

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
BIOLOGÍA



**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* Y CARACTERIZACIÓN
INFRARROJA DE POLISACÁRIDOS OBTENIDOS DE HONGOS DEL
GÉNERO *ALEURODISCUS SENSU LATO* ASOCIADOS A BOSQUES NATIVOS**

Enzo Eduardo Romero Villegas

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGO

CONCEPCIÓN – CHILE

ENERO, 2023.

Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Profesora guía

Dr. Ramón Ahumada-Rudolph

Universidad del Bío-Bío

Concepción

Profesores evaluadores

Dr. José Becerra Allende

Universidad de Concepción

Concepción

Dr. Jaime Cabrera-Pardo

Universidad del Bío-Bío

Concepción

Dr. Fabián Figueroa

Universidad de Concepción

Concepción

Por mi querido amigo peludo, Hachi

AGRADECIMIENTOS

Todo este trabajo fue posible gracias al apoyo incondicional y compañía de mi familia, en especial mi padre Juan y mi madre Karina, que me dieron fortaleza y brindaron todo lo que necesité durante este camino. Agradezco a mi abuelita Cintia por cuidar de mi cuando más lo necesitaba, a mis hermanos que siempre me apoyaron. A mis amigos que me han dado su apoyo y contención, en especial a mi buen amigo Jonhatan Gómez por compartir no solo buenos momentos académicos sino también por el apoyo y la buena compañía.

Agradecer a mi profesor guía Dr. Ramón Ahumada por su tutoría e infinita paciencia, al Dr. Jaime Cabrera y Dra. Vanessa Novoa por permitirme ser parte del Laboratorio de Química aplicada y Sustentable y por los buenos consejos que aportaron a mi formación académica y personal, a los colegas del laboratorio por el buen ambiente de trabajo. Agradecer al Profesor José Becerra por los consejos y buen criterio a la hora de acotar ideas. Al Dr. Fabian Figueroa y Dra. Verónica Albornoz por ayudarme en los detalles durante este trabajo. Gracias a Cristian Riquelme por aclarar mis dudas cuando mas lo necesitaba. Gracias al Dr. Christian Núñez del departamento de Química de la Universidad del Bío-Bío por facilitar las instalaciones para la realización de una parte de mis ensayos.

Quiero agradecer el apoyo por parte del proyecto FONDECYT regular 1190652, y al proyecto FIC-R 40036205-0 por financiar parte de esta investigación.

Nada de esto hubiera sido posible sin ustedes. ¡Gracias!

Tabla de contenido

1.	INTRODUCCIÓN	11
	Actividad biológica de los metabolitos secundarios y polisacáridos de origen	
	Fúngico	13
	Actividad antiinflamatoria.....	13
	Actividad inmunomoduladora.....	14
	Actividad inmunosupresora.....	15
	Actividad antioxidante.....	16
	Actividad anticancerígena	17
	Actividad neuroprotectora	18
	Material de estudio.....	18
	Género <i>Aleurodiscus</i> Rabenh. ex J. Shröt. (Stereaceae, Russulales). 18	
	Características de las especies a usar:.....	19
	<i>Aleurodiscus mirabilis</i> (<i>Gloeosoma mirabile</i>)	19
	<i>Aleurodiscus vitellinus</i> (<i>Gloeosoma vitellinum</i>)	20
	<i>Aleurodiscus triviale</i> (<i>Stereodiscus trivialis</i>)	20
	<i>Aleurodiscus patagonicus</i> (<i>Stereodiscus patagonicus</i>).....	21
2.	HIPÓTESIS.....	23
3.	OBJETIVOS	23
	Objetivo general.....	23

4.	Objetivos específicos	23
5.	METODOLOGÍA	24
	Materiales y métodos	24
	Cultivo en Medio Liquido	24
	Extracción de polisacáridos intracelulares (IPS).....	24
	Purificación de polisacáridos.....	25
	Análisis de espectroscopía infrarroja transformada de Fourier por reflectancia total atenuada (FT-IR ATR).....	25
	Análisis por espectroscopía UV-Vis	25
	Actividad Antioxidante <i>In vitro</i>	26
	Ensayo de decoloración del catión radical ABTS ^{•+}	26
	Rendimiento.....	26
6.	RESULTADOS.....	27
	Rendimiento de la extracción de polisacáridos (peso seco)	27
	Escaneo UV-VIS de los extractos puros de polisacáridos.....	28
	Análisis de polisacáridos mediante caracterización infrarroja	30
	Actividad Antioxidante <i>In vitro</i>	34
7.	DISCUSIÓN	36
8.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.	38
9.	ANEXOS	40
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Muestra la morfología macro y microscópica de las cuatro especies que se usaron en este trabajo. A. Basidisporas, B. Basidios; 1. <i>Aleurodiscus triviale</i> , 2. <i>Aleurodiscus mirabilis</i> , 3. <i>Aleurodiscus patagonicus</i> , 4. <i>Aleurodiscus vitellinus</i> (Rescatado y modificado de: Gorjón, Greslebin. & Rajchenberg 2013, MycoBank #120915, Phookamsak <i>et al.</i> , 2019, Núñez & Ryvarden 1997)	22
Figura 2. Determinación del rendimiento de polisacáridos purificados obtenidos luego del proceso de extracción de cada cepa de hongo del género <i>Aleurodiscus</i>	27
Figura 3 Espectroscopia Ultravioleta-visible (UV-vis) de los polisacáridos purificados de las cepas del género <i>Aleurodiscus</i>	28
Figura 4. Se muestra los espectros (FT-IR) de los polisacáridos purificados de las cuatro cepas del género <i>Aleurodiscus</i>	30
Figura 5. Segunda derivada de los espectros obtenidos por FT-IR de las cuatro cepas de <i>Aleurodiscus</i>	32
Figura 6. Ensayo de actividad antioxidante ABTS ^{•+} de los polisacáridos obtenidos de las especies <i>Aleurodiscus triviale</i> (1611), <i>Aleurodiscus mirabilis</i> (1612), <i>Aleurodiscus patagonicus</i> (1688) y <i>Aleurodiscus vitellinus</i> (1716). Acido ascórbico y Trolox fueron usados como control.....	34
Figura 7. Espectro FT-IR del extracto acuoso de <i>Aleurodiscus triviale</i>	40
Figura 8. Espectro FT-IR del extracto acuoso de <i>Aleurodiscus mirabilis</i>	41
Figura 9. Espectro FT-IR del extracto acuoso de <i>Aleurodiscus patagonicus</i>	42
Figura 10. Espectro FT-IR del extracto acuoso de <i>Aleurodiscus vitellinus</i>	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Códigos de identificación de las cepas estudiadas.....	24
Tabla 2. Destaca los principales grupos funcionales presentes en los espectros FT-IR de los polisacáridos de las cuatro especies del género <i>Aleurodiscus</i>	33

RESUMEN

Desde milenios los hongos han sido de gran valor para la humanidad, ya sea como comida o como recursos medicinales. Un gran número de moléculas se han aislado y utilizado con propiedades antitumorales, moduladoras del sistema inmune, antioxidantes. Los polisacáridos son una de las fuentes más potentes en cuanto a las sustancias bioactivas. En los últimos años la búsqueda de estos bio-polímeros con actividad biológica y otros tipos de aplicación, ha ido en incremento año tras año incluyendo áreas como la medicina, comida, nutraceutica y cosmetología. En este trabajo se presentan cuatro especies nativas de Chile, con novedosos polisacáridos, pues hasta la fecha nadie ha evaluado la bioactividad de polisacáridos de hongos del género *Aleurodiscus s. lat.* De forma preliminar este estudio tiene como objetivo evaluar la actividad antioxidante de los polisacáridos obtenidos de las cuatro especies. Extractos de polisacáridos obtenidos por la extracción mediante agua caliente fueron evaluados ante el radical ABTS^{•+}, para el caso se caracterizaron los polisacáridos mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), con el fin de ver grupos funcionales que puedan estar vinculados a la actividad antioxidante. Se utilizaron concentraciones de polisacáridos de 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL y de las cuatro cepas 1688 resulto con el mayor porcentaje de inhibición del radical (73,8%), seguido de 1612, 1716 y 1611. Los FT-IR evidenciaron la presencia de enlaces tipo α y β -glucanos, a la vez de bandas características de grupos sulfatos y de ácido urónico para algunas cepas. También se propone para siguientes estudios invertir esfuerzo en identificar los monómeros de la cadena polimérica a la vez de estudiar qué tipo de enlaces se encuentran presentes entre los monómeros de esta, evaluar además la eficacia de los polisacáridos de estas especies en ensayos de viabilidad celular, tipo citotóxicos y de inmunomodulación.

ABSTRACT

For thousands of years, mushrooms have been of great value to humanity, either as food or as medicinal resources. Many molecules have been isolated and been used with antitumor, immune system modulating, and antioxidant properties. Polysaccharides are one of the most powerful sources in terms of bioactive substances. In recent years, the search for these biopolymers with biological activity and other types of applications has been increasing year after year, including areas such as medicine, food, nutraceuticals and cosmetology. In this work, four native species from Chile are presented, with novel polysaccharides, since to date no one has evaluated the bioactivity from polysaccharides of fungi genus *Aleurodiscus s. lat.* Preliminarily, this study aims to evaluate the antioxidant activity of the polysaccharides obtained from the four species. The polysaccharide extracts obtained by hot water extraction were evaluated by the ABTS^{•+} scavenging assay. In this case, the polysaccharides were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), to see functional groups that may be present, linked to antioxidant activity. Concentrations of polysaccharides of 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2.5 mg/mL were used and of the four strains 1688 resulted with the highest percentage of radical inhibition (73.8%), followed by of 1612, 1716 and 1611. The FT-IR evidenced the presence of α and β -glucan type bonds, as well as bands characteristic of sulfate groups and uronic acid for some strains. It is also proposed for the following studies to invest effort in identifying the monomers of the polymeric chain while studying what type of links are present between the monomers of this, also evaluating the efficacy of the polysaccharides of these species in antitumor, cytotoxic, and immunomodulatory assays.

1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos inmemoriales, los hongos han sido valorados por la humanidad como un ostento culinario y como medicina popular. Los hongos se han usado para mejorar nuestra salud y tratar enfermedades severas, su uso en las terapias ancestrales remonta por lo menos desde la era Neolítica (Gargano *et al.*, 2017; Mau *et al.*, 2004) En contexto, estas misteriosas especies epigeas pertenecientes al Reino Fungi almacenan grandes perspectivas, en particular los macrohongos, basidiomicetos que forman cuerpos fructíferos visibles. Este grupo comprende cerca de 40,000 especies (He *et al.*, 2022)

El Reino Fungi incluye algunos de los organismos más importantes en términos de la economía como de la ecología. Son organismos simples, quimio-heterótrofos, utilizan su batería enzimática para degradar material lignocelulósico, proteínas, lípidos, azúcares simples y complejos (Charya 2015). Desarrollando un importante rol al ecosistema descomponiendo materia orgánica, redistribuyendo macronutrientes importantes como Carbono y Nitrógeno (Hawksworth *et al.*, 1983; Barnett *et al.*, 2000; Cepero *et al.*, 2012; Landenmark 2015)

Los hongos sintetizan una batería de sustancias químicas, no solo con el fin de degradar materia orgánica para alimentarse, sino que han desarrollado estrategias químicas para asegurar su supervivencia (Spiteller 2008). Estos compuestos químicos producidos por organismos, como hongos, plantas, microorganismos y algunos animales, que no son esenciales para su crecimiento o metabolismo básico, pero desempeñan un papel importante en la interacción del organismo con su entorno. Estos compuestos se producen como resultado de rutas metabólicas secundarias o vías metabólicas alternativas, en

contraste con los metabolitos primarios, que son esenciales para las funciones básicas de supervivencia y crecimiento de un organismo (Katz & Baltz 2016) Estos compuestos son de gran interés en la investigación científica debido a sus propiedades biológicas, incluyendo sus posibles aplicaciones medicinales y farmacéuticas, así como su importancia en la ecología y la interacción entre los organismos en los ecosistemas naturales (Atanasov *et al.*, 2015; Barnett *et al.*, 2000)

Entre los metabolitos secundarios con mayor actividad los podemos clasificar como; alcaloides, flavonoides, terpenoides, fenoles, ergosteroles, ácidos grasos, cumarinas, polisacáridos (Katz & Baltz 2016; Zhang *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018) Estos últimos, los polisacáridos, tienen un potencial bioactivo con aplicabilidad farmacéutica, nutracéutica y cosmecéutica. Además, en la prevención y tratamiento de enfermedades por posibles sus usos como; inmunomoduladores, antitumorales, anticoagulantes, anticancerígenos, anti-VIH, productos con propiedades hipoglucémicas y antioxidantes (Lee *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2003)

Los polisacáridos pertenecen a una clase estructuralmente diversa de macromoléculas, son polímeros de monómeros unidos mediante enlaces glucosídicos. En los hongos están presente principalmente en la pared celular, en su mayoría como α -manosa y glucanos con diferentes tipos de enlace glucosídico como (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)- β -glucano y (1 \rightarrow 3)- α -glucano (Gorin and Barreto-Berger 1983; Leung *et al.*, 2006). En general los β -glucanos que se encuentran en la pared celular de hongos (el grupo de glucanos más bioactivo e interesante), junto con la quitina, y/o formando complejos polisacárido-proteína (Wasser 2002)

Actividad biológica de los metabolitos secundarios y polisacáridos de origen Fúngico

Como los síndromes metabólicos están afectando a personas de todos los grupos de edades y culturas, los compuestos químicos de origen natural tienen aceptación en la sociedad. Por su complejidad sobre las moléculas sintéticas, tienen una diversidad y novedad estructural que les permite ser más selectiva al objetivo o uso farmacológico (Kothari *et al.*, 2018). El Reino Fungi al representar uno de los grupos más diversos y numerosos, incluso con especies por descubrir, pueden presentar una notable actividad farmacológica inexplorada (Zhao *et al.*, 2018):

Actividad antiinflamatoria

El proceso inflamatorio se trata de una compleja respuesta biológica por parte del tejido vascular contra algún agente agresor como patógenos, irritantes, o células dañadas. Puede ser tratado como ocasional o crónico, en ambos casos se ocasiona una cascada de eventos bioquímicos que comprometen el sistema vascular, inmune y las células adyacentes a la zona inflamada (Ferrero-Miliani *et al.*, 2017). Si bien la inflamación es una medida protectora del cuerpo para tratar de eliminar el estímulo nocivo, produce especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico, citoquinas, factor de necrosis tumoral (TNF- α), prostaglandinas, interleucina, entre otras especies que promueven aún más la respuesta inflamatoria. Estos factores proinflamatorios son precursores de daño celular pudiendo derivar en enfermedades como la artritis, cáncer, o esclerosis múltiple (Maeda & Omata 2008; Xu *et al.*, 2019)

Según Wu *et al.* (2017) un extracto de polisacárido obtenido del cultivo micelial de la especie *Grifola frondosa* posee una fuerte capacidad antiinflamatoria, disminuyendo

significativamente la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 y IL-1 β , así como la reducción de ROS intracelular inhibiendo la expresión de genes proinflamatorios en macrófagos RAW 264,7. Los polisacáridos obtenidos de una extracción alcalina de *Cordyceps militaris*, donde principalmente eran β -(1 \rightarrow 3)-D-glucanos mostraron un alto efecto antiinflamatorio inhibiendo la expresión de IL-1 β , TNF- α , and COX-2 (Smiderle *et al.*, 2014). Otro ejemplo son los polisacáridos de *Inonotus obliquus*, donde ensayos *in vitro* demostraron propiedades inhibitorias de expresión de señales de citoquinas proinflamatorias en macrófagos RAW 264,7 (NF- κ B, COX-2, e iNOS) (Ma, Chen, Dong & Lu 2013)

Actividad inmunomoduladora

Un sinnúmero de estudios han reportado el excelente potencial inmunomodulador de los hongos, donde aseguran que los polisacáridos son los responsables de esta respuesta bioactiva (Kothari *et al.*, 2018). Los glucanos y hetero-glucanos son los principales responsables en mejorar la respuesta inmune mediante la producción de citoquinas, como interferones o interleucinas, estimulando la actividad de las células blancas mediante la activación del sistema reticuloendotelial, del sistema complemento y aumentando la producción de inmunoglobulina (Wang 2020)

Los extractos mediante agua caliente del cuerpo fructífero de *Termitomyces robustus* mostraron un significativo potencial de activación de macrófagos, esplenocitos y timocitos, donde se le atribuyó la actividad tanto a los polisacáridos solubles como insolubles (Bhanja *et al.*, 2012). Ubaidillah *et al* (2015) reporta en su estudio preliminar de polisacáridos intra y extracelulares de *Ganoderma neojaponicum* una mejora en la proliferación de

macrófagos RAW264 y un incremento de la fagocitosis, indicando que se podrían usar como moduladores estimulantes del sistema innato para enfermedades infecciosas.

Actividad inmunosupresora

Fuera del área de la inmuno-estimulación del sistema nervioso, se encuentra su contra parte, la inmunosupresión, un área importante de la inmunomodulación de los productos naturales de origen fúngico, que se trata de una forma de terapia principalmente enfocada al área de trasplante de órganos, de forma que estos compuestos inmunosupresores previenen el ataque del sistema inmune en contra del órgano o tejido trasplantado, además de ser usados para tratar manifestaciones severas enfermedades de alergia y problemas autoinmune (Xu *et al.*, 2019)

Uno de los ejemplos destacables del área inmunosupresora de los productos naturales es el Ácido micofenólico, que fue aislado inicialmente de *Penicillium stoloniferum* en 1913 (Alsberg & Black 1913) quince años antes del descubrimiento de la Penicilina. Este compuesto no solo poseía propiedades antibióticas, sino que también antivirales y antiinflamatorias (Abraham 1945; Allison & Eugui 1991; Gong *et al.*, 1999). Tiempo más tarde una optimización de esta droga mediante esterificación daría como resultado Micofenolato de mofetilo que hasta el día de hoy se usa como un inmunosupresor para prevenir el rechazo de trasplante de órganos y en diversos trastornos autoinmunes (Armenti *et al.*, 2015)

Actividad antioxidante

Los radicales libres cumplen un rol importante a nivel fisiológico, pero al mismo tiempo pueden ser superados donde se consideran tóxicos. Estos se generan en procesos celulares como un subproducto de la fosforilación oxidativa, generando especies reactivas de oxígeno (ROS) y también pueden ser producidos por estar expuesto al ambiente como el caso de la luz ultravioleta, radiación ionizante y reacciones químicas (Marx 1987; Papas 1999). Los radicales libres por este metabolismo juegan un rol importante en la regulación y expresión de genes, un desbalance en su producción puede inducir daño oxidativo irreversible resultando en enfermedades tipo cardiovasculares, Alzheimer, reducción de la función inmune, cáncer, etc. (Pisoschi *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2016) Si bien nuestro organismo ha desarrollado defensas para tratar con estas especies reactivas, produciendo enzimas como la super oxido dismutasa, catalasas, peroxidasas, el uso de antioxidantes ya sea obtenido por la dieta o producidos por nuestro cuerpo como el glutatión para combatir este ROS (Homayouni-Tabrizi 2017; Cao *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2015) Para superar los efectos nocivos que puedan generar los radicales libres que se producen por el estrés metabólico y externo, es necesaria la búsqueda de antioxidantes naturales que sean seguros y sin efectos secundarios.

Se ha encontrado que los polisacáridos y heteropolisacáridos derivados de género *Ganoderma* pueden capturar especies reactivas de oxígeno producidas por el metabolismo celular, así como mejorar el accionar de enzimas como la super oxido dismutasa, catalasas y glutatión (Huand & Nie 2015; Li *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2019). *Phylloporia boldo*, una especie descrita reciente para Chile (Rajchenber *et al.*, 2019) se ha descrito que para su fracción acida de polisacáridos a una concentración de 30mg/mL mostró un porcentaje de inhibición del 24.5% para DPPH y 10.2% para ABTS (Albornoz *et al.*, 2022a)

Actividad anticancerígena

Las propiedades bioactivas de compuestos aislados de hongos, con efecto anticancerígeno se les atribuye principalmente a los polisacáridos (Wasser 1999; Mizuno 1996; Wasser 2002) Existe una diversidad de estos compuestos y sus derivados generan mecanismos de acción que evitan el desarrollo y/o eliminan afecciones cancerígenas; Dos son los principales y básicos mecanismos de la acción de polisacáridos en contra de células tumorales, acción indirecta (inmunoestimulación) y acción directa (inhibición del crecimiento tumoral e inducción de una respuesta apoptótica) (Lemieszek & Rzeski, 2012)

El hongo *Lentinula edodes* conocido como Shiitake, es comercializado desde hace 50 años. Produce el Lentinano, un β -glucano con enlaces glucosídico β -(1,3) como cadena principal y β -(1-6) para las cadenas ramificadas (Mizuno 1996; Mizuno 1999). Este polisacárido está aprobado en Japón como anticancerígeno, complementario con otros fármacos convencionales contra cáncer de tipo intestinal, hepático, estomacal, ovarios y pulmones (Mahajna *et al.*, 2007).

Albornoz *et al* (2022b) reportó una cepa del género *Fomitiporia* endémico de Chile y Argentina donde su fracción de polisacáridos ácidos, tienen una efectiva acción en contra de líneas celulares tumorales, siendo efectiva contra líneas celulares de leucemia HL-80 evaluada con un IC_{50} de 0.80 mg/mL. Zhang *et al* (2006) reporta un P-glucano carboxi-metilado del hongo *Pleurotus tuberreginum* contra células de carcinoma mamario MCF-7, reporto actividad anti-proliferativa por la detención de la fase G_1 en el ciclo celular a una concentración de IC_{50} 204 μ g/mL.

Actividad neuroprotectora

Las enfermedades neurodegenerativas son un serio problema de salud, mientras más aumenta nuestra esperanza de vida este número de enfermedades asociada a la demencia va en aumento. Muchas drogas han sido propuestas en los últimos 20 años para el tratamiento de diferentes tipos de enfermedades neurodegenerativas, con poco beneficio terapéutico y los efectos secundarios pueden llegar a ser severos (Dhahri *et al.*, 2021). El desafío es encontrar compuestos de origen natural que sean beneficiosos para este tipo de patologías, existen estudios prometedores en compuestos neuroprotectores incluidos los polisacáridos de origen fúngico, pero aún no se logra su aplicabilidad en terapias.

La enfermedad de Alzheimer se trata de un daño neurodegenerativo progresivo que se caracteriza por la acumulación de proteínas Tau hiper fosforiladas y plaquetas de péptido β -amiloide en la zona extracelular (Hardy & Selkoe 2002; Mazanetz & Fischer 2007). Recientes estudios en polisacáridos, como los fucoidanos, lentinanos, glicosaminoglicano se han usado de forma preventiva para evitar la acumulación de péptidos amiloides (Liu *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2016)

Material de estudio

Género *Aleurodiscus* Rabenh. ex J. Shröt. (Stereaceae, Russulales)

El género *Aleurodiscus* lo componen actualmente 60 especies ampliamente distribuidas por el mundo. (Gorjón *et al.*, 2013). Son con una ecología saprofita, descomponedores de material lignocelulósico con pudrición blanca. Según la especie, el basidiocarpo puede ser de apariencia cupulada, corticioide o esteroide, de margen variable, en algunas especies bien definido y reflexo, en otras no bien definido. Esporas amiloides, lisas o con ornamentación, pueden ser pequeñas o alargadas. Pueden presentarse en angiospermas y

gimnospermas leñosas, en Chile principalmente en arboles del genero *Nothofagus*, sobre ramas y troncos vivos o muertos, expuestos al sol o sombra (Núñez & Ryvarde 1997)

La investigación morfológica y filogenética de este grupo tan heterogéneo ha hecho que este numeroso y controversial grupo sea dividido en otros (Rajchenberg *et al.*, 2021), a fines de este trabajo se mostrará como genero el *Aleurodiscus sensu lato*

Entre Chile y Argentina se reconocen al menos diez especies de *Aleurodiscus s. lat.* (Gorjón *et al.*, 2013), existen estudios sobre su efecto neuroprotector de sus extractos totales, pero no se han estudiados sus polisacáridos (Gonzalez-Ramirez *et al.*, 2018)

Características de las especies a usar:

Aleurodiscus mirabilis (Gloeosoma mirabile)

Basidiocarpo inicialmente disciforme a cupulado, 1-3 mm diám., hasta 0,7 mm de espesor, confluyente, formando áreas irregularmente efundidas, margen determinado, reflexo, blanco en la superficie abhimenial, himenóforo liso, color salmón cuando esta fresco y ocráceo con la edad. Sistema de hifas monomítico, hifas generativas de paredes delgadas a gruesas, de 3-5 μm de diámetro, con abrazaderas, en la superficie abhimenial parcialmente sin ramificar (Núñez & Ryvarde 1997)

Aleurodiscus vitellinus (*Gloeosoma vitellinum*)

Basidioma cupuliforme cuando es joven, irregularmente convoluto cuando madura, subestipitado, cartilaginoso a gelatinoso; superficie himenial lisa, anaranjada; superficie abhimenial venada, concolora o más pálida que la superficie himenial; margen determinado, reflejado. Sistema de hifas monomítico, hifas sujetas, de 3 a 7 μm de diámetro, de paredes gruesas. Basidiósporas ampliamente elipsoides, 24–33 \times 19–23 μm , de paredes gruesas fuertemente amiloide. Hábitat y distribución: endémica de los Andes patagónicos de Argentina y Chile, y se sabe que crece en ramas o madera muertas de varias especies de *Nothofagus* (Gorjón *et al.*, 2013)

Aleurodiscus triviale (*Stereodiscus trivialis*)

Basidioma primero cupulado y luego coalescente, resupinado o efusivo-reflejo, membranoso o ligeramente cerámico cuando está fresco, coriáceo cuando está seco, de 250 a 500 μm de espesor. Superficie del himenio lisa o ligeramente merulioide, de color naranja pálido cuando está fresca, lisa y volviéndose rojiza en ejemplares viejos. Superficie abymenial tomentosa y blanca. Margen generalmente reflejado, adelgazado, concolorado o más pálido que la superficie del himenio. Sistema de hifas monomítico, hifas simple-septadas, 3–5 μm de diámetro, con paredes engrosadas hasta 2 μm basidiosporas elipsoidales, 12–16 \times 7–8 μm , amiloide liso, de paredes ligeramente gruesas. Hábitat y distribución: endémica de los Andes patagónicos y se sabe que crece en *Nothofagus antarctica*, *N. betuloides*, *N. dombeyi* y *N. pumilio*. (Gorjón *et al.*, 2013)

Aleurodiscus patagonicus (*Stereodiscus patagonicus*)

Basidiomas primero discoides luego confluentes; margen determinado, involuto; himenóforo liso a ligeramente reticulado, amarillo anaranjado pálido a amarillo anaranjado medio. Sistema hifal monomítico; hifas de paredes gruesas, de 3–6 μm de ancho; hifas parafisoides cilíndricas, ocasionalmente ramificadas, con pinzas dispersas, de 3–5 μm de ancho. Basidiosporas citriformes, lisas, de paredes delgadas, hialinas, fuertemente amiloides. distribución: Sobre madera en bosque templado lluvioso valdiviano en la Patagonia norte chilena (Phookamsak *et al.*, 2019)

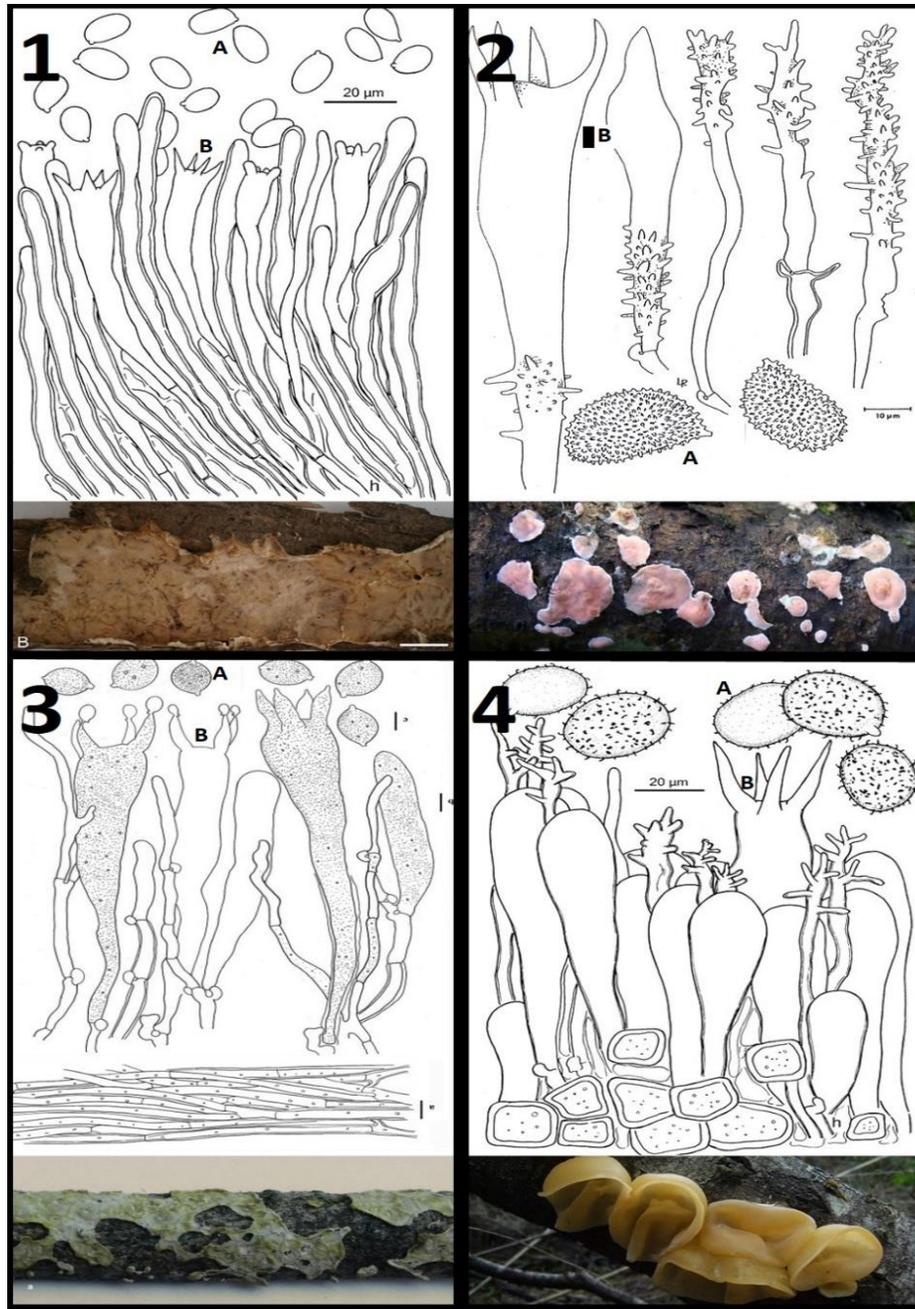


Figura 1. Muestra la morfología macro y microscópica de las cuatro especies que se usaron en este trabajo. **A.** Basidiosporas, **B.** Basidios; **1.** *Aleurodiscus triviale*, **2.** *Aleurodiscus mirabilis*, **3.** *Aleurodiscus patagonicus*, **4.** *Aleurodiscus vitellinus* (modificado de: Gorjón *et al.*, 2013, MycoBank #120915, Phookamsak *et al.*, 2019, Núñez & Ryvarden 1997)

2. HIPÓTESIS

Las cepas *A. triviale* *A. mirabilis* *A. patagonicus* y *A. vitellinus. s. lato*, poseen diferencias en los grupos funcionales de sus inexplorados polisacáridos, las que podrían generar distintas actividades antioxidantes.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante de los polisacáridos obtenidos desde cepas del género *Aleurodiscus sensu lato*.

4. Objetivos específicos

- I. Caracterizar los polisacáridos de las cepas del género *Aleurodiscus* mediante técnicas de FT-IR.
- II. Determinar el efecto antioxidante de los polisacáridos frente al radical ABTS^{•+}
- III. Evaluar el rendimiento de los polisacáridos obtenidos del micelio de las cepas.

5. METODOLOGÍA

Materiales y métodos

Las especies *A. mirabilis*, *A. patagonicus*, *A. triviale* y *A. vitellinus* fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Química aplicada y Sustentable de la Universidad del Bío Bío (Concepción, Chile)

Tabla 1. Códigos de identificación de las cepas estudiadas.

Nombre Cepa	Codigo LABQAS	GenBank®
<i>Aleurodiscus mirabilis</i>	1612	MT568513
<i>Aleurodiscus patagonicus</i>	1688	MT831057
<i>Aleurodiscus triviale</i>	1611	OP964613
<i>Aleurodiscus vitellinus</i>	1716	s/c

Cultivo en Medio Líquido

Las cepas fueron cultivadas en matraces de 5000 ml con medio de cultivo enriquecido de levadura, peptona y dextrosa (YPD. 3g/L, 10g/L, 20g/L respectivamente) y esterilizados en autoclave a 120 °C por 20 minutos. Donde crecieron con agitación constante a 120 rpm con una temperatura de 25°C con un pH inicial de 5.5 por 31 días.

Extracción de polisacáridos intracelulares (IPS)

Para la Extracción de polisacáridos intracelulares (IPS) el micelio de cada cepa se obtuvo filtrando el medio líquido utilizando papel de filtro Whatman grado 1, seguido de dos lavados con 250 ml de agua destilada. Posteriormente, el micelio se liofilizó. Para la extracción de los IPS, se realizaron tres extracciones de 180 minutos cada una, utilizando agua destilada a 90 °C y agitación constante. Los extractos acuosos resultantes se combinaron y concentraron en un rotavapor a 60 °C bajo presión reducida. Después de reducir el volumen, los polisacáridos se precipitaron mediante la adición de tres volúmenes

de etanol 95% frío y se dejaron reposar durante la noche a 4 °C. El precipitado resultante se separó del sobrenadante mediante centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos, obteniendo así el crudo de polisacáridos intracelulares de cada especie.

Purificación de polisacáridos

La purificación de los crudos de polisacáridos se realizó mediante diálisis con una membrana de celulosa (Peso molecular de corte 14 kDa). Donde el crudo de polisacáridos se disolvió en una solución 4M de NaCl para luego ser introducido a la manga de diálisis contra una solución de 0.5 M de NaCl, con agitación constante durante 24 horas a temperatura ambiente, pasado el tiempo se dejó dializar contra agua destilada por 48 horas, cambiando el agua cada 6 horas. Pasado el tiempo la solución dentro de la bolsa de diálisis se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos. Se conservó el sobrenadante y se precipitó con etanol 95% frío (3 volúmenes), se mantuvo a -20°C por 30 minutos para luego centrifugar a 4000 rpm por 20 minutos. Se conservó el pellet y fue almacenado a -20°C hasta su liofilización obteniéndose los polisacáridos puros intracelulares (Abdala *et al.*, 2019)

Análisis de espectroscopía infrarroja transformada de Fourier por reflectancia total atenuada (FT-IR ATR)

Para la caracterización de los grupos funcionales de los polisacáridos se utilizó el equipo de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier marca Shimadzu modelo IRAffinity-1S con accesorio ATR modelo QATR 10. La espectroscopia de absorción infrarroja de los polisacáridos puros se midió en la región 4000-400 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 60 escaneos. Se graficó el espectro con el software OriginPro 2018 y se utilizó el algoritmo Savitzky-Golay con 30 puntos de suavizado (Matsuhira 1996)

Análisis por espectroscopía UV-Vis

Una solución acuosa de polisacáridos purificados (1 mg/mL) se analizó usando un espectrofotómetro (Spectroquant Prove 600, Merk). La lectura del espectro UV-vis fue barrido entre 200-500 nm longitud de onda.

Actividad Antioxidante *In vitro*

Ensayo de decoloración del catión radical ABTS^{•+}

La actividad de eliminación de radicales libres de los polisacáridos purificados fue examinada usando radicales ABTS^{•+} (Re *et al.*, 1999). Donde 38,8 mg del radical ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) fue disuelto en 20mL de agua ultrapura Milli-Q, para obtener una concentración de 3.5 mM. Se preparó una solución de persulfato de potasio 1,225 mM y se mezclaron las dos soluciones, la solución resultante fue agitada y dejada en oscuridad por 16 horas para formar los cationes radicales de ABTS^{•+}. De esta mezcla se extrajo una alícuota y fue disuelta en agua hasta obtener una absorbancia de 0,70 a 734 nm. Luego 50µL de distintas concentraciones de polisacáridos purificados (2,5 - 20 mg/mL) fueron añadidas a 150 µL de solución 0,7 mM ABTS^{•+}, la microplaca fue llevada a incubar en oscuridad por 30 minutos y la absorbancia fue leída a 734 nm.

La capacidad para eliminar los radicales de ABTS^{•+} fue calculado según la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de eliminación de radicales ABTS}^{\bullet+} (\%) = (A_c - A_s) / A_c \times 100$$

Donde A_c es la absorbancia del control (50 µL de agua con 150 µL de solución ABTS^{•+}) y A_s es la absorbancia de la muestra.

Rendimiento

El rendimiento de cada extracto se calculó según Samavati (2013) Que se expresó en porcentaje según las siguiente formula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = (\text{Masa de polisacárido seco}) / (\text{Masa de micelio seco}) \times 100$$

6. RESULTADOS

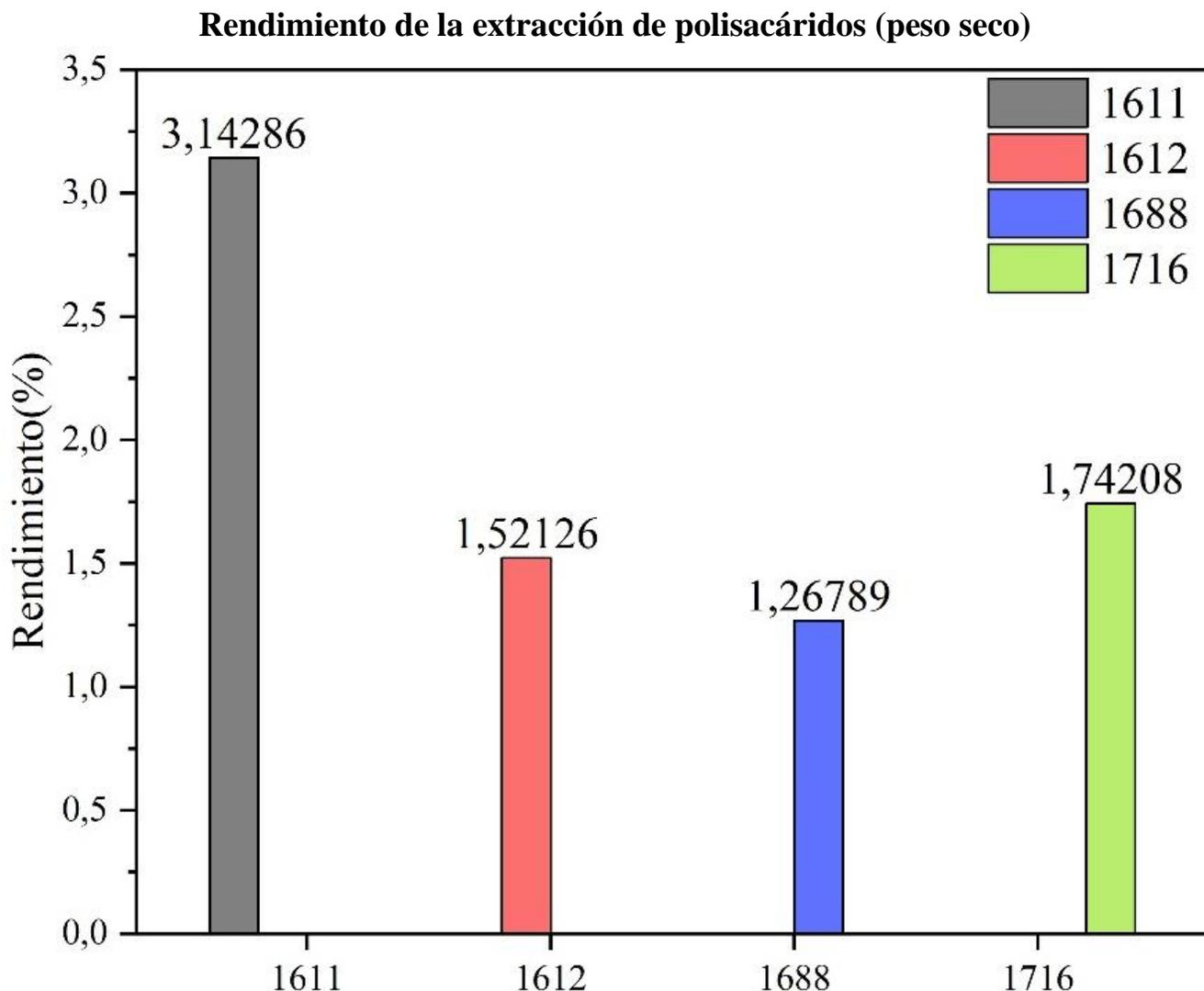


Figura 2. Determinación del rendimiento de polisacáridos purificados obtenidos luego del proceso de extracción de cada cepa de hongo del género *Aleurodiscus*.

De las cepas de polisacárido analizadas, la especie *Aleurodiscus triviale* (1611), presentó el mejor rendimiento con un 3,14% en relación con porcentaje de polisacáridos v/s peso seco de micelio, luego las cepas *Aleurodiscus vitellinus* (1716) con 1,74%, *Aleurodiscus mirabilis* (1612) con 1,52% y *Aleurodiscus patagonicus* (1688) con 1,27%, con rendimientos similares en relación con polisacáridos. En comparación con *A. triviale* estas cepas obtuvieron menos la mitad de rendimiento.

Escaneo UV-VIS de los extractos puros de polisacáridos

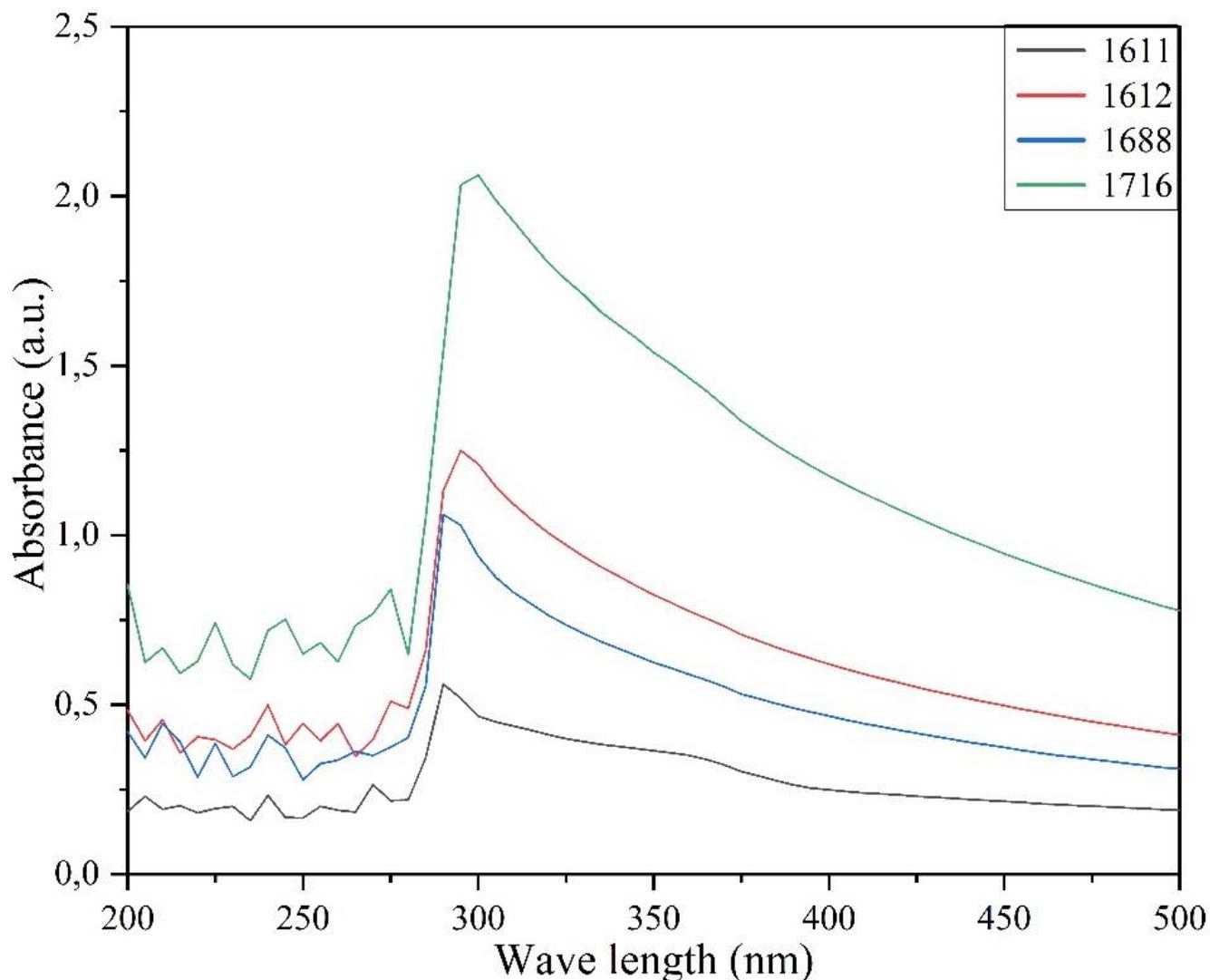


Figura 3 Espectroscopia Ultravioleta-visible (UV-vis) de los polisacáridos purificados de las cepas del género *Aleurodiscus*.

Los resultados del espectro UV-vis se observó un pick de absorbancia entre los rangos 290-305 nm, indicando presencia trazas de proteínas en las muestras de polisacáridos purificados (Fig. 3) o de compuestos aromáticos unidos covalentemente a los polisacáridos (Imbs *et al.*, 2015). Es necesario realizar otra técnica de purificación para eliminar estas trazas, frecuentemente en la extracción de crudos de polisacáridos co-precipitan con pigmentos y proteínas de similar peso molecular y son difícil de eliminar de los extractos.

Algunas técnicas de desproteinización: Método de Sevag, donde al polisacárido en solución acuosa se le agregan el reactivo de Sevag, una solución de Cloroformo-Butanol (CHCl_3 -*n*-BuOH, 4:1); También está el método de desproteinización por enzimólisis donde agregan a la solución enzimas endopeptidasas, generalmente se utiliza papaína en pH neutro para este proceso; El método de precipitación por acetato de plomo se basa en agregar 2% (m/v) de acetato de plomo y mezclarlo con 20 mL de polisacárido (Chen *et al.*, 2012) Otras técnicas más comunes son la de filtración por cromatografía utilizando gel DEAE o Sephadex G-100, la utilización de ácidos como HCl o TFA para desnaturalizar pigmentos y proteínas también es común a la hora de una mayor purificación de polisacáridos.

Análisis de polisacáridos mediante caracterización infrarroja

El espectro infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) identifica los grupos funcionales característicos de los polisacáridos, que son identificados por la transmitancia en longitudes de onda para los grupos funcionales.

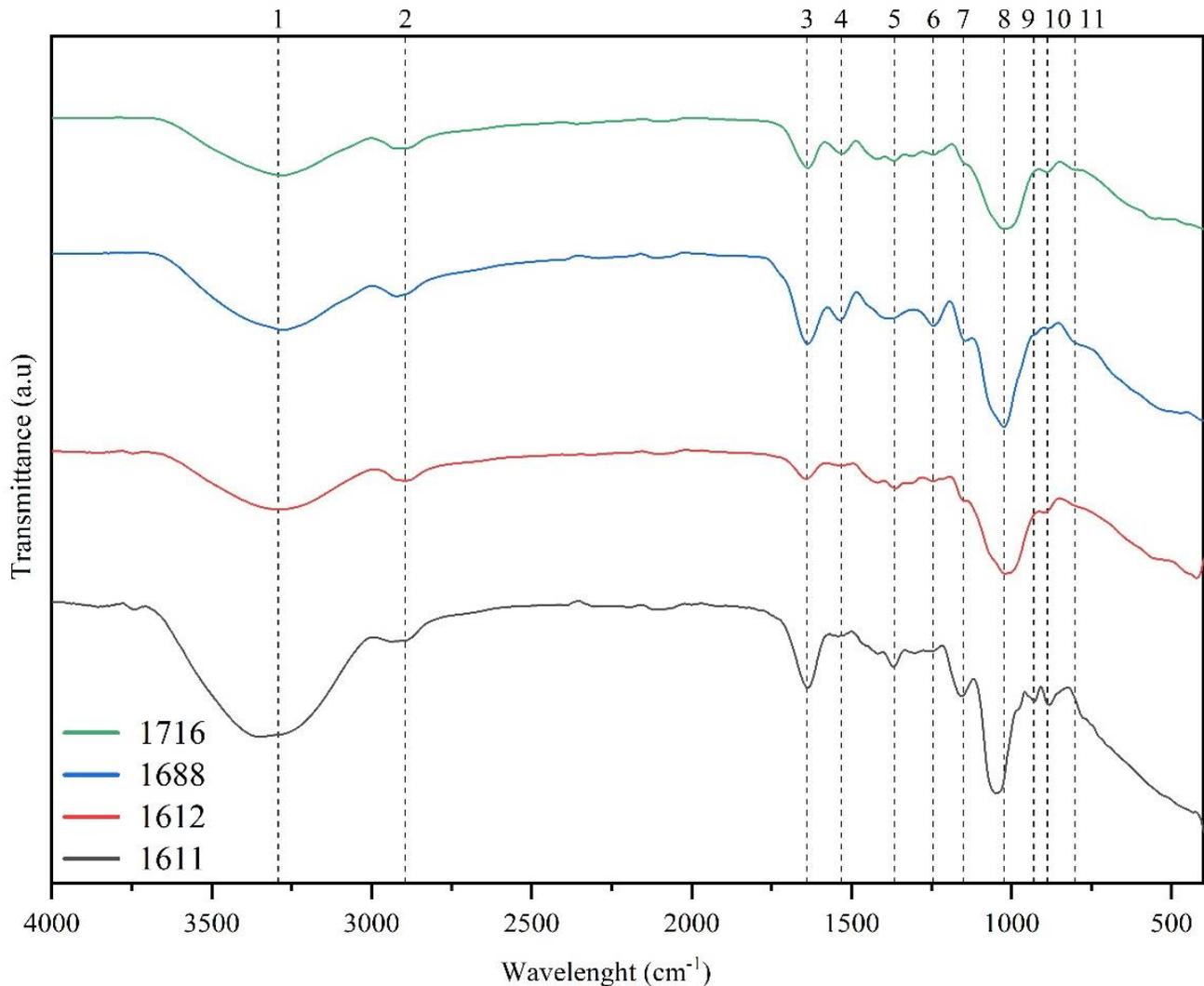


Figura 4. Se muestra los espectros (FT-IR) de los polisacáridos purificados de las cuatro cepas del género *Aleurodiscus*.

Se observa una característica absorción en los peaks 1 y 2, entre los rangos 3345 y 3280 cm⁻¹ que es correspondiente a vibraciones de grupos hidroxilos (O-H) (Carey 1992). La banda del segundo peak entre los 2900 cm⁻¹ se determina por las vibraciones de grupos

CH₂ (Maja *et al.*, 2012). Los peaks 3 y 4 se encuentran asociados a la presencia de Amidas primarias, compuestos fenólicos y aromáticos (Kozarski *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015) Las bandas 5 y 6 están asignada a vibraciones de los grupos C-H y COH en plano (Goo *et al.*, 2013; Shao *et al.*, 2014). Los peaks 7, 8, 9, 10 corresponden a estiramiento asimétrico de C-O-C en los enlaces glucosídicos, estiramiento asimétrico de C-O en enlaces α -glucosídico, la presencia de enlaces α y β de glucosa y la presencia de anillos de furanosa junto con enlaces β -glucosídicos respectivamente (longitud de onda 1151, 1023, 930 y 888 cm⁻¹) (Tangsadthakun *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2006). En la región de los 801 (peak 11) puede ser inferida a la presencia de grupos sulfatados en los polisacáridos (Zhang *et al.*, 2011)

Segunda derivada entre la región 2000-400 cm^{-1} del espectro infra rojo de los polisacáridos purificados.

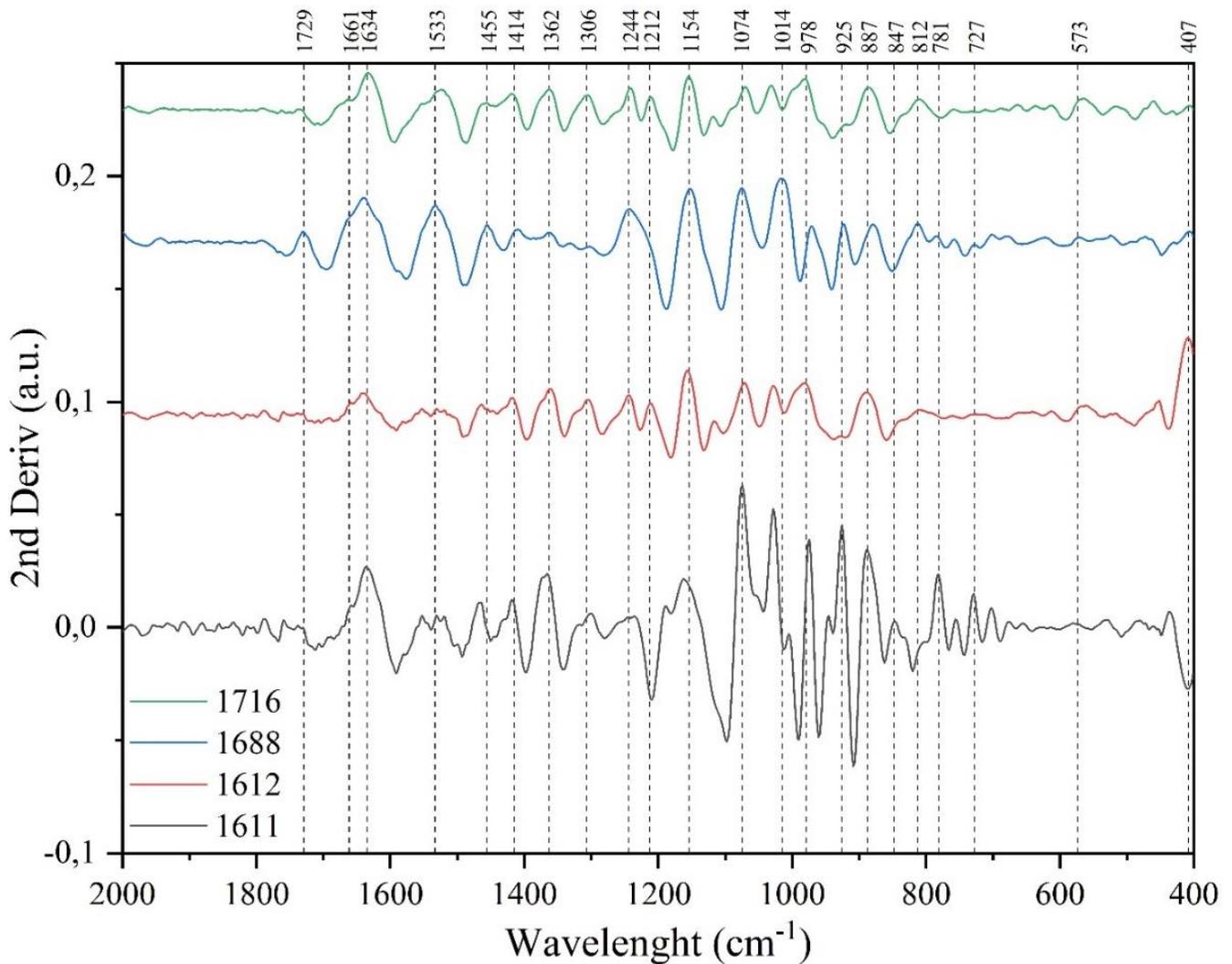


Figura 5. Segunda derivada de los espectros obtenidos por FT-IR de las cuatro cepas de *Aleurodiscus*.

La conversión a la segunda derivada entre la longitud de onda 2000-400 cm^{-1} del espectro de la Figura 5, provee de información adicional al resolver una mejor nitidez en las bandas y peaks (Chopin *et al.*, 1999; Matsuhira & Rivas 1993)

Los principales peaks que se pueden rescatar de este grafico son los que se resumen en la tabla de abajo (Choong *et al.*, 2011; Troncoso 2014; Rodriguez-Jasso *et al.*, 2011)

Tabla 2. Destaca los principales grupos funcionales presentes en los espectros FT-IR de los polisacáridos de las cuatro especies del género *Aleurodiscus*.

Número de onda				Tipo de vibración	Grupo funcional
/Código de cepa					
1611	1612	1688	1716		
---	---	1729	----	Estiramiento simétrico	C≡O
1634	1640	1638	1634	Estiramiento simétrico	Piranosas
1465	1465	1455	1459	Estiramiento asimétrico	CH ₃
1369	1362	1362	1362	Estiramiento simétrico	-N=C=N-
----	1244	1244	1241	Estiramiento asimétrico	S=O
1162	1156	1152	1154	Estiramiento simétrico	SO ₂
1074	1070	1074	1069	Estiramiento simétrico	C-O en β-Glu
----	812	812	810	Sulfato unido a un grupo alcoholico primario ecuatorial	C-S-O
----	564	573	566	Deformación asimétrica	S-O

Actividad Antioxidante *In vitro*

Ensayo de decoloración del catión radical ABTS^{•+}

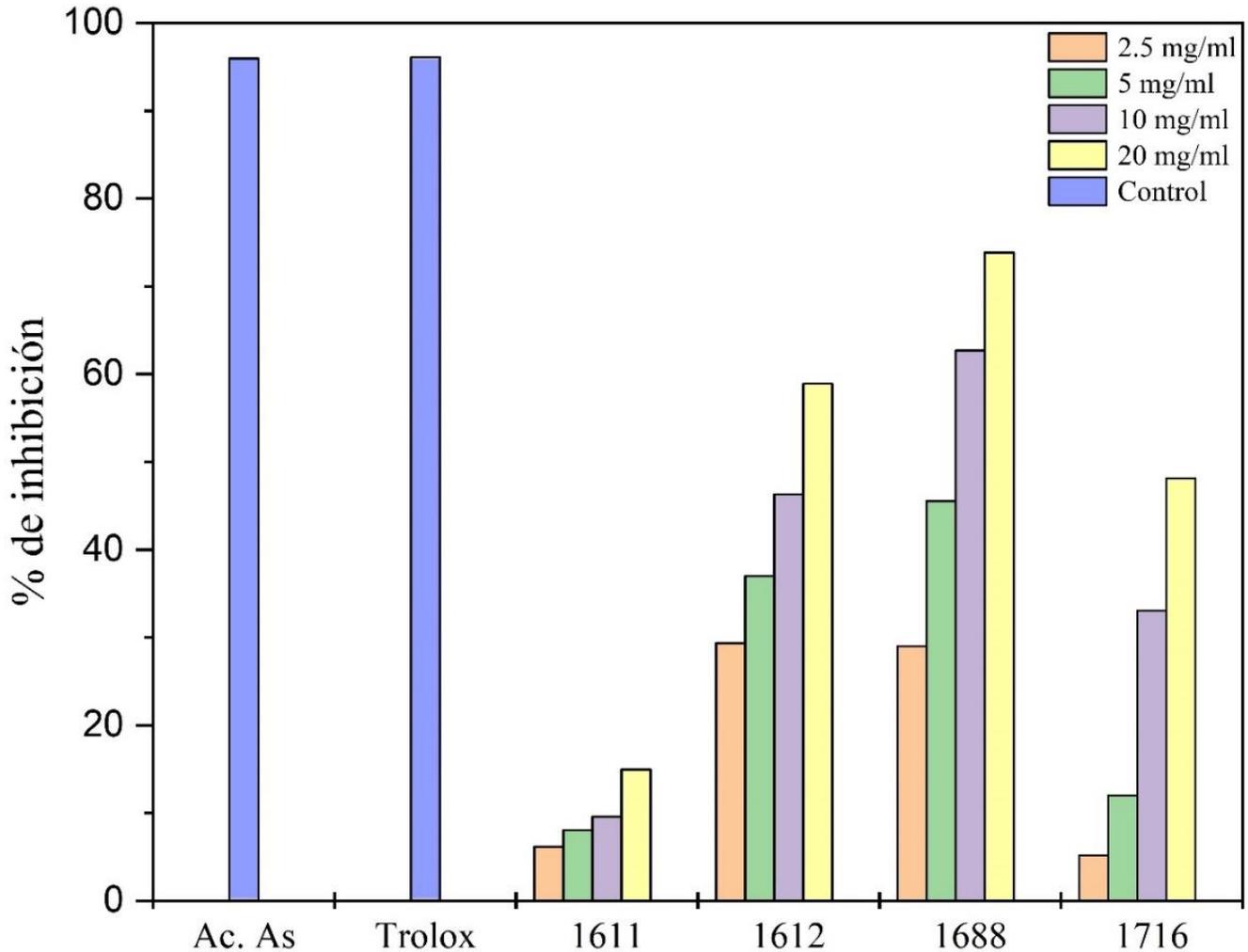


Figura 6. Ensayo de actividad antioxidante ABTS^{•+} de los polisacáridos obtenidos de las especies *Aleurodiscus triviale* (1611), *Aleurodiscus mirabilis* (1612), *Aleurodiscus patagonicus* (1688) y *Aleurodiscus vitellinus* (1716). Acido ascórbico y Trolox fueron usados como control.

Como se muestra en la Figura 6 las cuatro cepas fueron evaluadas para el ensayo antioxidante ABTS^{•+}. Se midieron en una concentración de 20 mg/mL como máxima, hasta una de 2,5 mg/mL como mínima. Los resultados relacionan el porcentaje de actividad antioxidante con el de la concentración del polisacárido donde a la máxima concentración

de las cepas 1611, 1612, 1688 y 1716 tuvieron un porcentaje de inhibición del radical ABTS^{•+} de 14,9%, 58,9% 73,8% y 48,1% respectivamente, en la concentración más baja mostraron un porcentaje de inhibición 6,2%, 29,3%, 29,0% y 5,2% respectivamente. Los controles de Ácido ascórbico y Trolox fueron de 100 µg/mL.

De estos resultados la cepa 1688 con una concentración 20 mg/ml obtuvo una inhibición 73,8%, siendo el mejor resultado para este ensayo, con respecto a los resultados de ácido ascórbico y Trolox.

7. DISCUSIÓN

Los polisacáridos son macromoléculas poliméricamente carbohidratadas en donde cada unión de los monómeros se encuentra covalentemente unida mediante enlaces glucosídicos, y que se puede presentar como una cadena lineal o ramificada. Al igual que otras muchas moléculas como ácidos nucleicos o proteínas, los polisacáridos se encuentran en todas las formas de vida en la naturaleza y juegan un rol importante en la supervivencia de las especies (Barbosa & Carvalho 2021). Al ser fuentes potenciales de generar respuestas biológicas y muchos de ellos tiene estructuras únicas según la especie, da una gran flexibilidad para ser utilizados como agentes bioactivos para beneficio humano (Wasser 2002)

La espectrometría IR es una técnica analítica muy extensa para el análisis de estructuras moleculares. La región típica de estudio para los polisacáridos es la región media de la longitud de onda IR entre unos 2500 nm y 25000 nm (Numero de onda entre los 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1}) El espectro IR, de los polisacáridos de este trabajo, se genera por la medición de la absorción de la radiación IR de la muestra en función de la radiación que se aplica en ellos. Los peaks aparecen porque la frecuencia de la radiación coincide con la misma frecuencia natural de los enlaces en las moléculas orgánicas (Hong *et al.*, 2021).

Al comparar los gráficos de los espectros IR se utilizó la caracterización cualitativa, junto con el programa OriginPro 2018, generando información de los grupos funcionales del polisacárido, *i.e.*, grupos anoméricos, aminas, furanos, anillos de piranosa, etc. El problema es la similitud entre los espectros IR como se ve en la Figura 4. y en los anexos Fig. 7 a Fig. 10. Por ser especies del mismo género, es por esto se decidió agregar la segunda derivada en la región “huella digital” (Pasandide *et al.*, 2017) entre los 2000 cm^{-1} y los 400 cm^{-1} (Figura 5) que ayuda a diferenciar bandas sobrelapadas, entregando información adicional espectro original que no logra definir.

El análisis de las muestras FT-IR por el espectro principal y por la segunda derivada en la región 2000 cm^{-1} - 400 cm^{-1} identificar grupos sulfatados, la presencia de trazas de ácido urónico, anillos de piranosa. Aparte se encontraron en los cuatro espectros bandas relacionadas con enlaces glucosídicos con carbonos anoméricos α y β . Hay algunas

diferencias en cuanto a grupos funcionales entre las especies: Por ejemplo, la cepa 1611 no presenta peaks en algunas bandas donde se asocia a la presencia de grupos sulfatos, a su vez la cepa 1688 es la única que se le puede atribuir trazas de ácido urónico por el peak en 1729 cm^{-1} (Wang *et al.*, 2011). En la zona de los 1100 cm^{-1} - 900 cm^{-1} donde generalmente aparecen los enlaces β -glucanos, la cepa 1611 tiene la mayor cantidad de peaks al comparar con las otras especies. Según Kozarski *et al* (2011) estos tipos de enlaces son una gran fuente de bioactividad en cuanto a actividad antitumoral. El peak entre la banda 1638 y 1636 para los espectros de todas las cepas que está asociado a la presencia de proteínas, corroborando con el ensayo UV-VIS de la Figura 2, que muestra absorbancia para la longitud de onda entre los 290 nm y 305 nm característico de la presencia de proteínas.

Muchos ensayos *in vitro* se han llevado a cabo para evaluar la actividad antioxidante de compuestos naturales (Wang *et al.*, 2015). Para este caso, el ensayo antioxidante ABTS^{•+} uno de los más usados y convenientes para el estudio de polisacáridos, pues se puede preparar con agua, ya que estos compuestos son solubles en medios polares, evitando solventes como etanol o metanol que nos pueden alterar las lecturas en el espectrofotómetro por la formación de precipitados (Aguirre *et al.*, 2015).

En cuanto a la actividad de las cepas se probaron concentraciones de 2,5 mg/mL 5 mg/mL 10 mg/mL y 20 mg/mL. Se observó actividad inhibitoria del radical en todas las cepas, en comparación con el blanco. El polisacárido la cepa *A. patagonicus* obtuvo la mayor inhibición con un 73,8% en su concentración máxima. La más baja actividad la obtuvo *A. triviale* con una inhibición del 14,9%, que puede estar atribuida a los escasos grupos funcionales altamente bioactivos, principalmente los grupos sulfatados o con presencia de ácido urónico que carece como se observa en la Tabla 2.

Albornoz *et al* (2022b) reporta el uso de 40 mg/mL de polisacáridos ácidos de la especie *Nothophellinus andinopatagonicus* para inhibir un 4,63% del radical, valor significativamente menor a los mostrados en este trabajo, lo interesante de esto es que en ese mismo trabajo evaluaron la actividad de proliferación de la línea celular HL-60 y con apenas una concentración de 10mg/mL el polisacárido fue capaz de inhibirla en un 95%. En muchos estudios ocurren casos similares, donde la actividad antioxidante es baja frente a radicales como ABTS^{•+} y frente a líneas celulares son excelentes una explicación a esto es que la actividad antioxidante está ligada a la presencia de complejos polisacárido-

proteína o péptidos que posean actividad antioxidante. (Jia *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2010)

La metodología de extracción de polisacáridos por agua caliente es practica y sencilla, pero sus desventajas son; tiempos de extracción, altas temperaturas que pueden reducir la actividad biológica y el rendimiento del extracto. Para la cepa *A. triviale* obtuvo el mejor rendimiento con 3,1% en relación con el peso seco de micelio, mientras que las demás cepas obtuvieron un 1,5% para *A. mirabilis*, 1,2% *A. patagonicus* y 1,7% para *A. vitellinus*, si comparamos con extractos de otros hongos como por ejemplo *Phylloporia boldo* con un 38% de rendimiento, *Nothophellinus andinopatagonicos* con un 20% de rendimiento por peso seco micelial (Albornoz *et al.*, 2022). You *et al* (2014) reporta para la especie *Tricholoma mongolicum* un rendimiento del 35%.

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

En las últimas décadas los polisacáridos de origen vegetal han sido el objetivo de numerosas investigaciones, por la gran diversidad y bioactividad que puedan presentar, sean provenientes de hongos o de algún otro organismo, son una fuente compuestos bioactivos con novedosas aplicaciones.

El objetivo del presente estudio es evaluar la actividad antioxidante de los polisacáridos obtenidos de cuatro cepas de *Aleurodiscus s. lato*, mediante extractos de agua caliente, diferenciarlos mediante técnicas IR y cuantificar capacidad antioxidante. Este tranajo el primer registro de actividad antioxidante y caracterización infrarroja para estas especies nativas que se desarrollan en los bosques nativos de Chile.

En las cuatro cepas se observó actividad antioxidante, *A. patagonicus* mostró la mayor actividad a esa misma concentración orden descendiente fue; *A. mirabilis*> *A. vitellinus*> *A. triviale*. Y que puede estar relacionado con los grupos funcionales reportados en la Tabla 2. Donde el que presentó mayo cantidad de grupos funcionales interesantes fue *A. patagonicus* >*A. mirabilis*=*A. vitellinus*> *A. triviale*.

Numerosos estudios han hablado sobre efectividad en la bioactividad de los β -glucanos que están presente en cada uno de estos extractos, siendo *A. triviale* el que presenta una mayor proporción según indican los resultados del FT-IR. Uno esperaría una mayor actividad antioxidante de su parte, esto no quiere decir que la cepa no sea viable, la auténtica actividad biológica de los polisacáridos se manifiesta a través de ensayos celulares, donde pueda generar alguna cascada en las rutas metabólicas que puedan ser aplicadas a la inmunomodulación, citotoxicidad, estimulación de enzimas anti-ROS, neuro-protección, etc. Pues la actividad antioxidante puede estar ligada a la presencia de proteínas o compuestos aromáticos unidos al polisacárido y puede no siempre ser una variable objetiva a la hora de generar conclusiones sobre el potencial bioactivo de la especie (Chan *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014; Javed, Payne & Lee 2016; Hsu *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2016). Se propone realizar ensayos, de viabilidad celular, citotóxicos con líneas celulares de cáncer humano, ensayos de inmunomodulación aplicados a macrófagos para ver viabilidad y medición de citoquinas. Para aumentar el conocimiento y la efectividad de las cepas estudiadas.

La contribución del espectro principal del FT-IR, acompañado con la segunda derivada, tiene la peculiar ventaja en un análisis rápido y efectivo, es fácil de interpretar y genera un margen de reproducibilidad. Los resultados arrojan que se trata solo de α y β -glucanos acompañados de los grupos funcionales que se vieron en la tabla 2. Para un mayor análisis y entendimiento de la estructura de los polisacáridos se necesitan hacer estudios de los monosacáridos mediante técnicas de espectrometrías HPLC-IR y GC-MS. Para determinar la disposición y, si es necesario, proponer el tipo de estructura de los polisacáridos, la resonancia magnética nuclear es una herramienta indispensable. Esta técnica permite identificar la posición de los enlaces glicosídicos (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4, 1 \rightarrow 6) en la cadena polimérica. Esperamos en un próximo estudio, hidrolizar y derivatizar los polisacáridos, analizarlos en cromatografía gases acoplado a una masa para conocer su estructura monomérica.

9. ANEXOS

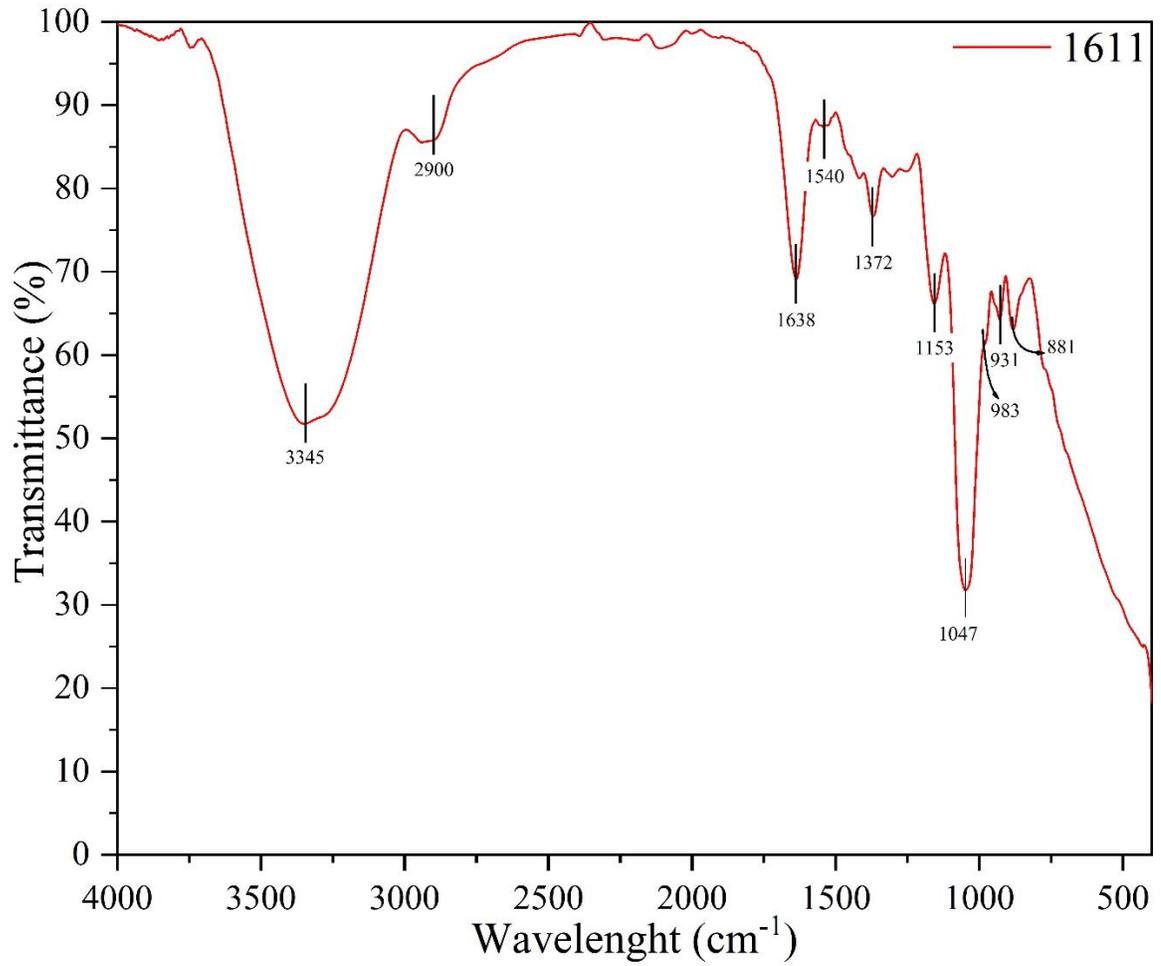


Figura 7. Espectro FT-IR del extracto acuoso de *Aleurodiscus triviale*.

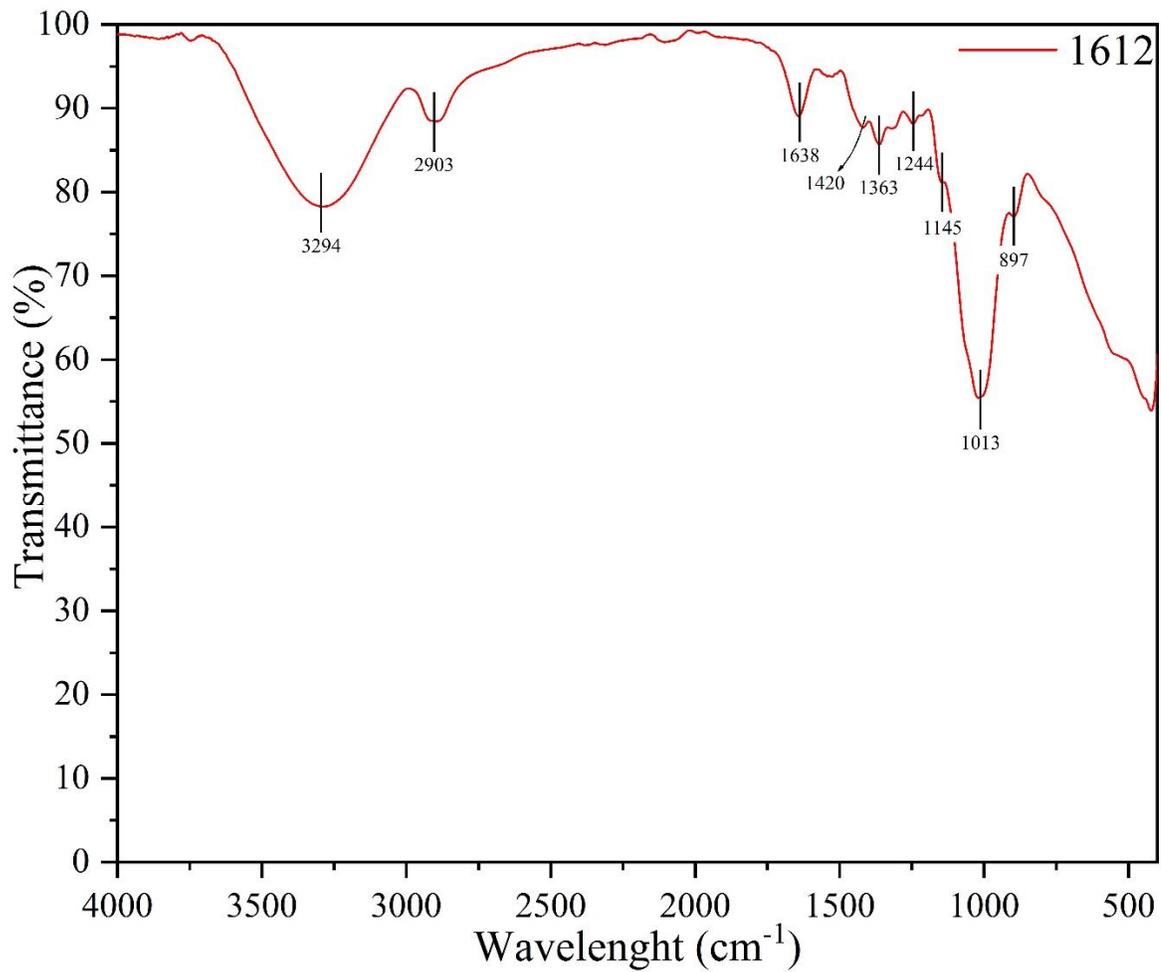


Figura 8. Espectro FT-IR del extracto acuoso de *Aleurodiscus mirabilis*.

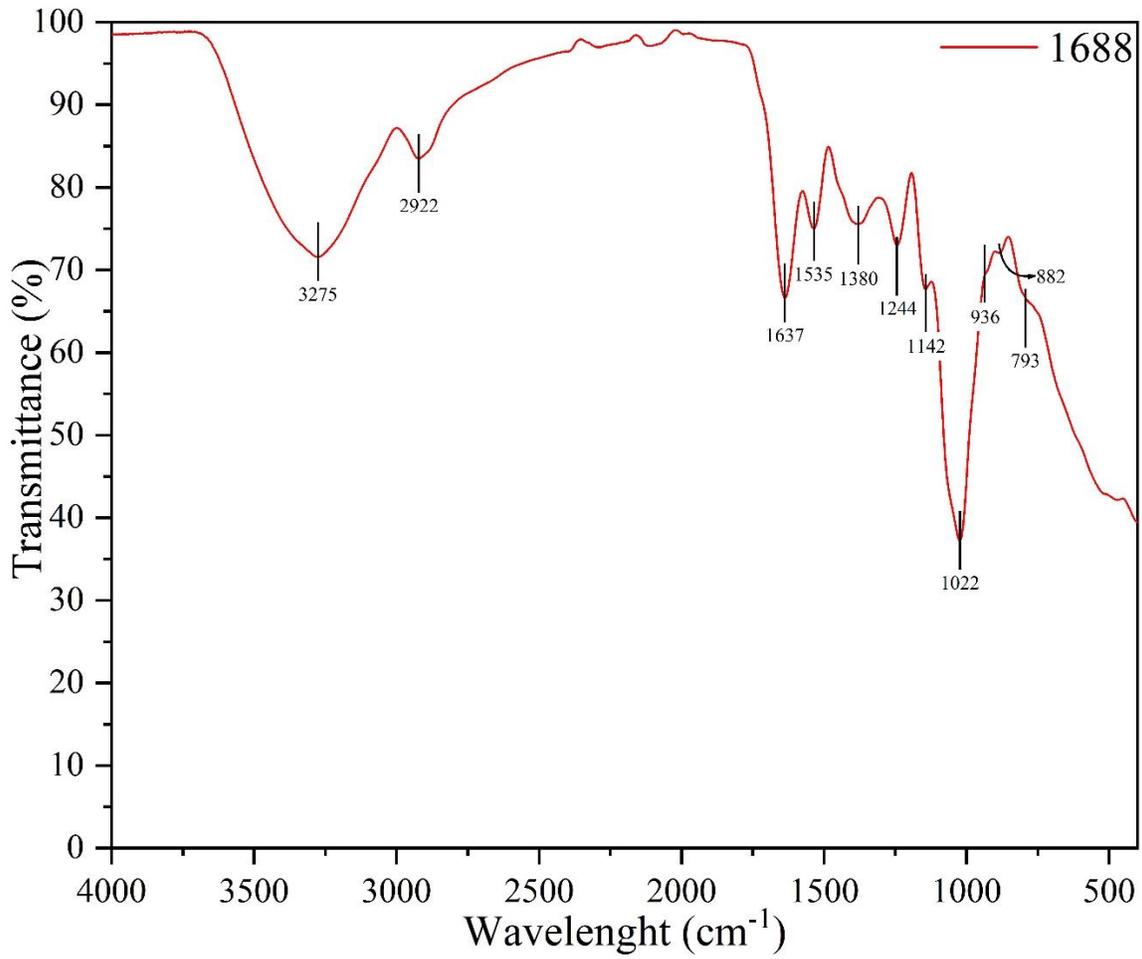


Figura 9. Espectro FT-IR del extracto acuoso de *Aleurodiscus patagonicus*.

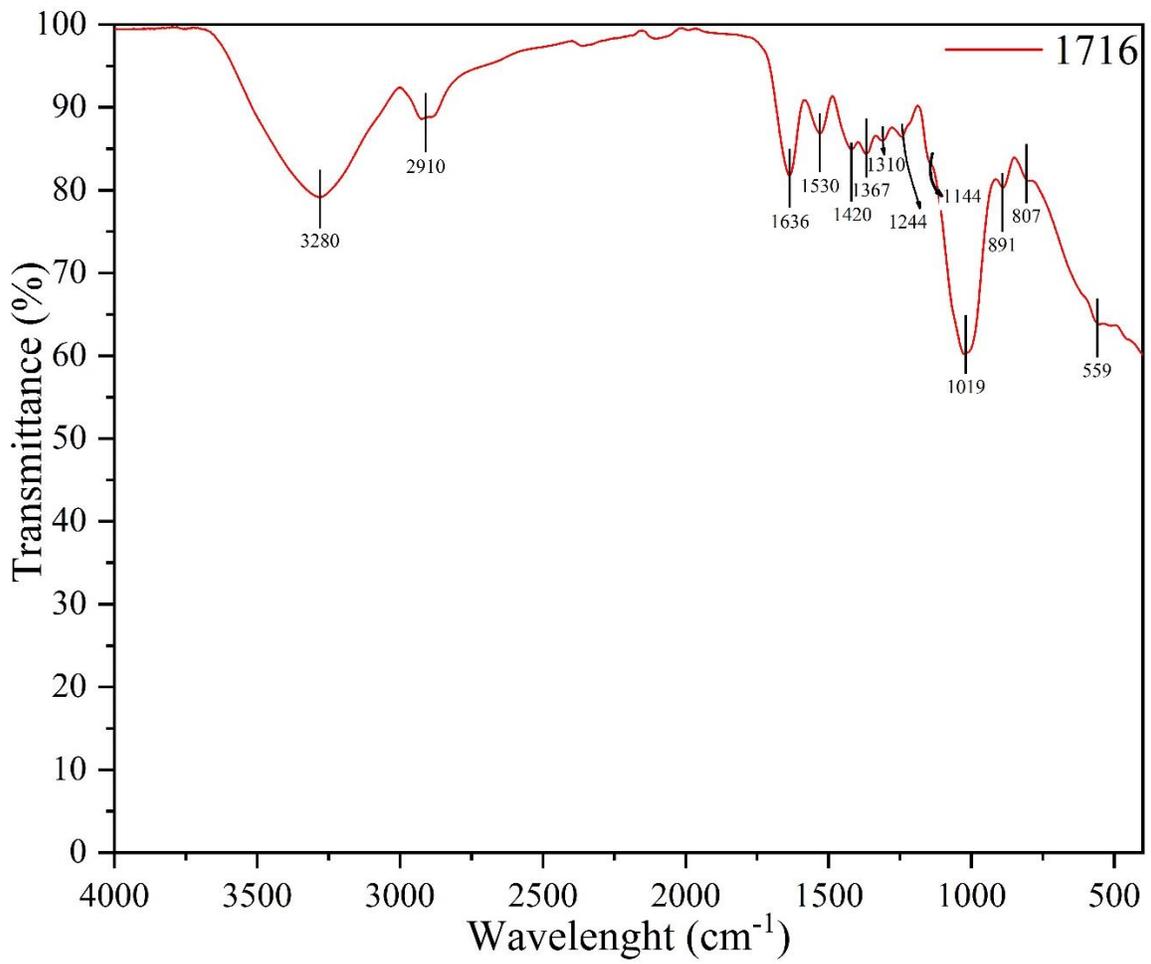


Figura 10. Espectro FT-IR del extracto acuoso de *Aleurodiscus vitellinus*.

10.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdala Díaz, R. T., Casas Arrojo, V., Arrojo Agudo, M. A., Cárdenas, C., Dobretsov, S., & Figueroa, F. L. (2019). Immunomodulatory and Antioxidant Activities of Sulfated Polysaccharides from *Laminaria ochroleuca*, *Porphyra umbilicalis*, and *Gelidium corneum*. *Marine Biotechnology*, 21(4), 577–587. <https://doi.org/10.1007/s10126-019-09905-x>
- Abraham, E. P. (1945). The effect of mycophenolic acid on the growth of *Staphylococcus aureus* in heart broth. *Biochemical Journal*, 39(5), 398–408. <https://doi.org/10.1042/bj0390398>
- Albornoz Muñoz, Verónica Agustina (2022b) Actividad anticancerígena y antioxidante in vitro de polisacáridos ácidos obtenidos desde hongos pertenecientes a la familia Hymenochaetaceae asociados a bosque nativo de Chile. [Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias, Mención Microbiología. Universidad de Concepción] Ciencias Biológicas - Tesis Doctorado url: <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/9940>
- Albornoz, V., Casas-Arrojo, V., Figueroa, F., Riquelme, C., Hernández, V., Rajchenberg, M., Smith, C. T., Campos, V. L., Abdala-Díaz, R. T., Becerra, J., Pérez, C., & Cabrera-Pardo, J. R. (2022a). In vitro cytotoxic capacity against tumor cell lines and antioxidant activity of acidic polysaccharides isolated from the Andean Patagonian fungus *Phylloporia boldo*. *Natural Product Research*, 1–6. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2158331>
- Allison, A. C., & Eugui, E. M. (1991). Immunosuppressive and long-acting anti-inflammatory activity of mycophenolic acid and derivative, RS-61443. *British Journal of Rheumatology*, 30, 57-61.
- Alsberg, C., & Black, O. F. (1913). Contributions to the study of maize deterioration: biochemical and toxicological investigations of *Penicillium puberulum* and

Penicillium stoloniferum (No. 270). US Government Printing Office.

- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.-M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1582–1614. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.08.001
- Barbosa, J. R., & de Carvalho Junior, R. N. (2021). Polysaccharides obtained from natural edible sources and their role in modulating the immune system: Biologically active potential that can be exploited against COVID-19. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.026>
- Barreto-Bergter, E., & Gorin, P. A. J. (1983). Structural Chemistry of Polysaccharides from Fungi and Lichens. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (Vol. 41, pp. 67–103). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60056-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60056-6)
- Bhanja, S. K., Nandan, C. K., Mandal, S., Bhunia, B., Maiti, T. K., Mondal, S., & Islam, S. S. (2012). Isolation and characterization of the immunostimulating β -glucans of an edible mushroom *Termitomyces robustus* var. *Carbohydrate Research*, 357, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.04.007>
- Bradburn, M. J., Clark, T. G., Love, S. B., & Altman, D. G. (2003). Survival Analysis Part III: Multivariate data analysis – choosing a model and assessing its adequacy and fit. *British Journal of Cancer*, 89(4), 605–611. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601120>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol* 28: 25–30.
- Cao, G.-J., Jiang, X., Zhang, H., Zheng, J., Croley, T. R., & Yin, J.-J. (2017). Exploring the activities of ruthenium nanomaterials as reactive oxygen species scavengers. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 35(4), 223–238. <https://doi.org/10.1080/10590501.2017.1391516>
- Chan, G. C.-F., Chan, W. K., & Sze, D. M.-Y. (2009). The effects of β -glucan on human

- immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 2(1), 25.
<https://doi.org/10.1186/1756-8722-2-25>
- Chen, B.-J., Shi, M.-J., Cui, S., Hao, S.-X., Hider, R. C., & Zhou, T. (2016). Improved antioxidant and anti-tyrosinase activity of polysaccharide from *Sargassum fusiforme* by degradation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 715–722.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.082>
- Chen, Y., Xie, M., Li, W., Zhang, H., Nie, S., Wang, Y., & Li, C. (2012). An effective method for deproteinization of bioactive polysaccharides extracted from lingzhi (*Ganoderma atrum*). *Food Science and Biotechnology*, 21(1), 191–198.
<https://doi.org/10.1007/s10068-012-0024-2>
- Choong, Y. K., Sun, S.-Q., Zhou, Q., Ismail, Z., Rashid, B. A. A., & Tao, J.-X. (2011). Determination of storage stability of the crude extracts of *Ganoderma lucidum* using FTIR and 2D-IR spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, S0924203111000774.
<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2011.05.008>
- Chopin, T., Kerin, B. F., & Mazerolle, R. (1999). Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Phycological Research*, 47(3), 167–188. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.1999.tb00297.x>
- Coscia, L., Armenti, D., King, R., Sifontis, N., Constantinescu, S., & Moritz, M. (2015). Update on the Teratogenicity of Maternal Mycophenolate Mofetil. *Journal of Pediatric Genetics*, 04(02), 042–055. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1556743>
- Dhahri, M., Alghrably, M., Mohammed, H. A., Badshah, S. L., Noreen, N., Mouffouk, F., Rayyan, S., Qureshi, K. A., Mahmood, D., Lachowicz, J. I., Jaremko, M., & Emwas, A.-H. (2021). Natural Polysaccharides as Preventive and Therapeutic Horizon for Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceutics*, 14(1), 1.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010001>

- Ferreira, I.C.F.R., Vaz, J.A., Vasconcelos, M.H., Martins, A., 2010. Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-cancer Agents Med. Chem.* 10, 424–436.
- Gargano, M. L., van Griensven, L. J. L. D., Isikhuemhen, O. S., Lindequist, U., Venturella, G., Wasser, S. P., & Zervakis, G. I. (2017). Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 151(3), 548–565. <https://doi.org/10.1080/11263504.2017.1301590>
- Geun Goo, B., Baek, G., Jin Choi, D., Il Park, Y., Synytsya, A., Bleha, R., Ho Seong, D., Lee, C.-G., & Kweon Park, J. (2013). Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, 129, 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.077>
- Gong, Z. J., De Meyer, S., Clarysse, C., Verslype, C., Neyts, J., De Clercq, E., & Yap, S. H. (1999). Mycophenolic acid, an immunosuppressive agent, inhibits HBV replication in vitro. *Journal of Viral Hepatitis*, 6(3), 229–236. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.1999.00163.x>
- González-Ramírez, M., Gavilán, J., Silva-Grecchi, T., Cajas-Madriaga, D., Triviño, S., Becerra, J., Saez-Orellana, F., Pérez, C., & Fuentealba, J. (2018). A Natural Benzofuran from the Patagonic *Aleurodiscus vitellinus* Fungus has Potent Neuroprotective Properties on a Cellular Model of Amyloid- β Peptide Toxicity. *Journal of Alzheimer's Disease*, 61(4), 1463–1475. <https://doi.org/10.3233/JAD-170958>
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*, 297(5580), 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>
- He, M.-Q., Zhao, R.-L., Liu, D.-M., Denchev, T. T., Begerow, D., Yurkov, A., Kemler,

- M., Millanes, A. M., Wedin, M., McTaggart, A. R., Shivas, R. G., Buyck, B., Chen, J., Vizzini, A., Papp, V., Zmitrovich, I. V., Davoodian, N., & Hyde, K. D. (2022). Species diversity of Basidiomycota. *Fungal Diversity*, 114(1), 281–325. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00497-3>
- Homayouni-Tabrizi, M., Asoodeh, A., & Soltani, M. (2017). Cytotoxic and antioxidant capacity of camel milk peptides: Effects of isolated peptide on superoxide dismutase and catalase gene expression. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.014>
- Hyde, K. D., Xu, J., Rapior, S., Jeewon, R., Lumyong, S., Niego, A. G. T., Abeywickrama, P. D., Aluthmuhandiram, J. V. S., Brahamanage, R. S., Brooks, S., Chaiyasen, A., Chethana, K. W. T., Chomnunti, P., Chepkirui, C., Chuankid, B., de Silva, N. I., Doilom, M., Faulds, C., Gentekaki, E., ... Stadler, M. (2019). The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, 97(1), 1–136. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00430-9>
- Imbs, T. I., Skriptsova, A. V., & Zvyagintseva, T. N. (2015). Antioxidant activity of fucose-containing sulfated polysaccharides obtained from *Fucus evanescens* by different extraction methods. *Journal of Applied Phycology*, 27(1), 545–553. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0293-7>
- Javed, S., Payne, G. W., & Lee, C. H. (2016, August). *Ganoderma applanatum* potential target for stimulating macrophages in immunosuppressive breast cancer microenvironment. In *Breast Cancer Research and Treatment* (Vol. 159, No. 1, pp. 181-181). 233 SPRING ST, NEW YORK, NY 10013 USA: SPRINGER.
- Jia, J., Zhang, X., Hu, Y.-S., Wu, Y., Wang, Q.-Z., Li, N.-N., ... Dong, X.-C. (2009). Evaluation of in vivo antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in STZ-diabetic rats. *Food Chemistry*, 115(1), 32–36. doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.043

- Kothari, D., Patel, S., & Kim, S.-K. (2018). Anticancer and other therapeutic relevance of mushroom polysaccharides: A holistic appraisal. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 377–394. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.138>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.02.004>
- Lee, I.-H., Huang, R.-L., Chen, C.-T., Chen, H.-C., Hsu, W.-C., & Lu, M.-K. (2002). Antrodia camphorata polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. *FEMS Microbiology Letters*, 209(1), 63–67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11110.x>
- Leonard Katz, Richard H Baltz, Natural product discovery: past, present, and future, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Volume 43, Issue 2-3, 1 March 2016, Pages 155–176, <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>
- Lemieszek, M., & Rzeski, W. (2012). Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. *Współczesna Onkologia*, 4, 285–289. <https://doi.org/10.5114/wo.2012.30055>
- Leung, M. Y. K., Liu, C., Koon, J. C. M., & Fung, K. P. (2006). Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology Letters*, 105(2), 101–114. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.01.009>
- Li, W.-J., Nie, S.-P., Xie, M.-Y., Yu, Q., Chen, Y., & He, M. (2011). *Ganoderma atrum* polysaccharide attenuates oxidative stress induced by d-galactose in mouse brain. *Life Sciences*, 88(15–16), 713–718. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.02.010>
- Liu, F., Zhao, W., Zhao, F., Dong, Q., Wang, Y., Wei, W., Jia, L., Li, L., & Lu, F. (2020).

- Dual Effect of the Acidic Polysaccharose Ulvan on the Inhibition of Amyloid- β Protein Fibrillation and Disintegration of Mature Fibrils. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(37), 41167–41176. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c14292>
- Ma, L., Chen, H., Dong, P., & Lu, X. (2013). Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Chemistry*, 139(1–4), 503–508. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.030>
- Ma, L., Zhao, H., Xia, Q., Cai, L., & Fu, P. P. (2015). Synthesis and phototoxicity of isomeric 7,9-diglutathione pyrrole adducts: Formation of reactive oxygen species and induction of lipid peroxidation. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(3), 577–586. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.06.001>
- Maeda, S., & Omata, M. (2008). Inflammation and cancer: Role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Science*, 99(5), 836–842. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00763.x>
- Mahajna, J. A., Yassin, M., & Wasser, S. P. (2007). U.S. Patent No. 7,258,862. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Marx, J. L. (1987). Oxygen Free Radicals Linked to Many Diseases: The oxygen free radicals, although made as by-products of normal oxygen-using reactions, nevertheless have a wide potential for causing cell injury. *Science*, 235(4788), 529–531. <https://doi.org/10.1126/science.3810154>
- Matsuhiro, B. (1996). Vibrational spectroscopy of seaweed galactans. In S. C. Lindstrom & D. J. Chapman (Eds.), *Fifteenth International Seaweed Symposium* (pp. 481–489). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1659-3_69
- Matsuhiro, B., & Rivas, P. (1993). Second-derivative Fourier transform infrared spectra of seaweed galactans. *Journal of Applied Phycology*, 5(1), 45–51. <https://doi.org/10.1007/BF02182421>
- Mau, J.-L., Chang, C.-N., Huang, S.-J., & Chen, C.-C. (2004). Antioxidant properties of

- methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chemistry*, 87(1), 111–118.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.026>
- Mazanetz, M. P., & Fischer, P. M. (2007). Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(6), 464–479. <https://doi.org/10.1038/nrd2111>
- Mizuno, T. (1996). Development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. *Foods Food Ingred J Jpn*, 167, 69-85.
- Mizuno, T. (1999). The Extraction and Development of Antitumor-Active Polysaccharides from Medicinal Mushrooms in Japan (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1(1), 9–29. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v1.i1.20>
- Núñez, M., & Ryvarden, L. (1997). The genus' *Aleurodiscus* ('Basidiomycotina'). *Fungiflora*.
- Papas, A. M. (Ed.). (2019). *Antioxidant status, diet, nutrition, and health*. CRC press.
- Phookamsak, R., Hyde, K. D., Jeewon, R., Bhat, D. J., Jones, E. B. G., Maharachchikumbura, S. S. N., Raspé, O., Karunarathna, S. C., Wanasinghe, D. N., Hongsanan, S., Doilom, M., Tennakoon, D. S., Machado, A. R., Firmino, A. L., Ghosh, A., Karunarathna, A., Mešić, A., Dutta, A. K., Thongbai, B., ... Xu, J. (2019). Fungal diversity notes 929–1035: Taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungi. *Fungal Diversity*, 95(1), 1–273.
<https://doi.org/10.1007/s13225-019-00421-w>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Rajchenberg, M., Pildain, M. B., Madriaga, D. C., de Errasti, A., Riquelme, C., & Becerra, J. (2019). New Poroid Hymenochaetaceae (Basidiomycota, Hymenochaetales) from

Chile. *Mycological Progress*, 18(6), 865–877. <https://doi.org/10.1007/s11557-019-01495-1>

- 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(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rodríguez Aguirre, O. E., Andrade Barreiro, W. A., Andrade Barreiro, W. A., Diaz Lopez, F. E., & Diaz Lopez, F. E. (2016). Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L. (Papaveraceae). *Revista de Tecnología*, 14(2). <https://doi.org/10.18270/rt.v14i2.1868>
- Rodriguez-Jasso, R. M., Mussatto, S. I., Pastrana, L., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2011). Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), 1137–1144. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.006>
- S., W. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 258–274. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1076-7>
- Shao, L., Wu, Z., Zhang, H., Chen, W., Ai, L., & Guo, B. (2014). Partial characterization and immunostimulatory activity of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* KF5. *Carbohydrate Polymers*, 107, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.037>
- Singara Charya, M. A. (2015). Fungi: An Overview. In B. Bahadur, M. Venkat Rajam, L. Sahijram, & K. V. Krishnamurthy (Eds.), *Plant Biology and Biotechnology* (pp. 197–215). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_7
- Smiderle, F. R., Baggio, C. H., Borato, D. G., Santana-Filho, A. P., Sasaki, G. L., Iacomini, M., & Van Griensven, L. J. L. D. (2014). Anti-Inflammatory Properties of

the Medicinal Mushroom *Cordyceps militaris* Might Be Related to Its Linear (1→3)-
β-D-Glucan. PLoS ONE, 9(10), e110266.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110266>

Spiteller, P. (2008). Chemical Defence Strategies of Higher Fungi. *Chemistry - A European Journal*, 14(30), 9100–9110. <https://doi.org/10.1002/chem.200800292>

Tangsadthakun, C., Kanokpanont, S., Sanchavanakit, N., Pichyangkura, R., Banaprasert, T., Tabata, Y., & Damrongsakkul, S. (2007). The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18(2), 147–163. <https://doi.org/10.1163/156856207779116694>

Troncoso Valenzuela, Marcos Antonio. (2014). Caracterización de los polisacáridos presentes en *Nothogenia fastigiata* (Bory de Saint-Vincent) P.G. Parkinson: Actividad Biológica y Aspectos fisiológicos [Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias mención Botánica, Universidad de Concepción] <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/1833>

Ubaidillah, N. H. N., Abdullah, N., & Sabaratnam, V. (2015). Isolation of the intracellular and extracellular polysaccharides of *Ganoderma neojaponicum* (Imazeki) and characterization of their immunomodulatory properties. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(3), 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.03.006>

Wang, Z.M.; Peng, X.; Lee, K.L.D.; Tang, J.C.; Cheung, P.C.K.; Wu, J.Y. Structural characterization and immunomodulatory property of an acidic polysaccharide from mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus CsHK1. *Food Chem.* 2011, 125, 637-643.

Wang, C.-H., Hsieh, S.-C., Wang, H.-J., Chen, M.-L., Lin, B.-F., Chiang, B.-H., & Lu, T.-J. (2014). Concentration Variation and Molecular Characteristics of Soluble (1,3;1,6)-β-d -Glucans in Submerged Cultivation Products of *Ganoderma lucidum*

- Mycelium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(3), 634–641.
<https://doi.org/10.1021/jf404533b>
- Wang, C.-Y. (2020). A Review on the Potential Reuse of Functional Polysaccharides Extracted from the By-Products of Mushroom Processing. *Food and Bioprocess Technology*, 13(2), 217–228. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02403-2>
- Wu, S.-J., Chen, Y.-W., Wang, C.-Y., & Shyu, Y.-T. (2017). Anti-inflammatory properties of high pressure-assisted extracts of *Grifola frondosa* in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(3), 671–678. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13320>
- Wu, Y.-S., Ho, S.-Y., Nan, F.-H., & Chen, S.-N. (2016). *Ganoderma lucidum* beta 1,3/1,6 glucan as an immunomodulator in inflammation induced by a high-cholesterol diet. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 500. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1476-3>
- Xu, J., Yi, M., Ding, L., & He, S. (2019). A Review of Anti-Inflammatory Compounds from Marine Fungi, 2000–2018. *Marine Drugs*, 17(11), 636. <https://doi.org/10.3390/md17110636>
- Yan, J.-K., Wang, Y.-Y., Wang, Z.-B., Ma, H.-L., Pei, J.-J., & Wu, J.-Y. (2016). Structure and antioxidative property of a polysaccharide from an ammonium oxalate extract of *Phellinus linteus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.063>
- Yan, Y., Zhang, H., Nie, S. P., Chen, Y., Chen, J., & Xie, M. (2009). Physico-chemical characteristics and antioxidant activity of polysaccharide from *Ganoderma atrum* fruitbody. *Food Sci*, 30(19), 55-60.
- Yang, J., Du, Y., Huang, R., Sun, L., Liu, H., Gao, X., & Kennedy, J. F. (2005). Chemical modification and antitumour activity of Chinese lacquer polysaccharide from lac tree *Rhus vernicifera*. *Carbohydrate Polymers*, 59(1), 101–107.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.09.004>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2003.10.022>
- You, Q., Yin, X., Zhang, S., & Jiang, Z. (2014). Extraction, purification, and antioxidant activities of polysaccharides from *Tricholoma mongolicum* Imai. *Carbohydrate Polymers*, 99, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.088>
- Zhang, F., Huang, Q., Yan, J., Zhang, X., & Li, J. (2015). Assessment of the Effect of Trichostatin A on HeLa Cells through FT-IR Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 87(4), 2511–2517. <https://doi.org/10.1021/ac504691q>
- Zhang, J.-J., Li, Y., Zhou, T., Xu, D.-P., Zhang, P., Li, S., & Li, H.-B. (2016). Bioactivities and Health Benefits of Mushrooms Mainly from China. *Molecules*, 21(7), 938. <https://doi.org/10.3390/molecules21070938>
- Zhang, M., Cheung, P. C.-K., Chiu, L. C.-M., Wong, E. Y.-L., & Ooi, V. E.-C. (2006). Cell-cycle arrest and apoptosis induction in human breast carcinoma MCF-7 cells by carboxymethylated β -glucan from the mushroom sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. *Carbohydrate Polymers*, 66(4), 455–462. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.03.031>
- Zhang, Y., Lu, X., Fu, Z., Wang, Z., & Zhang, J. (2011). Sulphated modification of a polysaccharide obtained from fresh persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit and antioxidant activities of the sulphated derivatives. *Food Chemistry*, 127(3), 1084–1090. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.100>
- Zhao, H., Zhang, M., Liu, Q., Wang, X., Zhao, R., Geng, Y., Wong, T., Li, S., & Wang, X. (2018). A comprehensive screening shows that ergothioneine is the most abundant antioxidant in the wild macrofungus *Phylloporia ribis* Ryvarden. *Journal*

of Environmental Science and Health, Part C, 36(2), 98–111.
<https://doi.org/10.1080/10590501.2018.1450201>