría en la disminución de la desnutrición porque tiene un buen aporte de macronutrientes. Aunque no tuvo un bajo aporte calórico (64.12 y 312.34 kcal/100 g, base fresca y seca, respectivamente), si tuvo un bajo contenido de grasas (1.53%).
- La muestra deshidratada de *P. cibaria* Singer tuvo una baja concentración de ácido ascórbico (3.27 mg/100 g base seca). En consecuencia, no proporciona la cantidad necesaria de esta vitamina para cumplir con el requerimiento diario de un adulto.
- La muestra deshidratada de *P. cibaria* Singer tuvo una alta concentración de hierro (30.41 mg/100 g base seca), zinc (6.77 mg/100 g base seca), flúor (2.37 mg/100 g base seca) y yodo (2.02 mg/100 g base seca), pero una baja concentración de calcio (75.99 mg/100 g base seca).
- En cuanto a la concentración de metales pesados en *P. cibaria* Singer, se concluye que la muestra no presentó concentraciones tóxicas de As (< 0.002 mg/kg base seca), Pb (< 0.002 mg/kg base seca), Hg (< 0.001 mg/kg base seca) y Cd (< 0.0001 mg/kg base seca). En consecuencia, su consumo es seguro.
- Los extractos metanólicos de *P. cibaria* Singer tuvieron una actividad antioxidante *in vitro* efectiva (IC50 < 0.25 mg/mL base seca). Por consiguiente, puede ser considerado un alimento funcional y su mayor consumo contribuiría en el buen estado de salud de la población.

Recomendaciones

- Analizar una muestra fresca de *P. cibaria* Singer directamente con el equipo analizador de humedad para obtener un resultado más preciso.
- Determinar el contenido de ácido ascórbico en la muestra fresca de *P. cibaria* Singer para evitar que el proceso de secado, molienda y conservación impacten negativamente en su concentración.
- Analizar la actividad antioxidante *in vivo* de *P. cibaria* Singer e identificar los componentes responsables de su capacidad antioxidante.

VII. Referencias bibliográficas

1. Trutmann P. The forgotten Mushrooms of Ancient Peru. 2012. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/233853675_THE_FORGOTTEN_MUSHROOMS_OF_ANCIENT_PERU
2. Holgado R, Lazarte R, Aranzabal C, Olarte M, Meza C. Cultivo orgánico de hongos nutraceuticos (*Pleurotus* sp.-seta, *Lentinula edodes*-shiitake) bajo condiciones artesanales en las comunidades campesinas de Huayllay-Cusco, Harin-Calca y San Nicolás de Bari-Anta). 2014. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Disponible en: <https://docplayer.es/54650710-Universidad-nacional-de-san-antonio-abad-del-cusco-facultad-de-ciencias-biologicas-proyecto-de-investigacion-con-fondos-del-canon-cop20.html>
3. Trutmann P, Holgado M. Native Mushrooms, Local Knowledge, and Potential of Native Mushrooms for Food and Health. Global Mountain Action. 2012.
4. Ugas R. 40 viejas y nuevas verduras para disfrutar tu alimentación y nutrirte mejor. Universidad Nacional Agraria La Molina. 2014. Página 110.
5. Simoni L. Conservación de *Pleurocollybia cibaria* Singer en el área de influencia del proyecto minero Constancia Chumbivilcas-districtos de Chamaca y Velille - Región Cusco. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. 2017.
6. Franquemont C, Plowman T. The Ethnobotany of Chinchero. An Andean Community in Southern Peru. Field Museum of Natural History. 1990. Página 33.
7. Agrahar-Murugkar D, Subbulakshmi G. Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. Food Chemistry. 2005; 89(4):599–603.

8. Obodai M, Ferreira I, Fernandes, A, Barros L, Mensah D, Dzomeku M, Takli R. Evaluation of the chemical and antioxidant Properties of Wild and Cultivated Mushrooms of Ghana. *Molecules*. 2014; 19(12):19532–19548.
9. Sudheep M, Sridhar K. Nutritional composition of two wild mushrooms consumed by the tribals of the Western Ghats of India. *Mycology*. 2014;5(2): 64–72.
10. Nakalembe I, Kabasa J, Olila D. Comparative nutrient composition of selected wild edible mushrooms from two agro-ecological zones, Uganda. *SpringerPlus*. 2015; 4, 433.
11. Boa E. Los hongos silvestres comestibles. perspectiva global de su uso e importancia para la población. P. imprenta: FAO. Roma. 2005.
12. Ayaz FA, Chuang LT, Torun H, Colak A, Sesli E, Presley J, Glew R. H. Fatty acid and amino acid compositions of selected wild-edible mushrooms consumed in Turkey. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2010; 62(4):328–335.
13. Bauer B. Protein fraction in edible Macedonian mushrooms. *European Food Research and Technology*. 2001; 212(4):469-472.
14. Hou Y, Wu G. Nutritionally essential amino acids. *Advances in Nutrition*. 2018; 9(6):849-851.
15. Liu B, Huang Q, Cai H, Guo X, Wang T, Gui M. Study of heavy metal concentrations in wild edible mushrooms in Yunnan Province, China. *Food Chemistry*. 2015; 188: 294–300.
16. Zou H, Zhou C, Li Y, Yang X, Wen J, Li C, Sun C. Speciation analysis of mercury in wild edible mushrooms by high-performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2020.
17. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Norma general del Codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. 1995. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/CXS_193s.pdf
18. Sánchez C. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and systems biotechnology*. 2017; 2(1):13-22.

19. Heleno S, Ferreira R, Antonio A, Queiroz M, Barros L, Ferreira I. Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. *Food bioscience*. 2015; 11:48-55.
20. Ng Z. X, Tan W. C. Impact of optimised cooking on the antioxidant activity in edible mushrooms. *Journal of food science and technology*. 2017; 54(12):4100-4111.
21. Kozarski M, Klaus A, Jakovljevic D, Todorovic N, Vunduk J, Petrović P, Van Griensven L. Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules*. 2015; 20(10):19489-19525.
22. Barreto N. Aislamiento de la cepa y producción de spawn de *Pleurocollybia cibaria* Singer. [Tesis magisterial]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2011.
23. Quispe A. Evaluación de la diversidad de hongos alimenticios silvestres del distrito de San Jerónimo de Cusco y su potencial de cultivo. [Tesis magisterial]. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2020.
24. Laura T. Estudio del potencial alimenticio y actividad antifúngica (anti-*Candida glabrata*) de siete especies de hongos basidiomicetos en el Perú. [Tesis de licenciatura]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2012.
25. Širić I, Humar M, Kasap A, Kos I, Mioč B, Pohleven F. Heavy metal bioaccumulation by wild edible saprophytic and ectomycorrhizal mushrooms. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016 Sep;23(18):18239-52.
26. Kokkoris V, Massas I, Polemis E, Koutrotsios G, Zervakis G. Accumulation of heavy metals by wild edible mushrooms with respect to soil substrates in the Athens metropolitan area (Greece). *Science of The Total Environment*. 2019; 685, 280-296.
27. Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew B, Beeregowda K. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary toxicology*. 2014; 7(2), 60–72.
28. Holgado M, Aranzabal R, Lazarte R. Cultivo orgánico de hongos nutraceuticos en comunidades campesinas de Huayllay, Harin y San Nicolás de Bari. Universidad San Antonio Abad del Cusco. 2019.
29. Anderson J, Root M. Human nutrition: Healthy options for life. 1° ed. Estados Unidos: Jones & Bartlett Learning; 2015. Capítulo 1, An introduction to foods,

- nutrients, and human health; 1-26. Disponible en: http://samples.jbpub.com/9781449698744/9781449647414_CH01_PASS01.pdf
30. Zimmerman M, Snow B. An introduction to nutrition. 1° ed. Estados Unidos: Independent; 2012. 807 p.
 31. National Institute of Health (NIH). Nutrient recommendations: dietary reference intakes (DRIs). Estados Unidos. NIH. Disponible en: https://ods.od.nih.gov/HealthInformation/Dietary_Reference_Intakes.aspx
 32. Codex Alimentarius. Directrices para el uso de declaraciones nutricionales y saludables (CXG 23-1997). 2013. Disponible en: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXG%2B23-1997%252FCXG_023s.pdf
 33. Batalla M. El agua como nutriente: actualización. *Offarm: farmacia y sociedad*. 2010; 29(4):58-61.
 34. Perry J, Ying W. A review of physiological effects of soluble and insoluble dietary fibers. *J Nutr Food Sci*. 2016; 6(2):476.
 35. Weickert M, Pfeiffer A. Impact of Dietary Fiber Consumption on Insulin Resistance and the Prevention of Type 2 Diabetes. *J Nutr*. 2018; 148(1):7-12.
 36. Capuano E. The behavior of dietary fiber in the gastrointestinal tract determines its physiological effect. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017; 57(16):3543-3564.
 37. Roncero I. Propiedades nutricionales y saludables de los hongos. Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón de la Rioja (CTICH). 2015. Disponible en: <https://www.adenyd.es/wp-content/uploads/2015/02/Informe-sobre-champi%C3%B1n-y-setas.pdf>
 38. Stull V, Finer E, Bergmans R. Impact of Edible Cricket Consumption on Gut Microbiota in Healthy Adults, a Double-blind, Randomized Crossover Trial. *Sci Rep*. 2018; 8(1):10762.
 39. Lopez-Santamarina A, Mondragon A. Animal-Origin Prebiotics Based on Chitin: An Alternative for the Future? A Critical Review. *Foods*. 2020; 9(6):782.
 40. Azuma K, Osaki T, Minami S, Okamoto Y. Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides. *J Funct Biomater*. 2015; 6(1):33-49.

41. Singdevsachan S, Auroshree P. Mushroom polysaccharides as potential prebiotics with their antitumor and immunomodulating properties: A review. *Bioactive carbohydrates and dietary fibre*. 2016; 7(1), 1-14.
42. Nakashima A, Yamada K. β -Glucan in foods and its physiological functions. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2018; 64(1):8-17.
43. University of Illinois. *Macronutrients: the importance of carbohydrate, protein, and fat*. 2015. Disponible en: <https://www.mckinley.illinois.edu/sites/default/files/docs/macronutrients.pdf>
44. Reynaud A. Requerimiento de micronutrientes y oligoelementos. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*. 2014; 60(2):161-170.
45. National Institute of Health (NIH). *Vitamin C*. 2020. Disponible en: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-HealthProfessional/>
46. FAO. *Nutrición humana en el mundo en desarrollo*. 2002. Capítulo 10: Minerales. Disponible en: <http://www.fao.org/3/w0073s/w0073s0e.htm#bm14x>
47. National Institute of Health (NIH). *Calcium*. 2020. Disponible en: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Calcium-HealthProfessional/>
48. Saz P. Oligoterapia: fundamentos. *Offarm*. 2010; 29 (6).
49. National Institute of Health (NIH). *Zinc*. 2020. Disponible en: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Zinc-HealthProfessional/>
50. Zhu F, Qu L, Fan W, Qiao M, Hao H, Wang X. Assessment of heavy metals in some wild edible mushrooms collected from Yunnan Province, China. *Environ Monit Assess*. 2011 Aug;179(1-4):191-9.
51. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Diez sustancias químicas que constituyen una preocupación para la salud pública*. sf. Disponible en: https://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/chemicals_phc/es/
52. Hong YS, Song KH, Chung JY. Health effects of chronic arsenic exposure. *J Prev Med Public Health*. 2014;47(5):245-252.
53. Wani AL, Ara A, Usmani JA. Lead toxicity: a review. *Interdiscip Toxicol*. 2015;8(2):55-64.
54. Unión Europea. Reglamento (UE) No 420/2011 de la Comisión, de 29 de abril de 2011, que modifica el Reglamento (CE) No 1881/2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

- D. Of. Unión Europea. 2011; 111, 3-6. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=celex%3A32006R1881>
55. Clever J, Jie M. China's maximum levels for contaminants in foods. USDA Foreign Agricultural Service GAIN Report CH14058, USDA Foreign Agricultural Service, Global Agricultural Information Network. 2014. Disponible en: https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=Maximum%20Levels%20of%20Contaminants%20in%20Foods%20_Beijing_China%20-%20Peoples%20Republic%20of_12-11-2014.pdf
56. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008; 4(2):89-96.
57. Kozarski M, Klaus A. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food chemistry.* 2011; 129(4):1667-1675.
58. Abdullah N, Ismail SM. Evaluation of Selected Culinary-Medicinal Mushrooms for Antioxidant and ACE Inhibitory Activities. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012:464238.
59. Yang J, Lin H. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food chemistry.* 2002; 77(2):229-235.
60. Index Fungorum. *Pleurocollybia cibaria* Singer. sf. Disponible en: <http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=337234>
61. Cepero de García M. *Biología de hongos.* Ediciones Uniandes-Universidad de los Andes. 2012.
62. Salazar V. *Manual de micología básica.* Universidad de Concepción & ONG Micófilos. 2016.
63. Zamalloa H. Taxonomía de los hongos comestibles del departamento del Cusco. *Revista de la Facultad de Ciencias.* Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 1964.
64. Singer R. Un hongo nuevo comestible de Sudamérica. *Facultad de ciencias exactas y Naturales.* 1963.
65. Helrich K. *Official Methods of AOAC International.* 15th Edition. Virginia, USA. Association of Analytical Communities. 1990.

66. Bano Z, Rajarathnam S. Pleurotus mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1988;27(2):87-158.
67. Vásquez F. Análisis proximal en alimentos Fundamentos teóricos y técnicas experimentales. *Colloquium.* 2019.
68. Möller J. Comparación de los métodos para la determinación de fibra en pienso y en los alimentos. *Foss.* Barcelona, España. 2014.
69. FAO. Chapter 3: Calculation of The Energy Content of Foods – Energy Conversion Factors. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en: <http://www.fao.org/3/y5022e/y5022e04.htm>
70. Nielsen S. Vitamin C determination by indophenol method. *Food analysis laboratory manual.* 2017; 143-146.
71. Ipohorski M, Bozzano P. Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales. *Ciencia e investigación.* 2013; 63(3):43-53.
72. University of Shouthampton. Glossary-at% and wt%. Sf. Disponible en: <http://www.soton.ac.uk/~pasr1/g5.htm>
73. Wilschefski S, Baxter M. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clin Biochem Rev.* 2019;40(3):115-133.
74. Universidad Burgos. Espectrometría de masas de plasma (ICP-MS). 2020.
75. Lamont-Doherty Earth Observatory. Earth Institute. Columbia University. Ion Chromatograph to detect major anions in precipitation (snow), groundwaters and drinking waters from New York. Disponible en: http://www.ldeo.columbia.edu/~martins/eda/Ic_lec.html.
76. Haddad PR. Ion chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 2004 Jun;379(3):341-3. doi: 10.1007/s00216-004-2572-7. Epub 2004 Mar 16.
77. Sarikurkcü C, Tepe B, Yamac M. Evaluation of the antioxidant activity of four edible mushrooms from the Central Anatolia, Eskisehir - Turkey: *Lactarius deterrimus, Suillus collitinus, Boletus edulis, Xeroocomus chrysenteron.* *Bioresour Technol.* 2008;99(14):6651-5.
78. Barros L, Venturini B, Baptista P. Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: a comprehensive study. *J Agric Food Chem.* 2008;56(10):3856-62.

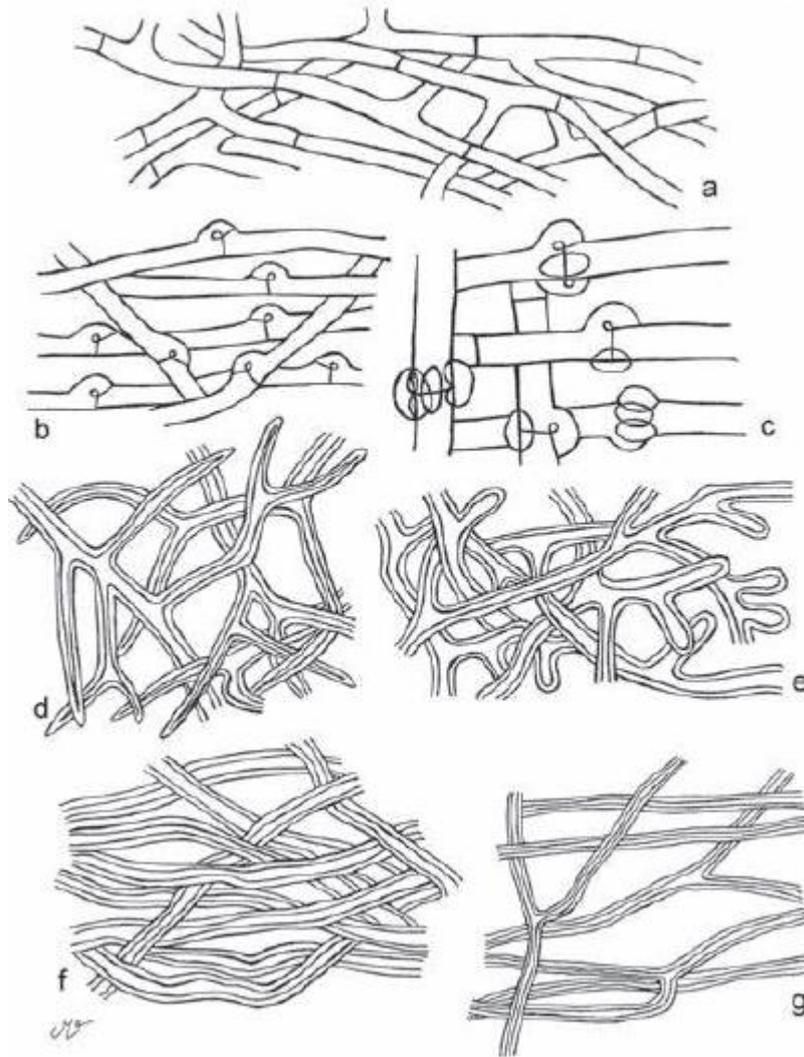
79. Palazzolo E, Gargano M, Venturella G. The nutritional composition of selected wild edible mushrooms from Sicily (southern Italy). *Int J Food Sci Nutr*. 2012 Feb;63(1):79-83.
80. Kalač P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food chemistry*. 2009;113(1),9-16.
81. Gómez L, Martínez N. Análisis proximal y de composición mineral de cuatro especies de hongos ectomicorrízicos silvestres de la Sierra Tarahumara de Chihuahua. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. 2019; 22:1-10.
82. Tapia M, Alzamora S. Effects of water activity (aw) on microbial stability as a hurdle in food preservation. *Water activity in foods: Fundamentals and applications*. 2020; 323-355.
83. Mocan A, Fernandes Â. Chemical composition and bioactive properties of the wild mushroom *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr: a study with samples from Romania. *Food Funct*. 2018;9(1):160-170.
84. Bach F, Helm C. Edible mushrooms: a potential source of essential amino acids, glucans and minerals. *International Journal of Food Science & Technology*. 2017;52(11):2382-2392.
85. Eguchi F, Kalaw S. Nutrient composition and functional activity of different stages in the fruiting body development of Philippine paddy straw mushroom, *Volvariella volvacea* (Bull.: Fr.) Sing. *Advances in Environmental Biology*. 2015;9(22 S3):54-66.
86. He W, Sun L. Effects of varying degrees of worm infection on the texture profile, nutritional, and flavor components of *Gomphidius rutilus* mushrooms. *Shipin Kexue/Food Science*. 2018;39(14):249-256.
87. Sun L, He W. Volatile components, total phenolic compounds, and antioxidant capacities of worm-infected *Gomphidius rutilus*. *Food Science and Human Wellness*. 2018;7(2):148-155.
88. Van A, Van J. Edible insects: future prospects for food and feed security (No. 171). Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013.
89. Mariod A. Nutrient composition of mealworm (*Tenebrio molitor*). In *African Edible Insects as Alternative Source of Food, Oil, Protein and Bioactive Components*. Springer, Cham. 2020;275-280.

90. Orsine J, Novaes M. Nutritional value of *Agaricus sylvaticus*; mushroom grown in Brazil. *Nutricion hospitalaria*. 2012;27(2):449-455.
91. Wang J, Law C. The degradation mechanism and kinetics of vitamin c in fruits and vegetables during thermal processing. *Drying Technologies for Foods, Fundamentals and Applications*. 2017;275-301.
92. Cortés M, García A. Fortificación de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) con calcio, selenio y vitamina C. *Vitae*. 2007;14(1):16-24.
93. Jaudenes J, Gutiérrez Á. Fluoride Risk Assessment from Consumption of Different Foods Commercialized in a European Region. *Applied Sciences*. 2020;10(18):6582.
94. Uju N, Obiakor-Okeke P. Nutritional Profile of Three Different Mushroom Varieties Consumed in Amaifeke, Orlu Local Government Area, Imo State, Nigeria. *Food Science and Quality Management*. 2014;31: 70-77.
95. Codex Alimentarius. Norma general para los hongos comestibles y sus productos. 1981. Disponible en: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B38-1981%252FCXS_038s.pdf
96. Lee Y, Jian S. Antioxidant properties of extracts from a white mutant of the mushroom *Hypsizigus marmoreus*. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008;21(2):116-124.
97. Reis F, Martins A. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between in vivo and in vitro samples. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(5):1201-7.
98. Sasidharan S, Aravindran S. In vitro antioxidant activity and hepatoprotective effects of *Lentinula edodes* against paracetamol-induced hepatotoxicity. *Molecules*. 2010;15(6):4478-89.
99. Mohsin M, Negi P, Ahmed Z. Determination of the antioxidant activity and polyphenol contents of wild Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt. Fr.) P. Karst. (higher Basidiomycetes) from central Himalayan hills of India. *Int J Med Mushrooms*. 2011;13(6):535-44.
100. González-Palma I, Escalona-Buendía HB. Evaluation of the Antioxidant Activity of Aqueous and Methanol Extracts of *Pleurotus ostreatus* in Different Growth Stages. *Front Microbiol*. 2016; 7:1099.

101. Vieira P, Gontijo D. Antioxidant activities, total phenolics and metal contents in *Pleurotus ostreatus* mushrooms enriched with iron, zinc or lithium. LWT-Food Science and Technology. 2013;54(2):421-425.

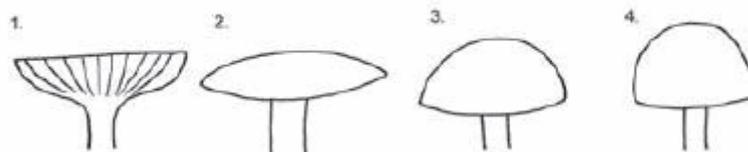
Anexos

Anexo 1. Clasificación de hifas en basidiomicetes.

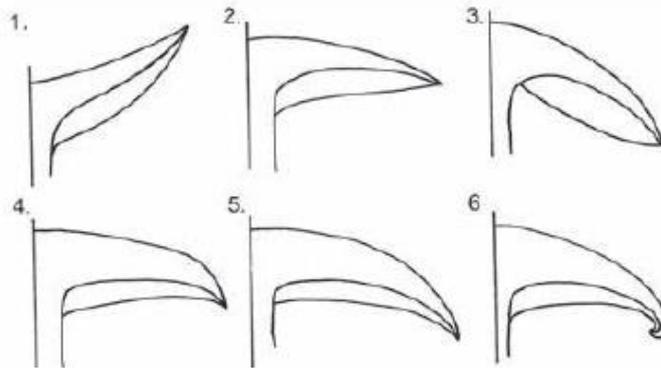


Clasificación: (a, b, c) hifas generativas, (d, e) hifas esqueléticas, (f, g) hifas ligativas o de unión [62].

Anexo 2. Características del píleo.

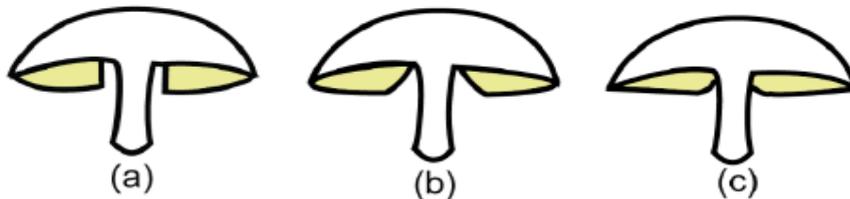


Formas del píleo: (1) plano, (2) plano-convexo, (3) convexo, (4) hemisférico. Modificado de Cepero *et al.* [62].

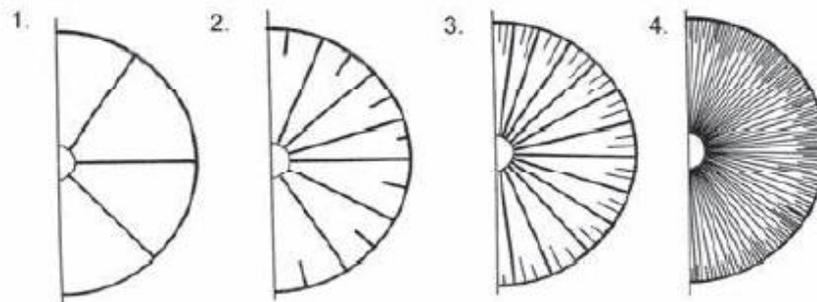


Tipos del margen del píleo. 1-3) recto. 4) decurbado. 5) incurvado, 6) enrollado hacia abajo. Modificado de Cepero *et al.* [62].

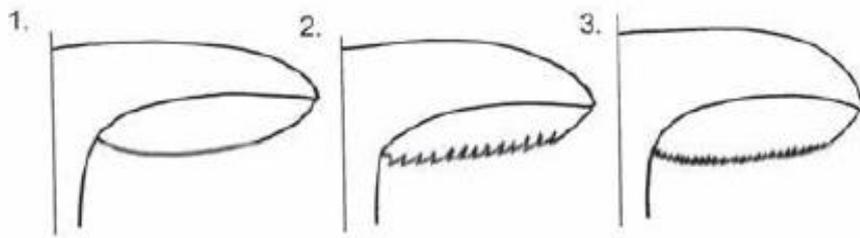
Anexo 3. Características de las lamelas.



Relación de unión de las lamelas al estípite. (a) distantes, (b) libres, (c) anexas. Modificado de introducción a la micología [63].

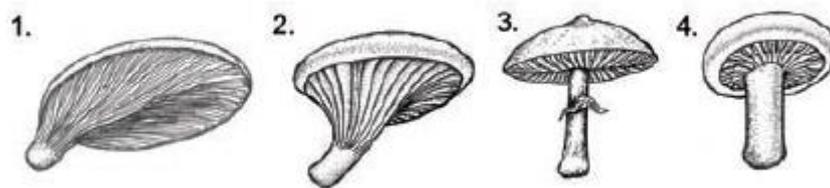


Disposición de las lamelas: (1) distantes, (2) subdistantes, (3) cercanas, (4) apretadas [62].

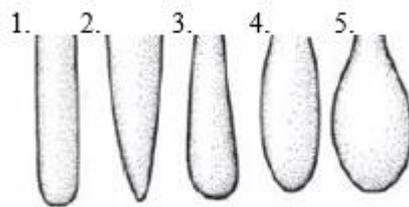


Margen de las lamelas: (1) entero, (2) serrado, (3) serrulado [62].

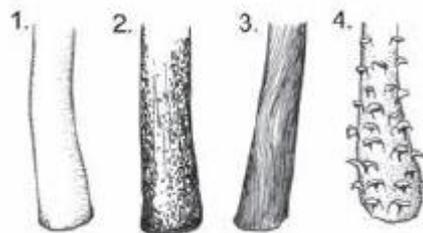
Anexo 4. Características del píleo.



Inserción del estípite al píleo: (1) lateral, (2) excéntrico, (3) céntrico, (4) ligeramente excéntrico. Modificado de Cepero *et al.* [62].

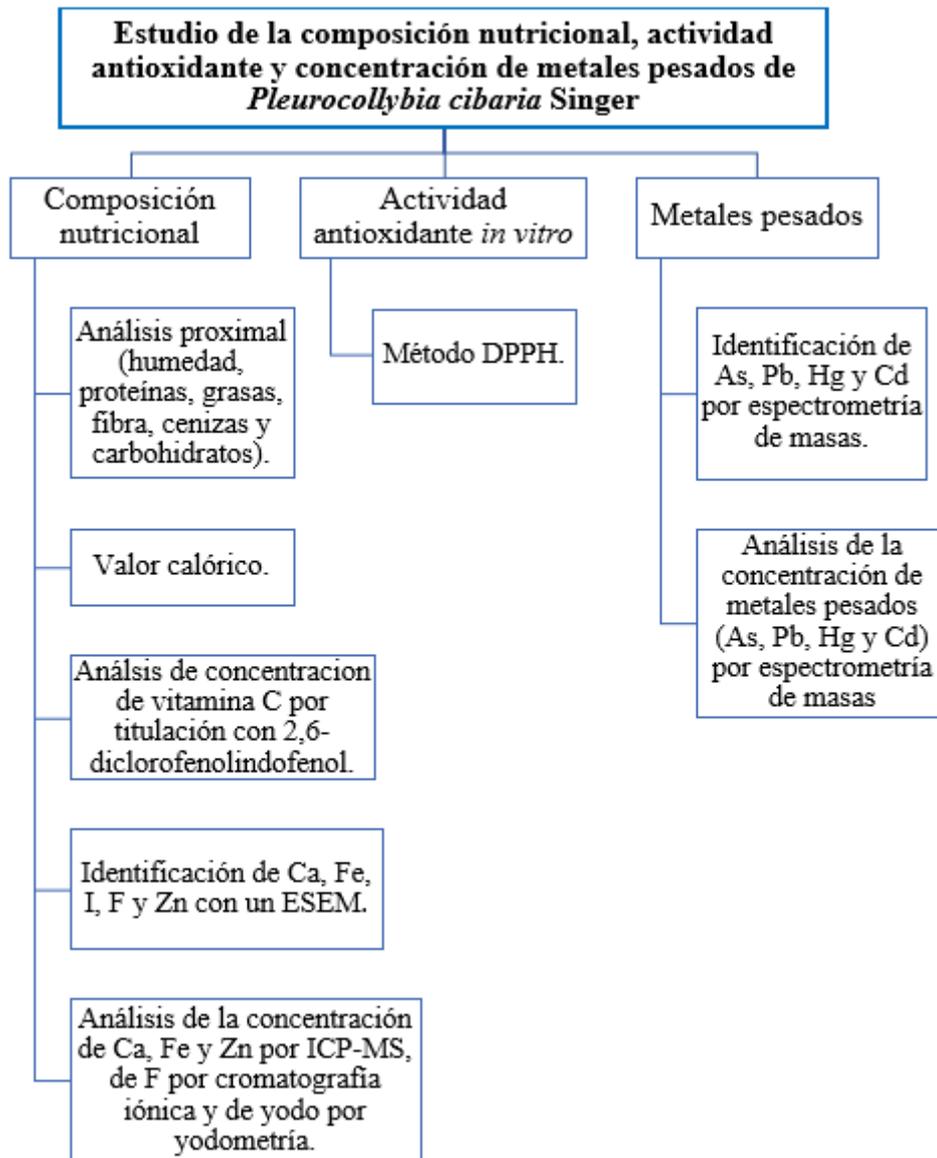


Formas de estípite: (1) cilíndrico, (2) tapón hacia abajo, (3) tapón hacia arriba, (4) subclavado, (5) clavado. Modificado de Cepero *et al.* [62].



Superficie del estípite: (1) lisa, (2) escabroso, (3) fibriloso, (4) escamoso. Modificado de Cepero *et al.* [62].

Anexo 5. Diseño del estudio



Anexo 6. Identificación y colección de muestra.

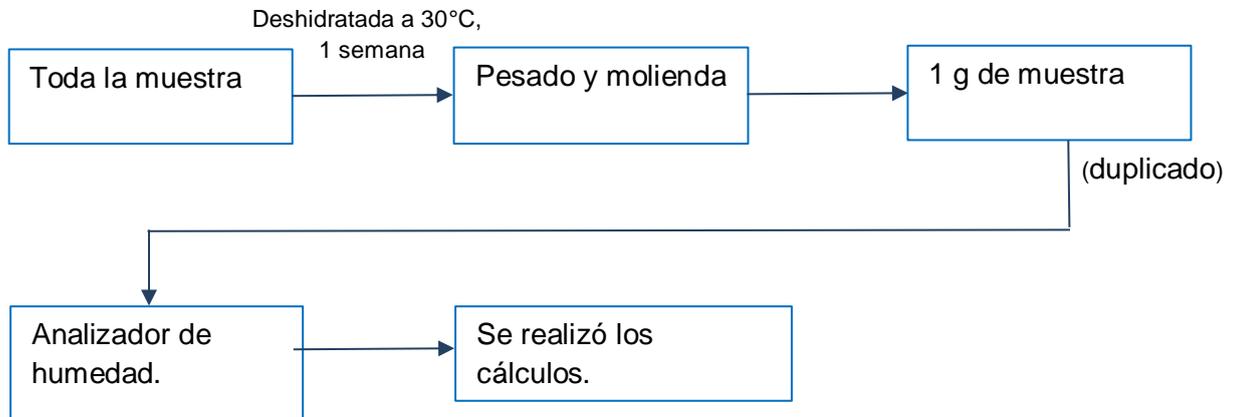


Anexo 7. Tratamiento de la muestra



Anexo 8. Análisis proximal.

A. Análisis de humedad



Proceso para determinar el contenido de humedad.

Muestra	Deshidratado en horno %	Deshidratado en analizador de humedad (%)		Total	Media	Desviación estándar
		Muestra				
Toda la muestra	68.93	1	10.87	79.80	79.48	0.46
		2	10.22	79.15		

Tabla de resultados del análisis de humedad.

B. Análisis de proteínas

Preparación de reactivos

- Mezcla de sulfato de cobre (CuSO_4) y sulfato de sodio (Na_2SO_4): En un recipiente con tapa se mezcló 1.11 g de CuSO_4 y 10.89 g de Na_2SO_4 . De esta manera, se obtuvo 12 de mezcla catalizadora. El ensayo se realizó por duplicado más un blanco. Por ello, 4 g de esta mezcla fue para cada ensayo.
- Hidróxido de sodio (NaOH) al 40%: En un recipiente de plástico de 200 mL se mezcló 60 mg de NaOH con 150 mL de agua destilada.

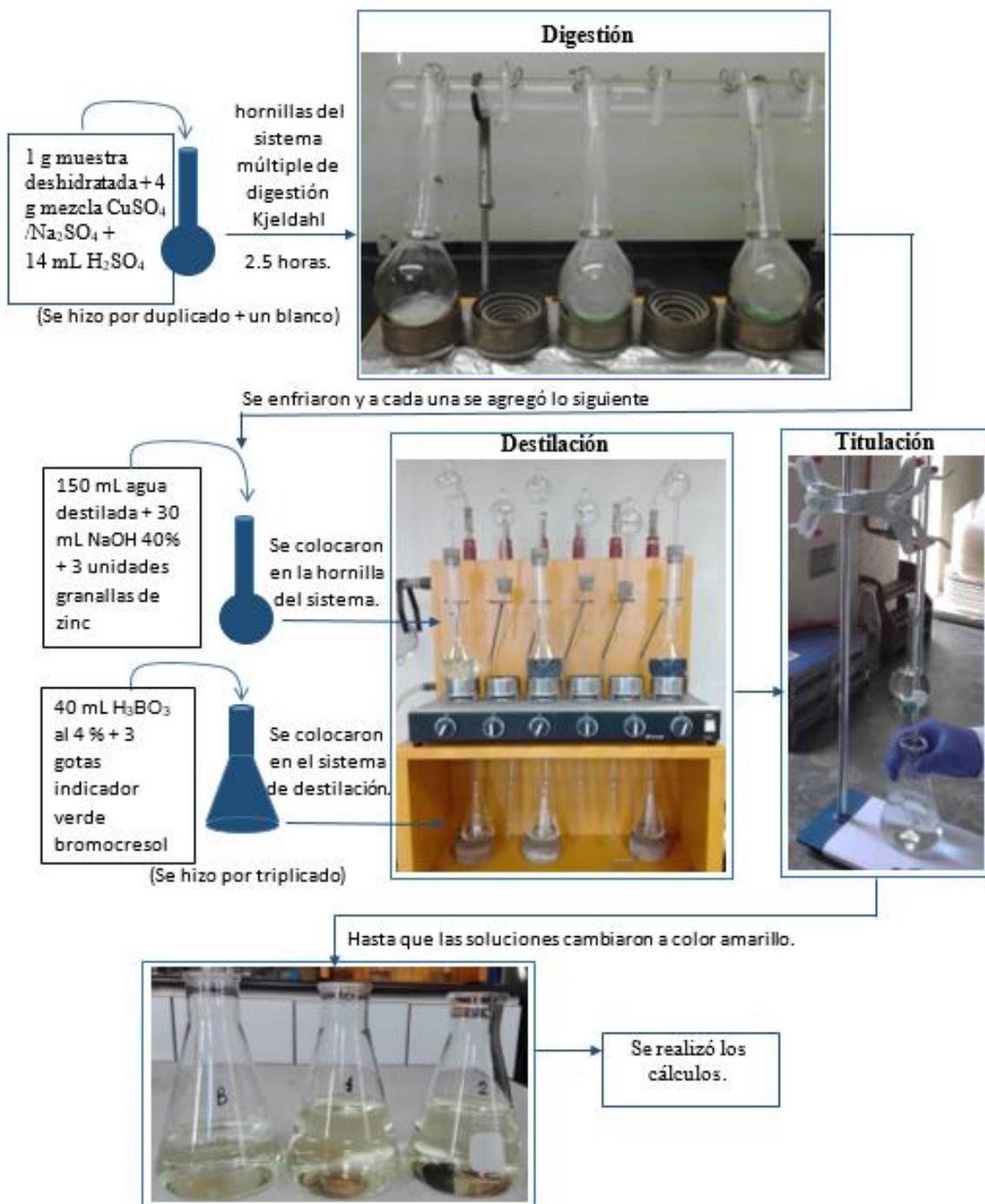
- Ácido bórico al 4%: En un matraz de Erlenmeyer de 200 mL se mezcló 8 g de ácido bórico con 200 mL de agua tibia. De esta manera, se preparó 200 mL de ácido bórico al 4%.
- 0.1 N de HCl: En un Erlenmeyer de 100 mL se agregó 0.23 mL de HCl y se aforó con agua destilada. El volumen de HCl utilizado se determinó a partir de las siguientes ecuaciones.

$$w = \frac{N * Eq * V}{1000 \text{ mL}} = \frac{0.1 \text{ N} * 36.46 * 200 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} = 0.7292 \text{ g}$$

$$v = \frac{m}{p} = \frac{0.7292 \text{ g}}{1.18 \frac{\text{g}}{\text{mL}}} = 0.6179$$

HCl 100 % pureza – 0.6179 mL

HCl 37.5% pureza – 0.23 mL.

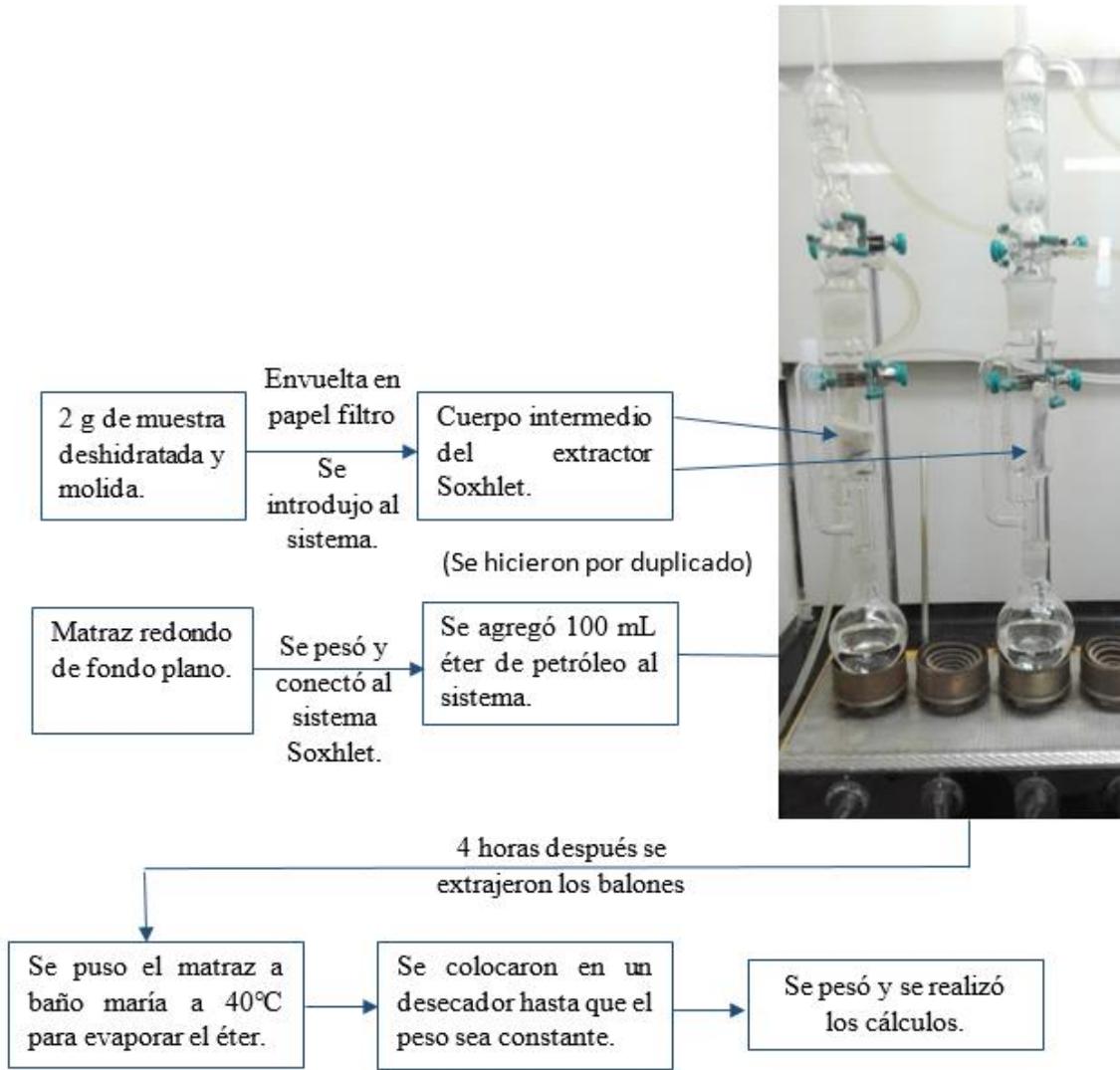


Proceso para determinar el contenido de proteínas.

Muestra	Gasto HCl 1N (mL)	Proteínas (%)	Media (%)	Desviación estándar
1	39.5	24.04	23.83	0.30
2	38.8	23.61		
Blanco	0.3	-		

Tabla de resultados del análisis de proteínas.

C. Análisis de grasas



Proceso para determinar el contenido de grasas.

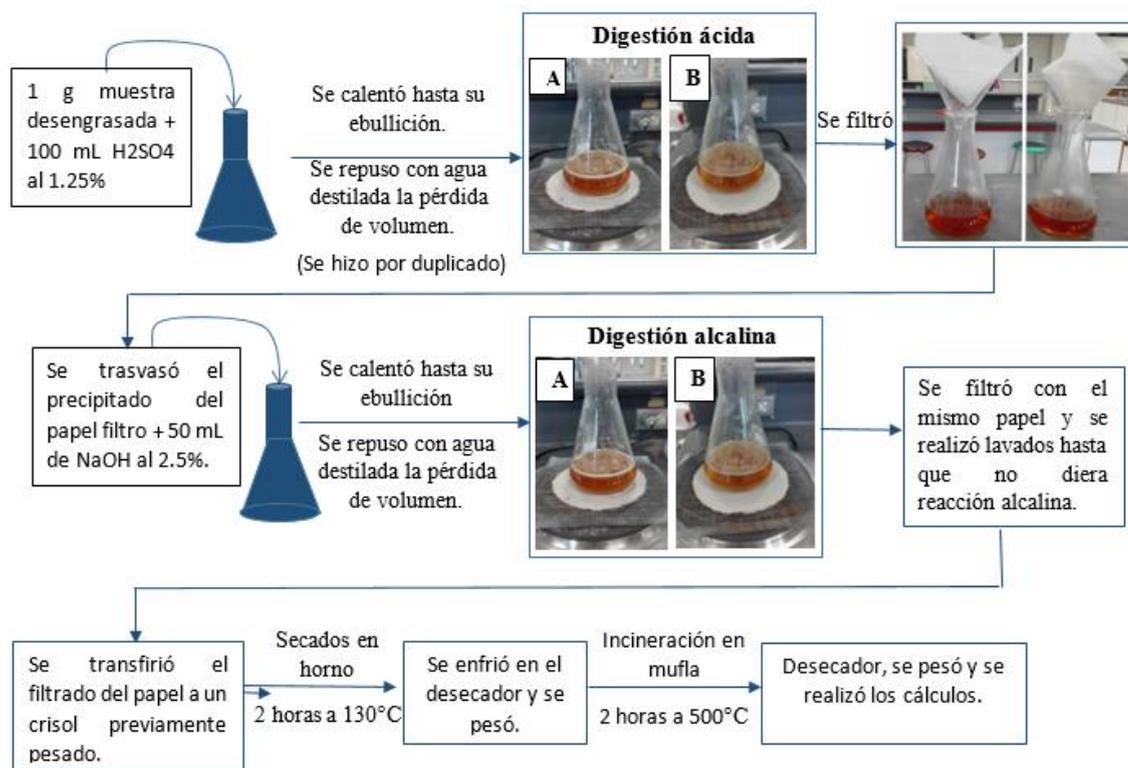
Muestra	Peso muestra (g)	Peso balón vacío (g)	Peso balón con extracto graso (g)	Grasas (%)	Media (%)	Desviación estándar
1	2.0028	112.5609	112.5891	1.41	1.53	0.18
2	2.0022	114.4787	114.5118	1.65		

Tabla de resultados del análisis de grasas.

D. Análisis de fibra

Preparación de reactivos

- **Ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1.25%:** Considerando que el H_2SO_4 utilizado tenía 96% de pureza, se mezcló 5.21 mL de H_2SO_4 con 400 mL de agua destilada. Así, se obtuvo 400 mL de H_2SO_4 al 1.25%.
- **Hidróxido de sodio (NaOH) al 2.5%:** En un recipiente de plástico de 200 mL se mezcló 3 g de hidróxido de sodio (100% de pureza) y se disolvió con 120 mL de agua destilada.

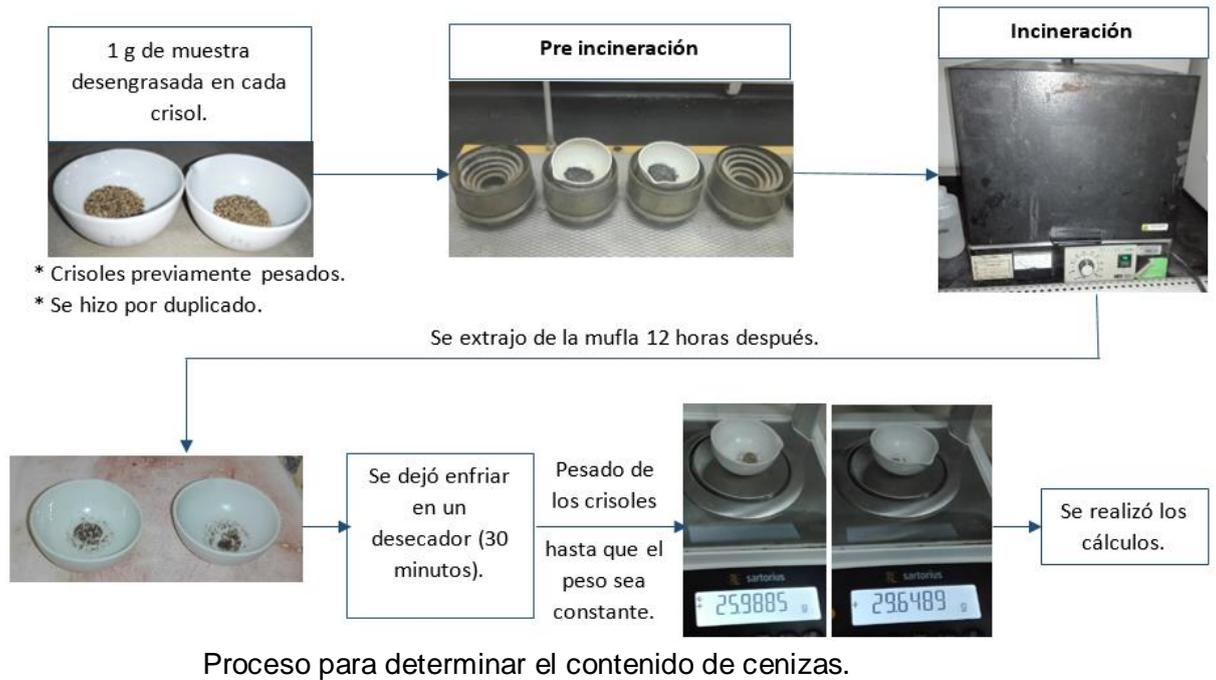


Proceso para determinar el contenido de fibra.

Muestra	Peso muestra (g)	Crisol con residuo seco (g)	Crisol con ceniza (g)	Fibra (%)	Media (%)	Desviación estándar
1	1	25.4212	25.5596	13.84	12.73	1.57
2	1	29.4038	29.52	11.62		

Tabla de resultados del análisis de fibra.

E. Análisis de cenizas



Muestra	Peso muestra (g)	Peso de porcelanas vacías (g)	Peso de porcelana con ceniza (g)	Cenizas (%)	Media	Desviación estándar
1	1.0001	25.8136	25.9885	17.49	17.47	0.03
2	1.0001	29.4744	29.6489	17.45		

Tabla de resultados del análisis de cenizas.

E. Tabla de macronutrientes, fibra y cenizas expresados en base fresca

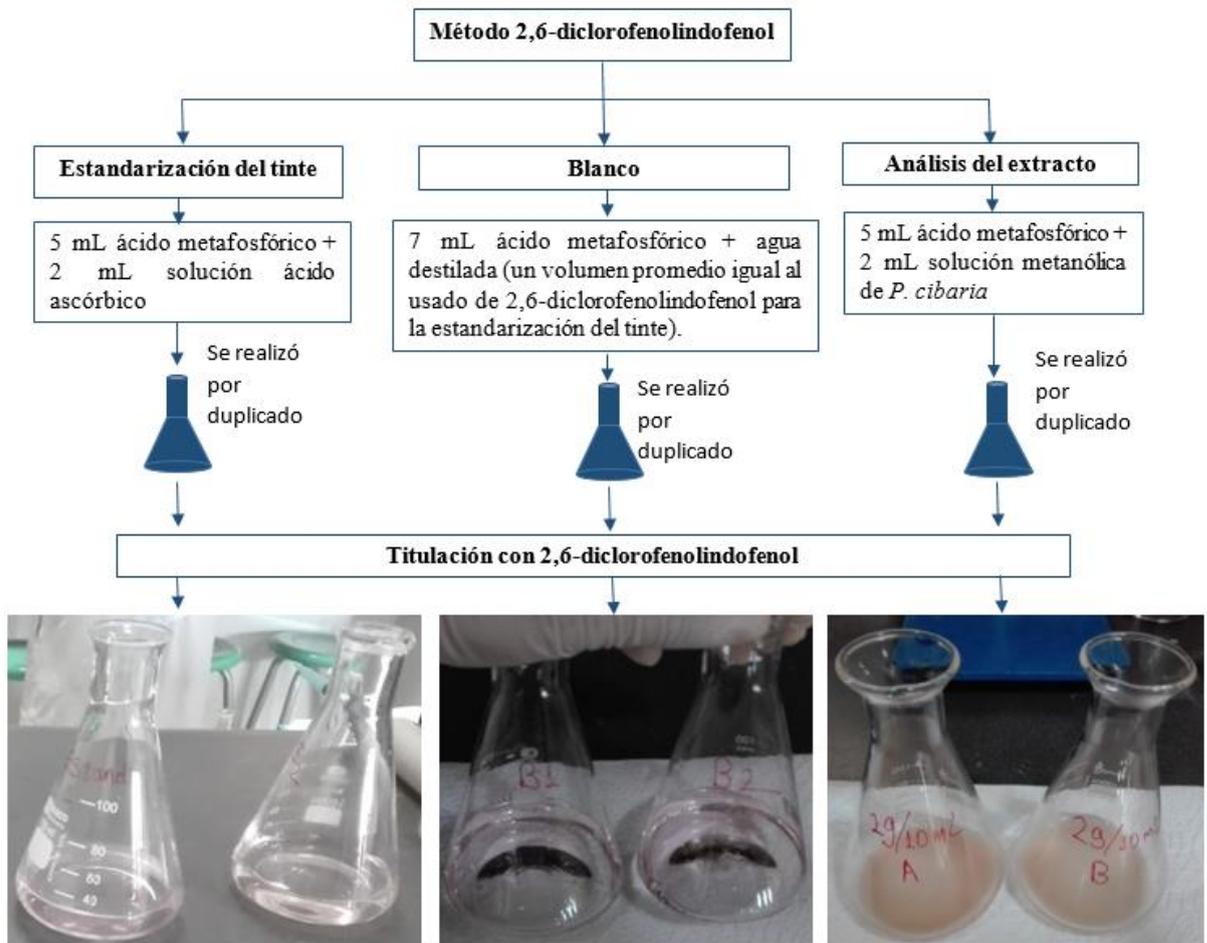
Proteínas	Grasas	Carbohidratos	Cenizas	Fibra	Valor calórico
4.89 ± 0.04	0.32 ± 0.05	9.13 ± 0.56	3.58 ± 0.08	2.61 ± 0.27	64.12 ± 2.31

Anexo 9. Análisis de ácido ascórbico

Preparación de reactivos

- Solución estándar de ácido ascórbico:** Se pesó 50.15 mg de ácido ascórbico (equivalía a 50 mg porque la pureza del ácido ascórbico era de 99.7%) en una balanza analítica, se transfirió a un matraz aforado de 50 mL y se diluyó en etanol hasta aforar.

- b. **Solución de indofenol – colorante:** En un vaso de precipitados de 200 ml se mezcló 50 ml de agua destilada con 42 mg de bicarbonato de sodio, luego se agregó 50 mg de sal de sodio de 2,6-dicloroindofenol. Se diluyó esta mezcla a 200 mL con agua destilada y se filtró. El filtrado se depositó en una botella de color ámbar y se refrigeró hasta su uso.
- c. **Solución de ácido metafosfórico-ácido acético:** En un vaso de precipitados de 200 mL se mezcló 40 mL de agua con 8 mL de ácido acético. Luego, se disolvió 3 g de ácido metafosfórico. Se diluyó la mezcla a 100 mL con agua destilada y se filtró. El filtrado se depositó en una botella de color ámbar y se refrigeró hasta su uso.
- d. **Extractos de *P. cibaria* Singer:** Se pesó 2 g de muestra deshidratada de *P. cibaria* Singer y se introdujo en un tubo de ensayo con tapa. Se agregó al tubo 10 mL de metanol. Este procedimiento se realizó por duplicado.



Proceso para determinar el contenido de ácido ascórbico.

	Repetición	Volumen de Titulación (mL)
Ácido ascórbico estándar	1	14.8
	2	14.8
Blanco	1	0.15
	2	0.15
Muestra	1	0.25
	2	0.25

Tabla de resultados del análisis de ácido ascórbico en *P. cibaria* Singer.

Cálculos

Ecuación para determinar la concentración del ácido ascórbico diluida en etanol.

$$F = \frac{[(50.2 \text{ mg} - 50 \text{ mL}) \times 2 \text{ mL}]}{14.8 - 0.15} = 0.13 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

Ecuación para determinar la concentración de ácido ascórbico en el extracto metanólico de *P. cibaria*.

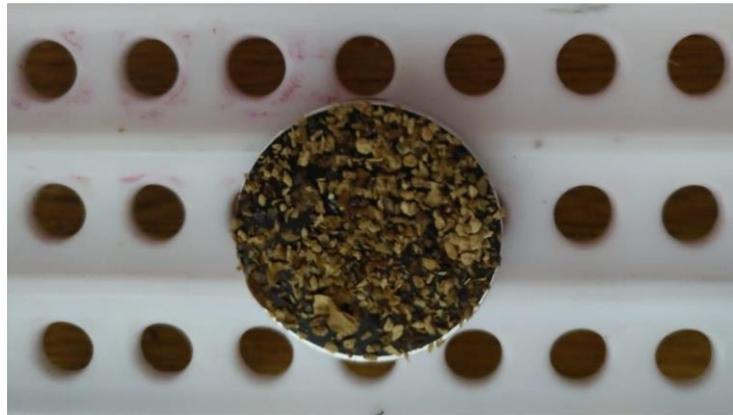
$$\frac{\text{mg ác. ascórbico}}{\text{mL}} = (0.25 \text{ mL} - 0.15 \text{ mL}) * \left(\frac{0.1306 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{2 \text{ mL}} \right) * \left(\frac{7 \text{ mL}}{7 \text{ mL}} \right) = 6.53 * 10^{-3} \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

Ecuación para determinar la concentración de ácido ascórbico en 100 g de *P. cibaria*.

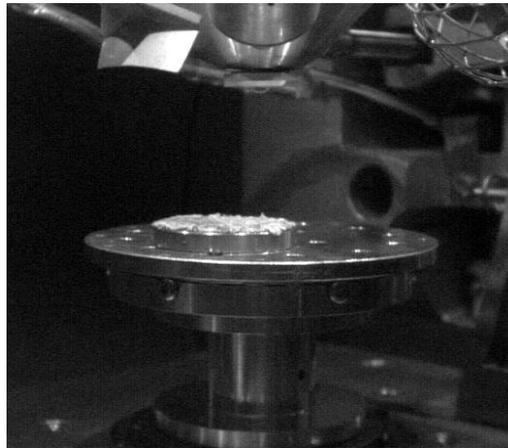
$$\frac{\text{mg ác. ascórbico}}{100 \text{ g de muestra}} = 6.53 * 10^{-3} \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times \frac{1 \text{ mL}}{0.2 \text{ g}} \times 100 \text{ g} = 3.265 \frac{\text{mg}}{100 \text{ g}}$$

Cabe resaltar que el volumen de titulación utilizado fue el mismo en el ensayo realizado por duplicado, por esta razón solo se realizó un cálculo y la desviación estándar fue cero.

Anexo 10. Identificación de minerales y metales pesados por ESEM



Preparación de la muestra.



Muestra en la platina del microscopio.

Anexo 11. Informe del ensayo de cuantificación de minerales y metales pesados realizados por el laboratorio SLab.



SISTEMA DE SERVICIOS Y ANÁLISIS
QUÍMICOS S.A.C. SLAB

INFORME DE ENSAYO
IE-110121-01

1. DATOS DEL CLIENTE

1.1 Cliente : LUIS ALBERTO ARMAS MUÑOZ
1.2 RUC/DNI : 70544464

2. FECHAS

2.1 Inicio : 11 de Enero de 2021
2.2 Fin : 19 de Enero de 2021
2.3 Emisión de informe : 21 de Enero de 2021

3. CONDICIONES AMBIENTALES DE ENSAYO

3.1 Temperatura : 20.1 °C
3.2 Humedad Relativa : 62.4 %

4. ENSAYO SOLICITADO Y METODOLOGÍA UTILIZADA

4.1 Ensayo solicitado : Barrido de Metales – Flúor - Yodo
4.2 Método utilizado : ICP-MS – Cromatografía Iónica - Yodometría

5. DATOS DE LA MUESTRA ANALIZADA

Tabla N°1: Datos de las muestras analizadas

Código Interno de Muestra	Descripción
S-0829	HONGO DESHIDRATADO Y MOLIDO (Pleurocollybia cibaria Singer – Seta Cusqueña) Fecha de Muestreo: 19-01-2020

6. RESULTADOS

6.1. Resultados Obtenidos

Tabla N°2: Resultados Obtenidos

Parámetro	Metodología Analítica	Resultado		Promedio	Desviación Estándar Relativa
Flúor, mg/Kg	Cromatografía Iónica	239.62	234.54	237.08	1.52
Yodo, mg/Kg	Yodometría	20.14	20.19	20.17	0.18

- Los Resultados pertenecen a las muestras entregadas al laboratorio
- Queda prohibida la copia parcial de este informe sin el consentimiento por escrito de SISTEMA DE SERVICIOS Y ANÁLISIS QUÍMICOS SAC.

DIEGO ROMANO VERGARAY D'ARRIGO
QUÍMICO
CQP. 1337

Tabla N°3: Resultados de Metales Pesados

Parámetro	Metodología Analítica	Resultado		Promedio	Desviación Estándar Relativa
Arsénico, mg/Kg	Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry	<0.002	<0.002	<0.002	N. A
Plomo, mg/Kg		<0.002	<0.002	<0.002	N. A
Mercurio, mg/Kg		<0.001	<0.001	<0.001	N. A
Cadmio, mg/Kg		<0.0001	<0.0001	<0.0001	N. A

Tabla N°4: Resultados de Metales

Parámetro	Metodología Analítica	Resultado		Promedio	Desviación Estándar Relativa
Calcio, mg/Kg	Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry	755.27	764.42	759.85	0.85
Zinc, mg/Kg		67.30	68.11	67.70	0.85
Hierro, mg/Kg		302.98	305.24	304.11	0.53

- Los Resultados pertenecen a las muestras entregadas al laboratorio
- Queda prohibida la copia parcial de este informe sin el consentimiento por escrito de SISTEMA DE SERVICIOS Y ANÁLISIS QUÍMICOS SAC.

Anexo 12

Preparación de reactivos

- a. **Solución metanólica de 0.1 mM de DPPH:** En una fiola de 100 mL se mezcló 7.89 mg de DPPH con 100 mL de metanol. La fiola se cubrió con papel aluminio y se refrigeró hasta su uso.
- b. **Extracto metanólico de *P. cibaria* Singer:** En 6 tubos diferentes se mezclaron 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 mg de *P. cibaria* Singer (deshidratada y molida) con 10 mL de metanol. Los 6 tubos se colocaron en baño maría durante 2.5 horas, se filtraron y los filtrados se almacenaron en distintos viales.
- c. **Solución metanólica de ácido ascórbico:** Se preparó una solución madre de 100 mg de vitamina C en 100 mL de metanol. De ella, se tomó 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mL y se agregó en 6 fiolas distintas de 10 mL y se enrasó cada una con metanol. De esta manera se obtuvieron 6 extractos metanólicos de diferentes concentraciones: 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 ug/mL.

Concentración del extracto metanólico <i>P. cibaria</i> Singer (mg/mL)	Ensayo	Extracto metanólico <i>P. cibaria</i> (mL)	Metanol (mL)	DPPH (mL)
-	Blanco metanol	-	2	-
-	Blanco DPPH	-	-	2
0.25	Blanco	2	-	-
	1A	1	-	1
	1B	1	-	1
0.5	Blanco	2	-	-
	2A	1	-	1
	2B	1	-	1
1	Blanco	2	-	-
	3A	1	-	1
	3B	1	-	1
2	Blanco	2	-	-
	4A	1	-	1
	4B	1	-	1
4	Blanco	2	-	-
	5A	1	-	1
	5B	1	-	1
8	Blanco	2	-	-
	6A	1	-	1
	6B	1	-	1

Volúmenes utilizados de cada concentración de extracto metanólico de *P. cibaria* Singer, DPPH y metanol para medir su absorbancia y determinar la actividad antioxidante *in vitro*.

Concentración de la solución ácido ascórbico (mg/mL)	Ensayo	Muestra (mL)	DPPH (mL)
0.0025	Blanco	2	-
	1	1	1
0.005	Blanco	2	-
	2	1	1
0.010	Blanco	2	-
	3	1	1
0.020	Blanco	2	-
	4	1	1

Volúmenes utilizados de cada solución de ácido ascórbico, DPPH y metanol para determinar la actividad antioxidante *in vitro*.



Actividad antioxidante *in vitro* del extracto metanólico de *P. cibaria* Singer luego de 30 minutos bajo oscuridad.