



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Departamento de Botánica

Caracterización química de polisacáridos del hongo endémico comestible
***Cortinarius lebre* y su influencia en la actividad antioxidante y**
anticoagulante

Seminario de Título presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
para optar al título de Bióloga

POR ZAIDA TAIS RODRÍGUEZ RIQUELME

Profesor Guía Dra. Claudia Pérez Manríquez

Profesor co- Guía Dr. Fabián Figueroa Rebolledo

Abril 2024

Concepción, Chile

HOJA DE FIRMAS

Director de tesis

Dra. Claudia Pérez Manríquez

Departamento de Botánica

Universidad de Concepción

Profesor Guía

Dr. Fabián Figueroa Rebolledo

Departamento de Botánica

Universidad de Concepción

Profesores evaluadores

Dr. José Becerra Allende

Departamento de Botánica

Universidad de Concepción

Dr. Felipe Galleguillos Guajardo

Departamento de Botánica

Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi madre, por todo el amor, contención, esfuerzo y sacrificio incondicional que me ha entregado a lo largo de este proceso y de mi vida. Sin duda, este camino recorrido no hubiese sido posible sin ella y a quien agradezco todo lo que he logrado y en lo que me he convertido, por su fiel creencia en mí y por brindarme fortaleza e inspiración todos los días. A mis queridos hermanos, por ser pacientes, amorosos y alegrarme los días durante este proceso, a pesar de la distancia su cariño fue un pilar fundamental para mí.

Agradecer a todo el equipo del Laboratorio de Química de Productos Naturales, a mis profesores Dra. Claudia Pérez y Dr. José Becerra por el compromiso, la sabiduría y la disposición entregada. A mis compañeros, quienes hicieron infinitamente más ameno, fácil y enriquecedor el trabajo de esta tesis y de los cuales pude aprender, en especial a Montserrat y Gabriela, mis compañeras más cercanas durante este proceso las cuales hoy me llevo como grandes amigas. En especial, me gustaría agradecer al Dr. Fabián Figueroa por todo el compromiso puesto en su tutoría, por la paciencia, el apoyo y consejos que sin duda marcaron los últimos años de mi formación como bióloga y como persona. Siempre estaré agradecida de la oportunidad de trabajar y aprender de él.

A la familia Ugarte Romo, por todo el cariño, apoyo, compañía y risas entregadas durante estos últimos años. Eternamente agradecida por su cálido recibimiento y por convertir Concepción en mi segundo hogar, lejos de mi ciudad natal. A mi amiga Camila, con quien nos acompañamos y alentamos durante todos los años de la carrera y por sobre todo los últimos meses de este difícil proceso

En último lugar, pero no por ello menos importante, quiero agradecer a mi compañero Alfredo por el amor, la compañía y el apoyo que me ha brindado a lo largo de estos años y de la distancia.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| HOJA DE FIRMAS | 2 |
| AGRADECIMIENTOS | 3 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 5 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 6 |
| RESUMEN | 7 |
| ABSTRACT | 8 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| HIPÓTESIS | 15 |
| OBJETIVO GENERAL | 15 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 15 |
| RESULTADOS | 22 |
| Recolección de <i>Cortinarius lebre</i> | 22 |
| Rendimiento de polisacáridos | 22 |
| I. Caracterización química de polisacáridos de <i>Cortinarius lebre</i> | 23 |
| Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). | 23 |
| Composición monomérica | 24 |
| Contenido de azúcares totales | 24 |
| Contenido de fenoles totales | 25 |
| Contenido de ácido urónico | 26 |
| II. Actividad antioxidante | 27 |
| i. Ensayo de neutralización del radical DPPH | 27 |
| ii. Ensayo de neutralización del radical ABTS ⁺ | 29 |
| iii. Análisis de correlación entre el ácido urónico y la actividad antioxidante | 31 |
| III. Actividad anticoagulante | 32 |
| DISCUSIÓN | 33 |
| CONCLUSIONES | 43 |
| BIBLIOGRAFÍA | 44 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Diagrama de diseño experimental. | 16 |
| Figura 2.. Ejemplares maduros de <i>Cortinarius lebre</i> recolectados en la Comuna Concepción. | 22 |
| Figura 3. Espectros FT-IR de polisacáridos aislados de <i>Cortinarius lebre</i> | 23 |
| Figura 4. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de azúcares. | 24 |
| Figura 5. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de fenoles totales | 25 |
| Figura 8. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de polisacáridos crudos de <i>C. lebre</i> | 27 |
| Figura 9. (A) Curva de calibración del estándar Trolox. (B) Porcentajes de inhibición del radical DPPH de <i>PsCl</i> | 28 |
| Figura 10. Porcentajes de inhibición del radical ABTS de polisacáridos crudos de <i>C. lebre</i> | 29 |
| Figura 11. (A) Curva de calibración del estándar Trolox. (B) Porcentajes de inhibición del radical ABTS de <i>PsCl</i> | 30 |
| Figura 12. (A) Correlación del porcentaje de inhibición del radical DPPH y el contenido de ácido urónico. (B) Correlación del porcentaje de inhibición del radical ABTS y el contenido de ácido urónico. | 31 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Composición de monosacáridos de los polisacáridos de <i>Cortinarius lebre</i> | 24 |
| Tabla 2. Coeficientes de correlación de Pearson de la actividad antioxidante y el contenido de ácido urónico..... | 31 |
| Tabla 3. Análisis de la actividad anticoagulante mediante de las pruebas TP y TTPA de los polisacáridos crudos de <i>Cortinarius lebre</i> a diferentes concentraciones..... | 32 |

RESUMEN

Las enfermedades que afectan al sistema circulatorio incluyen los trastornos trombóticos que son la principal causa de morbilidad y mortalidad asociadas a pacientes hospitalizados. El uso de agentes anticoagulantes constituye la principal alternativa de prevención y tratamiento de estas enfermedades. Aunque la heparina, un mucopolisacárido sulfatado, presenta varios efectos adversos, sigue siendo el fármaco más ampliamente utilizado debido a su efecto anticoagulante y antitrombótico. Los fármacos anticoagulantes naturales pueden obtenerse a partir de plantas, ricas en metabolitos secundarios bioactivos que, además de ser eficaces antioxidantes, poseen propiedades anticoagulantes y antiagregantes plaquetarias, por lo que pueden ser excelentes candidatos para el tratamiento de enfermedades trombóticas. Estudios recientes han demostrado la eficacia de polisacáridos fúngicos como inhibidores de la coagulación sanguínea a través de la catálisis de antitrombina. En la presente investigación, se determinó la composición química de los polisacáridos de la especie endémica comestible *Cortinarius lebre*. Los polisacáridos crudos fueron obtenidos mediante extracción con agua caliente. Para la caracterización se utilizaron técnicas de FTIR, composición monomérica, contenido de azúcares totales y contenido de ácido urónico. La capacidad anticoagulante, fue determinada *in vitro* por ensayos de coagulación de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) y tiempo de protrombina (PT). Paralelamente, se determinó la actividad antioxidante *in vitro* mediante los ensayos DPPH (IC₅₀ 6.4 mg/mL) y ABTS (IC₅₀ 5.09 mg/mL). Este estudio aborda por primera vez el contenido de polisacáridos de la especie *Cortinarius lebre* y su relación con las actividades biológicas y se propone a este hongo como potencial alternativo farmacológico complementario para la prevención y tratamiento de las enfermedades trombóticas.

Palabras clave: trombosis, anticoagulante, antitrombótico, antioxidante, polisacáridos fúngicos

ABSTRACT

Thrombotic diseases are a major cause of morbidity and mortality in hospitalized patients. Anticoagulant agents are the primary treatment option for preventing and treating these diseases. Despite its several adverse effects, heparin, a sulfated mucopolysaccharide, remains the most widely used drug due to its anticoagulant and antithrombotic effects. Natural anticoagulant medicines can be derived from plants, which contain bioactive secondary metabolites. These metabolites are effective antioxidants and have anticoagulant and antiplatelet properties, making them promising for treating thrombotic diseases. Recent studies have shown that fungal polysaccharides can inhibit blood coagulation by catalyzing antithrombin. The chemical composition of the polysaccharides from the edible endemic species *Cortinarius lebre* was determined in this research. The crude polysaccharides were obtained through hot water extraction. Characterization was performed using FTIR techniques, monomeric composition, total sugar content, and uronic acid content. The anticoagulant capacity was determined in vitro through activated partial thromboplastin time (APTT) and prothrombin time (PT) coagulation assays. The study determined the antioxidant activity in vitro using the DPPH (IC₅₀ 6.9 mg/mL) and ABTS (IC₅₀ 5.09 mg/mL) assays, while also addressing the polysaccharide content of the *Cortinarius lebre* species and its potential as a complementary pharmacological alternative for preventing and treating thrombotic diseases.

Keywords: Thrombotic diseases, Anticoagulant, Antioxidant, Polysaccharides, Fungal

INTRODUCCIÓN

Los hongos comestibles han sido parte de la dieta humana por mucho tiempo, reconocidos por sus particulares características organolépticas como aroma, sabor y textura. Son apreciados por su valor nutricional y considerados una buena fuente de carbohidratos, proteínas, fibras insolubles, aminoácidos y su bajo contenido de lípidos (Cano & Romero, 2016; Kalač, 2013)

Durante siglos, la cultura oriental ha utilizado y consumido hongos como alimentos medicinales y en las últimas décadas ha aumentado gradualmente en los países occidentales, ya que sumado a sus atributos nutricionales se valoran como una fuente tradicional de compuestos biológicamente activos, estos incluyen principalmente una variedad de compuestos de bajo peso molecular como policétidos y alcaloides. Además, compuestos de alto peso molecular como proteínas, lípidos y polisacáridos. Se han reportado como parte de tratamiento de variadas enfermedades como cáncer, hipertensión, síndromes metabólicos, entre otros. Estas características funcionales atribuidas a los hongos comestibles se deben principalmente a su composición química (De Silva et al., 2013; Manzi et al., 2001).

En relación a estos últimos, los polisacáridos son carbohidratos relativamente complejos y son moléculas formadas por unidades de monosacáridos unidas por enlaces glucosídicos, pueden diferir en la unidad y grado de ramificación, el tipo de enlace entre los monosacáridos y la longitud de sus cadenas (Chaplin, 2006; Glazer & Nikaido, 2007; Pontón, 2008)

En este contexto, los polisacáridos fúngicos se diferencian de otros tipos de polisacáridos en la naturaleza a través sus características químicas singulares, el grado de ramificación, longitud del esqueleto, conformación tridimensional, por mencionar algunas de ellas. Los polisacáridos fúngicos son en su mayoría betaglucanos, estos se conforman de una cadena principal de glucosa unidos por enlaces glucosídicos, la mayor parte de estos presentan una disposición β -(1,3) con puntos de ramificación β -(1,6). Los betaglucanos junto con la quitina constituyen los principales componentes de la pared celular de las células fúngicas, actuando como polisacáridos estructurales, además son capaces de interactuar con diferentes enzimas y receptores celulares, contribuyendo así en numerosos procesos biológicos, como la señalización celular y la modulación del sistema inmune (Duarte-Trujillo et al., 2018; Maity et al., 2021). Además, estos glucanos pueden unirse a otros azúcares, dando origen a

heteroglicanos, dependiendo del azúcar añadido a su cadena principal pueden clasificarse en galactanos, fucanos, xilanos, y mananos (Djordje et al., 2005; Pandya et al., 2019)

En relación a los polisacáridos fúngicos aislados desde hongos comestibles, varios glucanos y heteroglicanos han presentado una amplia gama de actividades biológicas como antitumorales, inmunológicas, antimicrobianas, antidiabéticas, antitrombóticas y antioxidantes, entre otras. Su mecanismo de acción de estos glucanos es escasamente conocido, sin embargo, se han asignado varias características estructurales como responsables de la amplia gama de propiedades biológicas, como las mencionadas anteriormente. La composición del azúcar, el peso molecular, la conformación, las estructuras de la columna vertebral y el patrón de ramificación son algunas de las características estructurales cruciales que contribuyen a la bioactividad de los polisacáridos (Duarte Trujillo et al., 2018; Maity et al., 2021)

Actividad anticoagulante de la heparina

La enfermedad tromboembólica venosa (ETE) consiste en la obstrucción de una o más venas por un trombo que puede ocasionar obstrucción de otros vasos a distancia, conocidos como émbolos. Esta enfermedad incluye las patologías trombosis venosa profunda (TVP) y tromboembolismo pulmonar (TEP), las cuales son afecciones comunes con alta morbilidad y mortalidad tanto en pacientes previamente sanos como en pacientes quirúrgicos hospitalizados. Si bien puede afectar a pacientes sin otras condiciones médicas previas se ha reportado que esta enfermedad tiene una incidencia 130 veces mayor en pacientes hospitalizados en comparación con la población general y se estima que el 25% de los eventos tromboembólicos tiene como factor de riesgo un procedimiento quirúrgico en sí mismo. Es la tercera causa más común de enfermedades cardiovasculares y ha sido catalogada como la principal causa de muerte evitable en pacientes hospitalizados (Aizman et al., 2011; Cifuentes & Aguiló, 2018; Martínez et al., 2014; Morales et al., 2019)

El tratamiento y la prevención de ETE se basa en la anticoagulación, debido a su eficacia la heparina, la cual se ha convertido en el fármaco más utilizado en cirugía vascular para prevención de la coagulación durante intervenciones prolongadas y trombosis postoperatorias (Morales et al., 2019).

La heparina es una mezcla heterogénea de mucopolisacáridos sulfatados de carácter ácido, obtenida a partir de la mucosa intestinal de cerdos, ovinos o bovinos. Su mecanismo de acción está mediado por la unión de la heparina a la antitrombina (ATIII), una glicoproteína de la sangre que inhibe la trombina. La interacción entre la ATIII y la trombina se acelera, lo que conduce a la inactivación de la trombina y dado que la función principal de la trombina es transformar el fibrinógeno en fibrina, se inhibe o disminuye la formación de este polímero, que es el paso final en la cascada de coagulación sanguínea (Mestechkina & Shcherbukhin, 2010a; Rivera et al., 2009)

La heparina no fraccionada (HNF) y la heparina de bajo peso molecular (HBPM) son ampliamente administradas en la práctica médica a pesar de manifestar una serie de efectos secundarios adversos, entre los más frecuentes y predecibles se destaca la hemorragia, la cual se ha reportado que incrementa con el uso de otros anticoagulantes ya que estos actúan de forma sinérgica. Además, induce la osteoporosis, trombocitopenia y reacciones de hipersensibilidad (erupción, escalofríos, fiebre). Sumado a esto, debido a que la heparina se extrae de tejidos animales, puede causar riesgo de contaminación por patógenos animales. Estos antecedentes han motivado el estudio, detección y búsqueda de anticoagulantes análogos efectivos libres de efectos secundarios a partir de diversas fuentes naturales no animales (Morales et al., 2019; Rivera et al., 2009).

Polisacáridos de origen fúngico con actividad anticoagulante

Se denomina anticoagulante a cualquier sustancia que impida la coagulación de la sangre o prolongue el tiempo de coagulación. La actividad anticoagulante se puede determinar mediante pruebas de coagulación, ensayos clásicos incluyen el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) que evalúa la vía intrínseca de coagulación, el tiempo de protrombina (PT) el cuál evalúa la vía extrínseca y tiempo de trombina (TT) que evalúa una vía común donde convergen ambas. Estas vías forman parte del modelo de Cascada de Coagulación, el cual explica el funcionamiento del mecanismo de coagulación mediante un proceso enzimático secuencial sobre la superficie de las plaquetas, con el cuál se favorece la generación de trombina (Guerrero & López, 2015).

Algunos de los anticoagulantes se aíslan de fuentes naturales, tales como los polisacáridos del hongo comestible *Auricularia auricularia-judae*, del cual se obtuvo un polisacárido ácido

sulfatado, aislado por método de extracción de agua caliente. El polisacárido, previamente purificado, mostró una actividad anticoagulante de 2 UI/mg y su método de acción fue mediada por la catalización de la inhibición de la trombina por la antitrombina. Estos resultados indican que los polisacáridos de *A. auricularia* inhiben la coagulación de la sangre mediante las vías intrínseca o convergente, pero con baja inhibición por la vía extrínseca. Se reporta que la composición química de este polisacárido, de bajo peso molecular (~160 kDa), se basa principalmente de manosa, glucosa, xilosa y en especial se destaca la presencia de ácido glucurónico como esencial para acción anticoagulante, ya que la actividad desapareció después de la reducción de sus grupos carboxilos (Guerrero & López, 2015; Yoon et al., 2003)

Igualmente, según lo indicado Nataraj et al (2022), los polisacáridos crudos de *Calocybe indica* de manera dosis dependiente (en un rango de 5 y 10 mg/mL) podría prolongar el APTT y el TT, lo que implica la inhibición de la vía de coagulación intrínseca y la formación de fibrina mediada por trombina.

Es importante destacar que existe una estrecha relación entre las actividades biológicas y las características estructurales de los polisacáridos, tales como, el contenido de monosacáridos, el peso molecular, el tipo de enlace glucosídico, el grado de ramificación y la conformación de la cadena. En este contexto, la capacidad anticoagulante está determinada en gran medida por el tamaño molecular de los polisacáridos y guarda relación con la composición la posición de los monosacáridos y el contenido de grupos sulfato. En cuanto a la composición monomérica, cabe destacar que los monosacáridos más abundantes en los polisacáridos reportados con actividad anticoagulante son la manosa, glucosa y xilosa (Nataraj et al., 2022a; Shanmugam & Mody, 2000; Wang et al., 2016; Zhang et al., 2008)

Actividad antioxidante de polisacáridos de origen fúngico

La trombosis es un proceso complejo que involucra la interacción de varios tipos de células, incluidas las células endoteliales vasculares, las plaquetas y los glóbulos rojos. El estrés oxidativo caracterizado por un exceso de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), puede perjudicar significativamente el funcionamiento de estas células, provocando una serie de eventos que conducen a la formación de trombos, es decir, constituye un factor de alto riesgo para enfermedades cardiovasculares y ataques cardíacos. Tomando en cuenta la relación entre el estrés oxidativo y las enfermedades cardiovasculares, y la búsqueda de

opciones complementarias para tratar estas afecciones, investigaciones recientes han presentado evidencia sobre antioxidantes de origen natural con propiedades antioxidantes que podrían tener efectos anticoagulantes (Bijak et al., 2016; Peiming et al., 2024; Rao et al., 2014). Es por esta razón que, en paralelo, se ha investigado la actividad antioxidante de los polisacáridos fúngicos. En el contexto actual de la búsqueda de alternativas de antioxidantes naturales, estos polisacáridos están siendo ampliamente estudiados debido a su capacidad para proteger a los organismos y las células del daño causado por el estrés oxidativo (Cazzi et al., 1997).

Estudios demuestran que la capacidad antioxidante de los polisacáridos de hongos está relacionada con la alta presencia de ácidos urónicos y grupos sulfatos. Un ejemplo es lo que se reporta en (Nataraj et al., 2022) para el polisacárido de *Calocybe indica*, el cual indica que el mecanismo de acción de los ácidos urónicos, se basa en que la presencia de estos átomos activa el hidrógeno del carbono anomérico, incrementando así la capacidad de suministrar hidrógeno por parte del polisacárido. A su vez, se ha reportado que la presencia de grupos sulfatos mejoraría la solubilidad en agua y las características fisicoquímicas de estos compuestos. Sumado a esto, la posición en la que estos grupos se encuentran guarda relación con la actividad antioxidante presente, los grupos posicionados en C-4 y C-6 aumentarían su actividad mientras que la disminuirán en una posición C-2. Por otro parte, se puede atribuir la capacidad antioxidante a los polisacáridos de bajo peso molecular, los cuales se espera, tengan más grupos OH reducidos, que puedan recibir y extinguir los radicales libres. Finalmente, se ha registrado que los betaglucanos en forma de piranosa exhiben una mayor actividad antioxidante, por lo que esta capacidad podría asociarse a la estructura del polisacárido (Nataraj et al., 2022a; Xie et al., 2016; Zhong et al., 2019)

Hongos de estudio: hongos comestibles del género *Cortinarius*

Los hongos comestibles han sido parte de la dieta humana en casi todo el mundo desde tiempos prehistóricos y un gran número de ellos corresponden a especies micorrícicas (Pérez et al., 2020)

En los bosques andino-patagónicos de *Nothofagus* se han descrito alrededor de mil especies de macrohongos, de ellas solo unas pocas especies son recolectadas y consumidas regularmente por poblaciones locales. Uno de los géneros más diversos de hongos

ectomicorrícicos en estos bosques es *Cortinarius*, del cual se han reportado varias especies comestibles, entre ellas *Cortinarius lebre* (Garrido, 1988; Palfner et al., 2022)

Cortinarius lebre Garrido (Cortinariaceae, Agaricales, Basidiomycota) se distribuye en el centro sur de Chile, se puede encontrar en grandes cantidades en remanentes de bosque nativo a lo largo de la Cordillera de la Costa, especialmente en la Región del Bío-Bío. Su fructificación se produce durante la temporada de lluvias en mayo y agosto, y se puede identificar por su consistencia dura y píleo de color violeta, pero especialmente se caracteriza por su fuerte y desagradable olor similar a la naftalina, cuyo componente está identificado como un indol y que a menudo se puede percibir a varios metros de distancia de los basidiomas (Arnold et al., 2011; Mueller et al., 2007; Palfner et al., 2022)

Además del atributo organoléptico informado, Jacinto-Azevedo et al (2021) mediante una composición proximal, proporcionaron atributos nutricionales de *Cortinarius lebre*, reportando un alto contenido en carbohidratos, proteínas y fibra, además de un bajo contenido de grasa. Los autores concluyeron que estas características indican que este hongo comestible tiene un alto valor nutricional y es ideal para consumirlo en dietas hipocalóricas.

Los análisis químicos y organolépticos son generalmente escasos para las especies formadoras de micorrizas en Sudamérica. Los estudios realizados sobre especies de *Cortinarius* se han enfocado en determinar su valor nutricional y dilucidar algunos de los metabolitos secundarios que estos hongos presentan. Sin embargo, el conocimiento sobre la descripción, caracterización y variación química de los polisacáridos de *Cortinarius lebre* no han sido documentadas, ni así sus actividades biológicas.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto y considerando que las características químicas de los polisacáridos están estrechamente relacionadas con las actividades biológicas que puedan presentar, se determinarán las características químicas de los polisacáridos del hongo comestible *C. lebre* y su relación con las actividades anticoagulante (TTPA, TP) y antioxidante (DPPH, ABTS^{•+})

HIPÓTESIS

1. La actividad antioxidante de los polisacáridos aislados desde *Cortinarius lebre* esta influenciada positivamente por el contenido de ácido urónico presente.
2. El grado de sulfatación y la composición monomérica de los polisacáridos de *Cortinarius lebre* incrementa su actividad anticoagulante por inhibición de la trombina.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las características químicas de los polisacáridos en la especie de hongo comestible *Cortinarius lebre* y su influencia diferenciada en la actividad antioxidante y anticoagulante.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar químicamente los polisacáridos aislados desde el cuerpo fructífero de *Cortinarius lebre*.
2. Evaluar la actividad antioxidante y anticoagulante de polisacáridos aislados desde el cuerpo fructífero de *Cortinarius lebre*.
3. Dilucidar la relación entre la composición química de los polisacáridos del hongo comestible *Cortinarius lebre* con su actividad antioxidante y anticoagulante

METODOLOGÍA

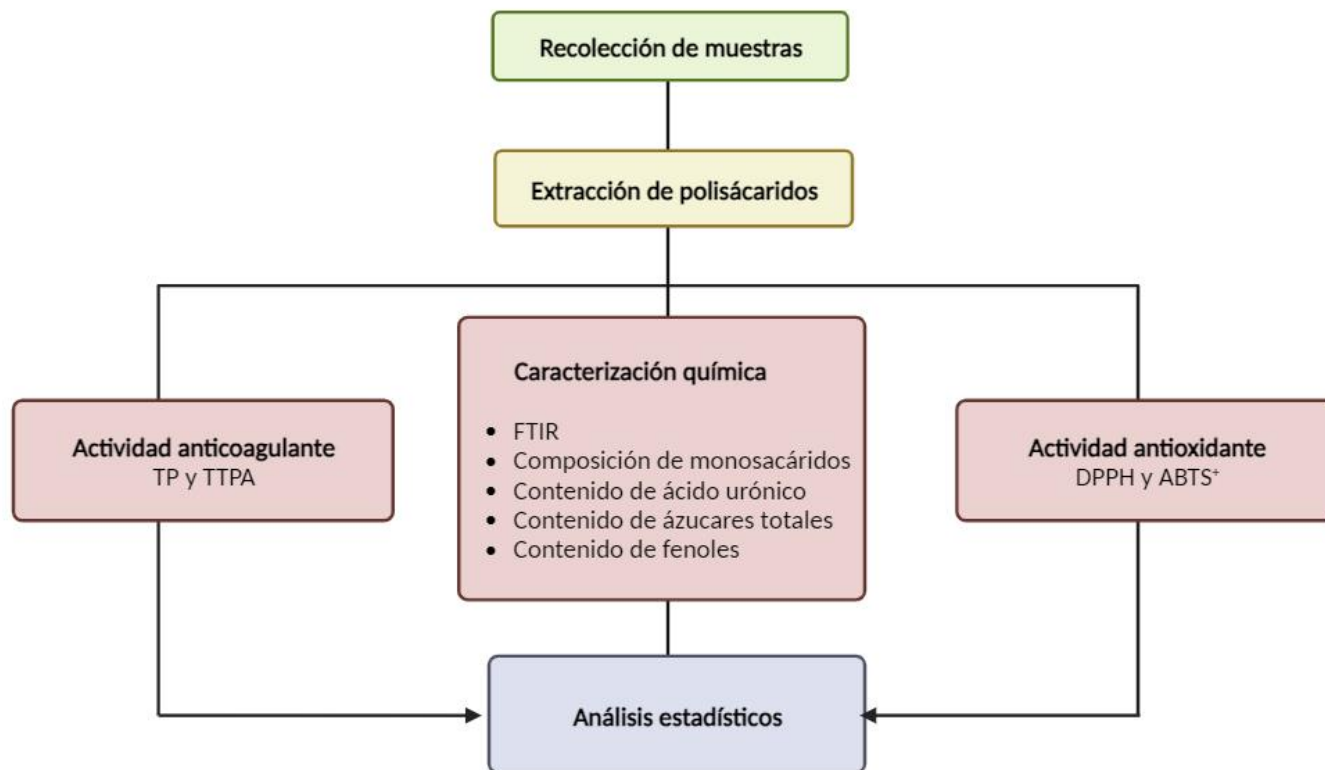


Figura 1: Diagrama de flujo que indica el diseño experimental.

Recolección e identificación del material biológico

Los cuerpos fructíferos de *Cortinarius lebre* fueron recolectados durante el mes de julio de 2023 en el Campus Concepción, Universidad de Concepción, Región del Bío Bío, Chile (36°50'17.5"S 73°01'32.0"W), asociada a *Nothofagus spp.* Posteriormente, las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Universidad de Concepción. Las muestras fueron almacenadas a -30°C y posteriormente liofilizadas durante 48 horas en un liofilizador automático modelo CHRIST Alpha 2-4 LO plus y almacenados a -20°C para su posterior utilización.

Para la identificación taxonómica de los hongos, estas fueron observadas las características macroscópicas de los hongos (morfología externa, color, olor, textura, tamaño) y microscópicas (estructuras reproductivas) con ayuda del material bibliográfico especializado (Furci, 2018; Lazo Araya, 2001).

Extracción y aislamiento de polisacáridos de *Cortinarius lebre*

Las muestras liofilizadas de *Cortinarius lebre* fueron trituradas en una picadora Moulinex DP800 y se determinó la masa inicial. Previo a la extracción, los pigmentos, proteínas, compuestos fenólicos y lípidos de la muestra fueron eliminados en una solución de EtOH al 70% durante 24 horas con agitación constante. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 4500 rpm durante 10 min, se recupera el residuo sólido resultante para finalmente ser secado y pesado para calcular su rendimiento.

Se realizó la extracción de polisacáridos de acuerdo con el método descrito por (Figueroa et al., 2020) con algunas modificaciones. El material fue resuspendido en 400 mL de agua destilada y calentado a 80°C durante 1 hora. Posteriormente, esta solución fue centrifugada a 4500 rpm durante 8 min y se recuperó el sobrenadante, este procedimiento fue repetido dos veces. Luego, con la finalidad de disminuir volumen del sobrenadante, este fue concentrado en un rotavapor (IKA HB10 digital, Staufen, Germany) a 90 rpm, presión reducida y 65°C hasta reducir el volumen a 300 mL.

Luego, para precipitar los polisacáridos, a los 300 mL de sobrenadante, se agregó etanol frío (EtOH absoluto) en una proporción 1:1 y se mantuvo a 4°C durante 24 h. Luego la muestra fue centrifugada a 4500 rpm durante 15 min, recolectándose los polisacáridos crudos (PsCl), los que serán liofilizados (en un liofilizador automático modelo CHRIST Alpha 2-4 LO plus) y almacenados a -20°C para su posterior uso.

Rendimiento de polisacáridos (Pc) (%).

El rendimiento de los polisacáridos crudos de *C. lebre* fue determinado utilizando la fórmula (Samavati, 2013)

$$\text{Rendimiento Pc} = (\text{Peso de Pc crudos (g)}) / (\text{peso de material seco (g)}) \times 100$$

Caracterización química de polisacáridos

Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

Para la caracterización de los grupos funcionales de los hongos se utilizó el equipo de espectroscopía de absorción infrarroja por transformada de Fourier Shimadzu modelo IRAffinity-1S con accesorio ATR modelo QATR 10. La espectroscopía de absorción infrarroja de los polisacáridos se midió en la región $4000-400\text{ cm}^{-1}$ con una resolución de 4cm^{-1} y 60 escaneos. Se grafica el espectro con el software OriginPro 2018 y utilizando el algoritmo Savitzky-Golay con 30 puntos de suavizado (Sangeetha et al., 2020)

Determinación del contenido de azúcares totales

Se determinó el contenido de azúcares totales utilizando la metodología según (Dubois et al., 1956) con algunas modificaciones. Se preparó una solución de antrona en H_2SO_4 a una concentración de 2mg/mL . Además, se preparó una solución de polisacáridos 5 mg/mL en agua destilada. Para la curva de calibrado, se utilizó glucosa como estándar y se realizaron diluciones en un rango de 200ug/mL a 10ug/mL en H_2O . Luego se extraen 200ul de cada muestra, se les agregó 1 mL de la solución de antrona, estas soluciones se hidrolizaron a 90°C durante 17 minutos. Finalmente, se depositaron 200 uL de cada muestra en una microplaca SPL 96 Well Plate Type 35096 y se midió la absorbancia a 620nm en el lector de microplaca BioTek Epoch™. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Determinación del contenido de ácido urónico

Se determinó el contenido de ácido urónico utilizando la metodología según (Taylor & Buchanan-Smith, 1992) con algunas modificaciones. Se preparó una solución de carbazol en etanol a una concentración de 10 mg/mL . Adicionalmente se agregaron 0.8 g de tetraborato de sodio a una solución de ácido sulfúrico 8.46 M , se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 24 horas. Para la curva de calibrado, se utilizó como estándar ácido galacturónico a una concentración de 10 mg/mL y se realizaron diluciones en un rango de 0 a $100\text{ (}\mu\text{g/mL)}$. Además, se preparó una solución de polisacáridos de 5mg/mL en agua destilada y se realizaron diluciones en un rango de 1 a 5 mg/mL . Luego, en tubos Eppendorf se agregan 100 uL de cada muestra de polisacáridos o 100 uL de cada muestra de ácido glucurónico y se adicionan 200 uL de agua destilada, 100 uL de carbazol y 1mL de ácido borato, estas

soluciones se hidrolizaron a 100°C durante 15 minutos. Finalmente, se depositaron 200 μ L de cada muestra a una microplaca SPL 96 Well Plate Type 35096 y se mide la absorbancia a 520nm en un lector de microplaca BioTek Epoch™. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Determinación de contenido de fenoles totales

Se utilizó el método colorimétrico desarrollado por (Folin & Ciocalteu, 1927). Inicialmente, se preparó una solución de polisacáridos en concentración 5 mg/mL en agua destilada.

Paralelamente, se preparó una solución de carbonato de calcio a una concentración de 200 mg/mL. Para la curva de calibración, se utilizó ácido gálico en un rango de concentraciones desde 10 μ g/mL hasta 200 μ g/mL en agua destilada. En tubos Eppendorf se añadieron 400 μ L de agua destilada, 20 μ L de muestra y 40 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y fue agitado en un vórtex V1 plus (Boeco, Hamburgo, Alemania). Se dejó reaccionar la mezcla durante 5 minutos. Seguidamente, se agregaron 200 μ L de carbonato de calcio y se incubó en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 200 μ L de cada muestra en una microplaca SPL 96 Well Plate Type 35096, y se midió la absorbancia a 765 nm utilizando el lector de microplacas BioTek Epoch™. La determinación fue realizada por triplicado. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de extracto.

Composición de monosacáridos

Después de someter los polisacáridos a una hidrólisis (3 ml de H₂SO₄ al 72%, 121°C, 1 h), se determinó la fracción de composición de monosacáridos totales mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con detector de índice de refracción y columna Phenomenex Rezex RoA Organic acid H⁺, 300x 7.5 mm. Se utilizaron glucosa, arabinosa, xilosa como estándar para el análisis (Dore, Faustino Alves, Pofirio Will, Costa, Sabry, De Souza Rêgo, et al., 2013).

Determinación actividad antioxidante

DPPH (2,2-difenilpicrilhidrazilo)

La actividad antioxidante de los polisacáridos se evaluó siguiendo el procedimiento de (Brand-Williams et al., 1995) con pequeñas modificaciones. Inicialmente se preparó el radical DPPH en metanol a una concentración de 0.1mM. Como curva de calibración, se utilizó una solución Trolox en etanol en concentraciones desde 200-10 µg /mL. Paralelamente, se prepararon las diluciones de polisacáridos en un rango de 1 a 5 mg/mL. Para la reacción se agregaron 100 µl de solución de diferentes concentraciones de muestras (mg/mL) o Trolox a 900 µl de solución de 2,2-difenilpicrilhidrazilo (DPPH). Luego, la mezcla se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, la absorbancia se leyó a 517 nm mediante un espectrómetro BioTek Epoch™. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. La actividad secuestrante de DPPH se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$DPPH\bullet (\%) = (Ac - As) / Ac \times 100$$

Donde Ac es la absorbancia del control negativo (agua destilada) y As es la absorbancia de la muestra.

ABTS^{•+}

La actividad de captación de radicales libres de los polisacáridos se determinó utilizando radicales ABTS (Re et al., 1999) El catión radical ABTS (ABTS^{•+}) se preparó haciendo reaccionar 50 mL de solución ABTS 7mM y una solución acuosa con persulfato de potasio 2,45 mM a temperatura ambiente durante 16 horas previo al uso. Esta solución fue disuelta en agua destilada hasta obtener una absorbancia de 0,8 a 734 nm. Luego, se mezclaron 100 µL de diferentes concentraciones de polisacáridos (5, 4, 3, 2, 1 mg/mL) con 900 µL de la solución ABTS^{•+}. La solución se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos y se centrifugaron los tubos Eppendorf durante 2 minutos. Finalmente, se agregaron 200 µL de la solución a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 734 nm. Adicionalmente, se utilizó Trolox como curva de calibración en concentraciones 200 a 0 µg/mL. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. La actividad secuestrante de ABTS^{•+} se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$ABTS^+(\%) = (Ac - As) / Ac \times 100$$

Donde Ac es la absorbancia del control negativo, en este caso agua destilada y As es la absorbancia de la muestra.

Actividad anticoagulante

Utilizando el método de (Mourão et al., 1996) Se realizarán ensayos de coagulación de tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) y tiempo de protombina (PT) usando plasma humano normal. Se probó un rango de concentraciones de 125 a 1.000 µg/mL de polisacáridos. Los tiempos de coagulación de la sangre se registraron en un coagulómetro. Los experimentos independientes se realizaron por triplicado. La actividad anticoagulante se expresó como tiempo de coagulación o UI/mg usando una curva estándar paralela basada en el 4º Estándar Internacional de Heparina (193 UI/mg).

Análisis estadístico

Los datos para los experimentos fueron expresados como promedios ± desviación estándar (DE) con un n muestral de tres. Previo a los análisis se evaluaron los supuestos de normalidad, y la homogeneidad de varianza. La evaluación estadística se realizó utilizando análisis de varianza (ANOVA) unidireccional o su variante no paramétrica Kruskal-Wallis en caso de no cumplir con los supuestos. Se realizó un análisis de correlación de Pearson para clarificar la relación entre la presencia de ácido urónico y la actividad antioxidante exhibida por *PsCl*. Las diferencias estadísticamente significativas se considerarán cuando $p < 0,05$. Las pruebas estadísticas se realizaron en el software estadístico INFOSTAT. (Kuckartz et al., 2013; Jerrold H. Zar, 1999; Zuur et al., 2009; Kim, 2014).)

RESULTADOS

Recolección de *Cortinarius lebre*



Figura 2. *Cortinarius lebre* Garrido basidiomas maduros.

Se recolectaron 8 ejemplares maduros (33.6 g) con las siguientes características:

Características morfológicas: Píleo de 8-10 cm de diámetro, plano con margen débilmente deprimido e irregular, superficie lisa y viscosa, de color liliáceo a marrón, láminas muy próximas de color crema a marrón. Estípite de 8-15 cm, cilíndrico, seco, fibroso-escamoso de color crema. No se observaron rastros de cortina. Olor fuerte a naftalina.

Hábitat y hábito: ejemplares ectomicorrícicos que crecen en pequeños grupos, entre la hojarasca o el suelo de bosque de *Nothofagus*.

Lugar de recolección: Ciudad de Concepción, Región del Biobío (36°50'17.5"S 73°01'32.0"W).

Rendimiento de polisacáridos

A partir de 33.6 g de cuerpo fructífero liofilizado de *Cortinarius lebre*, se obtuvieron 6 g de polisacáridos crudos (*PsCl*), lo que representa un rendimiento del 17.8%.

I. Caracterización química de polisacáridos de *Cortinarius lebre* Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

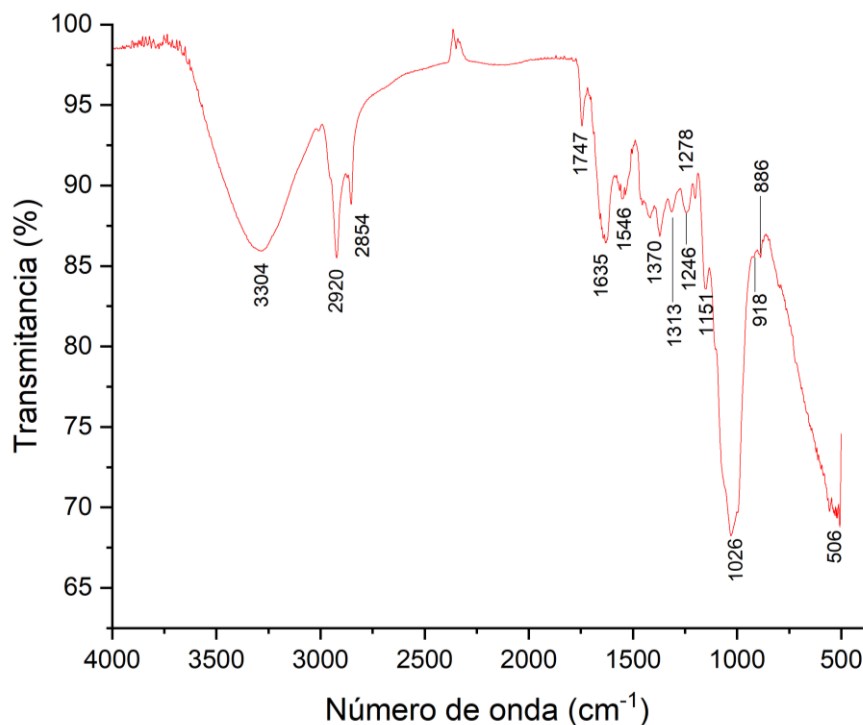


Figura 3. Espectro FT-IR de polisacáridos aislados de *Cortinarius lebre*.

Se realizó un análisis espectroscópico FTIR para caracterizar los grupos funcionales asociados a los polisacáridos crudos de *C. lebre* mediante la determinación de las vibraciones moleculares de los grupos funcionales orgánicos. Los resultados del análisis detectaron la presencia de bandas de absorción que corresponde a las estructuras típicas de polisacáridos. Se demostró la existencia de enlaces glucosídicos tipo α y β , presencia de trazas de ácido urónico, anillos de piranosa y algunas amidas.

Composición monomérica

Tabla 1. Composición de monosacáridos de los polisacáridos de *Cortinarius lebre*.

| | Glucosa | Xilosa/Manosa | Arabinosa |
|-------------------------|-------------|---------------|-------------|
| Monómeros (%p/p) | 36.98± 0.02 | 8.82 ± 0.07 | 0.38 ± 0.02 |

* Peak de xilosa/manosa fue expresado como xilosa equivalente.

Contenido de azúcares totales

La determinación del contenido de azúcares se llevó a cabo mediante el método de la antrona, un método colorimétrico para la determinación de la concentración de carbohidratos ampliamente utilizado debido a la facilidad del procedimiento, sensibilidad y rapidez de ejecución, además de ser apropiado para cuantificar diferentes azúcares como monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Esta técnica se basa en la hidrólisis de los polisacáridos en azúcares simples mediante una hidrólisis ácida y posterior cuantificación de los monosacáridos restantes. Este proceso implica la formación de un complejo de color azul-verde entre los carbohidratos y el reactivo de antrona, que se determina colorimétricamente con un máximo de absorción a 620 nm (Dubois et al., 1956; López-Legarda et al., 2017)

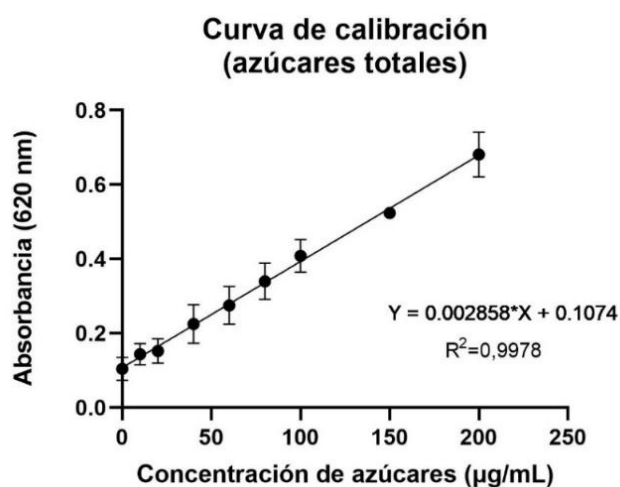


Figura 4. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de azúcares utilizando como reactivo estándar glucosa. Los valores se expresan como medias ± error estándar ($n=3$)

- Absorbancia de la muestra (nm): 0.336
- Contenido de azúcares en 100 µg/mL de muestra: 80.25
- Porcentaje de azúcares de la muestra: 80.25%

Contenido de fenoles totales

La determinación del contenido de fenoles totales se realizó según el método de Folin-Ciocalteu (1927), este método ha sido descrito en la literatura como un protocolo estándar para la cuantificación de polifenoles en tejidos vegetales y alimentos de origen vegetal. En esta técnica, el reactivo Folin-Ciocalteu (una mezcla de ácidos fosfotúngico y fosfomolibdeno) en presencia de compuestos fenólicos se reduce, en un medio alcalino, a óxidos azules de tungsteno y molibdeno, que muestran absorción de luz a 765 nm. Como estándar se utiliza el ácido gálico, comúnmente utilizada para expresar los resultados en datos cuantitativos, como ácido gálico por unidad de muestra (Blainski et al., 2013; Kupina et al., 2018)

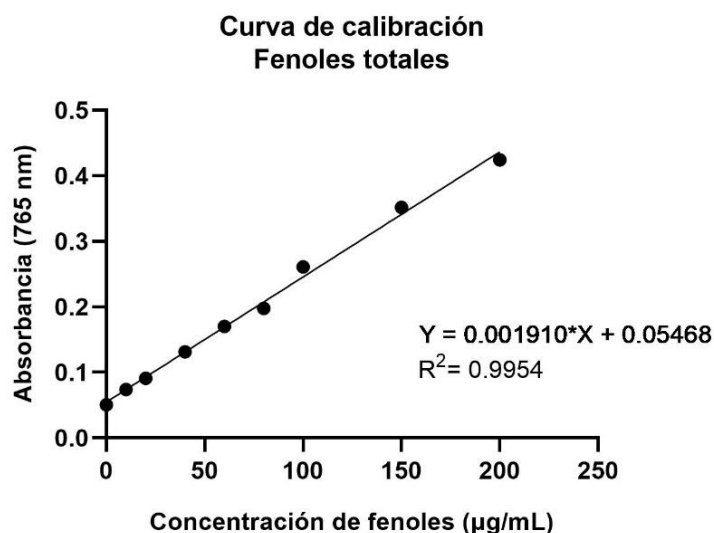


Figura 5. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de fenoles totales utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu. Los valores se expresan como medias \pm error estándar ($n=3$).

- Absorbancia de la muestra (nm): 0.157
- Contenido de fenoles en 5 mg/mL de *PsCl*: 54.07 µg/mL
- Contenido de fenoles de *PcCl*: 10.8 mg GAE/g
- Porcentaje de fenoles de la muestra: 1.08%

Contenido de ácido urónico

Para determinar el contenido de ácido urónico de los polisacáridos de *C. lebre* fue utilizado el método del ácido carbazol-sulfúrico, un ensayo colorimétrico simple y sensible que utiliza como estándar el ácido glucurónico, un ácido urónico común presente en varios extractos biológicos, lo que lo convierte en un método adecuado para el análisis cuantitativo de carbohidratos complejos. El principio de esta técnica se basa en hidrolizar los polisacáridos con ácido sulfúrico concentrado para luego reaccionarlos con carbazol y producir un cromóforo que puede cuantificarse espectrofotométricamente con un máximo de absorción de 520 nm (Knutson & Jeanes, 1968; Li et al., 2007; Taylor & Buchanan-Smith, 1992)

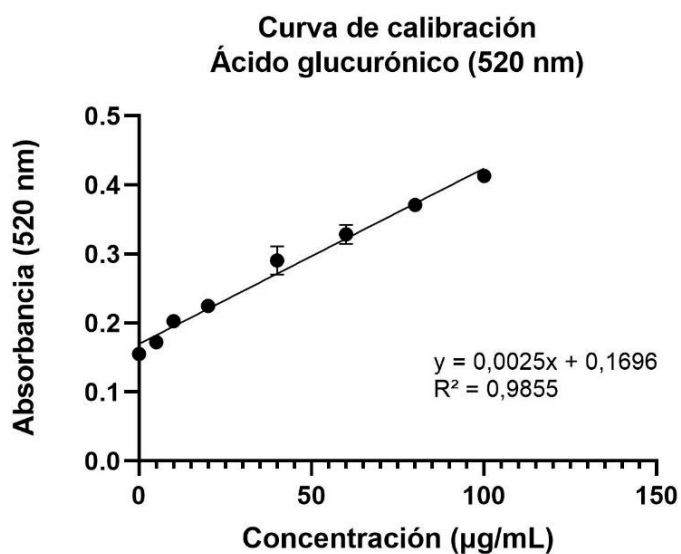


Figura 6. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de ácido urónico utilizando como reactivo estándar ácido galacturónico. Los valores se expresan como medias \pm error estándar ($n=3$)

- Absorbancia de la muestra (nm): 0.287
- Contenido de ácido urónico en 5 mg/mL: 47.09 µg/mL
- Porcentaje de ácido urónico de la muestra: 0.94%

II. Actividad antioxidante

i. Ensayo de neutralización del radical DPPH

Los polisacáridos crudos de *C. lebre* exhibieron porcentajes de inhibición del radical DPPH de manera dosis dependiente, el valor máximo alcanzado fue de $33.67 \pm 0,53\%$ a una concentración de 5 mg/mL. Como se observa en la Figura 6, en concentraciones de *PsCl* menores se redujo el porcentaje de inhibición del radical: $25.88 \pm 1,12\%$ (4 mg/mL) $19.27 \pm 0,68\%$ (3 mg/mL) $12.39 \pm 0.80\%$ (2 mg/mL) y a la menor concentración (1 mg/mL) no exhibió inhibición. Además, en las Figuras 6 y 7 se indican los valores de IC_{50} estimados de *PsCl* y Trolox, indicando un 6,92 mg/mL y 72,14 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

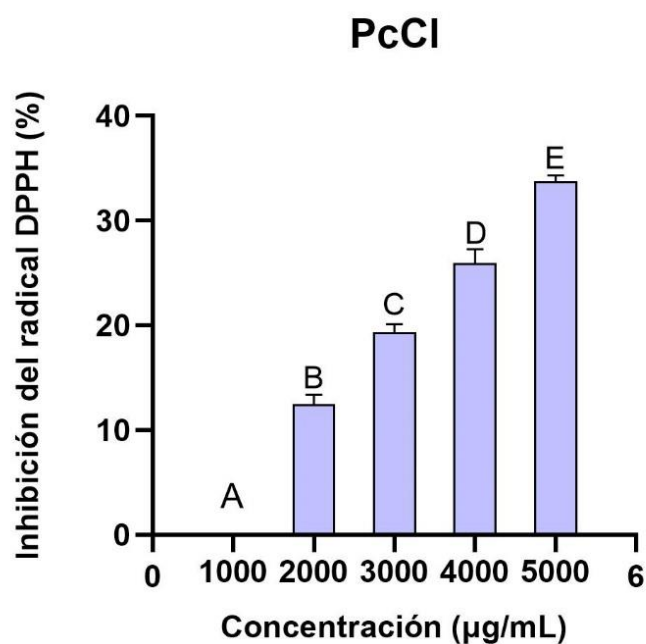
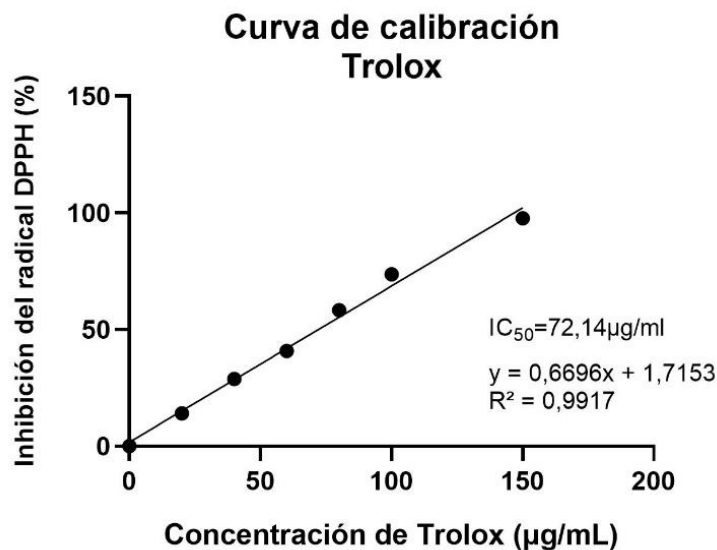


Figura 8. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de polisacáridos crudos de *C. lebre* a diferentes concentraciones. Se designaron grupos basados en las diferencias significativas, se indican con diferentes letras. Los valores se expresan como medias \pm error estándar ($n=3$)

A)



B)

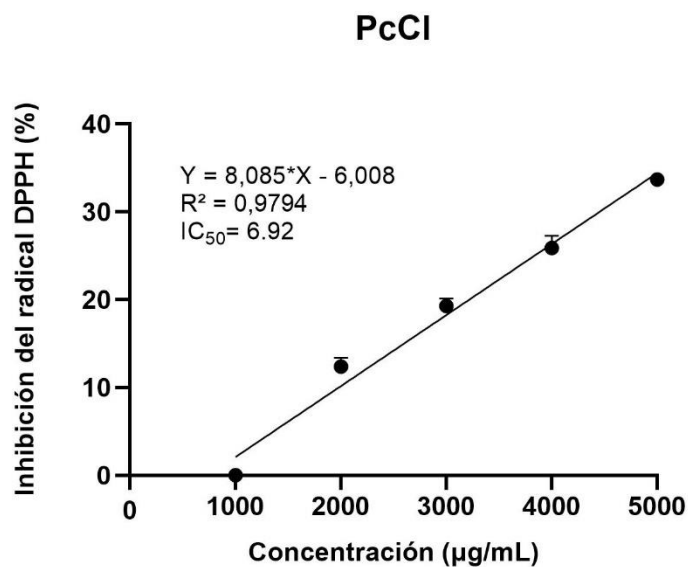


Figura 9. (A) Curva de calibración del estándar Trolox, se presenta valor de IC_{50} . (B) Porcentajes de inhibición del radical DPPH de PsCl y se indica el valor de IC_{50} . Todos los valores se expresan como medias \pm DE ($n=3$). En ambos gráficos se indica ecuación de la recta y coeficiente de determinación asociados.

ii. **Ensayo de neutralización del radical ABTS⁺**

La figura 8, indica los porcentajes de inhibición del radical ABTS por parte de los polisacáridos de *C. lebre*, en donde la concentración más alta, de 5 mg/mL exhibió un porcentaje de $50 \pm 1,19\%$, para las concentraciones menores probadas en este ensayo los porcentajes disminuyeron dependientes de la concentración, indicando valores de $39 \pm 1,48\%$ (4 mg/mL) $17 \pm 1,38\%$ (3 mg/mL) $7 \pm 0,57\%$ (2 mg/mL) y en la menor concentración, de 1 mg/mL no exhibió actividad. Adicionalmente, se estimaron los valores de IC₅₀ de *PsCl* y Trolox, los cuales indicaron valores de 5,09 mg/mL y 42,10 µg/mL respectivamente.

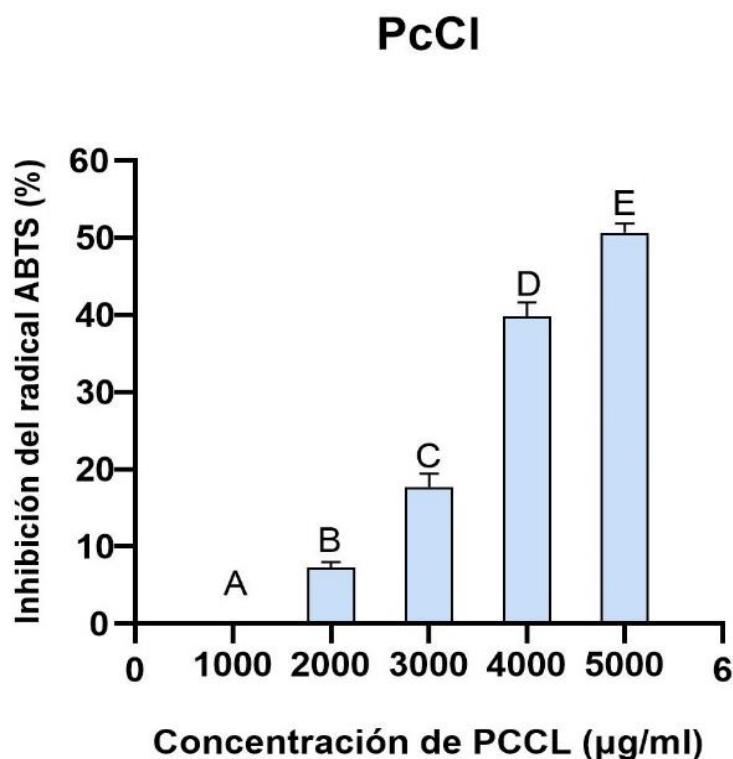
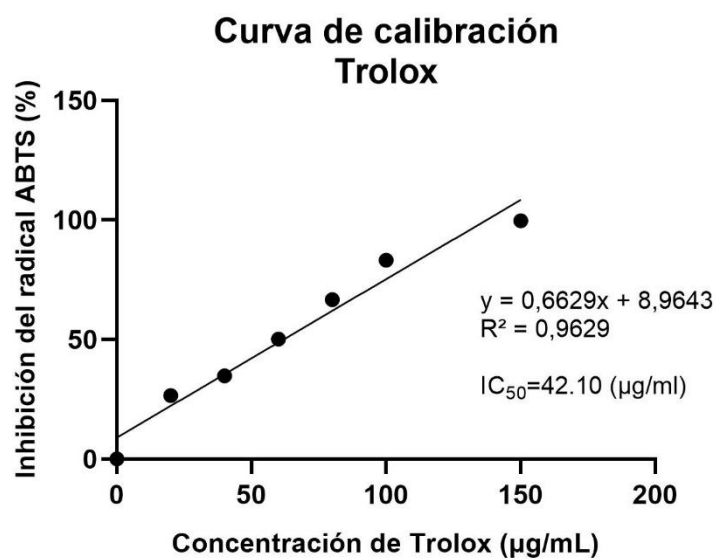


Figura 10. Porcentajes de inhibición del radical ABTS de polisacáridos crudos de *C. lebre* a diferentes concentraciones. Se designaron grupos basados en las diferencias significativas, se indican con diferentes letras. Los valores se expresan como medias \pm error estándar ($n=3$)

A)



B)

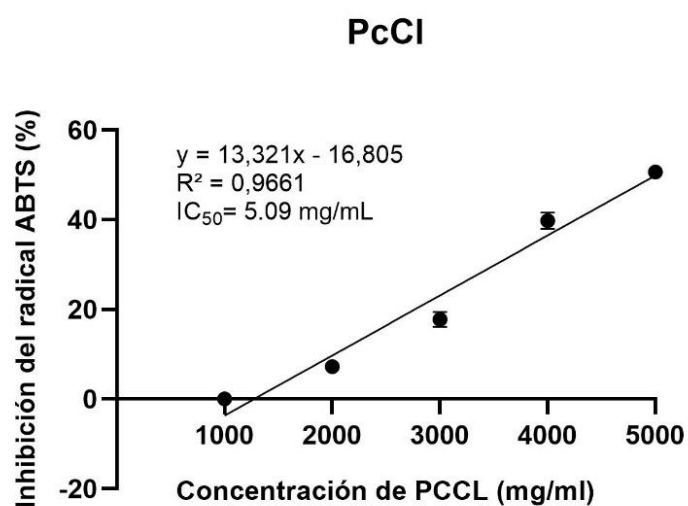


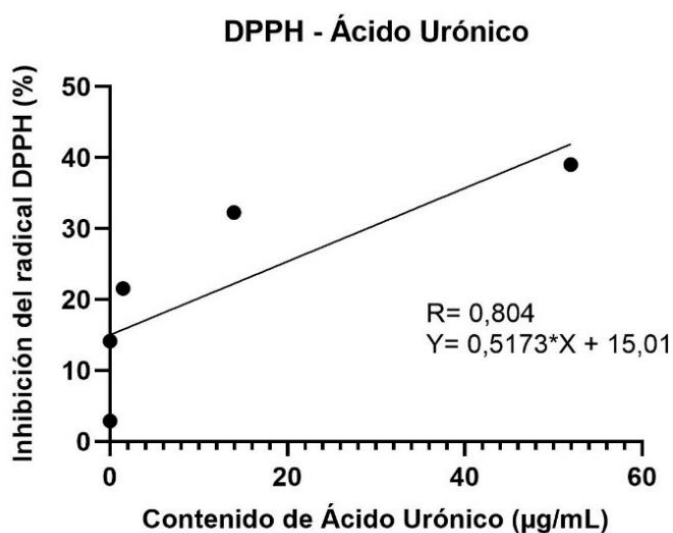
Figura 11. (A) Curva de calibración del estándar Trolox, se presenta valor de IC50. (B) Porcentajes de inhibición del radical DPPH de PsCl y se indica el valor de IC50. Todos los valores se expresan como medias DE (n=3). En ambos gráficos se indica ecuación de la recta y coeficiente de determinación asociados.

iii. Análisis de correlación entre el ácido urónico y la actividad antioxidante

Tabla 2. Coeficientes de correlación de Pearson de la actividad antioxidante y el contenido de ácido urónico.

| | DPPH (%) | ABTS (%) |
|------------------------------------|-------------|-------------|
| Ácido urónico ($\mu\text{g/mL}$) | $r = 0.804$ | $r = 0.865$ |

A)



B)

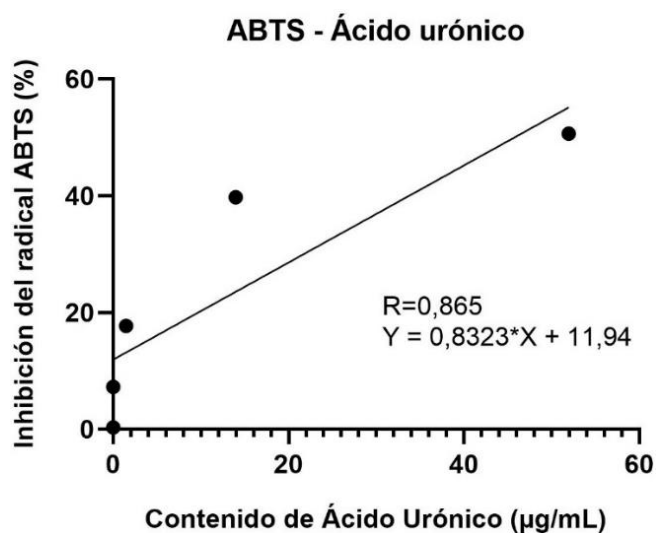


Figura 12. (A) Correlación del porcentaje de inhibición del radical DPPH y el contenido de ácido urónico. (B) Correlación del porcentaje de inhibición del radical ABTS y el contenido de ácido urónico. En ambos gráficos se indica ecuación de la recta y coeficiente de determinación asociado.

III. Actividad anticoagulante

La actividad anticoagulante de los polisacáridos crudos de *C. lebre* se investigaron mediante las pruebas clásicas de coagulación sanguínea: TP (tiempo de protrombina) y TTPA (tiempo de tromboplastina activada) usando heparina como referencia, estos ensayos evalúan las vías extrínsecas e intrínsecas de la coagulación sanguínea, respectivamente.

La Tabla 2 indica la actividad anticoagulante de diferentes muestras de polisacáridos sobre las pruebas de coagulación TP y TTPA, además de incluir los valores obtenidos de la heparina usada como control positivo. La actividad anticoagulante TP y TTPA en concentraciones entre 125-1000 µg/mL se posicionaron en el rango normal de coagulación y no existieron diferencias significativas entre niveles, lo que indica que no prolongaron el tiempo de coagulación de la vía intrínseca ni extrínseca, a pesar del aumento de las concentraciones de polisacáridos.

Tabla 3. Análisis de la actividad anticoagulante mediante de las pruebas TP y TTPA de los polisacáridos crudos de *Cortinarius lebre* a diferentes concentraciones.

| Muestra | Concentración (µg/ml) | TP (s) | TTPA (s) |
|-------------|-----------------------|--------------|---------------|
| Heparina | 2 | 39.7 ± 0.47 | 44.03 ± 2.85 |
| | 5 | 60.7 ± 0.25 | 121.33 ± 1.45 |
| <i>PsCl</i> | 125 | 13.4 ± 0.2 | 38.9 ± 0.26 |
| | 250 | 13.6 ± 0.36 | 38.6 ± 0.70 |
| | 500 | 14.06 ± 0.16 | 38.06 ± 0.55 |
| | 1000 | 14.2 ± 0.12 | 37.7 ± 0.36 |

Rango normal TP: 11-13 s.; TTPA: 28-40 s. Los valores se expresan como medias ± DE en segundos (n=3).

DISCUSIÓN

Cortinarius lebre (Cortinariaceae, Agaricales, Basidiomycota) es una especie de hongo comestible endémica de Chile y está reportada en asociación con bosques dominados por *Nothofagus spp.* Presenta (Píleo de 40-150 mm de diámetro, hemisférico, ligeramente aplanado umbonado, levemente viscoso, de color vináceo, en la madurez liláceo-ocráceomarrón. Sus lamelas son de color crema y marrón en ejemplares maduros. El estípite de 60-150 x 15-30 mm, cilíndrico, ligeramente atenuado, seco, fibroso-escamoso, blanco. Sabor suave. Olor a naftalina. Esporada marrón. Las características morfológicas las descripciones de hábitat al que está asociado y en el cual se distribuyen los ejemplares recolectados, coinciden con las proporcionadas en la tanto descripción original (Garrido, 1988) como en publicaciones más recientes (Arnold et al., 2011; Palfner et al., 2022), lo que confirma que los especímenes recolectados para este estudio corresponden a basidiomas maduros de *Cortinarius lebre*.

Los atributos nutricionales reportados por Jacinto-Azevedo et al (2021) de *Cortinarius lebre* lo posicionaron como un hongo comestible de alto valor nutricional, a través de un análisis proximal determinó que este hongo tenía un bajo contenido de grasa y un alto contenido de proteínas, fibra y carbohidratos. Siendo este último macronutriente muy abundante, exhibiendo un valor de 66%, lo que es concordante con el contenido de carbohidratos en hongos.

Los carbohidratos constituyen la mayor parte seca de los hongos. Se ha reportado que los carbohidratos presentes en hongos comestibles oscilan en un rango de 50% al 70-85%. Además de caracterizarse por su gran cantidad también destacan por su diversidad estructural. Entre los carbohidratos presentes en los hongos se encuentran los glucanos, quitina y glicoproteínas. Estos carbohidratos desempeñan roles fundamentales en la biología de los hongos, participando en la estructura de la pared celular, la comunicación celular, en la formación de estructuras biológicas y en la interacción con el entorno. (Ao et al., 2019; Maity et al., 2018; Vetter, 2023; W. Wang et al., 2022). Por todos estos antecedentes, es consistente que el contenido de azúcares totales reportados en los polisacáridos de *C. lebre* sea de un 80%.

La biología de los hongos está modelada por la presencia de polisacáridos, en especial la quitina y los glucanos. Estos polisacáridos se unen mediante enlaces intermoleculares formando una estructura polimérica compacta, que conforma la pared celular, donde desempeñan labores estructurales y son responsables de las interacciones con el medio externo, como la señalización celular. Los polisacáridos predominantes en las paredes celulares fúngicas son del tipo α y β glucanos. Los alfa glucanos son amorfos y solubles en agua y se encuentran en forma de glucógeno, reserva energética de los hongos, además, de cumplir funciones estructurales si se encuentran unidos mediante enlaces α -1,3 y α -1,4. Mientras que los betaglucanos son más abundantes y sus estructuras son más variables debido a las configuraciones que pueden adoptar gracias a los enlaces. Por consiguiente, los polisacáridos desempeñan un rol central en la biología y bioquímica de los hongos.(Barbosa et al., 2020; Pontón, 2008; Vetter, 2023)

Dado los antecedentes, de que los polisacáridos son componentes estructurales, el método de extracción de estos mismos se basa en la deconstrucción de la pared celular. El método de extracción con agua caliente es una técnica convencional para aislar polisacáridos en conjunto con el método de precipitación con alcohol, debido a los bajos costos de ejecución, equipo simple y fácil implementación. Los polisacáridos de *Cortinarius lebre* exhibieron un rendimiento de 17.8%. En la mayoría de los trabajos sobre polisacáridos fúngicos, estos son sometidos a tratamientos de purificación, entre lo más simples utilizados se encuentra la purificación por membrana de diálisis, este procedimiento puede eliminar entre un 50-90% de los carbohidratos solubles de los extractos crudos de agua caliente, por lo que los rendimientos de azúcares pueden ser considerablemente más bajos que en polisacáridos crudos (W. Wang et al., 2022)

La actividad biológica de los polisacáridos depende principalmente de sus características estructurales, como la composición química y sus componentes asociados y también de sus propiedades físicas como el peso molecular o la solubilidad.(Maity et al., 2018; J. Wang et al., 2016) En ese sentido, los polisacáridos poseen estructuras más complejas en comparación con otras macromoléculas biológicas como las proteínas o los ácidos nucleicos, debido a la diversidad de unidades monoméricas y tipos de enlaces. En ese sentido, a espectrometría infrarroja es una técnica analítica ampliamente utilizada para el análisis de estructuras

moleculares. En el caso de los polisacáridos, se enfoca en la región media del espectro infrarrojo, que abarca una longitud onda entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} . El espectro infrarrojo de los polisacáridos se obtiene al medir la absorción de radiación infrarroja por la muestra en relación con la radiación incidente. Los estiramientos en el espectro surgen cuando la frecuencia de la radiación coincide con la frecuencia natural de los enlaces presentes en las moléculas orgánicas.(Hong et al., 2021).

En primer lugar, la banda ancha ubicada alrededor de 3304 cm^{-1} indica una vibración de estiramiento de los grupos hidroxilo. Las bandas ubicadas en torno a 2920 cm^{-1} y 2854 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones de estiramiento y flexión de los grupos CH del enlace CH_2 del azúcar. La banda de absorción ubicada a 1747 cm^{-1} corresponde a una vibración del estiramiento de $\text{C}=\text{O}$ en $-\text{COOH}$ lo que indicaría la presencia de ácido urónico. La banda de absorción ubicada alrededor de 1635 cm^{-1} indicaría el carboxilo de amida primaria y 1546 cm^{-1} indicaría la presencia del grupo NH de amidas secundarias, estas dos últimas bandas podrían confirmar la presencia de proteínas. Las bandas en torno a 1246 , 1151 y 1026 cm^{-1} fueron asignados a vibraciones C-O-C, C-C y O=C-H flexión en el anillo de piranosa respectivamente. Finalmente, las bandas características a 918 y 886 cm^{-1} fueron típicos de las configuraciones α y β de las unidades de azúcar respectivamente (Y. Guo et al., 2022; Hong et al., 2021; Jeff et al., 2013; Lu et al., 2022; Tian et al., 2016; Y. Wang & Guo, 2020; Y. Zhang et al., 2018)

Actividad antioxidante

La trombosis es un proceso complejo que implica la interacción de varios tipos de células, tales como las células endoteliales vasculares, las plaquetas y los glóbulos rojos. El estrés oxidativo, caracterizado por una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede perjudicar significativamente el funcionamiento normal de estas células, al modular la actividad plaquetaria, promover la formación de coágulos e impactar diversos procesos celulares involucrados en la coagulación y así exacerbar la propensión a la formación de trombos. Estudios han reportado la complejidad del estrés oxidativo y su impacto en la trombosis y se ha propuesto la terapia antioxidante como una estrategia terapéutica esencial en la prevención y tratamiento de las enfermedades trombóticas. (Afanas'ev, 2011; Dubois-

Deruy et al., 2020; Krötz et al., 2004; Peiming Li & Huang, 2024; Sugamura & John F. Keaney, 2011)).

La actividad antioxidante de los polisacáridos crudos de *C. lebre* fueron evaluadas mediante los ensayos de neutralización de los radicales DPPH y ABTS^{•+}. Los resultados de dichos ensayos indicaron que *PsCl* tiene una actividad antioxidante baja, donde se observó un efecto dosis dependiente, demostraron porcentajes de inhibición de $33.67 \pm 0.53\%$ (DPPH) y $50 \pm 1.19\%$ (ABTS) a la máxima concentración evaluada, 5 mg/mL y luego los porcentajes de inhibición disminuyeron conforme disminuía la concentración de *PsCl*.

En el primer caso, la capacidad de eliminación de los antioxidantes se basó en la reducción del DPPHmetanólico, manifestada por el papel donador de hidrógeno y la reacción de DPPH-al no radical DPPH-H(Lo et al., 2011). Los valores de IC₅₀ indican a la concentración inhibitoria media que se necesita para reducirla actividad antioxidante en un 50%. En ese sentido, los polisacáridos de *C. lebre* alcanzaron un valor IC₅₀ de 6,92 mg/mL en el ensayo DPPH. Este valor es alto en comparación con la capacidad antioxidante de otros hongos comestibles para este mismo ensayo. En el trabajo de He et al., 2012, determinaron el potencial antioxidante de los polisacáridos crudos de cuatro especies de basidiomicetos medicinales; *Agaricus bisporus*, *Auricularia auricula*, *Flammulina velutipes* y *Lentinus edodes*, donde se reportó que los valores IC₅₀ oscilaron entre un $\approx 0,5$ mg/mL y $>2,0$ mg/mL. El ensayo de eliminación de radicales ABTS depende de la transferencia de electrones entre el antioxidante y los radicales ABTS^{•+} El valor IC₅₀ obtenido en el ensayo ABTS fue de 5,09 mg/mL, al igual que en el ensayo anterior se han reportado para hongos comestibles reconocidos valores inferiores de IC₅₀, como en el caso de *Lentinus edodes* y *Pleurotus djamor* que exhibieron 2,17 mg/mL y 0,8 mg/mL (Muñoz-Castiblanco et al., 2022).

Los resultados exhibidos son considerablemente mayores a los exhibidos por el Trolox; 72,14 µg/mL para DPPH y para ABTS. Sin embargo, esto concuerda con Chen et al., 2009 y Tsiapali et al., 2001 informaron que la mayoría de los polímeros de los carbohidratos tienen una baja actividad antioxidante, significativamente más débil que los antioxidantes sintéticos como el Trolox o ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC).

Los polisacáridos son una alternativa en el foco de la investigación para su potencial como antioxidantes naturales, sin embargo, la relación entre la actividad antioxidante y las

propiedades químicas de los polisacáridos aún no está completamente determinada. Algunos factores clave que se han identificado como responsables incluyen la composición de monosacáridos, el peso molecular, la estructura química, el contenido de compuestos fenólicos, ácidos urónicos y el grado de sulfatación. Para desarrollar polisacáridos como alternativa antioxidante natural, es necesario determinar la relación esencial estructura-actividad.

Según J. Wang et al., (2016) varios estudios postulan que los extractos crudos de polisacáridos pueden actuar como mejores antioxidantes que las fracciones purificadas, debido a la presencia de otros compuestos asociados. En este estudio los polisacáridos aislados no fueron sometidos a ningún proceso de purificación, por lo que se sugiere que estas moléculas vienen conjugadas con otros componentes, como aminoácidos, proteínas, ácido urónico, entre otros compuestos. Se ha reportado que polisacáridos que contienen un alto contenido de ácido urónico muestran una actividad antioxidante significativa. La interacción entre los átomos de hidrógeno del polisacárido y el ácido urónico podría ofrecer una cantidad considerable de hidrógeno para neutralizar los radicales libres (P. He et al., 2016; Kumar & Nagar, 2014; Wu et al., 2024; Yin et al., 2021).

En este estudio se determinó que el contenido de ácido urónico presente en los polisacáridos fue del 0.94%. Además, la observación de una banda de absorción en la región 1735 cm^{-1} en el FTIR podría confirmar la presencia de trazas de ácido urónico.

La mayor parte de los polisacáridos fúngicos son neutros y no contienen ácido urónico, en contraste con los polisacáridos de plantas y algas, y solo unos pocos han demostrado tener un bajo contenido de ácido urónico. En esta línea, Liu et al (2020) reportaron que dos fracciones de polisacáridos aislados del hongo *Stropharia rugosoannulata*, tan solo en una fracción se indicó un 0,71% de ácido urónico. Así mismo en Yan et al., 2019 indicaron que el contenido de ácido urónico en cuatro tipos de hongos; *Pleurotus eryngii*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus* y *Hypsizygus marmoreus*. oscilaba entre un 1,7% y el 3,1%.

Se realizó un análisis de correlación de Pearson para clarificar la relación entre el contenido de ácido urónico presente en los polisacáridos y la actividad antioxidante exhibida por estos. Los coeficientes de correlación de Pearson reportados en este estudio fueron $r=0.804$ para el ensayo de DPPH y $r=0.865$ para el ensayo ABTS. De acuerdo a Kuckartz et al (2013), los

valores $r = 0.7 < 1$ se consideran correlaciones muy altas. Esto que indica que el contenido de ácido urónico se correlacionó positivamente con la capacidad de eliminación de radicales DPPH y ABTS^{•+}. Estos resultados sugieren que la presencia de ácido urónico en los polisacáridos de *C. lebre*, aún en pequeñas cantidades contribuyen de manera importante en la capacidad antioxidante de este hongo. En los polisacáridos neutros y urónicos, el grupo hidroxilo es el que más contribuye a la acción antioxidante donando hidrógeno o electrones para estabilizar los radicales libres o reaccionando directamente con los radicales libres para terminar la reacción en cadena de los radicales (Lindsay, 1996).

Por otra parte, numerosos estudios han reportado una correlación positiva directa entre la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos representan una de las fuentes más importantes de antioxidantes naturales en virtud de la actividad donadora de electrones del grupo hidroxilo fenólico ácido. Estudios han informado que las fracciones de polisacáridos crudos están compuestas principalmente de conjugados presentes después del pretratamiento, el tratamiento con agua caliente y la precipitación con etanol (Chen et al., 2009; Kozarski et al., 2012; Siu et al., 2014).

La mayoría de los polisacáridos y polifenoles se encuentran segregados en los tejidos vegetales intactos, debido a que estos últimos se encuentran almacenados en las vacuolas, las cuales están separadas de las paredes celulares por membranas, por esta razón se cree que las interacciones entre polisacáridos y polifenoles no ocurren en las células vivas. Sin embargo, cuando las células se rompen durante el procesamiento, estos dos compuestos comienzan a asociarse y formar un complejo de interacción, ya sea covalente o no covalente. Estas interacciones son vitales para las cualidades biológicas y nutritivas de productos alimentarios, en este caso los hongos comestibles (Q. Guo et al., 2022; J. Liu et al., 2018; X. Liu et al., 2020).

En este estudio, el contenido fenólico total de los polisacáridos fue determinado según el método de Folin-Ciocalteu (1927) y exhibió un valor de 10.8 mg GAE/g (Y. J. Guo et al., 2012) reportaron que el contenido fenólico total de 49 hongos comestibles osciló entre un 2.4 a 19.3 mg GAE/g, considerando estos antecedentes se postula que *C. lebre* tiene una cantidad moderada de compuestos fenólicos. Estudios indican que la producción de metabolitos secundarios en hongos, en este caso compuestos fenólicos, está condicionada

principalmente por el tipo de nutrientes que conforman el sustrato y las condiciones climáticas en las que se desarrollan, estos factores pueden alterar y cambiar su metabolismo, generando diferencias en la presencia de compuestos bioactivos y su concentración (Jong & Birmingham, 1992; Sánchez, 2017).

En el mismo estudio, se reportó como la cantidad de compuestos fenólicos presentes se correlacionaron positivamente con la capacidad antioxidante, mediante los ensayos de poder antioxidante reductor férrico (FRAP) y capacidad antioxidante de Trolox equivalente (TEAC). Además, determinaron que los compuestos fenólicos más abundantes en los hongos comestibles fueron el ácido gálico y el ácido p-hidroxibenzoico, los cuales se sugiere podrían ser los responsables de reducir oxidantes y eliminar radicales libre.

Finalmente, cabe destacar que la presencia de proteínas y aminoácidos asociados a los polisacáridos crudos, pueden brindarle una mayor actividad antioxidante, lo que se debe a su capacidad de donar protones a los radicales deficientes en electrones. En este estudio del espectro FTIR, en las bandas de absorción ubicadas en torno a 1635 cm^{-1} y 1546 cm^{-1} se pudo identificar amidas primarias y secundarias respectivamente, lo que confirmaría la presencia de proteínas.(J. Wang et al., 2016b)

En resumen, las capacidades antioxidantes de los polisacáridos no son función de un sólo grupo y se sugiere que estuvieron influenciadas sinérgicamente por los efectos combinados del contenido de ácido urónico, fenoles y la presencia de complejos polisacáridos-proteínas.

Actividad anticoagulante

Las pruebas de coagulación son ensayos funcionales que tienen como objetivo replicar *in vitro* la activación del sistema de coagulación y evaluar la funcionalidad de este mismo, lo que permite fundamentar y orientar el diagnóstico clínico, o en este caso evaluar nuevos compuestos que inhiban o estimulen el sistema de coagulación. Las pruebas clásicas utilizadas son el **tiempo de protrombina (TP)** que evalúa el funcionamiento de la vía extrínseca de la coagulación y el **tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa)** que evalúa a la vía intrínseca. Los resultados de los ensayos indicaron valores en un rango normal de coagulación, ya que la prueba TP ni TTPa exhibieron una prolongación del tiempo de

coagulación, lo que indica que los polisacáridos crudos de *Cortinarius lebre* no poseen actividad anticoagulante por ninguna vía de coagulación.

La composición de monómeros de los polisacáridos de *Cortinarius lebre* se analizó mediante HPLC y demostró que su principal componente era la glucosa con un 36.98%, además de presentar de xilosa/manosa en un 8.82%. Según su composición química, este polisacárido se asemeja a la otros con potencial anticoagulante como es reportado por Yoon et al (2003) en el hongo *Auricularia auricula* que contenía mayoritariamente monosacáridos manosa, glucosa y xilosa, además contenía residuos de ácido hexurónico constituidos principalmente por ácidos glucurónico, ya que tras la reducción sobre los grupos carboxilo del polisacárido se observó una disminución en el contenido de ácido hexurónico y un aumento proporcional en la cantidad de glucosa. La actividad anticoagulante que presentó este hongo casi desapareció después de la reducción de los grupos hidroxilo, por lo tanto, en este estudio se afirma que los residuos de ácido glucurónico fueron esenciales para la actividad anticoagulante. Esto concuerda con los ensayos anticoagulantes reportados en (Pawlaczyk et al., 2013) donde también consideraron significativa la acción anticoagulante de los carbohidratos y el ácido urónico presente en los polisacáridos de *Fragaria vesca*. Sus partes de carbohidratos estaban compuestos por ácidos hexurónicos, residuos de ramnosa, arabinosa y galactosa. Los polisacáridos de *C. lebre*, a pesar de coincidir mayoritariamente en la composición de monosacáridos de otros polisacáridos con actividad anticoagulante reportada, presentó un bajo contenido de ácido urónico (0.94%) lo que en ese sentido podría explicar su nula actividad antioxidante.

Además, es importante destacar que los polisacáridos de *C. lebre* sería estructuralmente diferente de los polisacáridos sulfatados que contienen fucosa de las algas marinas, de los compuestos como los glucosaminoglicanos de los tejidos de invertebrados o heparinoides que tienen propiedades anticoagulantes y actividades antiplaquetarias reportados.

Varios estudios han reportado sobre como el alto grado de sulfatación de los polisacáridos influye en una mayor capacidad anticoagulante. (Liu et al., 2017; Mestechkina & Shcherbukhin, 2010b; Miao et al., 2020; Nataraj et al., 2022b; Thimmaraju & Govindan, 2022; Vasconcelos et al., 2013; Yoon et al., 2003) Sin embargo, en este hongo el contenido de sulfato fue menor al 1%. En contraste, los polisacáridos de algas con alto contenido de

sulfatos, especialmente fucoidanos, son característicos como moléculas anticoagulantes. (Chagas et al., 2020; Chang et al., 2021; Dore, Faustino Alves, Pofirio Will, Costa, Sabry, de Souza Rêgo, et al., 2013; Kim & Wijesekara, 2011; X. Wang et al., 2013)

Es consistente el contenido de sulfato con la biodisponibilidad de azufre en los diferentes ambientes en que estos organismos se desarrollan. En ambientes marinos, la principal fuente de azufre es el sulfato (SO_4^{2-}) derivado de la erosión química de la roca continental y la posterior disolución del azufre mineralizado. En contraste, los ambientes terrestres obtienen el azufre a través de la deposición de basura orgánica y excrementos animales. En adición, se ha reportado una disminución considerable en la deposición atmosférica de S inorgánico. El azufre en un rango normal se encuentra en un 0.05% del cuál 95% en formas orgánicas, mientras que las fuentes inorgánicas como el sulfato son menos comunes en suelos terrestres. (Allen & Shachar-Hill, 2009; Linder, 2018; Sadzawka R., 1999)

Sumado a esto, es necesario considerar el rol ecológico que cumple *C. lebre* como hongo ectomicorrícico. Se ha informado, que la asociación de las raíces de los árboles con hongos ectomicorrícicos influye en la nutrición de azufre de los árboles, principalmente en la absorción y asimilación de sulfatos. Esto puede suceder mediante la absorción de sulfato por las hifas de hongos micorrícicos como paso intermedio. Estos antecedentes, ecológicos y químicos nos permiten entender el bajo grado de sulfatación presentes en los hongos (Allen & Shachar-Hill, 2009; Gahan & Schmalenberger, 2014; Rennenberg, 1999; Traynor et al., 2019).

Finalmente, para entender cómo se relaciona la composición química del hongo es necesario considerar que tanto la especie estudiada como el hábitat en el que se desarrolla, cumplen un rol fundamental en la síntesis y conformación de los metabolitos secundarios (Bills & Gloer, 2016).

Además, se debe considerar que las condiciones climáticas y barreras naturales, la microbiota chilena es única. Estas condiciones permiten que exista una amplia variedad de hongos con diferentes formas de vida; saprófitos, parásitos y simbióticos asociados a la flora endémica de Chile (Garrido et al., 1985).

Otro aspecto a considerar es que la especie de este estudio es un hongo simbiote ectomicorrícico, a nivel de especie, se caracteriza por tener requisitos específicos en términos de tipo de vegetación, condiciones climáticas y edáficas. Se ha reportado que algunos metabolitos son fundamentales para el éxito ecológico de los hongos, ya que median la adquisición y transporte de nutrientes y las comunicaciones intra e inter especies, la formación de pigmentos, entre otras funciones. Finalmente, debido a que la expresión de los metabolitos es provocada por estímulos químicos y ambientales y se coordina con el crecimiento y la formación de estructuras del organismo, se puede afirmar que el ambiente determina la importancia que tienen los metabolitos en la supervivencia o reproducción de estos, de esta forma condicionan su cantidad y estructura (Bills & Gloer, 2016; Palfner et al., 2022).

CONCLUSIONES

En este estudio, por primera vez se analizaron en detalle las propiedades químicas y las posibles aplicaciones de los polisacáridos crudos del hongo comestible *Cortinarius lebre*, obtenidos mediante el método de agua caliente y precipitados con etanol.

La actividad antioxidante de los polisacáridos crudos de *C. lebre* fue dosis dependiente y baja, ya que se necesitaron dosis altas para exhibir la actividad. En este estudio la actividad exhibida se atribuye a su contenido de ácido urónico y efecto de los fenoles presentes en los polisacáridos, dada la naturaleza cruda de estos mismos, por lo que la hipótesis 1 se acepta. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para dilucidar el mecanismo antioxidante de *PsCl*

Por otro lado, los polisacáridos de *C. lebre* no demostraron capacidad anticoagulante en ninguna de las vías analizadas, posicionándose en los valores normales de la coagulación de la sangre sin generar efecto alguno. En este estudio, relacionamos la inactividad con la ausencia de grupos sulfatos y a la composición monomérica de los polisacáridos, por esto se rechaza la segunda hipótesis.

Las bioactividades que se propusieron para *C. lebre* estaban mediadas por la composición de los polisacáridos de este hongo, las cuales a su vez están estrechamente relacionadas con la especie y el entorno en el que se encuentra. El ambiente determinó la composición química y sus características en función de la ecología de este hongo.

Finalmente, para futuros estudios acerca de los polisacáridos de *C. lebre* cabe mencionar que deben ser orientados a dilucidar los mecanismos asociados a la actividad antioxidante, a través de ensayos con diferentes sistemas de radicales libres e identificar otros compuestos que podrían ser responsables de esta bioactividad. Además, considerando que este estudio fue realizado en polisacáridos crudos y se determinó que esto podría afectar su actividad biológica, es necesario explorar la obtención de polisacáridos específicos, a través de técnicas de purificación, aislamiento o fraccionamiento que puedan potenciarlo como un hongo bioactivo, para estas u otras actividades biológicas que pudiera presentar.

BIBLIOGRAFÍA

- Afanas'ev, I. (2011). ROS and RNS Signaling in Heart Disorders: Could Antioxidant Treatment Be Successful? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 293769.
- Aizman, A., Abbott, E., & Rojas, L. (2011). Profilaxis de enfermedad tromboembólica en pacientes hospitalizados con patología médica, estrechando la brecha entre las guías y la práctica clínica. *Revista médica de Chile*, 139(9), 1210–1227.
- Allen, J. W., & Shachar-Hill, Y. (2009). Sulfur transfer through an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology*, 149(1), 549–560.
- Ao, T., & Deb, C. R. (2019). Nutritional and antioxidant potential of some wild edible mushrooms of Nagaland, India. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 1084–1089.
- Arnold, N., Palfner, G., Schmidt, J., Kunht, C., & Becerra, J. (2011). Chemistry of the aroma bouquet of the edible mushroom “lebre” (*Cortinarius lebre*, basidiomycota, agaricales) from Chile. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 57, 1333–1335.
- Barbosa, J. R., & Carvalho Junior, R. N. de. (2020). Occurrence and possible roles of polysaccharides in fungi and their influence on the development of new technologies. En *Carbohydrate Polymers* (Vol. 246). Elsevier Ltd.
- Bijak, M., Saluk, J., Szelenberger, R., & Nowak, P. (2016). Popular naturally occurring antioxidants as potential anticoagulant drugs. *Chemico-Biological Interactions*, 257, 35–45.

- Bills, G. F., & Gloer, J. B. (2016). Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *Microbiology Spectrum*, 4(6).
- Blainski, A., Lopes, G. C., & De Mello, J. C. P. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* 2013, Vol. 18, Pages 6852-6865, 18(6), 6852–6865.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Lindsay, C. (1996). Food additives. *Food Chem.*
- Cano, E., & Romero, L. (2016). Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. *Revista chilena de nutrición*, 43, 75–80.
- Chagas, F. D. da S., Lima, G. C., dos Santos, V. I. N., Costa, L. E. C., de Sousa, W. M., Sombra, V. G., de Araújo, D. F., Barros, F. C. N., Marinho-Soriano, E., de Andrade Feitosa, J. P., de Paula, R. C. M., Pereira, M. G., & Freitas, A. L. P. (2020). Sulfated polysaccharide from the red algae *Gelidiella acerosa*: Anticoagulant, antiplatelet and antithrombotic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 415–421.
- Chang, L.-H., Chuang, E.-Y., Cheng, T.-M., Lin, C., Shih, C.-M., Wu, A. T. H., Jheng, P.-R., Lu, H.-Y., Shih, C.-C., & Mi, F.-L. (2021). Thrombus-specific theranostic nanocomposite for codelivery of thrombolytic drug, algae-derived anticoagulant and NIR fluorescent contrast agent. *Acta Biomaterialia*, 134, 686–701.
- Chaplin, M. F. (2006). Carbohydrate Analysis. En *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*. John Wiley & Sons, Ltd.

- Chen, S. K., Tsai, M. L., Huang, J. R., & Chen, R. H. (2009). In vitro antioxidant activities of low-molecular-weight polysaccharides with various functional groups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2699–2704.
- Cifuentes, F., & Aguiló, J. (2018). Prevención de enfermedades tromboembólicas en el paciente quirúrgico. Tesis Doctoral. Universidad de Chile.
- De Silva, D. D., Rapior, S., Sudarman, E., Stadler, M., Xu, J., Aisyah Alias, S., & Hyde, K. D. (2013). Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Diversity*, 62(1), 1–40.
- Djordje B. Zeković Stefan Kwiatkowski, M. M. V. D. J., & Moran, C. A. (2005). Natural and Modified (1→3)-β-D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(4), 205–230.
- Dore, C. M. P. G., Faustino Alves, M. G. das C., Pofirio Will, L. S. E., Costa, T. G., Sabry, D. A., de Souza Rêgo, L. A. R., Accardo, C. M., Rocha, H. A. O., Filgueira, L. G. A., & Leite, E. L. (2013). A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 467–475.
- Duarte Trujillo, A., Pineda Insuasti, J., & Juárez, M. (2018). Beta-Glucanos de *Pleurotus* y sus efectos en la salud Beta-Glucans from *Pleurotus* and its effects on health. 1, 26–36.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.

Dubois-Deruy, E., Peugnet, V., Turkieh, A., & Pinet, F. (2020). Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants*, 9(9).

Figuroa, F. A., Abdala-Díaz, R., Hernández, V., Pedreros, P., Aranda, M., Cabrera-Pardo, J. R., Pérez, C., Becerra, J., & Urrutia, R. (2020). Invasive diatom *Didymosphenia geminata* as a source of polysaccharides with antioxidant and immunomodulatory effects on macrophage cell lines. *Journal of Applied Phycology*, 32(1), 93–102.

Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On Tyrosine and Tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627–650.

Furci, G. (2018). *Guía de Campo Hongos de Chile*, Vol.2.

Gahan, J., & Schmalenberger, A. (2014). The role of bacteria and mycorrhiza in plant sulfur supply. *Frontiers in Plant Science*, 5(10).

Garrido, N. (1988). *Agaricales s.l. und ihre Mykorrhizen in den Nothofagus-Wäldern Mittelchiles*. Schweizerbart Science Publishers.

Garrido, N., Bresinsky, A., & Marticorena, C. (1985). *Index agaricalium chilensium*.

Glazer, A., & Nikaido, H. (2007). “Microbial Biotechnology. Fundamentals of Applied Microbiology.” A.N. Glazer and H. Nikaido.

- Guerrero, B., & López, M. (2015). Generalidades del sistema de la coagulación y pruebas para su estudio. *Investigación clínica*, 56, 432–454.
- Guo, Q., Xiao, X., Lu, L., Ai, L., Xu, M., Liu, Y., & Douglas Goff, H. (2022). Polyphenol-Polysaccharide Complex: Preparation, Characterization, and Potential Utilization in Food and Health.
- Guo, Y. J., Deng, G. F., Xu, X. R., Wu, S., Li, S., Xia, E. Q., Li, F., Chen, F., Ling, W. H., & Li, H. Bin. (2012). Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro-fungi. *Food and Function*, 3(11), 1195–1205.
- Guo, Y., Wang, L., Li, L., Zhang, Z., Zhang, J., Zhang, J., & Wang, J. (2022). Characterization of polysaccharide fractions from *Allii macrostemonis bulbis* and assessment of their antioxidant. *LWT-Food Science and Technology*, 165, 113687.
- He, J. Z., Ru, Q. M., Dong, D. D., & Sun, P. L. (2012). Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from four common edible mushrooms. *Molecules*, 17(4), 4373–4387.
- He, P., Zhang, A., Zhang, F., Linhardt, R. J., & Sun, P. (2016). Structure and bioactivity of a polysaccharide containing uronic acid from *Polyporus umbellatus sclerotia*. *Carbohydrate Polymers*, 152, 222–230.
- Hong, T., Yin, J.-Y., Nie, S.-P., & Xie, M.-Y. (2021). Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis: Progress, challenge and perspective.

- Jacinto-Azevedo, B., Valderrama, N., Henríquez, K., Aranda, M., & Aqueveque, P. (2021). Nutritional value and biological properties of Chilean wild and commercial edible mushrooms. *Food Chemistry*, 356, 129651.
- Jeff, I. B., Li, S., Peng, X., Kassim, R. M. R., Liu, B., & Zhou, Y. (2013). Purification, structural elucidation and antitumor activity of a novel mannogalactoglucan from the fruiting bodies of *Lentinus edodes*. *Fitoterapia*, 84(1), 338–346.
- Jong, S. C., & Birmingham, J. M. (1992). Medicinal Benefits of the Mushroom *Ganoderma*. En S. L. Neidleman & A. I. Laskin (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 37, pp. 101–134). Academic Press. 3
- Kalač, P. (2013). A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), 209–218.
- Kim, S.-K., & Wijesekara, I. (2011). Chapter 18 - Anticoagulant Effect of Marine Algae. En S.-K. Kim (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 64, pp. 235–244). Academic Press.
- Knutson, C. A., & Jeanes, A. (1968). Determination of the composition of uronic acid mixtures. *Analytical Biochemistry*, 24(3), 482–490. 3
- Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvić, M. M., Todorović, N., Jakovljević, D., & Van Griensven, L. J. L. D. (2012). Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1–2), 144–153.

- Krötz, F., Sohn, H.-Y., & Pohl, U. (2004). Reactive Oxygen Species. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(11), 1988–1996.
- Kuckartz, U., Rädiker, S., Ebert, T., & Schehl, J. (2013). Korrelation: Zusammenhänge identifizieren. En U. Kuckartz, S. Rädiker, T. Ebert, & J. Schehl (Eds.), *Statistik: Eine verständliche Einführung* (pp. 207–237). VS Verlag für Sozialwissenschaften.
- Kumar, V., & Nagar, S. (2014). Studies on *Tinospora cordifolia* monosugars and correlation analysis of uronic acids by spectrophotometric methods and GLC. *Carbohydrate Polymers*, 99, 291–296.
- Kupina, S., Fields, C., Roman, M. C., & Brunelle, S. L. (2018). Determination of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay: Single-Laboratory Validation, First Action 2017.13. *Journal of Aoac International*, 101(5), 1466–1472.
- Lazo Araya, W. (2001). *Hongos de Chile [recurso electrónico]: atlas micológico* (1a. ed. digital). Universidad de Chile, Facultad de Ciencias.
- Li, J., Kisara, K., Danielsson, S., Lindström, M. E., & Gellerstedt, G. (2007). An improved methodology for the quantification of uronic acid units in xylans and other polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 342(11), 1442–1449.
- Linder, T. (2018). Assimilation of alternative sulfur sources in fungi. En *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 34, Número 4). Springer Netherlands.

- Liu, J., Bai, R., Liu, Y., Zhang, X., Kan, J., & Jin, C. (2018). Isolation, structural characterization and bioactivities of naturally occurring polysaccharide-polyphenolic conjugates from medicinal plants-A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 2242–2250.
- Liu, X., Le Bourvellec, C., & Renard, C. M. G. C. (2020). Interactions between cell wall polysaccharides and polyphenols: Effect of molecular internal structure. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3574–3617.
- Liu, Y., Hu, C. F., Feng, X., Cheng, L., Ibrahim, S. A., Wang, C. T., & Huang, W. (2020). Isolation, characterization and antioxidant of polysaccharides from *Stropharia rugosoannulata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 883–889.
- Liu, Y., Tang, Q., Duan, X., Tang, T., Ke, Y., Zhang, L., Li, C., Liu, A., Su, Z., & Hu, B. (2017). Antioxidant and anticoagulant activities of mycelia polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* after sulfated modification.
- Lo, T. C. T., Chang, C. A., Chiu, K. H., Tsay, P. K., & Jen, J. F. (2011). Correlation evaluation of antioxidant properties on the monosaccharide components and glycosyl linkages of polysaccharide with different measuring methods. *Carbohydrate Polymers*, 86(1), 320–327.
- López-Legarda, X., Taramuel-Gallardo, A., Arboleda-Echavarría, C., Segura Sánchez, F., & Restrepo-Betancur, L. (2017). Comparison of methods using sulfuric acid for determination of total sugars. 29, 180–198.
- Lu, M.-K., Chang, C.-C., Chao, C.-H., & Hsu, Y.-C. (2022). Structural changes, and anti-inflammatory, anti-cancer potential of polysaccharides from multiple processing of

Rehmannia glutinosa. *International Journal of Biological Macromolecules*, 206, 621–632.

Maity, P., Sen, I. K., Chakraborty, I., Mondal, S., Bar, H., Bhanja, S. K., Mandal, S., & Maity, G. N. (2021). Biologically active polysaccharide from edible mushrooms: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 172, 408–417.

Maity, P., Sen, I. K., Chakraborty, I., Mondal, S., Bar, H., Bhanja, S. K., Mandal, S., & Nath Maity, G. (2018). Biologically active polysaccharide from edible mushrooms: A review.

Manzi, P., Aguzzi, A., & Pizzoferrato, L. (2001). Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*, 73(3), 321–325.

Martinez Alexander T.; Bamber Luke; Rietbrock Stephan, C. C. (2014). Epidemiology of first and recurrent venous thromboembolism: A population-based cohort study in patients without active cancer. *Thrombosis and Haemostasis*, 112(08), 255–263.

Mestechkina, N. M., & Shcherbukhin, V. D. (2010a). Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(3), 267–273.

Mestechkina, N. M., & Shcherbukhin, V. D. (2010b). Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(3), 267–273.

- Miao, J., Regenstein, J. M., Qiu, J., Zhang, J., Zhang, X., Li, H., Zhang, H., & Wang, Z. (2020). Isolation, structural characterization and bioactivities of polysaccharides and its derivatives from *Auricularia-A* review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 102–113.
- Morales M, M., Arboleda R, L., & Bello E, A. (2019). Anticoagulación en enfermedad tromboembólica venosa. *Revista chilena de cardiología*, 38(2), 122–131
- Mourão, P. A. S., Pereira, M. S., Pavão, M. S. G., Mulloy, B., Tollefsen, D. M., Mowinckel, M.-C., & Abildgaard, U. (1996). Structure and Anticoagulant Activity of a Fucosylated Chondroitin Sulfate from Echinoderm: sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. *Journal of Biological Chemistry*, 271(39), 23973–23984.
- Mueller, G. M., Schmit, J. P., Leacock, P. R., Buyck, B., Cifuentes, J., Desjardin, D. E., Halling, R. E., Hjortstam, K., Iturriaga, T., Larsson, K.-H., Lodge, D. J., May, T. W., Minter, D., Rajchenberg, M., Redhead, S. A., Ryvarden, L., Trappe, J. M., Watling, R., & Wu, Q. (2007). Global diversity and distribution of macrofungi. *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 37–48.
- Muñoz-Castiblanco, T., Mejía-Giraldo, J. C., & Puertas-Mejía, M. Á. (2022). Lentinula edodes, a Novel Source of Polysaccharides with Antioxidant Power. *Antioxidants*, 11(9)
- Nataraj, A., Govindan, S., Ramani, P., Subbaiah, K. A., Sathianarayanan, S., Venkidasamy, B., Thiruvengadam, M., Rebezov, M., Shariati, M. A., Lorenzo, J. M., & Pateiro, M. (2022b). Antioxidant, Anti-Tumour, and Anticoagulant Activities of Polysaccharide from *Calocybe indica* (APK2). *Antioxidants*, 11(9).

- Palfner, G., Salazar Vidal, V., Melgarejo-Estrada, E., Lechner, B., Palma-Martínez, J., Montenegro, I., & Casanova-Katny, A. (2022). Edible Ectomycorrhizal Mushrooms in South America (pp. 321–337). https://doi.org/10.1007/978-3-031-12994-0_16
- Pandya, U., Dhuldhaj, U., & Sahay, N. S. (2019). Bioactive mushroom polysaccharides as antitumor: an overview. *Natural Product Research*, 33(18), 2668–2680.
- Pawlaczyk, I., Lewik-Tsirigotis, M., Capek, P., Matulová, M., Sasinková, V., Dabrowski, P., Witkiewicz, W., & Gancarz, R. (2013). Effects of extraction condition on structural features and anticoagulant activity of *F. Vesca* L. Conjugates. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 741–750.
- Peiming Li, X. M., & Huang, G. (2024). Understanding thrombosis: the critical role of oxidative stress. *Hematology*, 29(1), 2301633.
- Perez, J., Guerin-Laguette, A., Flores Arzu, R., & Yu 于富强, F.-Q. (2020). Mushrooms, Humans and Nature in a Changing World Perspectives from Ecological, Agricultural and Social Sciences: Perspectives from Ecological, Agricultural and Social Sciences.
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78–82.
- Rao, T., Htay, H. H., NK, Y., H, S., T, O., T, H., Okamoto, T., & K, S. (2014). Antioxidant and Anti-thrombotic Properties of Selected Plant Extracts of Asia. *Austin J Nutr Metab*, 1, 1–6.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231–1237.
- Rennenberg, H. (1999). The significance of ectomycorrhizal fungi for sulfur nutrition of trees. En *Plant and Soil* (Vol. 215).
- Rivera, G., Tasé, M. J., & Groning Roque. (2009). Fármacos en la terapéutica de enfermedades tromboembólicas. En *Farmacología en el proceso de atención en Enfermería* (pp. 275–283). Ciencias Médicas.
- Sadzawka R., A. (1999). *Manual de Azufre en Suelos y Plantas* [Instituto de Investigaciones Agropecuarias].
- Samavati, V. (2013). Polysaccharide extraction from *Abelmoschus esculentus*: Optimization by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 95, 588–597.
- Sánchez, C. (2017). Bioactives from mushroom and their application. En *Food Bioactives: Extraction and Biotechnology Applications* (pp. 23–57). Springer International Publishing.
- Sangeetha, B., Krishnamoorthy, A. S., Amirtham, D., Jeya, D., Sharmila, S., Renukadevi, P., & Malathi, V. G. (2020). FT-IR Spectroscopic Characteristics of *Ganoderma lucidum* Secondary Metabolites. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 38(6), 1–8.

- Shanmugam, M., & Mody, K. H. (2000). Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Current Science*, 79(12), 1672–1683.
- Siu, K. C., Chen, X., & Wu, J. Y. (2014). Constituents actually responsible for the antioxidant activities of crude polysaccharides isolated from mushrooms. *Journal of Functional Foods*, 11(C), 548–556.
- Sugamura, K., & John F. Keane. (2011). Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 978–992.
- Taylor, K. A., & Buchanan-Smith, J. G. (1992). A Calorimetric Method for the Quantitation of Uronic Acids and a Specific Assay for Galacturonic Acid. En *ANALYTICALBIOCHEMISTRY* (Vol. 201).
- Thimmaraju, A., & Govindan, S. (2022). Novel studies of characterization, antioxidant, anticoagulant and anticancer activity of purified polysaccharide from *Hypsizygus ulmarius* mushroom.
- Tian, Y., Zhao, Y., Zeng, H., Zhang, Y., & Zheng, B. (2016). Structural characterization of a novel neutral polysaccharide from *Lentinus giganteus* and its antitumor activity through inducing apoptosis. *Carbohydrate Polymers*, 154, 231–240.
- Traynor, A. M., Sheridan, K. J., Jones, G. W., Calera, J. A., & Doyle, S. (2019). Involvement of Sulfur in the Biosynthesis of Essential Metabolites in Pathogenic Fungi of Animals, Particularly *Aspergillus* spp.: Molecular and Therapeutic Implications. En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A.

- Tsiapali, E., Whaley, S., Kalbfleisch, J., Ensley, H. E., William Browder, ‡ I, & Williams, D. L. (2001). Original Contribution glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity.
- Vasconcelos, A. F. D., Dekker, R. F. H., Barbosa, A. M., Carbonero, E. R., Silveira, J. L. M., Glauser, B., Pereira, M. S., & Corradi Da Silva, M. D. L. (2013). Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular β -(1 \rightarrow 6)-d-glucan (lasiodiopdan). *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1908–1914.
- Vetter, J. (2023). The Mushroom Glucans: Molecules of High Biological and Medicinal Importance. En *Foods* (Vol. 12, Número 5). MDPI.
- Wang, J., Hu, S., Nie, S., Yu, Q., & Xie, M. (2016b). Reviews on Mechanisms of in Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides. En *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2016). Hindawi Publishing Corporation.
- Wang, W., Tan, J., Nima, L., Sang, Y., Cai, X., & Xue, H. (2022). Polysaccharides from fungi: A review on their extraction, purification, structural features, and biological activities. En *Food Chemistry: X* (Vol. 15). Elsevier Ltd.
- Wang, X., Zhang, Z., Yao, Z., Zhao, M., & Qi, H. (2013). Sulfation, anticoagulant and antioxidant activities of polysaccharide from green algae *Enteromorpha linza*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 225–230.
- Wang, Y., & Guo, M. (2020). Purification and structural characterization of polysaccharides isolated from *Auricularia cornea* var. *Li*. *Carbohydrate Polymers*, 230, 115680.

- Wu, Y., Chen, H., Wang, B., Xu, J., Li, J., Ying, G., & Chen, K. (2024). Extraction of *Ampelopsis japonica* polysaccharides using p-toluenesulfonic acid assisted n-butanol three-phase partitioning: Physicochemical, rheological characterization and antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254.
- Xie, J.-H., Wang, Z.-J., Shen, M.-Y., Nie, S.-P., Gong, B., Li, H.-S., Zhao, Q., Li, W.-J., & Xie, M.-Y. (2016). Sulfated modification, characterization and antioxidant activities of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus*. *Food Hydrocolloids*, 53, 7–15.
- Yan, J., Zhu, L., Qu, Y., Qu, X., Mu, M., Zhang, M., Muneer, G., Zhou, Y., & Sun, L. (2019). Analyses of active antioxidant polysaccharides from four edible mushrooms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 945–956.
- Yin, D., Sun, X., Li, N., Guo, Y., Tian, Y., & Wang, L. (2021). Structural properties and antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Laminaria japonica* using various methods. *Process Biochemistry*, 111, 201–209.
- Yoon, S.-J., Yu, M.-A., Pyun, Y.-R., Hwang, J.-K., Chu, D.-C., Juneja, L. R., & Mourão, P. A. S. (2003). The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. *Thrombosis Research*, 112(3), 151–158.
- Zhang, H.-J., Mao, W.-J., Fang, F., Li, H.-Y., Sun, H.-H., Chen, Y., & Qi, X.-H. (2008). Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. *Carbohydrate Polymers*, 71(3), 428–434.

Zhang, Y., Zeng, Y., Men, Y., Zhang, J., Liu, H., & Sun, Y. (2018). Structural characterization and immunomodulatory activity of exopolysaccharides from submerged culture of *Auricularia auricula-judae*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 978–984.

Zhong, Q., Wei, B., Wang, S., Ke, S., Chen, J., Zhang, H., & Wang, H. (2019). The Antioxidant Activity of Polysaccharides Derived from Marine Organisms: An Overview. *Marine Drugs*, 17(12).