



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Forestales
Programa de Magister en Ciencias Forestales

**COMPARACIÓN DE PARÁMETROS QUÍMICO-NUTRICIONALES DE
LAS ESPECIES DEL GÉNERO *CYTTARIA* MÁS CONSUMIDAS EN CHILE**



Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Forestales

Viviana Edith Salazar Vidal
CONCEPCIÓN-CHILE
2019

Profesor Guía: José Violido Becerra Allende
Laboratorio de Química de Productos Naturales
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

COMPARACIÓN DE PARÁMETROS QUÍMICO-NUTRICIONALES DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *CYTTARIA* MÁS CONSUMIDAS EN CHILE

Comisión Evaluadora:

José Becerra Allende (Profesor guía)

Químico Farmacéutico, Dr.

Claudia Pérez Manríquez (Profesor co-guía)

Químico, Dra.

Pedro Aqueveque Muñoz (Comisión evaluación)

Profesor de Biología, Dr.

Manuel Sánchez Olate (Comisión evaluación)

Ingeniero Forestal, Dr.



Director de Postgrado:

Darcy Ríos Leal

Profesor de Biología y Química, Dra.

Decano Facultad de Ciencias Forestales:

Jorge Cancino Cancino

Ingeniero Forestal, Dr.

DEDICATORIA

“A mis padres y a ese mundo que pocos conocen, que descubrí hace años por casualidad y que espero seguir estudiando”



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que estuvieron conmigo en este proceso denominado “Tesis”, sin las cuales no hubiese sido posible. En primer lugar, agradezco a mi familia por su apoyo constante y entender que soy curiosa, que me apasiona estudiar y que me es imposible dejar de hacerlo.

Estoy enormemente agradecida de mis tutores, el Dr. José Becerra y a la Dra. Claudia Pérez, por acompañarme en este proceso, por su paciencia infinita y por dejarme ser yo, valorando mis ideas. Asimismo, agradezco al Dr. Mario Aranda, a la Prof. Gisela Ríos y a Patricia Gómez del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Farmacia, por su disposición a aclarar mis dudas y realizar diversos análisis químicos de mis muestras. A la Dra. Carola Vergara y a la Dra. Vania Sáez del Departamento de Análisis Instrumental de la misma Facultad, por su apoyo con la liofilización de algunas muestras.

Al Dr. Pedro Aqueveque, Jefe del Laboratorio de Microbiología y Micología Aplicada del Departamento de Agroindustrias de la Facultad de Ingeniería Agrícola del Campus Chillán, por sus sugerencias para mejorar mi trabajo de tesis y a mis colegas del Laboratorio de Química de Productos Naturales por su ayuda y comprensión, con mención especial al Dr. Fabián Figueroa y Luis Fabián Soto que me ayudaron con extracción de polisacáridos y en muchas cosas más, Gabriela Oyarce, que realizó el ensayo de ABTS⁺⁺ y me ayudó con su interpretación, Sergio Triviño por liofilizar parte de mis muestras y aclarar mis dudas, Verónica Albornoz y Dra. Solange Torres por orientarme. También quiero agradecer, a la químico-analista Francisca Narváez por su buena disposición, por guiarme durante la extracción de polifenoles totales y con el ensayo de Folin-Ciocalteu. Al Dr. Roberto Abdala de la Universidad de Málaga por realizar los ensayos de citotoxicidad.

A la Dra. Andrea Romero del Instituto de Micología y Botánica de la Universidad de Buenos Aires por ayudarme con bibliografía relevante del género *Cyttaria*. A la secretaria de postgrado de la Facultad de Ciencias Forestales, Sra. Margarita Figueroa, por siempre estar dispuesta a resolver mis dudas. A Don Eduardo y a la Sra. Claudia del laboratorio donde desarrollé mi tesis, por su colaboración y amabilidad. A todos quienes me acompañaron a buscar muestras a terreno, en especial, a mi padre, familia, María José Dibán, Dra. Laura Sánchez-Jardón y Christian Valdés. Finalmente, agradezco a mis amigos, a la vida por llevarme por caminos insospechados y por guiarme incluso cuando me siento perdida haciendo de mí, una mujer valiente.

RESUMEN

El género *Cyttaria* pertenece a la familia Cyttariaceae (División Ascomycota) y sus especies son parásitos obligados de árboles del género *Nothofagus*. Se distribuye naturalmente en el hemisferio sur en lugares donde existe presencia de estas especies arbóreas, encontrándose siete especies de *Cyttaria* presentes en nuestro país: *C. berteroi*, *C. darwinii*, *C. espinosae*, *C. hariotii*, *C. hookeri*, *C. johowii* y *C. exigua*, que comúnmente se conocen como “Digüeños” y que tienen gran importancia desde el punto de vista alimenticio, ya que han sido consumidos desde la prehistoria por pueblos originarios.

En Chile se han realizado estudios sobre taxonomía, ecología y análisis químico-nutricional de algunas especies del género *Cyttaria*, recolectadas principalmente en la Región Metropolitana y Región del Maule. Por este motivo, en esta investigación se incluyen especies de otras zonas geográficas de Chile y se propone determinar cuál de estas especies estudiadas presenta una mejor composición nutricional y un alto potencial medicinal para combatir enfermedades asociadas a estrés oxidativo y cáncer, lo que puede aportar información relevante. El objetivo de esta investigación fue determinar la composición nutricional, capacidad antioxidante y actividad citotóxica de las especies del género *Cyttaria* más consumidas en Chile recolectadas durante el año 2018.

El presente estudio describe el análisis de la composición nutricional de *Cyttaria* spp., para lo que se utilizó el procedimiento oficial descrito en AOAC. El contenido fenólico total y la capacidad antioxidante de diferentes extractos de las especies *C. hariotii* y *C. espinosae*, se evaluó mediante un ensayo ABTS⁺. Por otro lado, los fenoles totales fueron determinados por el ensayo Folin-Ciocalteu y se expresaron como equivalentes de ácido gálico.

Dentro de los resultados obtenidos, la especie *C. espinosae* presentó un alto contenido de proteínas con un promedio de 20 g/100 g en peso seco. El extracto de *C. hariotii* presentó una cantidad promedio de 1,1 mg/g equivalentes de ácido gálico, asociado a un alto contenido de compuestos fenólicos y una capacidad antioxidante promedio de 10,8 mg de equivalentes Trolox/100g de extracto. Asimismo, el extracto de polisacáridos de uno de los extractos de *C.*

hariotii mostró un efecto citotóxico sobre las células de la línea celular de leucemia humana donde se obtuvo un valor IC_{50} de 2,1 mg/mL que disminuyó el % de viabilidad celular.

Palabras clave: Cyttariales, digüeños, hongos comestibles, antioxidantes, citotoxicidad.



ABSTRACT

The genus *Cyttaria* belongs to the family Cyttariaceae (Ascomycota Division) and its species are obligate parasites of trees of the genus *Nothofagus*. It is naturally distributed in the southern hemisphere in places where there is a presence of these tree species, with seven species of *Cyttaria* present in our country: *C. berteroi*, *C. darwinii*, *C. espinosae*, *C. hariotii*, *C. hookeri*, *C. johowii* and *C. exigua*, which are commonly known as “Digüeños” and which are of great importance from the nutritional point of view, since they have been consumed from prehistory by native people.

In Chile, studies have been carried out on taxonomy, ecology and chemical-nutritional analysis of some species of the *Cyttaria* genus, collected mainly in the Metropolitan Region and Maule Region. For this reason, this research include species from other geographical areas of Chile and it is intended to determine which *Cyttaria* species studied has a better nutritional composition and a high medicinal potential for the prevention and treatment of degenerative diseases, which can provide relevant information. As a general objective we proceeded to determine the nutritional composition, antioxidant capacity and antitumor activity of *Cyttaria* species, more consumed in Chile, collected during 2018.

This study describes the analysis of nutritional composition of *Cyttaria* spp. terminated by means of official AOAC described method. The content of total polyphenols and total antioxidant capacity of different extracts from *C. hariotii* y *C. espinosae* was evaluated using the ABTS. Likewise, total phenol were determined by means of Folin-Ciocalteu assay, and results were expressed as gallic acid equivalents.

Among the results obtained, the species *C. espinosae* had a high protein content with an average of 20 g/100 g in dry weight. The extract of *C. hariotii* had an average amount of 1.1 mg/g equivalent of gallic acid, which is associated with a higher content of phenolic compounds and an average antioxidant capacity of 10.8 mg of Trolox equivalents/100g of extract. Likewise, the polysaccharides extract of one of the *C. hariotii* extracts showed a

cytotoxic effect on the cells of the human leukemia cell line where an IC_{50} value of 2.1 mg/mL was obtained which decreased the % cell viability.

Keywords: Cyttariales, digüeños, edible fungi, antioxidants, cytotoxicity.



TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VII
TABLA DE CONTENIDO	IX
INDICE DE TABLAS	XI
INDICE DE FIGURAS	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes generales del género <i>Cyttaria</i>	1
1.2. Relación de <i>Cyttaria</i> spp. con especies del género <i>Nothofagus</i>	2
1.3. Importancia de especies del género <i>Cyttaria</i> como PFNM.....	4
1.3.1. Conservación de los hongos chilenos con énfasis en <i>Cyttaria</i> spp.	6
1.3.2. Descripción de las especies consideradas en este estudio	8
1.4. Aporte nutricional de los hongos comestibles.....	12
1.5. Compuestos bioactivos presentes en los hongos comestibles	16
1.6. Potencial medicinal de los hongos comestibles.....	18
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
2.1. Hipótesis	20
2.1.1. Hipótesis 1	20
2.1.2. Hipótesis 2	20

2.2. Objetivo general	20
2.3. Objetivos específicos.....	20
III. METODOLOGÍA.....	21
3.1. Recolección, documentación in situ y determinación de <i>Cyttaria</i> spp.....	21
3.2. Liofilización de los estromas de recolectados	22
3.3. Obtención de los extractos metanólicos	22
3.4. Análisis de la composición nutricional.....	22
3.5. Cuantificación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu	23
3.6. Capacidad antioxidante utilizando el ensayo ABTS ⁺⁺	23
3.7. Extracción de polisacáridos totales	24
3.8. Ensayo de citotoxicidad y determinación de la actividad antitumoral	25
3.9. Análisis estadístico	25
IV. RESULTADOS	26
4.1. Composición nutricional de <i>Cyttaria</i> spp.....	26
4.2. Determinación de polifenoles totales de <i>Cyttaria</i> spp. por ensayo Folin-Ciocalteu	26
4.3. Capacidad antioxidante de <i>Cyttaria</i> spp. por ensayo ABTS ⁺⁺	27
4.4. Efecto citotóxico de polisacáridos aislados de <i>Cyttaria</i> spp. en líneas tumorales	28
V. DISCUSIÓN	31
VI. CONCLUSIONES	36
VII. BIBIOGRAFÍA.....	37
VIII. ANEXOS	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies nativas incluidas desde el I al XIV Proceso de Clasificación de Especies....	7
Tabla 2. Proporción de aminoácidos esenciales en mg/g peso seco en algunas especies de hongos comestibles.....	14
Tabla 3. Composición en ácidos grasos (%) de algunas especies de hongos comestibles	14
Tabla 4. Información sobre la recolección de muestras de <i>Cyttaria</i> spp. para este estudio	21
Tabla 5. Contenido de humedad, cenizas, grasa, proteína, fibra e hidratos de carbono (HC) de las muestras de <i>Cyttaria</i> spp. consideradas en este estudio (n = 3)	26



ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** a) Estromas de *C. berteroi*; b) Esquema de un estroma de *Cyttaria*. ec: ectostroma, en: endostroma, a: apotecio, c: columela, ps: pseudotejido intersticial, v: venas, p: pie 1
- Figura 2.** Relaciones entre especies de *Cyttaria* y *Nothofagus*. Las líneas que conectan a los árboles hospederos y sus parásitos representan asociaciones; los números en paréntesis indican el número de asociaciones por taxón. Los recuadros sombreados con tonos grises indican los subgéneros de *Nothofagus* que albergan a *Cyttaria* spp. (Fuente: Peterson et al., 2010) 3
- Figura 3.** a) Estromas de *Cyttaria berteroi* creciendo sobre una rama de *N. obliqua*; b) Representación de estructuras microscópicas de *C. berteroi* (Gamundí, 1971, ver Anexo 1).... 9
- Figura 4.** a) Estromas de *Cyttaria espinosae* creciendo sobre una rama de *Nothofagus obliqua* juvenil; b) Representación de estructuras microscópicas de *C. espinosae* (Gamundí, 1971, ver Anexo 2) 10
- Figura 5.** a) Estromas de *Cyttaria hariotii* creciendo sobre una rama de *Nothofagus dombeyi*; b) Representación de estructuras microscópicas de *C. hariotii* (Gamundí, 1971, ver Anexo 3) 12
- Figura 6.** Comparación del índice nutricional de diferentes alimentos con el índice nutricional de hongos comestibles (Fuente: Boa, 2004)..... 13
- Figura 7.** Contenido de compuestos fenólicos totales expresados en mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca, utilizando el ensayo Folin-Ciocalteu en extractos de *Cyttaria* spp. (n= 3) 27
- Figura 8.** Capacidad antioxidante por el ensayo ABTS⁺, expresada en mg de equivalentes Trolox/100g de extractos *Cyttaria* spp. (n= 3) 28
- Figura 9.** Efecto de los polisacáridos crudos extraídos de *C. hariotti* y *C. berteroi* en porcentaje de supervivencia ± desviación estándar en la línea celular de cáncer de colon humano (HCT-116). IC₅₀ *C. hariotti*: 3,70 mg/mL; IC₅₀ *C. berteroi*: 927 mg/mL..... 29
- Figura 10.** Efecto de los polisacáridos crudos extraídos de *C. hariotti* y *C. berteroi* en porcentaje de supervivencia ± desviación estándar en la línea celular de leucemia humana (U-937). IC₅₀ *C. hariotti*: 2,10 mg/mL; IC₅₀ *C. berteroi*: > 10 mg/mL 29
- Figura 11.** Efecto de los polisacáridos crudos extraídos de *C. hariotti* y *C. berteroi* en porcentaje de supervivencia ± desviación estándar en la línea celular de cáncer de mama (MCF-7). IC₅₀ *C. hariotti*: 9,47 mg/mL; IC₅₀ *C. berteroi*: > 10 mg/mL 30

I. INTRODUCCION

Los hongos del género *Cyttaria* son parásitos obligados de árboles del género *Nothofagus*, como: robles, coihues, ñirres, entre otros y se encuentran distribuidos en el hemisferio sur. Estos hongos se desarrollan sobre las ramas y, en algunos casos, sobre troncos de los árboles, ocasionando malformaciones en forma de tumores, de las que emergen fructificaciones en forma de estromas, generalmente, durante la primavera.

En Sudamérica, las especies de *Cyttaria* se ubican en bosques nativos de Chile y Argentina, donde algunas de ellas son apetecidos y recolectadas por la comunidad general. En el pasado han sido estudiadas, principalmente, en términos taxonómicos y ecológicos, pero últimamente han adquirido un papel relevante, debido a las propiedades nutricionales y potencial medicinal que poseen (Schmeda-Hirschmann et al., 2001; Inzunza, 2016; Toledo et al., 2016).

1.1. Antecedentes generales del género *Cyttaria*

El género *Cyttaria* Berk. pertenece a la familia Cyttariaceae (División Ascomycota) y es de carácter monotípico. Cuenta con 11 especies conocidas a nivel mundial, siete en Sudamérica (Gamundí, 1971; 1991; Gamundí et al., 2004) y cuatro en Australasia, siendo todas parásitas exclusivas del género *Nothofagus*, causando tumores en sus hospederos a partir de los cuales fructifican estromas (Figura 1).

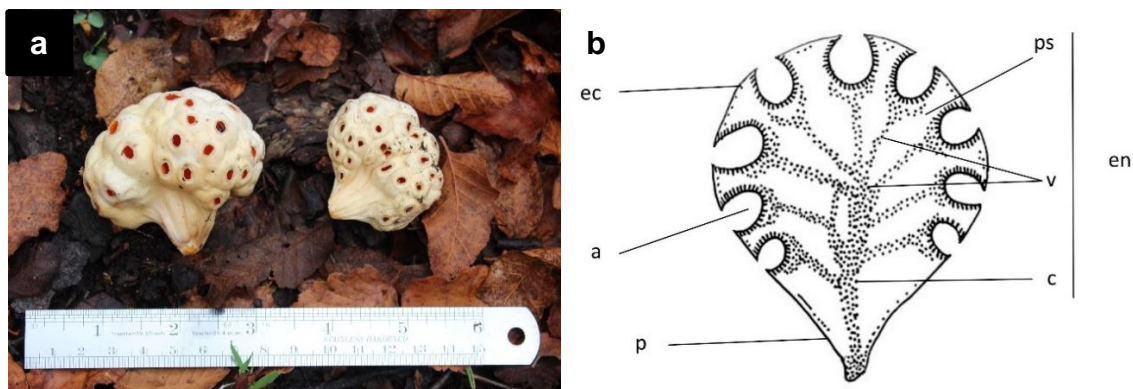


Figura 1. a) Estromas de *C. berteroi*; b) Esquema de un estroma de *Cyttaria*. ec: ectostroma, en: endostroma, a: apotecio, c: columela, ps: pseudotejido intersticial, v: venas, p: pie.

Existen numerosos trabajos taxonómicos sobre las especies sudamericanas del género *Cyttaria* (Barrera, 2004; Espinosa 1926, Marchionatto, 1940; Gamundí, 1971, 1986; Gamundí et al., 2004; Sandoval-Leiva, 2012), en los cuales se da a conocer información relevante sobre estas especies y donde se evidencia la presencia en Chile de *C. berteroi* Berk., *C. darwinii* Berk., *C. espinosae* Lloyd, *C. hariotii* E. Fisch., *C. hookeri* Berk., *C. johowii* Espinosa y *C. exigua* Gamundí. La distribución del género *Cyttaria* está asociada a la presencia de *Nothofagus*. Por esta razón a nivel sudamericano podemos encontrarlo en Chile y Argentina, pero también está presente en otros lugares del hemisferio sur como Australia y Nueva Zelanda.

En general, los estromas de estos hongos son carnosos a gelatinosos, esféricos a piriformes, donde se encuentran inmersos los apotecios, con ascos 8-esporados, cilíndricos, inoperculados, con presencia de un poro apical, paráfisis abundantes, pluriseptadas y filiformes, esporas uniseriadas, no septadas, hialinas, amarillentas cuando jóvenes, grises a negras cuando maduras, lisas a rugulosas y elípticas a subglobosas (Gamundí, 1971; 1986). A diferencia de la mayoría de los hongos, las paredes celulares de estromas de *C. hariotii* y probablemente de otras especies del género, están conformadas por β -(1-3)-glucanos y carecen de quitina (Oliva et al., 1986).

1.2. Relación de *Cyttaria* spp. con árboles del género *Nothofagus*

Existe una asociación obligatoria entre las especies del género *Cyttaria* y sus hospederos que corresponden a árboles del género *Nothofagus* que a menudo se cita como un ejemplo clásico de cofilogenia y es uno de los pocos casos en los que la biogeografía de un hongo es incluida en un análisis de este tipo (Peterson et al., 2010). La historia del género *Nothofagus* es clave en la comprensión biogeográfica del hemisferio sur (Darlington, 1965; Steenis, 1971; Cracraft, 1975), ya que el polen de *Nothofagus* es distintivo, producido en grandes cantidades y fácil de fosilizar, siendo un indicador de que *Nothofagus* estaba muy extendido en gran parte del sur de Gondwana antes de la ruptura continental (Dettmann et al., 1990; Hill, 1991).

Las asociaciones entre las especies de *Cyttaria* y *Nothofagus*, por lo general, no corresponden a una simple relación uno a uno; varias especies de *Cyttaria* pueden infectar una especie de

Nothofagus y una especie de *Cyttaria* puede infectar a varias especies de *Nothofagus* (Figura 2). En general, una especie de *Cyttaria* se asocia con más de una (hasta 5) especies de *Nothofagus*, que a su vez están asociados con más de una (hasta 4) especies de *Cyttaria* (Peterson et al., 2010). No obstante, en nuestro país la única especie de *Nothofagus* no parasitada por *Cyttaria* spp. es *Nothofagus alesandrii* Espinosa.

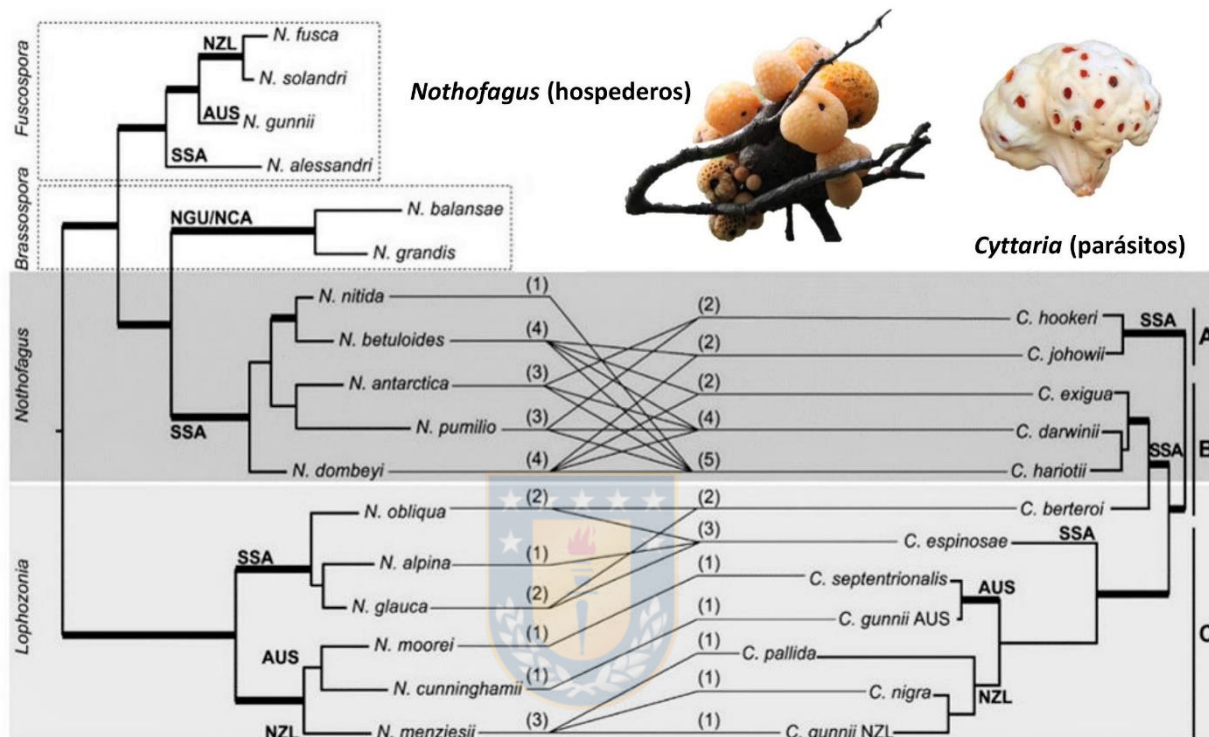


Figura 2. Relaciones entre especies de *Cyttaria* y *Nothofagus*. Las líneas que conectan a los árboles hospederos y sus parásitos representan asociaciones; los números en paréntesis indican el número de asociaciones por taxón. Los recuadros sombreados con tonos grises indican los subgéneros de *Nothofagus* que albergan a *Cyttaria* spp. SSA: Sur de Sudamérica, AUS: Australia, NZL: Nueva Zelanda, NGU: Nueva Guinea, NCA: Nueva Caledonia (Fuente: Peterson et al., 2010).

Las especies de *Cyttaria* son comúnmente conocidas como “Digüeñes” siendo consumidas en Chile y en Argentina, pero como se mencionó anteriormente, también podemos encontrarlas en otras zonas geográficas donde crecen árboles del género *Nothofagus*. Así los digüeñes han sido utilizados con fines gastronómicos desde hace años, siendo recolectados para consumo o fines comerciales.

1.3. Importancia de las especies del género *Cyttaria* como PFSM

Los Productos Forestales No Madereros (PFSM) han sido definidos como “aquellos bienes de origen biológico distinto de la madera, procedentes de los bosques, de otros terrenos arbolados y de árboles situados fuera de los bosques, independiente de su naturaleza” (INFOR, 2009). En los últimos años, los PFSM han causado un interés considerable en todo el mundo, pues se está reconociendo su importancia para conseguir la conservación de la diversidad biológica y, además, se ha comprobado que su consumo mejora la calidad de vida de las personas.

La recolección de PFSM es una actividad ancestral donde los hongos silvestres comestibles (HSC) han tenido gran importancia. Los hongos nativos presentan un buen nivel de riqueza y diversidad, debido al alto grado de endemismo que presentan los bosques nativos, lo que se debe a las condiciones ambientales y ecológicas predominantes (FAO, 1999). Según López & Fuenzalida (1998) numerosos hongos han sido recolectados por los mapuches como alimento, dentro de los que destacan las especies de *Cyttaria*, conocidas vulgarmente como "Digüeños", "Quireños", entre muchos otros nombres comunes. Los digüeños (*Cyttaria* spp.) son hongos comestibles que parasitan robles, coigües y otros árboles del género *Nothofagus*, distribuidos desde la zona central de Chile hasta la Patagonia. La práctica de su recolección como alimento se remonta a los primeros habitantes de estas tierras y actualmente, todavía son recolectados. Los cuerpos fructíferos de estos hongos en un comienzo fueron considerados “frutos” del árbol hospedero y no solamente se consumían en estado fresco, sino también se hacían fermentar para obtener un brebaje alcohólico conocido como “chicha” (Mösbach, 1991).

Las especies del género *Cyttaria* se caracterizan por presentar estromas esféricos y carnosos, por lo que han sido recolectados desde la prehistoria por varias tribus amerindias y usados como una fuente de alimento (Domínguez, 2010). El pueblo Mapuche estaba conformado por cazadores, recolectores y agricultores, siendo su territorio coincidente con los bosques de *Nothofagus* del centro y sur de Chile. En la Región de Los Ríos y en la Región de Los Lagos, la recolección de PFSM, en especial, de HSC es una tradición que se remonta a mucho tiempo atrás. De hecho, para los Huilliches los hongos comestibles formaban parte importante de su dieta (Sepúlveda, 2005).

Otros autores se refieren al consumo de los digüeños por etnias que habitaban Tierra del Fuego, por ejemplo: *C. darwinii* fue consumido por los Selknam (Onas) y también era recolectada por los Kawashkar (Alacalufes) (Emperaire, 1963) y Yámanas (Chapman, 1987). Mientras que *C. hookeri*, conocido como "Assuim" o "Uaíaca", también era recolectado, con un sabor ligeramente amargo e inoloro en fresco, por lo que era consumido preferentemente deshidratado (Muñoz et al., 1981).

Muñoz et al., (1981) incluyen a *C. berteroi*, *C. darwinii*, *C. espinosae*, *C. hariotii* y *C. hookeri* entre las especies comestibles de este género, aunque hoy en día se sabe que todas las especies de *Cyttaria* son comestibles, algunas en menor cantidad que otras por su consistencia y sabor. Su recolección para el consumo y/o venta directa, continúa siendo una actividad conveniente para la población rural de la zona centro-sur de Chile, donde los digüeños son vendidos en mercados y ferias. Todas las especies de *Cyttaria* comercializadas son recolectadas en bosques dominados por *Nothofagus*. La especie más común es *C. espinosae*, que habitualmente se encuentra en renovales de *Nothofagus macrocarpa* (A.DC.) F.M.Vázquez & R.A.Rodr. (Roble de Santiago) y *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. (Hualle), mientras que *C. berteroi* es común en árboles maduros de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser (Hualo) y *N. obliqua*.

Aunque cada vez son más las personas que consumen digüeños en Chile, todavía se conoce poco acerca de su valor nutritivo y compuestos bioactivos que presenten actividad biológica y/o farmacológica, destacando los estudios realizados por los autores Ipinza et al., (1989) y Schmeda-Hirschmann et al., (1999, 2001) en la Región Metropolitana y Región del Maule, respectivamente. Por el contrario, en Argentina se han realizado varios trabajos examinando ejemplares del género *Cyttaria*, los que han llevado a aislar y determinar la estructura de compuestos solubles en agua o solventes polares, formados por un número elevado de moléculas de azúcares simples. La composición de los polisacáridos de *C. hariotii* y *C. johowii* fue investigada por Fernández-Cirelli & Lederkremer (1974), Waksman et al., (1975) y Waksman et al., (1977). Mientras que Fernández-Cirelli et al., (1989), analizaron el efecto de los cambios estructurales sobre la acción antitumoral de los glucanos de *C. hariotii* y *C. darwinii*.

Aun así, queda mucho por investigar en términos químico-nutricionales sobre *Cyttaria* spp. y otros hongos silvestres comestibles nativos asociados a *Nothofagus*.

1.3.1. Conservación de los hongos chilenos con énfasis en *Cyttaria* spp.

Los hongos fueron ignorados en iniciativas tradicionales de conservación por mucho tiempo, principalmente, debido a la escasa información sobre su demografía, distribución y ecología. Heilmann-Clausen et al., (2014) promovieron la integración de los hongos en la biología de la conservación y gracias a esto, hoy en día existe una guía útil para la estimación de medidas clave en el proceso de evaluación de amenazas de la Unión Internacional para la Conservación (UICN). Un hito significativo para contribuir a la conservación de los hongos, ha sido la reciente incorporación de las primeras 100 especies de hongos a la Lista Roja Global de Especies Amenazadas de la UICN (Mueller, 2017).

Actualmente, en nuestro país contamos con colecciones biológicas conocidas como fungarios que pertenecen a distintas instituciones y que tienen como finalidad la conservación de los hongos, ya que permiten proteger su diversidad, conocer la composición de especies de un ecosistema o cambios en sus poblaciones a través del tiempo y espacio, así como también, permite comparar sus características para una adecuada determinación taxonómica.

La clasificación del estado de conservación de especies en Chile está a cargo del Ministerio del Medio Ambiente (MMA), a través del Reglamento para la Clasificación de Especies Silvestres (RCE). En el año 2013, se incorpora el Reino Fungi a la Ley 19.300 sobre Bases Generales del Medio Ambiente, por lo que desde el XI Proceso de Clasificación, los hongos se encuentran incluidos en el Inventario Nacional de Especies MMA, encontrándose actualmente 83 registros de macrohongos, de los cuales 23 son nativos y/o endémicos (Tabla 1, actualizada a julio de 2019), lo cual se vio favorecido gracias a la incorporación de los estudios de hongos en las líneas de base de proyectos en estudio por el Servicio de Evaluación Ambiental (SEA), donde la revisión y análisis sólo se centra en el estudio de los macrohongos, excluyendo los hongos inferiores. En la Tabla 1 se resaltan en color amarillo dos especies del género *Cyttaria*, *C. exigua* catalogada en Preocupación menor (LC) y *C. berteroi* catalogada En Peligro (EN).

Tabla 1. Especies nativas incluidas desde el I al XIV Proceso de Clasificación de Especies.

Espece	Categoría	Distribución nacional	Función ecológica
<i>Amanita gayana</i>	NT	VIII - X	Micorriza <i>Nothofagus</i>
<i>Amanita merxmuelleri</i>	LC	VII - XII	Micorriza <i>Nothofagus</i>
<i>Anthracoephyllum discolor</i>	LC	IV - X	Saprótrofo
<i>Boletus loyo</i>	EN	VII - XIV	Micorriza <i>Nothofagus</i>
<i>Bondarzewia guaitecasensis</i>	LC	IX - XI	Parásito <i>Nothofagus</i>
<i>Clitocybula dusenii</i>	LC	VIII - XII	Saprótrofo
<i>Cordyceps cuncunae</i>	DD	IX-XIV-X	Parásito de larvas
<i>Cortinarius magellanicus</i>	LC	VII - XII	Micorriza <i>Nothofagus</i>
<i>Cyttaria berteroi</i>	EN, LC	V - X	Parásito <i>Nothofagus</i>
<i>Cyttaria exigua</i>	LC	XI - XII	Parásito <i>Nothofagus</i>
<i>Dermocybe nahuelbutensis</i>	NT	VII - XIV	Micorriza <i>Nothofagus</i>
<i>Descolea antarctica</i>	LC	RM - XII	Micorriza <i>Nothofagus</i>
<i>Entoloma necopinatum</i>	VU	IX - X	Saprótrofo
<i>Gastroboletus valdivianus</i>	EN	VIII - XIV	Micorriza <i>Nothofagus</i>
<i>Gautieria inapire</i>	VU	X	Micorriza <i>Nothofagus</i>
<i>Hygrocybe striatella</i>	VU	VI - XIV	Saprótrofo
<i>Hygrophorus nothofagi</i>	EN	VII, VIII, IX, XIV	Micorriza <i>Nothofagus</i>
<i>Lepiota trongolei</i>	NT	VIII - X	Saprótrofo
<i>Mycena subulifera</i>	NT	VIII - X	Saprótrofo
<i>Porpoloma sejunctum</i>	LC	VII - XII	Micorriza <i>Nothofagus</i>
<i>Russula austrodelica</i>	VU	VII - XIV	Micorriza <i>Nothofagus</i>
<i>Russula fuegiana</i>	LC	VII - XII	Micorriza <i>Nothofagus</i>
<i>Thaxterogaster albocanus</i>	NT	VII - XII	Micorriza <i>Nothofagus</i>

Fuente: Elaboración propia basada en información obtenida de la página web del MMA.

Las especies de hongos nativos que se encuentran en nuestro país están amenazadas, tanto por problemas globales como el cambio climático, y/o regionales, como los cambios en el uso de suelo, los incendios y la pérdida de vegetación nativa (Petit et al., 2018), lo que conlleva un problema para estudiar estos organismos y, al mismo tiempo, para ayudar a conservar las especies de interés, que incluyen hongos silvestres comestibles que aún continúan siendo parte de la dieta de algunos pueblos originarios ligados a los bosques templados lluviosos del centro y sur de Chile (Toledo et al., 2014; Cortés et al., 2017). Existen hongos comestibles asociados a bosques de *Nothofagus* spp., ya sean ectomicorrícicos o parásitos, dentro de los que podemos encontrar a: *Boletus loyo* (Loyo), *Boletus loyita* (Pichi Loyo), *Ramaria* spp. (Changles),

Fistulina antarctica (Lengua de vaca), *Grifola gargal* (Gargal) y *Cyttaria* spp. (Digüeñes). En este último caso, se sabe que *C. berteroi* se encuentra catalogada EN, siendo sus principales amenazas actuales la restricción de su distribución a la zona central y centro-sur, la tala del bosque nativo dominado por *Nothofagus* spp. y la sobreexplotación de este PFNM, debido al aumento de su recolección para venta y/o consumo, lo que podría extrapolarse a otras especies del género, especialmente, a *C. espinosae* por ser una de las más consumidas.

Es necesario promover la conservación y valorizar nuestros hongos comestibles, ya que tienen gran importancia como fuente de nutrientes y compuestos bioactivos. Los efectos beneficiosos que tienen los hongos sobre la salud humana han llevado a que éstos sean considerados como alimentos funcionales que se definen como: “Aquellos alimentos que además de aportar nutrientes, pueden influir de forma específica y positiva sobre ciertas funciones biológicas, mejorando nuestro estado general de salud y/o reduciendo el riesgo de padecer ciertas enfermedades” (Rodríguez et al., 2006).



1.3.2. Descripción de las especies consideradas en este estudio

Es importante reconocer las características distintivas de los hongos comestibles, esto se logra observando sus características externas y microscópicas. Todas las especies de *Cyttaria* presentes en nuestro país son comestibles, pero a continuación sólo se describen macro y microscópicamente las especies más consumidas en Chile, considerando las descripciones realizadas por Gamundí (1971) y observaciones personales sobre su ecología, fructificación y comestibilidad.

Cyttaria berteroi Berk, comúnmente se conoce como Pinatra o Curacucha (Figura 3), posee estromas maduros gelatinosos, turbinados e irregularmente globosos, de gran tamaño, 2,5-12 cm de diámetro, con apotecios separados de boca pequeña irregularmente circular o poligonal, con un borde reflexo, delimitados superficialmente por valéculas; sólidos o con cavidades irregulares y venas opacas, ramificadas irregularmente; sin espermogonios. De color amarillento a anaranjado en fresco y de color ferruginoso en estado seco.

Presenta apotecios urceolados, dispersos y escasos, de 4-7 mm de profundidad, 7-12 mm de diámetro, con himenio anaranjado vivo en fresco, debido a un pigmento lipóide que contienen las paráfisis y los ascos, siendo éstos 8-esporados, claviformes, inoperculados, adelgazándose hacia abajo para terminar en un pie bifurcado, con cilindro apical amiloide, ascosporas uniseriadas, cuando jóvenes subglobosas a elipsoides, al madurar más o menos cúbicas al interior del asco, irregularmente globosas a subpoliédricas al ser liberadas, quedando ocasionalmente adheridas unas con otras, con contenido granuloso y glóbulos amarillentos, episporio castaño, grueso y liso, de 11-19 μm en diámetro.

Se desarrolla sobre ramas de *N. macrocarpa*, *N. obliqua* y *N. glauca*, fructificando durante la primavera, entre los meses de octubre y noviembre; con una distribución restringida desde la zona central hasta Valdivia. Sus estromas maduros son grandes, con una consistencia carnosa, elástica y levemente acuosa. Con un olor y sabor levemente dulce. Suelen ser muy codiciadas y cada vez menos frecuentes en el bosque, siendo una especie catalogada En Peligro (EN) para la Región de Valparaíso y Región Metropolitana, principalmente por tala de bosque nativo.

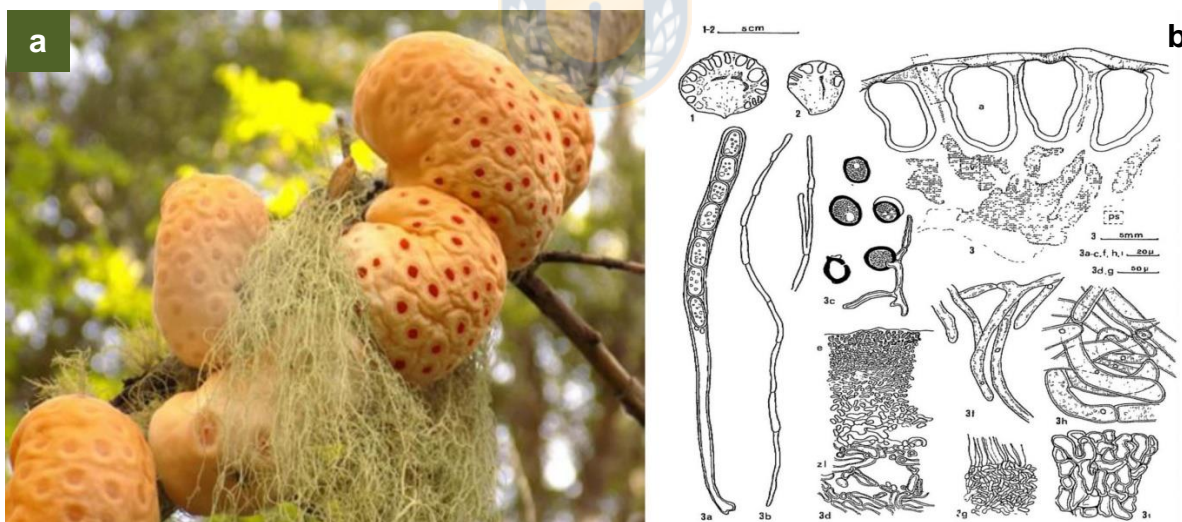


Figura 3. a) Estromas de *Cyttaria berteroi* creciendo sobre una rama de *N. obliqua*; b) Representación de estructuras microscópicas de *C. berteroi* (Gamundí, 1971, ver Anexo 1).

Cyttaria espinosae Lloyd, comúnmente se denomina Digüeño, Quireño, etc. (Figura 4), sus estromas maduros carnosos, globosos, con apotecios muy cercanos entre sí, de boca diagonal, separados por tabiques muy delgados; con base estéril blanca, hueco en la madurez y con endostroma de consistencia corchosa, de 1,5-5 cm de diámetro; se desarrollan sobre tumores globosos; con espermogonios abortados. De color amarillo-anaranjado a anaranjado intenso en los dos tercios superiores cuando joven y de un color anaranjado-ocráceo cuando maduro. Presenta apotecios prismáticos a piramidales, de 3-5 mm de diámetro y 4-6 mm de profundidad, con el himenio de color anaranjado y aspecto aterciopelado; ascos 8-esporados, cilíndricos, paráfisis pluriseptadas, bifurcadas, ápice algo ensanchado, conteniendo muchas gúttulas; paráfisis apicales robustas, cilíndricas, en empalizada laxa; ascosporas subglobosas, lisas, ocráceas a fumosas, de paredes delgadas y conteniendo muchas gúttulas, 11-14 μm de diámetro;

Crece sobre las ramas de *N. macrocarpa*, *N. obliqua*, *N. glauca* y *Nothofagus alpina* (Poepp. & Endl.) Oerst. Fructifica durante la primavera, entre los meses de septiembre y noviembre, con una distribución restringida a la zona centro-sur. Sus estromas maduros, tienen una consistencia carnosa, blanda, algo seca y elástica. Olor y sabor agradable, no característico. Su recolección se ha mantenido en el transcurso del tiempo, aumentando drásticamente en los últimos años. Esta especie es la más consumida a nivel nacional a lo largo de toda su distribución geográfica, siendo su principal amenaza la sustitución de bosque nativo por plantaciones forestales y la sobreexplotación como Producto Forestal No Maderero (PFNM).

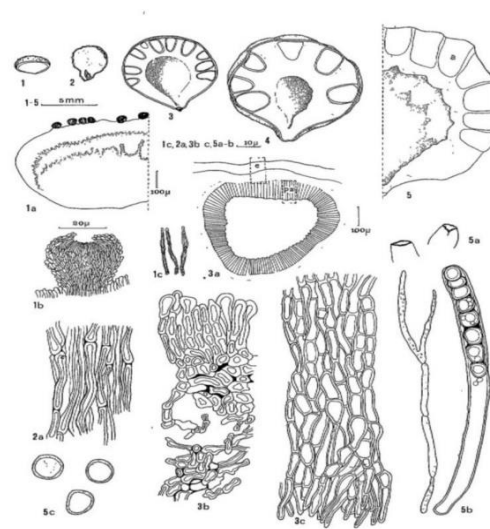
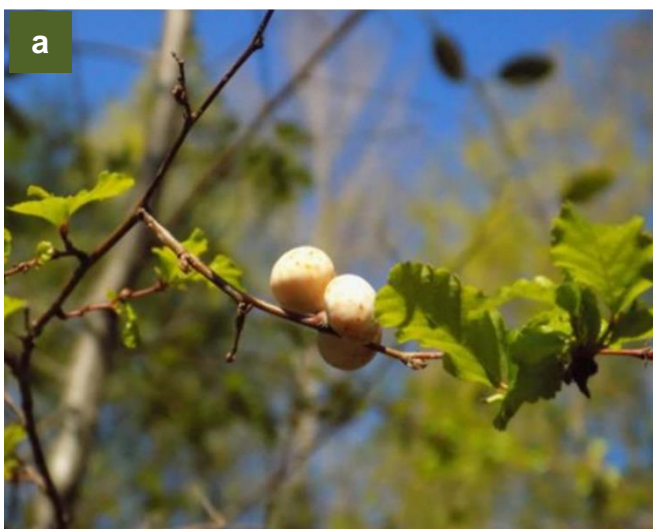


Figura 4. a) Estromas de *Cyttaria espinosae* creciendo sobre una rama de *Nothofagus obliqua* juvenil; b) Representación de estructuras microscópicas de *C. espinosae* (Gamundí, 1971, ver Anexo 2).

Cytaria hariotii E. Fisch, recibe el nombre común de Llao Llao o Digüeñe del Coihue (Figura 5), presenta estromas maduros subglobosos con una base cónica, de 2-4,5 cm de diámetro; con apotecios contiguos, separados por valéculas profundas, huecos en la columela; estromas inmaduros amarillo-anaranjados y amarillo-ambarinos cuando maduros, diluyéndose hacia la base, con venación irregular; espermogonios superficiales, sobresalientes. De consistencia gelatinosa en estado fresco y córnea en seco.

Presenta apotecios caliciformes, de 5-7 mm de profundidad, 3-8 mm de diámetro en la parte media y 2-5 mm de diámetro en la boca, con himenio de color anaranjado intenso, constituido por ascos cilíndricos, 8-esporados, achatados en el ápice, con un poro apical amiloide en estado inmaduro, con ápice desgarrado cuando dehiscentes; paráfisis simples, pluriseptadas, catenuladas, conteniendo gránulos amarillentos; ascosporas uniseriadas, unicelulares, subglobosas, pero a veces poliédricas debido a la presión mutua que existe al interior del asco, con episporio grueso y áspero, ocre-oliváceo, tamaño variable 12-15 μm de diámetro.

Se desarrolla sobre ramas y troncos de *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst., *Nothofagus antarctica* (G.Forst.) Oerst., *Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser, *Nothofagus betuloides* (Mirb.) Oerst. y *Nothofagus nitida* (Phil.) Krasser. Produce estromas durante primavera y verano, entre los meses de noviembre y enero; con una distribución desde la zona centro-sur hasta la Patagonia. Sus estromas maduros tienen consistencia sabrosa, elástica y acuosa. Con un olor agradable, similar al durazno y sabor agradable. Suelen consumirse en poca cantidad, ya que fermentan rápidamente, por lo que son utilizados para preparar una bebida alcohólica (chicha).



Figura 5. a) Estromas de *Cyttaria hariatii* creciendo sobre una rama de *Nothofagus dombeyi*; b) Representación de estructuras microscópicas de *C. hariatii* (Gamundí, 1971, ver Anexo 3).

1.4. Aporte nutricional de los hongos comestibles

Los hongos silvestres han sido parte de la dieta humana durante varios siglos, esto se debe a sus características nutricionales y organolépticas: sabor, textura y olor (Román et al., 2006). Nutricionalmente hablando los hongos son bajos en grasas, pero presentan un alto contenido en proteínas, carbohidratos, fibra dietética, vitaminas y minerales (Crisan & Sands, 1978).

Además de ser reconocidos como un alimento nutritivo, ciertos hongos también son una fuente importante de compuestos biológicamente activos con potencial medicinal, éstos incluyen: compuestos fenólicos, esteroides y triterpenos (Wasser, 2010).

Como se muestra en la Figura 6, el índice nutricional de algunas setas está basado en el contenido relativo de aminoácidos esenciales que nos muestra de forma intuitiva la calidad proteica de un alimento, siendo levemente inferior al de la carne y comparable al de la leche y algunas legumbres.



Figura 6. Comparación del índice nutricional de diferentes alimentos con el índice nutricional de hongos comestibles (Fuente: Boa, 2004).

Cuando se estudian los componentes nutricionales siempre debe tenerse en cuenta si se está hablando en peso seco o peso fresco, pues la cantidad de humedad de los hongos varía dependiendo la especie o el estado de desarrollo (Albertó, 2008). En general, el contenido de proteína cruda de hongos comestibles varía mucho y oscila entre el 15% y el 35% de peso seco dependiendo de la especie, variedades y etapa de desarrollo del cuerpo fructífero (Crisan & Sands 1978; Longvah & Deosthale, 1998; Manzi et al., 1999; Díez & Álvarez, 2001; Mdachi et al., 2003).

De acuerdo a la FAO (1991), la calidad de la proteína de los hongos es mejor que la mayoría de las proteínas vegetales, esto se debe a que las proteínas de los hongos son relativamente ricas en aminoácidos (Tabla 2) como: treonina (41-95 mg/g de proteína en peso seco), valina (36-89 mg/g de proteína en peso seco), ácido glutámico (130-240 mg/g de proteína en peso seco), ácido aspártico (91-120 mg/g de proteína peso seco) y arginina (37-140 mg/g proteína en peso seco), pero suelen ser pobres en metionina (1.2-22 mg/g proteína en peso seco) y cisteína (16-19 mg/g de proteína en peso seco). También se ha informado que la lisina, leucina, isoleucina y el triptófano suelen ser los aminoácidos limitantes en algunos hongos comestibles (Cheung, 1997; Manzi et al., 1999; Díez & Alvarez, 2001).

Tabla 2. Proporción de aminoácidos esenciales en mg/g peso seco en algunas especies de hongos comestibles.

Aminoácidos ¹	<i>B. edulis</i>	<i>C. gambosa</i>	<i>C. cibarius</i>	<i>P. ostreatus</i>
Ile	0,12	nd ²	nd	nd
Leu	0,47	0,45	0,21	0,02
Lys	5,46	4,19	5,74	4,65
Met	0,74	1,01	0,41	0,12
Phe	0,19	0,08	0,06	0,09
Thr	9,14	5,71	8,98	6,99
Trp	0,03	0,09	0,02	0,01
Val	1,41	1,27	1,34	1,21

¹Ile, L-Isoleucina; Leu, L-Leucina; Lys, L-Lisina; Met, L-Metionina; Phe, L-Fenilalanina; Thr, L-Treonina; Trp, L-Triptofano; Val, L-Valina; ²No detectado; Fuente: Beluhan & Ranogajec (2011).

Los hongos comestibles generalmente son bajos en lípidos (menos del 5% en peso seco), en especial, su perfil de ácidos grasos insaturados. En general, los ácidos grasos más abundantes en hongos son el ácido oleico y linoleico (688-840 mg/g de lípido en peso seco), sin embargo, hay especies ricas en otro tipo de ácidos grasos, como es el caso de *Cantharellus cibarius*, que presenta un elevado porcentaje del ácido graso insaturado gadoleico (Tabla 3) (Cheung, 1997; Longvah & Deosthale, 1998; Díez & Álvarez, 2001; Yang et al., 2002). Respecto al ácido linoleico, este es un ácido graso esencial para el ser humano y tiene una gran importancia en la síntesis de compuestos orgánicos volátiles responsables del característico olor a seta (Combet et al., 2006).

Tabla 3. Composición en ácidos grasos (%) de algunas especies de hongos comestibles.

Ácidos grasos	<i>B. edulis</i>	<i>L. deliciosus</i>	<i>C. gambosa</i>	<i>C. cibarius</i>	<i>P. ostreatus</i>
C14:0 Mirístico	0,15-0,18	0,17-0,48	0,40	0,09-0,13	0,66
C16:0 Palmítico	9,84-10,03	5,4-12,08	13,57-15,16	7,19-13,08	12,4
C16:1 Palmitoleico	0,53-2,01	0,18-0,92	0,65-0,88	0,2-0,49	0,46
C18:0 Esteárico	2,75	25,33-51,29	2,14-3,24	3,34-6,49	3,71
C18:1 Oleico	36,1-39,72	12,51-41,26	18,1-32,54	8,13-10,78	10,36
C18:2 Linoleico	42,2-44,32	17,06-23,19	43,88-57,75	50,01-53,59	65,29
C18:3 Linolénico	0,07-0,17	0,26-0,41	0,45-0,93	0,08-0,1	0,03
C20:0 Araquidónico	0,34-0,44	0,18-0,44	0,33-0,47	0,18-0,31	0,13
C20:1 Gadoleico	0,49-0,68	0,03-0,1	0,13	11,48-27,98	0,11

Fuente: Barros et al., (2007, 2008); Pedneault et al., (2006); Ergonul et al., (2013); Chye et al., (2008).

En cuanto al contenido total de carbohidratos presentes en los champiñones, incluyendo carbohidratos digeribles y no digeribles, éste varía con las especies, teniendo un valor que va desde el 35% al 70% PS (Longvah & Deosthale, 1998; Díez & Álvarez, 2001; Mau et al., 2001). Los carbohidratos digeribles más abundantes en hongos son el manitol (Vaz et al., 2011), la glucosa (Kim et al., 2009) y el glucógeno (Díez & Álvarez, 2001). Los no digeribles se encuentran en mayor proporción e incluyen oligosacáridos como la trealosa y polisacáridos como la quitina, β -glucanos, mananos y otros heteropolisacáridos.

Algunos estudios comparativos entre especies, muestran a *Lentinula edodes* como la más rica en carbohidratos (17,62 g/100 g de materia seca) y azúcares simples, frente a otras especies como el champiñón común *Agaricus bisporus* (5,98 g/100 g de materia seca) (Reis et al., 2012). Existe una gran variación en el contenido de fibra dietética de los champiñones, dependiendo de su morfología y la especie (Cheung, 1997; Díez & Álvarez, 2001). Según algunos estudios los hongos son una buena fuente de fibra dietética, teniendo mayor cantidad de fibra insoluble que de soluble (Manzi et al., 2004). Los hongos que mayor porcentaje de fibra total presentan son *A. bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Cyclocybe aegerita* (Manzi et al., 1999, 2004).

Existe poca información sobre el contenido de vitaminas disponible en los hongos en estado silvestre, pero se ha observado que algunos hongos comestibles cultivados contienen varias vitaminas, incluyendo riboflavina (vitamina B2), niacina y folatos en concentraciones que dependen de la especie y varían dentro del rango de 1.8-5.1, 31-65 y 0.30-0.64 mg/100 g PS, respectivamente (Mattila et al., 2001).

También existe presencia de pequeñas cantidades de vitamina C, pero la vitamina D está casi completamente ausente en hongos comestibles cultivados por la baja exposición solar; sin embargo, los niveles de ergosterol y ergocalciferol son relativamente altos (400-600 mg/100 g PS) lo que es importante, ya que éstos pueden ser convertidos en vitamina D en presencia de la luz solar (Mattila et al., 2002).

Respecto al contenido de minerales, éste varía entre 6 y 11% según la especie de hongo, por ejemplo, *L. edodes* (Shiitake) 5,9%, *P. ostreatus* (Champiñón ostra) presenta un 6,9%, *Pleurotus eryngii* (Seta cardo) 8,6% y *Hericium erinaceus* (Melena de león) 9,4%. Entonces comparados con los vegetales, los hongos contienen una cantidad aceptable de minerales, siendo los macroelementos que más abundan en los hongos cultivados: calcio, fósforo, potasio y magnesio; y los microelementos: cobre, selenio, hierro y cinc (Manzi et al., 1999).

Lo descrito anteriormente, adquiere gran relevancia si consideramos que los hongos silvestres comestibles no sólo son una buena fuente de nutrición, aminoácidos, vitaminas y minerales, sino que también, algunos tienen potencial medicinal, debido a los compuestos bioactivos que contienen.

1.5. Compuestos bioactivos presentes en los hongos comestibles

El uso medicinal de los hongos tiene una larga historia en Oriente -China y Japón- donde hace miles de años existe una tradición de comer hongos por el conocimiento heredado de que su consumo es beneficioso para la salud, mientras que su uso como medicina en el Occidente es más reciente (Wasser, 2010). Mediante diversos estudios se ha podido determinar que los hongos comestibles pueden tener diferentes acciones terapéuticas, dentro de las cuales las más comunes son: efecto antitumoral, inmunomodulador, hipocolesterolémico, hepatoprotector, antidiabético, antiviral, antibacteriano y antiparasitario (Albertó, 2008).

Los hongos medicinales se caracterizan por tener materiales en la pared celular y metabolitos secundarios que tienen un rango más amplio de propiedades farmacológicamente activas en comparación con hongos que sólo son comestibles (Lindequist et al., 2005). Se han reportado propiedades bioactivas en algunos hongos que contienen polisacáridos en su pared celular, las que se han descrito como: inmunoestimulantes, antitumorales, hipoglucémicas y antioxidantes, a través de varios estudios *in vivo* e *in vitro* (Reshetnikov et al., 2001; Wasser, 2002; Zhang et al., 2007; Cheung, 2008). Los péptido-polisacáridos son considerados compuestos inmunomoduladores y se han utilizado clínicamente como terapia coadyuvante para tratar tumores con diferentes grados de éxito en la prolongación del tiempo de supervivencia de pacientes

con cáncer (Taguchi et al., 1982; Mitomi et al., 1992; Kodama et al., 2002). Se ha demostrado que en el caso del champiñón, los polisacáridos que contienen poseen actividad antitumoral directa contra varios tumores y además previenen la metástasis del tumor, pudiendo evitar la oncogénesis e incrementar su actividad cuando se utiliza en conjunto con la quimioterapia (Hazama et al., 1995).

El lentinan es uno de los β -glucanos más utilizados en la industria farmacéutica, con probada actividad antitumoral e inmunomoduladora (Zhang et al., 2011). Además, se ha comprobado que la administración de lentinan durante el tratamiento con quimioterapia incrementa la calidad de vida en pacientes con cáncer de estómago, de colon y otro tipo de carcinoma en comparación con aquellos pacientes que sólo se tratan con quimioterapia (Zhu et al., 2007).

Otro conocido polisacárido con actividad inmunomoduladora es el grifolan, aislado a partir del hongo *Grifola frondosa* y que podría estar presente en la especie nativa *G. gargal*. Por otra parte, se ha demostrado que los polisacáridos de la pared celular de algunos hongos tienen radicales libres con actividad *in vitro* (hidroxilo y superóxido) que pueden tener el potencial suficiente para desarrollarse como antioxidantes (Liu et al., 1997).

Investigaciones sobre hongos como fuentes naturales de antioxidantes, han aumentado en el último tiempo, particularmente, dilucidando la correlación entre sus compuestos fenólicos y sus propiedades antioxidantes *in vitro*, (Cheung et al., 2003; Cheung & Cheung, 2005; Ferreira et al., 2009; Vidovic et al., 2010), lo que hace pensar que estos compuestos sí tienen capacidad antioxidante y merecen ser estudiados.

Entre las sustancias biológicamente activas presentes en los hongos, los compuestos fenólicos han atraído la atención debido a sus excelentes propiedades antioxidantes, antiinflamatorias o antitumorales (Puttaraju et al., 2006). Esto se debe a que el estudio de la actividad antioxidante es importante, ya que ésta ayuda a combatir los radicales libres que dañan nuestro cuerpo y provocan gran parte de las enfermedades que ocasionan la muerte o deterioran la calidad de vida de las personas (Youngson, 2004).

Los compuestos fenólicos poseen una fuerte actividad antioxidante, lo que ha sido demostrado en numerosos trabajos, principalmente *in vitro*, desde extractos acuosos y metanólicos de hongos comestibles (Mau et al., 2001, Heleno et al., 2012). Igualmente, existen estudios que demuestran la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos que han sido obtenidos a partir de diferentes especies del género *Lactarius* (Barros et al., 2007).

En vista que muchas especies de hongos aún no se han estudiado en nuestro país, dadas las condiciones geográficas que favorecen la presencia de especies nativas y endémicas, se vuelve necesario realizar más investigaciones para descubrir los beneficios que estos organismos pueden tener para nuestra salud, los que no sólo deben basarse en compuestos que sean un buen aporte nutricional para nuestra dieta, sino también, en elementos y productos naturales que permitan tratar enfermedades degenerativas.

1.6. Potencial medicinal de los hongos comestibles

A lo largo de la historia, miles de especies de plantas y hongos han sido utilizados con fines alimenticios y medicinales. Esto no sólo implica un aporte nutricional, sino también el ingreso al organismo de compuestos que influyen en nuestra salud (Schmeda-Hirschmann et al., 1999). La relación que existe entre la alimentación y sus compuestos farmacológicamente activos es un elemento comúnmente olvidado en estudios realizados sobre productos naturales (Etkin & Ross, 1991); sin embargo, se ha comprobado que estar expuestos a constituyentes nutritivos de plantas y hongos, incide en la salud de los consumidores.

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo que cobra más de 6 millones de vidas cada año (Siegel et al., 2018). En este sentido, los hongos están siendo evaluados no sólo de manera nutricional, sino también farmacológicamente, pues al ser considerados un alimento funcional nutricional son al mismo tiempo fuente de medicinas fisiológicamente beneficiosas sin efectos colaterales negativos (Mshigeni & Chang, 2017). Hoy en día, además de combatir enfermedades como el cáncer, es necesario prevenir su aparición, por lo que los compuestos biológicamente activos provenientes de los hongos cobran gran importancia. Es fundamental estudiar hongos descritos como comestibles, que además de ayudar a una buena alimentación,

ayuden a potenciar nuestro sistema inmune. Los polisacáridos de los hongos actúan como inmunomoduladores, activando diferentes respuestas inmunes en el hospedero.

La mayor parte de las investigaciones relacionadas con el género *Cyttaria* en Chile y otros países, está referida a su taxonomía, evolución y ecología (Espinosa, 1926; Marchionatto, 1940; Rawlings, 1956; Gamundí, 1971; Ipinza et al., 1989; Peterson et al., 2010). Existen estudios previos sobre la composición químico-nutricional de *Cyttaria* spp. realizados por los autores Schmeda-Hirschmann et al., (1999, 2001) con especies recolectadas en su mayoría en la Región del Maule, zona central de Chile, donde se investigó la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana, antiproliferativa y antitumoral; sin embargo, en este estudio no se da a conocer cuál especie de *Cyttaria* presenta una mejor composición nutricional y/o mejor potencial medicinal, ya sea por su capacidad antioxidante o efecto citotóxico.

En esta investigación, se determinará la composición nutricional, capacidad antioxidante y actividad citotóxica de las especies de *Cyttaria* más consumidas en Chile. Para lo anterior, se comparará la capacidad antioxidante de las *C. espinosae* y *C. hariatii* y; conjuntamente, se contrastará el efecto citotóxico de los polisacáridos extraídos a partir *C. berteroi* y *C. hariatii* en distintas líneas celulares tumorales: HCT-116 correspondiente a cáncer de colon, U-937 a leucemia humana y MCF-7 a cáncer de mama. De este modo, se proyecta aportar a la investigación de estos hongos silvestres comestibles para conocer los compuestos químicos-nutricionales con potencial medicinal que éstos poseen, buscando su conocimiento, valoración y conservación como PFNM.

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

2.1.1. Hipótesis 1

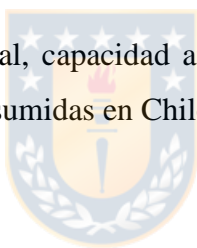
Las especies de los hongos comestibles *C. espinosae* y *C. hariatii* presentan diferencias en la composición nutricional, relacionadas con su contenido proteico y su capacidad antioxidante.

2.1.2. Hipótesis 2

Los polisacáridos de las especies de hongos comestibles *C. hariatii* y *C. berteroi* presentan actividad citotóxica diferenciada en líneas tumorales de leucemia, cáncer de colon y mama.

2.2. Objetivo general

Determinar la composición nutricional, capacidad antioxidante y actividad citotóxica de las especies del género *Cyttaria* más consumidas en Chile.



2.3. Objetivo específicos:

- Determinar y comparar la composición nutricional de las especies *C. espinosae* y *C. hariatii* que crecen en nuestro país.
- Evaluar y comparar la cantidad de polifenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de *C. espinosae* y *C. hariatii*.
- Evaluar y comparar la actividad citotóxica de los polisacáridos de *C. berteroi* y *C. hariatii* en líneas tumorales de leucemia, cáncer colon y mama.

III. METODOLOGIA

3.1. Recolección, documentación *in situ* y determinación de *Cyttaria* spp.

El trabajo en terreno se realizó durante las estaciones de primavera y verano a fines del año 2018 (en los meses de septiembre, octubre, noviembre y diciembre) en cuatro localidades de Chile: Cerro El Roble, Vilches Alto, Palos Quemados y Cochrane (Tabla 4).

Tabla 4. Información sobre la recolección de muestras de *Cyttaria* spp. para este estudio.

Localidad	Región	<i>Cyttaria</i> spp.	<i>Nothofagus</i> spp.
Cerro El Roble	Metropolitana	<i>C. espinosae</i>	<i>N. macrocarpa</i>
Vilches Alto	Maule	<i>C. hariotii</i>	<i>N. dombeyi</i>
Palos Quemados	Biobío	<i>C. espinosae</i>	<i>N. obliqua</i>
Palos Quemados	Biobío	<i>C. berteroi</i>	<i>N. obliqua</i>
Cochrane	Aysén	<i>C. hariotii</i>	<i>N. antarctica</i>

Fuente: Elaboración propia.

En todos los sectores donde se recolectó muestras de *Cyttaria* se presentó una dominancia arbórea de *Nothofagus* spp. (de norte a sur: *N. macrocarpa*, *N. dombeyi*, *N. obliqua* y *N. antarctica*).

Los estromas de *Cyttaria* spp. recolectados, fueron procesados de acuerdo a la metodología descrita por Rossman et al., (1998). Los caracteres macroscópicos de los estromas fueron observados y documentados en campo con fotografías *in situ* a color realizadas con una cámara réflex modelo Canon T6 y en laboratorio bajo una lupa estereoscópica.

La determinación taxonómica de los especímenes recolectados, se realizó observando los caracteres microscópicos bajo un microscopio óptico trinocular AmScope modelo T670B sobre secciones de material fresco y/o rehidratado, montado en agua, KOH al 5%, floxina y reactivo de Melzer, utilizando como bibliografía base publicaciones relevantes, tales como: Espinosa (1926), Marchionatto (1940) y Gamundí (1971), entre otros. Las muestras de cada especie se depositaron en el Fungario de ONG Micófilos (MICOCL).

3.2. Liofilización de los estromas recolectados

Una vez recolectados los estromas de *Cyttaria* spp. fueron rotulados y guardados en un congelador a una temperatura de -20°C . Luego, fueron liofilizados por 36 horas en un liofilizador automático de laboratorio modelo CHRIST Alpha 2-4 LO plus.

Una vez liofilizadas las muestras, fueron molidas para disminuir su tamaño de partícula y aumentar su superficie de contacto con una picadora Moulinex DP800.

3.3. Obtención de los extractos metanólicos

La obtención total de polifenoles se realizó mediante una extracción sólido/líquido asistida por baños de ultrasonido con posterior homogenización. Los extractos se prepararon en frascos de Erlenmeyer de 500 mL, para lo cual se pesó 2 g de muestra liofilizada previamente molida en una balanza analítica. Posteriormente, se añadió 100 mL de metanol por triplicado. Se realizó baños de ultrasonido a una frecuencia de 60 Hz durante un tiempo de 5 segundos con 3 repeticiones dentro de 4 ciclos con intervalos de 10 min, luego se dejó en agitación constante durante 12 h aproximadamente. Transcurrido el tiempo de agitación se aplicó nuevamente baños de ultrasonido. Finalmente, se obtuvo extractos acuosos de color anaranjado intenso y amarillo pálido.

3.4. Análisis de la composición nutricional

Se realizó un análisis químico-proximal de las muestras previamente liofilizadas, utilizando procesos estandarizados por la Association of Official Analytical Chemist (AOAC, 2012).

Se analizó parámetros, tales como: humedad, cenizas, lípidos, proteínas, fibra dietaria y carbohidratos. El porcentaje de materia seca fue determinado por el método gravimétrico. Las cenizas fueron determinadas mediante la carbonización de la muestra en un horno de incineración a 600°C .

Para determinar la grasa total se realizó una extracción continua con hexano en equipo Soxhlet. La fibra dietaria fue determinada mediante la ebullición de la muestra en hidróxido de sodio diluido, ácido clorhídrico diluido, alcohol y éter.

Finalmente, la proteína total fue determinada a través del método Kjendahl utilizando 6,25 como factor de conversión (USDA, 1931) y el porcentaje restante se consideró como carbohidratos y se obtuvo a partir de los valores promedios.

3.5. Cuantificación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu

El contenido de polifenoles totales se determinó por el método Folin-Ciocalteu de acuerdo a Magalhaes et al., (2010) con modificaciones. A 250 μL de una solución 100 $\mu\text{g/mL}$ de los extractos obtenidos con cada solvente, se añadió 250 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu al 10%, con un tiempo de reacción de 2 min a temperatura ambiente. Luego, se adicionó 250 μL de la solución saturada de Na_2CO_3 y después de 1 hora de reposo en oscuridad, se determinó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Se comparó con una curva de calibración del ácido gálico (Anexo 4) y se expresó los resultados como mg en equivalentes de ácido gálico por 100 mg de los extractos, peso seco.

3.6. Capacidad antioxidante utilizando el ensayo ABTS^{•+}

La determinación de la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de *Cyttaria* spp., se realizó utilizando el ensayo ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). El ABTS fue disuelto en agua a la concentración de 3,5 mM. La formación del cation radical (ABTS^{•+}) se produjo haciendo reaccionar el ABTS con 1,225 mM de persulfato de potasio (1:1) y manteniendo la mezcla en oscuridad y temperatura ambiente durante 12-16 horas antes de su uso. Pasado este período de tiempo, el cation radical se diluyó en etanol hasta obtener un valor de absorbancia de $0,7 \pm 0,05$ a 750 nm (Re et al., 1999). Se preparó soluciones stock (10 mg/mL) de los extractos totales de *Cyttaria* spp. con metanol y a 20 μL de cada solución, se le agregó 180 μL del radical ABTS^{•+} previamente diluido, se dejó incubando a oscuridad y temperatura ambiente durante 40 minutos y

posterior a esto, se midió la absorbancia a 750 nm. El compuesto Trolox (Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) se utilizó para construir la curva de calibración (0,39-3,2 mM) (Anexo 5) y los resultados se expresaron como capacidad antioxidante de los equivalentes de Trolox (CAET) en 100 g de extracto, peso seco. Se realizó mediciones por triplicado.

3.7. Extracción de polisacáridos totales

La extracción de polisacáridos ácidos se realizó de acuerdo al método descrito por Pagares et al., (2012) con modificaciones. Se suspendió 10 mg de muestra en 300 mL de etanol durante 12 h, para la eliminación de pigmentos. Posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos y se recolectó el precipitado. Esto se repitió hasta que el precipitado resultó incoloro. Seguidamente se re-suspendió el precipitado en 500 mL de agua destilada, se calentó hasta llegar al punto de ebullición durante 40-45 minutos con agitación constante y se dejó reposar durante 1 hora para permitir la liberación completa del polisacárido en el agua. Luego se centrifugó a 4500 rpm por 10 min a 4°C y este proceso de extracción se repitió dos veces). Posteriormente, se extrajo el sobrenadante y para reducir volumen se concentró en rotavapor.

La precipitación de polisacáridos se realizó utilizando etanol absoluto frío en la proporción 3:1 a la solución resultante del punto anterior y se mantuvo por 15 minutos a -20°C. Una vez pasado ese tiempo se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos. Finalmente, el precipitado de polisacáridos se almacenó a -20°C hasta su purificación. El precipitado obtenido se purificó utilizando una solución 4 M de NaCl. Una vez frío, se precipitó con etanol 96% v/v y se centrifugó durante 7 min más a 4.000 rpm. La purificación se realizó como mínimo dos veces obteniéndose un precipitado color blanquecino. Posteriormente, el polisacárido se dializó utilizando membranas de diálisis (Sigma), una solución de NaCl 4 M durante 4 h y en constante agitación, favoreciendo el intercambio iónico. Transcurridas las 4 h se procedió al vaciado de la membrana, el contenido se precipitó con etanol al 96% y centrifugado durante 7 minutos a 4.000 rpm. El polisacárido obtenido fue congelado y liofilizado durante 24-48 horas e introducido en viales para su posterior utilización.

3.8. Ensayo de citotoxicidad y determinación de la actividad antitumoral

El ensayo de citotoxicidad se realizó de acuerdo a Abdala-Díaz et al., (2019), utilizando las líneas tumorales: HCT-116 correspondiente a cáncer de colon humano, U-937 a leucemia humana y la MCF-7 a cáncer de mama. Las líneas tumorales se mantuvieron con medio DMEM, antibiótico/antimicótico, L-glutamina, suero fetal bovino al 5% e incubado 37°C en 5% de CO₂.

En una placa de 96 pozos de 4.0 x 10⁵ células/pozo, se agregó 100 µL de las muestras (compuesto en concentraciones de 1200 µg/mL en DMSO 10% v/v, en dilución seriada hasta 37.5 µg/mL) y se mantuvo en iguales condiciones de suplementos e incubación por 48 horas, al cabo de este tiempo se realizó un conteo del número de células viables, por exclusión con azul Tripán. En cada caso se determinó la concentración citotóxica media (CC₅₀), concentración que reduce el número de células viables al 50%. Como control negativo se utilizó el cultivo celular sin adición de la muestra, al cual también se le hizo un conteo celular como punto de comparación del crecimiento logarítmico a las 48 horas. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

La citotoxicidad y actividad anticancerígena de las muestras *C. berteroi* y *C. hariatii* se realizó mediante el recuento de las células viables 48 horas después de la adición de las muestras en las concentraciones desde 1200 µg/mL hasta 37.5 µg/mL. El porcentaje de células viables se calculó a partir del valor medio del recuento de los cultivos tratados con cada concentración de las muestras con respecto al control, que es el 100% de viabilidad.

3.9. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos acerca de la composición nutricional y capacidad citotóxica, de *Cyttaria* spp., fueron expresados como media +/- desviación estándar y sometidos a análisis de la varianza de una vía (ANOVA, Sokal and Rohlf, 2013). Cuando el ANOVA detectó diferencias significativas entre los valores, las medias se compararon usando el test de Tukey HSD (p<0,05). Para el desarrollo de análisis se utilizó el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

IV. RESULTADOS

4.1. Composición nutricional de *Cyttaria* spp.

En la Tabla 5 muestran las propiedades químico-nutricionales que aportan distintas especies de *Cyttaria* en base a g/100g en peso seco. Se observó que el contenido de proteínas fue mayor en las muestras de *C. espinosae* (Ce1, Ce2 y Ce3), llegando a ser hasta cuatro veces mayor que en la especie *C. hariotti*. Por otra parte, si bien las muestras de *C. hariotti* (Ch1, Ch2 y Ch3) no resultaron ricas en proteínas y presentaron un menor contenido de lípidos, hasta tres veces menos que el mayor valor registrado para este parámetro en *C. espinosae*, exhibieron un mayor contenido de carbohidratos, aproximadamente el doble que *C. espinosae*. El promedio del porcentaje de fibra dietaria para ambas especies estudiadas fue similar, con un valor aproximado de 4% para *C. espinosae* y 3% para *C. hariotti*.

Tabla 5. Análisis nutricional de las especies de *Cyttaria* consideradas en este estudio (g/100 g en peso seco) en % de humedad, cenizas, grasa, proteína, fibra e hidratos de carbono (n = 3).

Muestra	% Humedad	% Cenizas	% Lípidos	% Proteína	% Fibra	% HC
Ce1	17,6 ± 0,3	5,2 ± 0,2	4,5 ± 0,0	14,4 ± 0,3	3,0 ± 0,4	55,3
Ce2	4,3 ± 0,0	4,4 ± 0,1	3,9 ± 0,0	20,9 ± 0,1	1,6 ± 0,1	64,9
Ce3	8,6 ± 0,1	4,8 ± 0,0	4,4 ± 0,0	24,5 ± 0,2	7,7 ± 0,1	49,9
Ch1	3,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	3,6 ± 0,0	3,1 ± 0,2	87,2
Ch2	5,9 ± 0,0	2,2 ± 0,0	1,4 ± 0,1	4,4 ± 0,0	2,7 ± 0,3	83,4
Ch3	4,5 ± 0,2	2,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	4,3 ± 0,1	2,9 ± 0,3	85,3

Valores expresados en porcentaje de peso seco.

4.2. Determinación de polifenoles totales de *Cyttaria* spp. por ensayo Folin-Ciocalteu

Se analizó extractos de *Cyttaria* spp. por medio del ensayo Folin-Ciocalteu para cuantificar polifenoles totales desde los extractos metanólicos al 100% por extracción sólido/líquido, asistido por baños de ultrasonido y con posterior homogenización. En la Figura 7, se observa que los extractos de *C. espinosae* presentaron un mayor contenido en mg/g de equivalentes de ácido gálico en peso seco, lo que se asocia a un mayor contenido de compuestos fenólicos,

siendo este valor para Ce2 fue cercana a 1,4 mg/g de equivalentes de ácido gálico, mientras que Ce1 y Ce3 mostraron un valor igual a los 0,88 mg/g y 0,94 mg/g de equivalentes de ácido gálico. Por otra parte, los extractos de *C. hariatii* mostraron un bajo contenido de compuestos fenólicos, el mayor valor fue para Ch2 con 0,64 mg/g de equivalentes de ácido gálico y para Ch1 y Ch3, 0,55 y 0,48 mg/g de equivalentes de ácido gálico, respectivamente. La diferencia entre el mayor (Ce2) y el menor valor obtenido en este ensayo (Ch3) fue de 0,92 mg/g de equivalentes de ácido gálico, por lo tanto, los extractos de *C. espinosae* duplicaron la cantidad de compuestos fenólicos que exhibieron los extractos de *C. hariatii*.

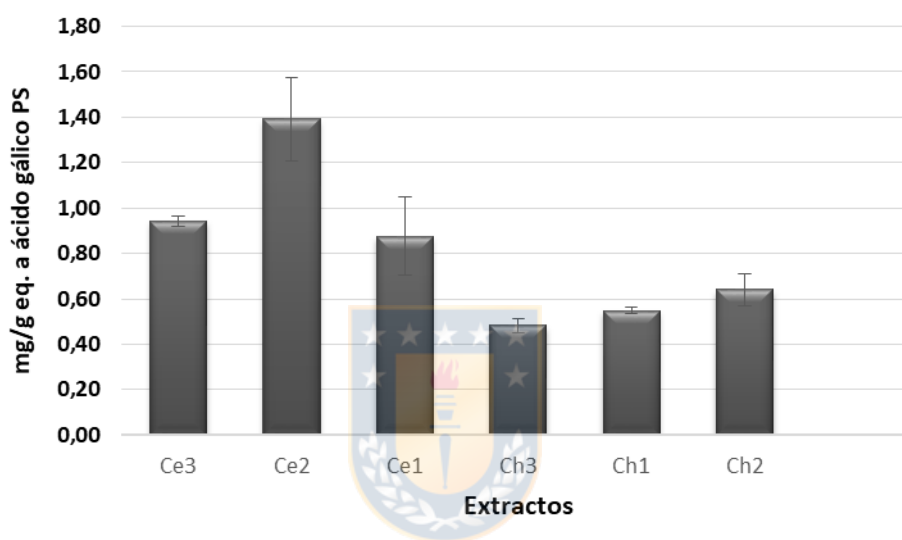


Figura 7. Contenido de compuestos fenólicos totales expresados en mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca, utilizando el ensayo Folin-Ciocalteu en extractos de *Cyttaria* spp. (n= 3).

4.3. Capacidad antioxidante de *Cyttaria* spp. por ensayo ABTS^{•+}

Los resultados del análisis de la capacidad antioxidante se realizó por reducción del radical ABTS^{•+} en extractos metanólicos al 100% de *Cyttaria* spp. En la Figura 8, la actividad antioxidante se expresó en mg de equivalentes Trolox/100g de extractos de *Cyttaria* spp. En esta figura, la capacidad antioxidante fue mayor en los extractos de *C. hariatii* Ch1 y Ch2 con valores en orden de 12,7 y 12 mg de equivalentes Trolox/100g de extracto, siendo el extracto de *C. espinosae* Ce3 el que mostró el menor valor con 1,6 mg de equivalentes Trolox/100g de extracto. Los extractos Ch3, Ce1 y Ce2 presentaron valores similares de 7,8, 8,1 y 6,8 mg de

equivalentes Trolox/100g de extracto, respectivamente. La mayor actividad antioxidante se presentó en los extractos Ch1 y Ch2 de *C. hariatii* con un incremento de aproximadamente 10 mg de equivalentes Trolox/100g de extracto en comparación con el menor valor reportado para el extracto Ce3 de *C. espinosae*.

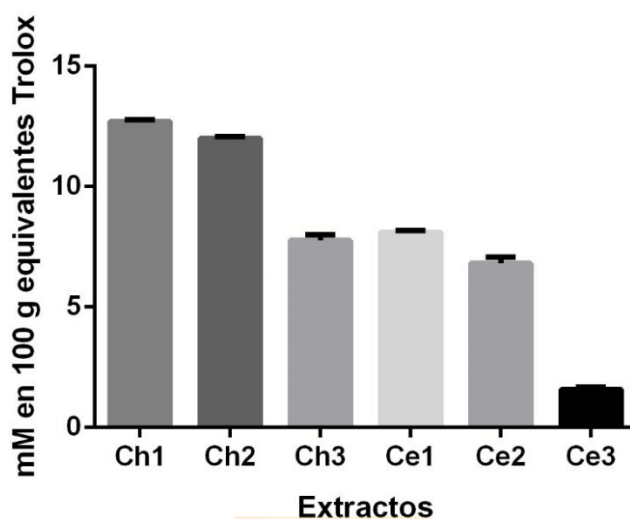


Figura 8. Capacidad antioxidante por el ensayo ABTS^{•+}, expresada en μ g de equivalentes Trolox/100g de extracto en peso seco (n= 3).

4.4. Efecto citotóxico de polisacáridos aislados de *Cyttaria* spp. en líneas tumorales

Los extractos de polisacáridos crudos extraídos desde muestras liofilizadas de *C. berteroi* y *C. hariatii* fueron probados mediante un ensayo de citotoxicidad en distintas líneas tumorales: HCT-116 (Figura 9) correspondiente a cáncer de colon, U-937 a leucemia humana (Figura 10) y MCF-7 a cáncer de mama (Figura 11).

El extracto de polisacáridos crudos de *C. hariatii* (Ch3) mostró un efecto citotóxico sobre cáncer de colon y leucemia humana al ser tratados con un IC₅₀ de 3,70 mg/mL y 2,10 mg/mL respectivamente. Por otro lado, no hubo igual efecto en cáncer de mama donde se obtuvo un valor de IC₅₀ de 9,47 mg/mL. En cambio, *C. berteroi* (Cb) presentó un leve efecto contra cáncer de colón donde con un IC₅₀ de 9,27 mg/mL disminuyó el % de viabilidad celular, en comparación, con un bajo efecto citotóxico sobre células de las líneas tumorales de leucemia humana y cáncer de mama, donde se obtuvo un valor IC₅₀ de >10 mg/mL.

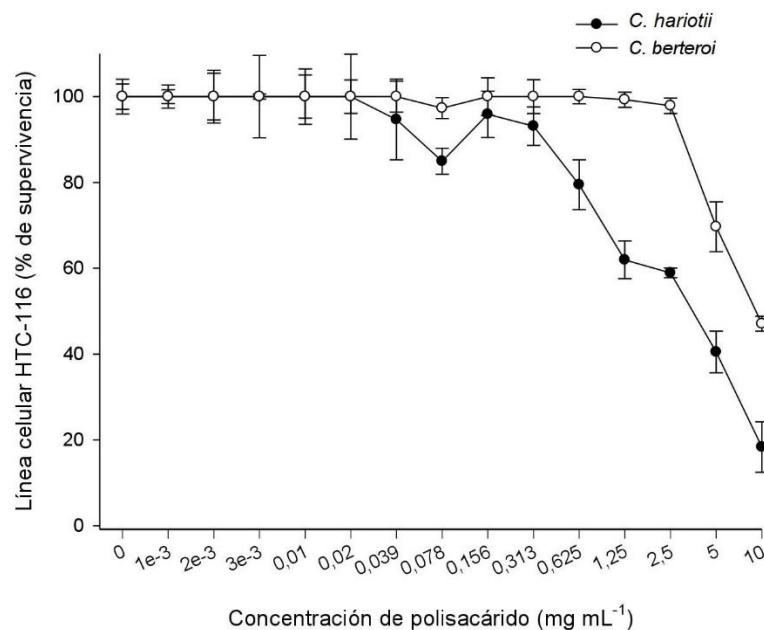


Figura 9. Efecto de los polisacáridos crudos extraídos de *C. hariatii* y *C. berteroi* en % de supervivencia \pm desviación estándar en la línea celular de cáncer de colon humano (HCT-116). IC_{50} *C. hariatii*: 3,70 mg/mL; IC_{50} *C. berteroi*: 9,27 mg/mL.

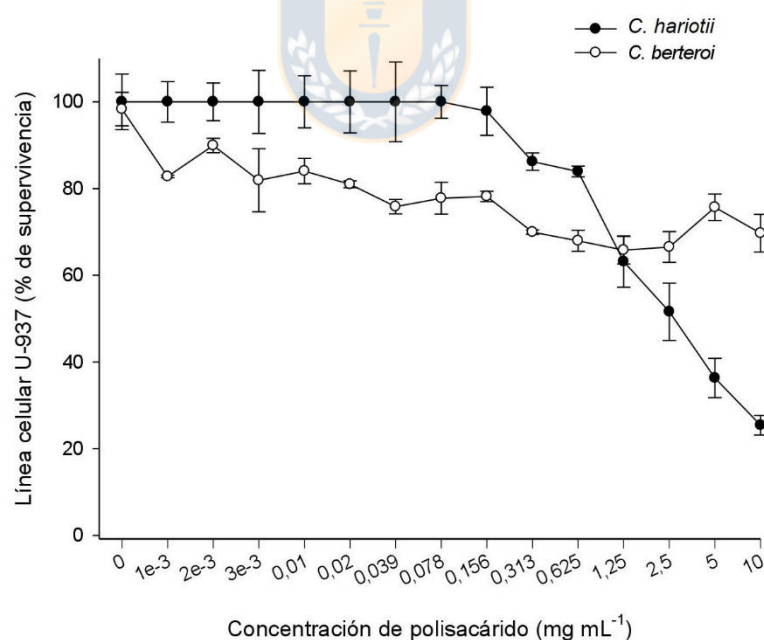


Figura 10. Efecto de los polisacáridos crudos extraídos de *C. hariatii* y *C. berteroi* en % de supervivencia \pm desviación estándar en la línea celular de leucemia humana (U-937). IC_{50} *C. hariatii*: 2,10 mg/mL; IC_{50} *C. berteroi*: > 10 mg/mL.

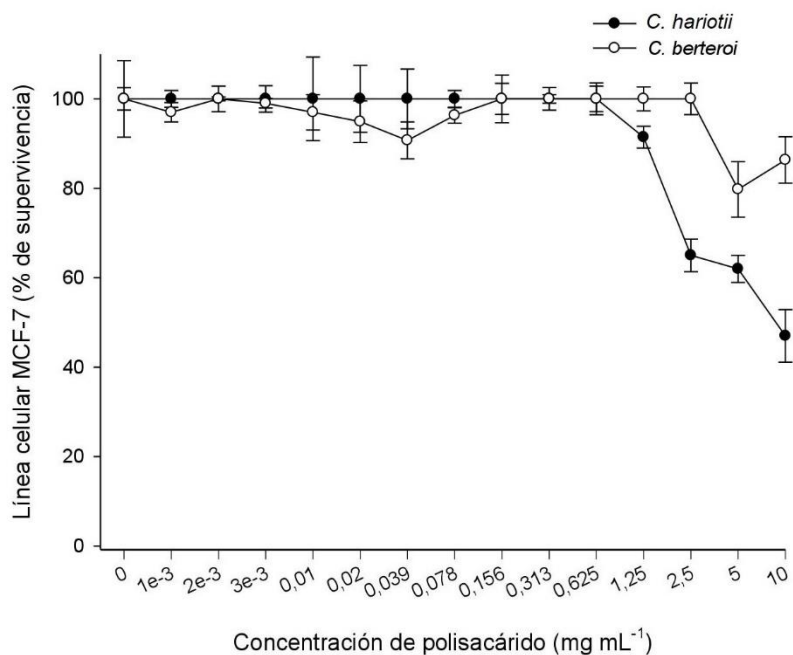
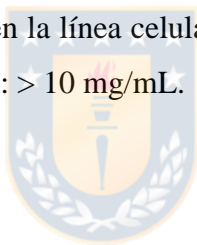


Figura 11. Efecto de los polisacáridos crudos extraídos de *C. hariatii* y *C. berteroi* en % de supervivencia \pm desviación estándar en la línea celular de cáncer de mama (MCF-7). IC_{50} *C. hariatii*: 9,47 mg/mL; IC_{50} *C. berteroi*: > 10 mg/mL.



V. DISCUSIÓN

La descripción y estudio de las características que presentan los hongos silvestres comestibles con efecto medicinal es de suma importancia para la salud humana, tanto para nuestros pueblos originarios y personas de origen rural que han recolectado y consumido estos hongos desde hace tiempo (Sepúlveda, 2005; Domínguez, 2010), como para la población urbana que recientemente ha comenzado a utilizarlos como suplemento nutricional, ya sea en fresco o en otras preparaciones (deshidratados, conservas, cápsulas) (Albertó, 2008).

Los hongos silvestres comestibles presentan un alto valor económico y gastronómico, debido a sus propiedades nutricionales y medicinales, siendo considerados alimentos funcionales, ya que además de sus propiedades nutricionales, han demostrado tener efectos benéficos para la salud humana que pueden ser utilizados para prevenir o tratar enfermedades degenerativas (Cano-Estrada & Romero-Bautista, 2016). Por lo anterior, es necesario indagar y conocer la composición químico-nutricional de los hongos comestibles, en especial, de aquellos que son nativos de nuestro país y cuya información puede ser muy útil para la población, así como para promover su conservación.

En esta investigación se logró determinar la composición nutricional que aportan distintas especies de *Cyttaria* en base a g/100g en peso seco mediante un análisis químico-proximal. Las especies examinadas fueron *C. espinosae* (Ce) y *C. hariatii* (Ch), donde se pudo observar que el contenido proteico fue mayor para *C. espinosae* con un valor medio de 20 g/100g en peso seco, llegando a ser casi cuatro veces mayor que en la especie *C. hariatii* que presentó un valor medio de proteínas igual a 4,1 g/100g en peso seco, coincidiendo con lo reportado por Schemeda-Hirshmann et al., (1999), que obtuvieron valores similares en cuanto al contenido de proteínas presentes en las especies recolectadas en la Región del Maule, con un valor promedio de 18,5 g/100g en peso seco para *C. espinosae* y de 7,5 g/100g en peso seco para *C. hariatii*, respectivamente. Asimismo, Toledo et al., (2016) reportaron 3,3% de proteínas al analizar muestras de *C. hariatii* en la Patagonia, mientras que Inzunza (2016) obtuvo un porcentaje de proteínas igual a un 20% para *C. espinosae* y de un 13% para *C. hariatii*, aproximadamente, analizando muestras provenientes de la Región del Ñuble.

De acuerdo con la literatura, las proteínas y carbohidratos son los dos componentes principales presentes en los hongos comestibles (Kalac̆, 2009), siendo estos dos parámetros donde se observó mayores diferencias entre las especies estudiadas: *C. espinosae* y *C. hariatii*. Como se sabe el contenido y la calidad de las proteínas de los hongos es mayor que en las plantas, pues proveen aminoácidos esenciales convirtiéndose en una buena fuente de nutrición para el ser humano, particularmente, para quienes no consumen carne en su dieta (Valverde et al., 2015). Bajo estas condiciones, *C. espinosae* presentó un alto contenido de proteínas, lo que se traduce en un mejor contenido nutricional frente a *C. hariatii*.

Por otra parte, si bien las muestras de *C. hariatii* no fueron tan ricas en proteínas y presentaron un menor contenido de lípidos (4,3, y 1,2 g/100 g en peso seco en promedio), hasta tres veces menos que el valor promedio de este parámetro para la especie *C. espinosae*, presentaron un mayor contenido de carbohidratos (85%) frente a *C. espinosae* (57%). Los carbohidratos, se encuentran en altas proporciones en hongos comestibles, incluyendo la quitina, glucógeno, trehalosa y manitol; Además, contienen fibra, β -glucanos, hemicelulosas y otras sustancias, tales como algunos azúcares (Jedidi et al., 2017), siendo la glucosa el mocosacárido más común detectado en ambas especies, pero mayormente en *C. hariatii*, especie utilizada por el pueblo mapuche y otros pueblos originarios para preparar un brebaje alcohólico (chicha) en el sur de Chile (Domínguez, 2010).

Respecto al parámetro nutricional de la fibra dietaria, los valores obtenidos en este estudio fueron inferiores a los reportados por Schemeda-Hirshmann et al., (1999) e Inzunza (2016). En la actualidad, el interés por incluir la fibra en la nutrición humana se debe a la relación que existe entre el consumo inadecuado de fibra y el aumento progresivo de enfermedades degenerativas en las sociedades desarrolladas (Escudero-Álvarez & González-Sánchez, 2006)

En los extractos metanólicos obtenidos en el laboratorio a partir de los estromas liofilizados de *C. espinosae* y *C. hariatii*, se pudo observar por medio de un ensayo de Folin-Ciocalteu que hubo un mayor contenido de compuestos fenólicos expresados en mg/g de equivalentes de ácido gálico para *C. espinosae*. siendo el promedio 1,1 mg/g de equivalentes de ácido gálico para esta especie, mientras que los extractos metanólicos de *C. hariatii* mostraron un bajo

contenido de compuestos fenólicos, con un promedio de 0,5 mg/g de equivalentes de ácido gálico aproximadamente. La diferencia entre los extractos de ambas especies es evidente y significativa estadísticamente ($p < 0,05$), donde *C. espinosae* duplicó la cantidad de compuestos fenólicos presentes en los extractos de *C. hariotii*. Sin embargo, al evaluar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *C. espinosae* y *C. hariotii* mediante un ensayo ABTS⁺, se obtuvo valores promedio 5,5 y 10,8 mg de equivalentes Trolox/100g de extracto, respectivamente. De este modo, la capacidad antioxidante expresada en mg de equivalentes Trolox/100g de extracto fue significativamente mayor para los extractos de *C. hariotii* en comparación con los extractos de *C. espinosae* ($p < 0,05$).

Los antioxidantes son esenciales en el cuerpo humano para prevenir el daño oxidativo. Estas sustancias pueden obtenerse de diversas fuentes como frutas, plantas y hongos (Belloso et al., 2015). Generalmente, se observa una correlación directa entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de los hongos evaluados (Barros et al., 2008). En este caso esto no sucedió así y puede deberse a que otros compuestos presentes en los hongos comestibles presentan un efecto antioxidante, por ejemplo, los pigmentos e incluso algunos polisacáridos (Wang et al., 2018), siendo los carotenoides los más abundantes en especies de *Cyttaria*, los que aun siendo tratados con etanol absoluto previo a la obtención de los extractos, pueden quedar en forma de residuos. Además de los factores mencionados, de acuerdo a Kuskoski et al., (2005), la actividad antioxidante también depende de la estructura y la concentración del extracto.

La actividad antioxidante obtenida para los extractos de las especies de *Cyttaria* evaluadas por ambos métodos descritos anteriormente, no es tan elevada en comparación con la actividad reportada en otros estudios similares realizados con hongos comestibles como el de los autores Witkowska et al., (2011), donde se expone que *Boletus edulis* es uno de los hongos silvestres comestibles con mayor actividad antioxidante. De las especies analizadas, *C. hariotii* presentó mejor actividad antioxidante por medio de un ensayo ABTS⁺, alcanzando un valor máximo de 12,7 mg de equivalentes Trolox/100 g de extrato, lo que indica que los hongos presentan gran potencial como agentes protectores, aportando antioxidantes naturales para el ser humano por

medio de la dieta, reduciendo el daño oxidativo y permitiendo lograr una buena calidad de vida (Kozarski et al., 2015).

Alternativamente, diversos compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, DMPD, DMPO y FRAP) son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos que contienen los hongos para captar los radicales libres generados, operando en contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (Kim et al., 2002). Los métodos más usados para determinar la capacidad antioxidante de algunos alimentos son: DPPH, ABTS⁺ o Folin-Ciocalteu, pero muchas veces los resultados obtenidos durante los estudios no son comparables, porque se utilizan diferentes métodos bajo diversas condiciones experimentales, donde la reactividad uniforme del compuesto usado como estándar es de gran importancia (Abramovič et al., 2018).

Dentro de las propiedades medicinales de los hongos, además de la capacidad antioxidante, se destacan sus propiedades anticancerígenas, representadas por diversos principios activos, tales como: lectinas, β -glucanos, ergosteroles y argininas, que actúan en la estimulación del sistema inmunológico, antiproliferación y daño celular (Novaes et al., 2011). En este estudio, para evaluar el potencial anticancerígeno de *Cyttaria* spp. se realizó extractos de polisacáridos crudos a partir de estromas liofilizados de *C. berteroi* (Cb) y *C. hariotii* (Ch3), los que fueron probados mediante un ensayo de citotoxicidad en distintas líneas tumorales: HCT-116 (cáncer de colon), U-937 a (leucemia humana) y MCF-7 (cáncer de mama). Dentro de los resultados obtenidos, se destaca la acción de los polisacáridos crudos obtenidos de la especie *C. hariotii*, mostrando un efecto citotóxico sobre cáncer de colon y leucemia humana al ser tratados con un IC₅₀ de 3,70 mg/mL y 2,10 mg/mL respectivamente. Por otro lado, los extractos de *C. berteroi* tuvieron un efecto citotóxico no relevante sobre las células de la líneas tumorales de leucemia humana y cáncer de mama, pero presentaron un leve efecto contra cáncer de colon donde se necesitó un IC₅₀ de 9,27 mg/mL para disminuir el % de viabilidad celular.

De las dos especies de *Cyttaria* evaluadas mediante ensayos de citotoxicidad, los extractos de *C. hariotii* mostró los resultados más promisorios, principalmente, como un buen alimento funcional. El efecto citotóxico de *C. hariotii* más alto se observó sobre la línea tumoral de

leucemia humana (U-937), lo que coincide con lo expuesto por Schmeda-Hirshmann et al., (2001) quienes utilizando extractos hidrosolubles de cuatro especies de *Cyttaria* evaluaron su efecto inmunomodulador en ratones con linfoma L5178Y, en los cuales sólo *C. hariotii* fue capaz de modificar la respuesta inmune. En base a estos resultados, es recomendable realizar estudios con otras líneas tumorales que permitan conocer el potencial medicinal de nuestros hongos silvestres comestibles.

En general, la acción terapéutica de los hongos es atribuida a los compuestos bioactivos que poseen (Cano-Estrada & Romero-Bautista, 2016). Según los autores Hawksworth & Lücking (2017), existen entre 2.2 a 3.8 millones de especies de hongos con sólo 120.000 especies actualmente aceptadas correspondientes al 8% de la diversidad fúngica a nivel mundial. Por ende, existe una gran diversidad de hongos silvestres comestibles que aún no se conocen o que sus compuestos biológicamente activos aún no han sido determinados, en cuyo caso podrían ser aprovechados para desarrollar alimentos nutraceuticos y promover nuevas investigaciones para beneficiar la salud humana.

Los resultados obtenidos en este estudio constituyen una aproximación a los posibles usos alimenticios y/o farmacológicos de las especies de *Cyttaria* distribuidas a lo largo de Chile y ha permitido conocer cuáles especies presentan mayor potencial nutricional y medicinal. Es preciso estudiar en profundidad las especies que tuvieron mayor bioactividad, buscar formas de cultivarlas en laboratorio y trabajar en pro de buscar nuevas soluciones a problemas concretos en nuestro país, así como ayudar a conservar el bosque nativo que es el hábitat donde éstas se desarrollan.

VI. CONCLUSIONES

- *C. espinosae* presentó un alto contenido de proteínas y lípidos en comparación con *C. hariatii*. Por tanto, *C. espinosae* puede considerarse un hongo silvestre comestible que ayuda a una nutrición equilibrada.
- Los extractos metanólicos de *C. hariatii* presentan una mayor actividad antioxidante que los extractos de *C. espinosae*, representando una fuente natural de compuestos funcionales que ayudan a retrasar o prevenir el daño que producen los radicales libres a las células del cuerpo, ocasionando enfermedades causadas por el estrés oxidativo.
- Los polisacáridos totales extraídos de *C. hariatii* y *C. berteroi* presentaron diferencias en la actividad citotóxica en líneas tumorales de leucemia, cáncer colon y mama.
- Los polisacáridos de *C. hariatii* presentan una alta citotoxicidad en la línea celular de leucemia humana (U-937), con un IC₅₀ igual a 2,1 mg/mL.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se sugiere que investigaciones futuras diluciden la estructura química de los polisacáridos y fenoles responsables de la actividad biológica en especies de *Cyttaria*.
- En esta investigación, se comprobó que las especies analizadas podrían representar una buena fuente como alimento funcional, con presencia de compuestos con actividad antioxidante y efecto citotóxico sobre algunas líneas tumorales. No obstante, se reitera la necesidad de realizar más estudios sobre el género *Cyttaria* en nuestro país, por ejemplo, realizando una caracterización químico-nutricional de todas las especies.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdala-Díaz, R., Arrojo, V., Agudo, M., Cárdenas, C., Dobretsov, S. & F. Figueroa. 2019. Immunomodulatory and Antioxidant Activities of Sulfated Polysaccharides from *Laminaria ochroleuca*, *Porphyra umbilicalis*, and *Gelidium corneum*. *Marine Biotechnology*, 21, 577 - 587.
2. Abramovič, H., Grobin, B., Poklar Ulrih, N. & B. Cigić. 2018. Relevance and standardization of in vitro antioxidant assays: ABTS, DPPH, and Folin–Ciocalteu. *Journal of Chemistry*, 2018.
3. Albertó, E. 2008. Cultivo intensivo de los hongos comestibles: Cómo cultivar Champiñones, Gírgolas, Shiitake y otras especies. Editorial Hemisferio Sur S.A.
4. AOAC. 2012. Official Methods of Analysis, 19th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington. Buenos Aires, Argentina.
5. Barrera, E. 2004. Especies chilenas *Cyttaria* Berkeley (Cyttariaceae). *Chagual* 2: 62-65.
6. Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Sá Morais, J. & I. Ferreira. 2007. Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (12), 4781-4788.
7. Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. M. & I. Ferreira. 2008. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (8), 2742-2747.
8. Belloso, K., González, I., Suárez, R. & A. Cáceres. 2015. Actividad antioxidante de extractos de diez basidiomicetos comestibles en Guatemala. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 2 (2), 29-36.

9. Beluhan, S. & A. Ranogajec. 2011. Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms. *Food Chemistry*, 2011. 124 (3): 1076-1082.
10. Busswell, J. & S. Chang. 1993. Edible mushrooms: attributes and applications. In: Eds. S. Chang, J. Busswell and S. Chiu, *Mushroom Biology and Mushroom Products*. 3-20. The Chinese University Press, Hong Kong.
11. Cano-Estrada, A. & L. Romero-Bautista. 2016. Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. *Revista Chilena de Nutrición*, 43(1), 75-80.
12. Chapman, A. 1987. *La Isla de Estados en la prehistoria: Primeros datos arqueológicos*. EUDEBA, Buenos Aires.
13. Cheung, P. 1997. Chemical evaluation of some lesser-known edible mushroom mycelia produced in submerged culture from soymilk waste. *Food Chemistry* 60: 61-5.
14. Cheung, L., Cheung, P. & V. Ooi. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry* 81: 249–55.
15. Cheung, L. & P. Cheung. 2005. Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry* 89: 403–9.
16. Cheung, P. 2008. Nutritional value and health benefits of mushrooms. In: *Mushrooms as Functional Foods*, (PCK Cheung ed.), pp. 71–110. Wiley: Hoboken, NJ.
17. Chye, F.Y., Wong J.Y. & J.S. Lee. 2008. Nutritional Quality and Antioxidant Activity of Selected Edible Wild Mushrooms. *Food Science and Technology International*. 14(4): 375-384.

18. Combet, E., Henderson, J., Eastwood, D. C. & K. S. Burton. 2006. Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: properties, analysis, and biosynthesis. *Mycoscience*, 47(6), 317-326.
19. Cortés, M., Montenegro, I., Boza, S., Henríquez, J. L. & T. Araya. 2017. La recolección de productos forestales no madereros (PFNM) por mujeres campesinas del sur de Chile: reconfigurando la tensión entre lo local y lo global. *Revista Iberoamericana de Viticultura, Agroindustria y Ruralidad*, 4(12), 22-45.
20. Cracraft, J. 1975. Historical biogeography and Earth history—perspectives for a future synthesis. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62:227–250.
21. Crisan, E. & A. Sands. 1978. Nutritional values. In: *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*, (ST Chang & Buswell Eds). Academic Press: New York. 137-165.
22. Dettmann M, D Pocknall, E Romero, M Zamalao. 1990. *Nothofagidites Erdman ex Potonie 1960: a catalogue of species with notes on the paleogeographic distribution of Nothofagus BL (Southern Beech)*. New Zealand Geological Survey Palaeontological Bulletin 60: 1-79.
23. Domínguez, E. 2010. Flora de interés etnobotánico usada por los pueblos originarios: Aónikenk, Selk'nam, Kawésqar, Yagan y Haush en la Patagonia Austral. *Dominguezia*, 26(2), 19-29.
24. Darlington, P. 1965. *Biogeography of the southern end of the world; distribution and history of far-southern life and land, with an assessment of continental drift*. Cambridge, Massachusetts: Harvard Univ. Press. 236 pp.
25. Díez, V. & A. Alvarez. 2001. Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. *Food Chemistry* 75: 417–22.

26. Emperaire, J. 1963. Los Nómades del Mar. Edit. Universidad de Chile, Santiago de Chile.
27. Ergonul, P. G., Akata, I., Kalyoncu, F. & B. Ergonul. 2013. Fatty acid compositions of six wild edible mushroom species. The Scientific World Journal, 2013.
28. Escudero-Álvarez, E. & P. González.Sánchez. 2006. La fibra dietética. Nutrición Hospitalaria, 21: 61-72.
29. Espinosa, M. 1926. Los hongos del género *Cyttaria*. Revista Chilena de Historia Natural. 30: 206-256.
30. Etkin, N. & P. Ross. 1991. Should we set a place for diet in ethnopharmacology? Journal of Ethnopharmacology 32:25-36.
31. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1991. Productos Forestales No Madereros; Posibilidades Futuras. Roma, Italia. Estudio FAO MONTES N° 97, 36 pp.
32. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1999. Hacia una definición uniforme de los Productos Forestales No Madereros. Unasyuva 50 (198): 63-64.
33. Fernández-Cirelli, A. & R. de Lederkremer. 1974. Structure of a polysaccharide from *Cyttaria hariato* Fischer. Acetolysis studies. Anales de la Asociación Química Argentina 62:141-145.
34. Fernández-Cirelli, A., Oliva, E. & R. de Lederkremer. 1989. Occurrence of D-arabinohexulosonic acid in polysaccharides of *Cyttaria* species. Phytochemistry 28:1645-1647.

35. Ferreira, I., Barros, L. & R. Abreu. 2009. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry* 16: 1543–60.
36. Gamundí, I. 1971. Las Cyttariales sudamericanas (Fungi - Ascomycetes). *Darwiniana* 16(3-4): 461-510.
37. Gamundí, I. 1986. Fungi, Ascomycetes. Cyttariales, Helotiales: Geoglossaceae, Dermateaceae. *Flora criptogámica de Tierra del Fuego*. 10(4): 1-126.
38. Gamundí, I. 1991. Review of recent advances in the knowledge of the Cyttariales. *Systema Ascomycetum* 10: 69-77.
39. Gamundí, I., Minter, D., Romero, A., Barrera, V., Gaiotti, A., Messutti, M. & M. Stecconi. 2004. Checklist of the Discomycetes (Fungi) of Patagonia, Tierra del Fuego and adjacent Antarctic areas. *Darwiniana* 42(1-4): 63-164.
40. Gucia, M., Jarzyńska, G., Kojta, A. & J. Falandysz. 2012. Temporal variability in 20 chemical elements content of Parasol Mushroom (*Macrolepiota procera*) collected from two sites over a few years. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 47:2, 81-88.
41. Hawksworth, D. L. & R. Lücking. 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology spectrum*, 5 (4).
42. Hazama, S., Oka, M., Yoshino, S., Iizuka, N., Wadamori, K., Yamamoto, K., ... & Y. Masaki. 1995. Clinical effects and immunological analysis of intraabdominal and intrapleural injection of lentinan for malignant ascites and pleural effusion of gastric carcinoma. *Gan to kagaku ryoho. Cancer & Chemotherapy*, 22 (11), 1595-1597.
43. Heilmann-Clausen, J., Barron, E., Boddy, L., Dahlberg, A., Griffith, G., Nordén, J., Ovaskainen, O., Perini, C., Senn-Irlet, B. & P. Halme. 2014. A fungal perspective on conservation biology. *Conservation Biology* 29:61–68.

44. Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., Queiroz, M. J., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. 2012. Phenolic, polysaccharidic, and lipidic fractions of mushrooms from Northeastern Portugal: chemical compounds with antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(18), 4634-4640.
45. Hill, R. 1991. Tertiary *Nothofagus* (Fagaceae) macrofossils from Tasmania and Antarctica and their bearing on the evolution of the genus. *Bot J Linn Soc* 105:73–112.
46. INFOR. 2009. Exportaciones forestales de productos no madereros. Boletín N° 4, Septiembre 2009. 18 pp.
47. Inzunza, K. 2016. Propiedades bioactivas de dos especies de *Cyttaria* (digüeños) (*C. espinosae* y *C. hariatii*) y su caracterización nutricional. Facultad de Ingeniería Agrícola, Universidad de Concepción.
48. Ipinza, R., Pérez, F. & A. Kappes. 1989. *Cyttaria espinosae* Lloyd., un hongo de interés en fitopatología, alimentación y evolución de los bosques de *Nothofagus* en Chile. *Boletín Sociedad Micológica de Madrid*, 13: 31-47.
49. Jedidi, I. K., Ayoub, I. K., Philippe, T. & N. Bouzouita. 2017. Chemical composition and nutritional value of three Tunisian wild edible mushrooms. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(4), 2069-2075.
50. Kalač, P. 2009. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food chemistry*, 113(1), 9-16.
51. Kim, D., Lee, K., Lee, H. & C. Lee. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3713-3717.
52. Kim, M. Y., Lee, S. J., Ahn, J. K., Kim, E. H., Kim, M. J., Kim, S. L., et al. 2009. Comparison of free amino acid, carbohydrates concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms. *Food Chemistry*, 113(2), 386-393.

53. Kodama, N., Komuta, K. & H. Nanba. 2002. Can maitake MD-fraction aid cancer patients? *Alternative Medicine Review* 7: 236–9.
54. Kozarski, M., Klaus, A., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Vunduk, J., Petrović, et al. 2015. Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules*, 20, 19489-19525.
55. Kuskoski, E., Asuero, M., Troncoso, A., Mancini-Filho, J. & R. Fett. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25 (4), 726-732.
56. Kumar, V., Kamle, P. & A. Mithal. 2014. High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC): A Review. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry* 4 (2): 42-44.
57. Lillo, L., Cabello, G., Cespedes, C., Caro, C. & J. Perez. 2014. Structural studies of the exopolysaccharide produced by a submerged culture of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 13, 359-365.
58. Lindequist, U., Niedermeyer, T. & W. Julich. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2: 285–99.
59. Liu, F., Ooi, V. & S. Chang. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharides extracts. *Life Sciences* 60: 763–71.
60. Longvah, T. & Y. Deosthale. 1998. Composition and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food Chemistry* 63: 331–4.
61. López, L. & F. Fuenzalida. 1998. Algunos problemas identificados en la comercialización de productos provenientes del bosque nativo. *Proyecto Manejo Sustentable del Bosque Nativo*. CONAF.

62. Magalhaes, L., Santos, F., Segundo, M., Reis, S. & J. Lima. 2010. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta* 83:441–447.
63. Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V., & L. Pizzoferrato. 1999. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chemistry* 65: 477–82.
64. Manzi P., Marconi S., Guzzi A., Pizzoferrato L. 2004. Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry*, 84: 201–206.
65. Marchionatto, J. 1940. Las especies de *Cyttaria* y *Cytariella* en la Argentina *Darwiniana* 4 (1): 9-32.
66. Mattila, P., Könkö, K., Eurola, M., Pihlava, J., Astola, J., Vahteristo, L., ... & V. Piironen. 2001. Contents of vitamins, mineral elements and some phenolic compound in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 2449–53.
67. Mattila, P., Lampi, A-M., Ronkainen, R., Toivo, J., & V. Piironen. 2002. Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry* 76: 293–8.
68. Mau, JL., Lin, HC., Ma, JT. & SF. Song. 2001. Non-volatile taste components of several specialty mushrooms. *Food Chemistry* 73: 461–6.
69. Mdachi, S., Nkunya, M., Nyigo, V. & I. Urasa.. 2003. Amino acid composition of some Tanzanian wild mushrooms. *Food Chemistry* 86: 179–82.
70. Mitomi, T., Tsuchiya, S., Iijima, N. Aso, K., Suzuki, K., Nishiyama, K., ... & K. Oya. 1992. Randomized, controlled study on adjuvant immunochemotherapy with PSK in curatively resected colorectal cancer. *Diseases of the Colon & Rectum* 35: 123–30.

71. Möshach, E. 1991. Botánica Indígena de Chile. C. Aldunate & C. Villagrán, ed., Museo Chileno de Arte Precolombino, Fundación Andes y Editorial Andrés Bello, Santiago de Chile.
72. Mshigeni, K. & S. Chang. 2017. Hongos, Medio Ambiente y Salud Humana: Tesoros de la tierra para la salud, la felicidad y la longevidad. Editorial Vile. Guatemala. 151 pp.
73. Mueller, G. 2017. Progress in conserving fungi: engagement and red listing. *BG Journal* 14: 30-33.
74. Muñoz, M., Barrera, E. & I. Meza. 1981. El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile. Publicación ocasional N° 33, Museo Nacional de Historia Natural, Santiago de Chile.
75. Nikkarinen, M. & E. Mertenen. 2004. Impact of geological origin on trace element composition of edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis* 17: 301–310.
76. Novaes, M., Valadares, F., Reis, M., Goncalves, D. & M. Menezes, 2011. The effects of dietary supplementation with Agaricales mushrooms and other medicinal fungi on breast cancer: Evidence based medicine. *Clinics* 66: 2133-2139.
77. Oliva, E., Fernandez-Cirelli, A. & R. Lederkremer. 1986. Chemical composition of the cell Wall of the tree fungus *Cyttaria hariotii* Fischer. *Experimental Mycology* 10: 150-156.
78. Ou, B., Hampsch-Woodill, M. & R. Prior. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (10), 4619-4626.

79. Parages, M. L., Rico, R. M., Abdala-Díaz, R. T., Chabrillón, M., Sotiroidis, T. G., & C. Jiménez. 2012. Acidic polysaccharides of *Arthrospira (Spirulina) platensis* induce the synthesis of TNF- α in RAW macrophages. *Journal of Applied Phycology*, 24 (6), 1537-1546.
80. Pedneault, K., Angers, P., Gosselin, A. & R. J. Tweddell. 2006. Fatty acid composition of lipids from mushrooms belonging to the family Boletaceae. *Mycological Research*, 110 (10), 1179-1183.
81. Peterson, K., Pfister, D. & C. Bell. 2010. Cophylogeny and biogeography of the fungal parasite *Cyttaria* and its host *Nothofagus*, Southern Beech. *Mycologia* 102(6): 1417-1425.
82. Petit, I. J., Campoy, A. N., Hevia, M. J., Gaymer, C. F. & F. A. Squeo. 2018. Protected areas in Chile: are we managing them? *Revista Chilena de Historia Natural*, 91 (1).
83. Puttaraju, N., Venkateshaiah, S., Dharmesh, S., Urs, S. & R. Somasundaram. 2006. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9764–9772.
84. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 9/10, 1231-1237.
85. Reis, F. S., Barros, L., Martins, A. & I. C. Ferreira. 2012. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), 191-197.
86. Reshetnikov, S., Wasser, S. & K. Tan. 2001. Higher Basidiomycota as a source of Antitumour and immunostimulating polysaccharides. A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3: 361-394.

87. Ribeiro, N., Magalhaes, L., Reis, S., Lima, J. & M. Segundo. 2011. High-throughput total cupric ion reducing antioxidant capacity of biological samples determined using flow injection analysis and microplate-based methods. *Anal. Sci.* 2011; 27:483–488.
88. Rodriguez, R., Jiménez, A., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R. & A. Heredia. 2006. Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 2006. 17(1): 3-15.
89. Román, M., Boa, E. & S. Woodward. 2006. Wild-gathered fungi for health and rural livelihoods. *Proceedings for the Nutrition Society* 65: 190–7.
90. Rossman, A., Tulloss, R., O'Dell, T. & R. Thorn. 1998. Protocols for an all taxa Biodiversity Inventory of Fungi in a Costa Rican conservation area. Parkway Publishers, Inc. North Caroline 175 pp.
91. Sandoval-Leiva, P. 2012. Acerca de *Cyttaria exigua* Gamundí en Chile. *Boletín Micológico*, 2012; 27(2): 61 -64.
92. Schmeda-Hirschmann, G., Razmilic, I., Reyes, S., Gutiérrez, M. & J. Loyola. 1999. Biological Activity and Food Analysis of *Cyttaria* spp. (Discomycetes). *Economic Botany* Vol. 53 (1): 30-40.
93. Schmeda-Hirschmann, G., Villaseñor-García, M. M., Lozoya, X. & A. Puebla-Pérez. 2001. Immunomodulatory activity of Chilean *Cyttaria* species in mice with L5178Y lymphoma. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(2-3), 253-257.
94. Siegel, R., Miller, K. & A. Jemal. 2019. *Cancer Statistics, 2019*. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 69 (1), 7-34.
95. Sepúlveda, J. 2005. Principios de alimentación mapuche como un aporte a la soberanía alimentaria. Centro de educación y tecnología para el desarrollo del sur (CETSUR), Temuco.

96. Sokal, R. & F. Rohlf. 2013. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. 4th ed. New York: W.H. Freeman. 915 pp.
97. Steenis, C. 1971. *Nothofagus*, key genus of plant geography, in time and space, living and fossil, ecology and phylogeny. *Blumea* 19:65–98.
98. Taguchi, T., Furue, H., Kimura, T., Kondoh, T., Hattori, T., Itoh, I. & N. Ogawa. 1982. Life-span prolongation effect of lentinan on patients with advanced or recurrent colorectal cancer. *International Journal of Immunopharmacology* 4: 271–9.
99. Toledo, C., Barroetaveña, C. & M. Rajchenberg. 2014. Fenología y variables ambientales asociadas a la fructificación de hongos silvestres comestibles de los bosques andino-patagónicos en Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(4), 1093-1103.
100. Toledo, C., Barroetaveña, C., Fernandes, A., Barros, L. & I. Ferreira. 2016. Chemical and antioxidant properties of wild edible mushrooms from native *Nothofagus* spp. forest, Argentina. *Molecules*, 21(9), 1201.
101. USDA. 1931. Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins. Washington D.C. Report 183: 22.
102. Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T. & O. Paredes-López. 2015. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*.
103. Vaz, J. A., Barros, L., Martins, A., Santos-Buelga, C., Vasconcelos, M. H. & I. C. Ferreira. 2011. Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. *Food Chemistry*, 126(2), 610-616.

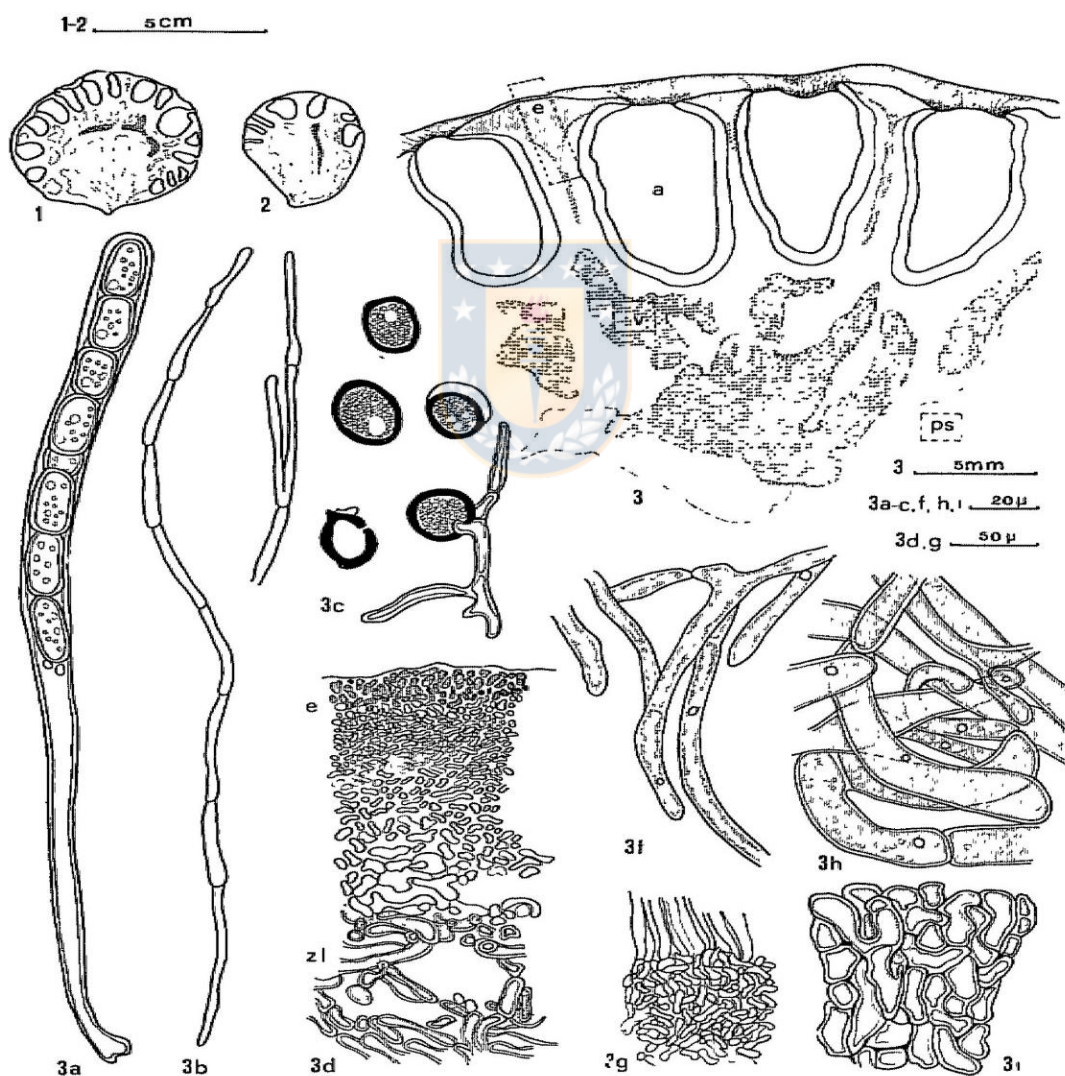
104. Vidovic, S., Mujic, I., Zekovic, Z., Lepojević, Z., Tumbas, V. & A. Mujić 2010. Antioxidant properties of selected boletus mushrooms. *Food Biophysics* 5: 49–58.
105. Waksman, N., Svec, B., Cirelli, A. & R. de Lederkremer. 1975. Identification and quantitative determination of D-arabino-hexulosonic acid in *Cyttaria* species. *Phytochemistry* 14: 1009-1010.
106. Waksman, N., de Lederkremer, R. & A. Cerezo. 1977. The structure of an alpha-D-glucan from *Cyttaria hariatii* Fischer (Fungi). *Carbohydrate Research* 59: 505-515.
107. Wang, J., Yang, X.-H., Mujumdar, A. S., Fang, X.-M., Zhang, Q., Zheng, Z., Gao, Z. & H. Xiao. 2018. Effects of high-humidity hot air impingement blanching (HHAIB) pretreatment on the change of antioxidant capacity, the degradation kinetics of red pigment, ascorbic acid in dehydrated red peppers during storage. *Food Chemistry*, 259: 65–72.
108. Wasser, S., Tam, K. & V. Elisashvili. 2002. Hypoglycemic, interferonogenesis, and immunomodulatory activity of Tremellastin from the submerged culture of *Tremella mesenterica*. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 4: 215–27.
109. Wasser, S. 2010. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends and unsolved problems. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 12: 1–16.
110. Witkowska, A. M., Zujko, M. E. & I. Mironzcuk-Chodakowska. 2011. Comparative study of wild edible mushrooms as sources of antioxidants. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 13, 335-341.
111. Yang, J., Lin, H. & J. Mau. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* 77: 229–35.
112. Youngson, R. 2004. ¿Qué son los radicales libres? En: *Antioxidantes y radicales libres*. Madrid: Edit. Acirbia. Madrid, España. 15-29.

113. Zhang, M., Cui, S., Cheung, P. & Q. Wang. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology* 18: 4-19.
114. Zhang, Y., Li, S., Wang, X., Zhang, L. & P. C. Cheung. 2011. Advances in lentinan: isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food hydrocolloids*, 25(2), 196-206.
115. Zhu X-L., Chen A-F., Lin Z-B. 2007. *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance the function of immunological effector cells in immunosuppressed mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 111:219–226.

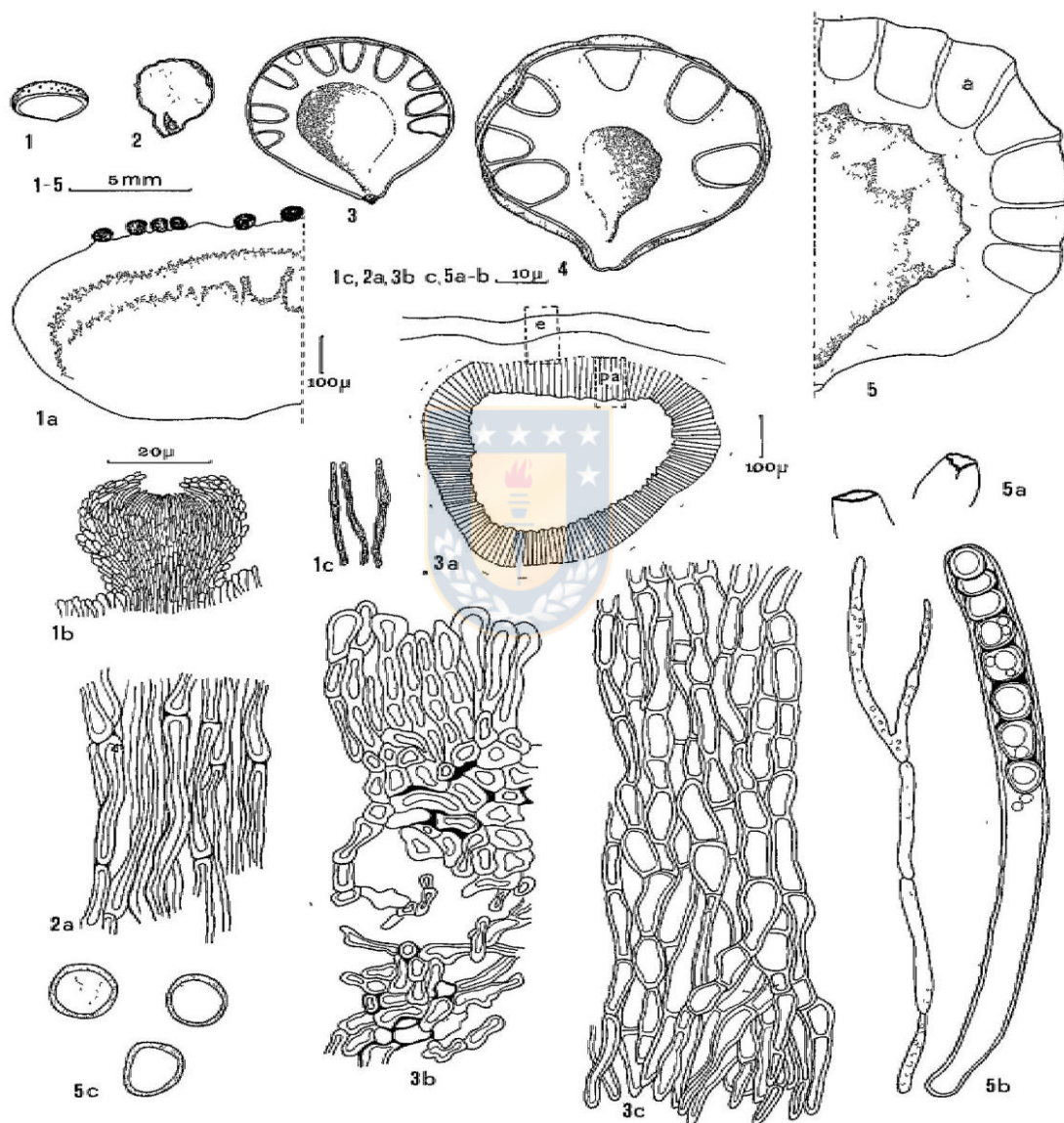


VIII. ANEXOS

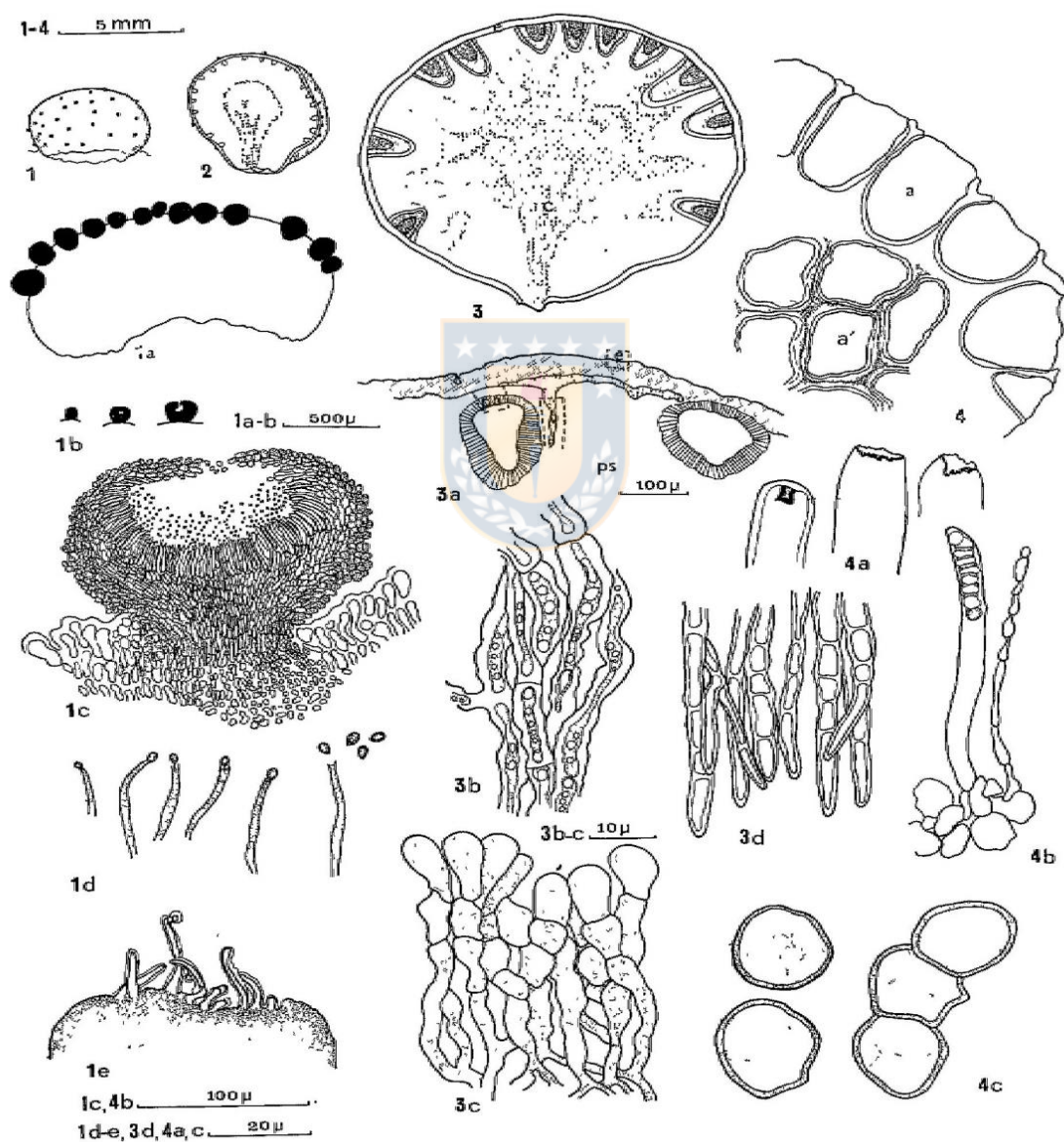
Anexo 1. Detalle de microscopia de *Cyttaria berteroi*. 1. Estroma en sección sagital, 2. (Estroma en sección sagital (plano perpendicular al de la fig. 1), 3. Detalle de fig. 1: e: ectostroma; v: venas; a: apotecio; ps: pseudotejido intersticial. 3. a-1; Detalles de fig 3. 3a. asco, 3b. paráfisis, 3c. ascosporas (una germinando), 3d. sección de un estroma, zl: zona lacunosa, 3f. hifas de ps, 3g. subhimenio, 3h. hifas de r, 3i. detalle de e. Fuente: Gamundí, 1971.

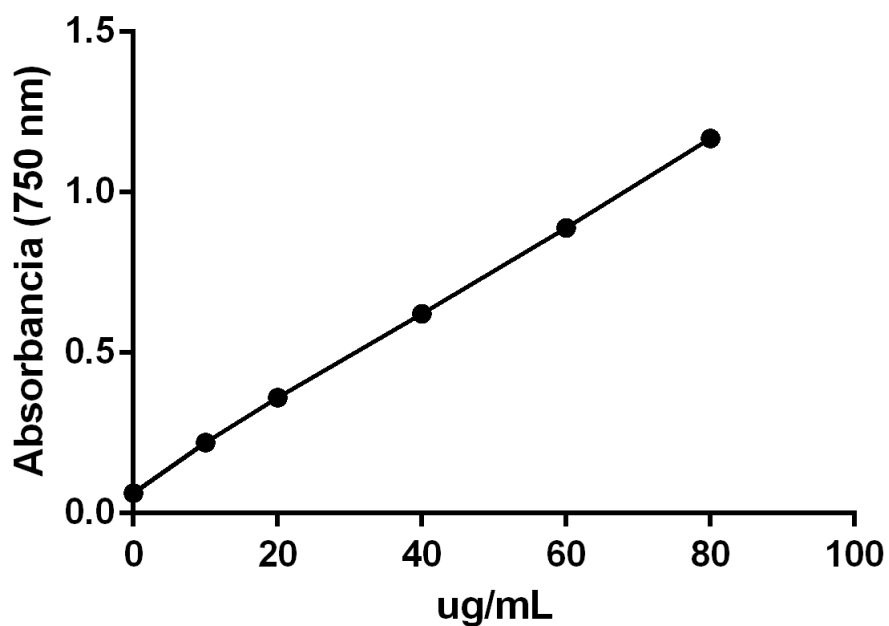


Anexo 2. Detalle de microscopia de *Cyttaria espinosae*. 1-5. Desarrollo del estroma, en corte sagital. 1ac. Detalles de 1; 1b. espermogonio, 1c. fiálides. 2ª. Detalle de la columela. (c) en 2. 3ac. Detalles de 3; 3ª. sección de un apotecio inmaduro, e. ectostroma, pa. paráfisis apicales, 3b, e aumentada. 3c. pa aumentada, 5ª-c. Detalles de 5, 5a. ápice de ascos dehiscentes, 5b. asco maduro y paráfisis, sc. ascosporas. Fuente: Gamundí, 1971.

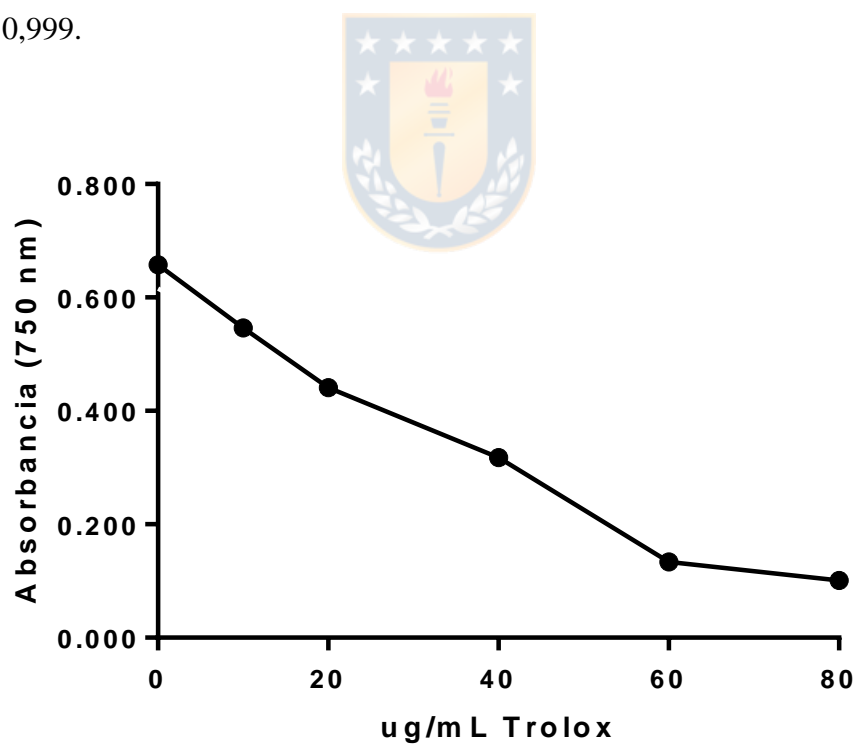


Anexo 3. Detalle de microscopia de *Cyttaria hariotii*. 1-4. Desarrollo del estroma (2-4. en corte sagital), c. columela, a. apotecio en sección y a¹ en vista frontal. 1 ac. Detalles de 1, 1b. 1c. spermacios, 1d. spermacios adheridos a hifas receptoras, 3ad. Detalles de 3, 3a. sección aumentada, e: ectostroma, pa: paráfisis apicales, ps: pseudotejido intersticial, v: venas, 3b. hifas de ps, 3c. detalles de e, 3d. paráfisis apicales (pa), 4^a-c. Detalles de 4, 4^a. ápices de ascos (a la izquierda inmaduro), 4b. ascos y paráfisis, 4c. ascosporas. Fuente: Gamundí, 1971.





Anexo 4. Curva de calibración del ácido gálico para el ensayo de Folin-Ciocalteu (n=3), con un $R^2=0,999$.



Anexo 5. Curva de calibración del Trolox para el radical $ABTS^{*+}$, expresado en media y desviación estándar (n=3) con un valor $R^2=0,962$.

Anexo 6. Datos climáticos de las zonas geográficas consideradas en este estudio a lo largo del año 2018, con enfoque en la temperatura y precipitación.

