



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
BIOLOGÍA

**Evaluación de la actividad antioxidante de polisacáridos
y extracto total provenientes de cultivos *in vitro* de
*Ganoderma australe***

Tesis para optar al grado de Biólogo

NAOMI LISSETTE IVANIA FERNÁNDEZ ALARCÓN
CONCEPCIÓN-CHILE
2021

Profesor Guía: Dra. Claudia Pérez Manríquez
Profesor Co-Guía: Dr. Fabián Figueroa
Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

© 2021 Naomi Lissette Ivania Fernández Alarcón

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

La tesis de pregrado titulada “Evaluación de la actividad antioxidante de polisacáridos y extracto total provenientes de cultivos *in vitro* de *Ganoderma australe*” de la

Srta. Naomi Lissette Ivania Fernández Alarcón realizada en la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción ha sido aprobada por la siguiente Comisión Evaluadora:

Dra. Claudia Pérez

Profesor guía

Departamento de Botánica

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

de la Universidad de Concepción

Dr. Fabián Figueroa

Profesor co-guía

Departamento de Botánica

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

de la Universidad de Concepción

Dr. José Becerra

Miembro de la comisión evaluadora

Departamento de Botánica

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

de la Universidad de Concepción

Dr. Götz Palfner

Miembro de la comisión evaluadora

Departamento de Botánica

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

de la Universidad de Concepción



Agradecimientos

Quiero agradecer a la luz que ha guiado mis pasos siempre, aquella divinidad que se me inculcó desde pequeña, pero que con el paso de los años comprendí, el inmenso amor que tiene hacia mí. A mi madre por siempre creer en mí, impulsarme a ser mejor, por llenarme de su bondadoso amor. A mi hermano, por ser un gran ejemplo en mi vida, por inspirarme. A mi hermana y mis sobrinos, por distraerme con sus locuras, risas y juegos cuando me sentía estresada o triste, por alegrarme los días. A los amigos, la familia que se escoge, por crecer conmigo, apoyarme, escucharme, comprenderme. Sin ellos el camino hubiese sido mucho más difícil. También quiero agradecer a mi profesora guía Dr. Claudia Pérez, por su amabilidad, conocimiento, disposición, por siempre estar presente cuando la solicitaba. Al Dr. José Becerra, por su conocimiento y simpatía. Al tremendo equipo que forma el Laboratorio de Química de Productos Naturales, empezando por Cristian, por apoyarme en las primeras y decidoras etapas de mi tesis. A la Dra. Solange por entregarme sus conocimientos, simpatía y paciencia. A Dr. Fabián, por apoyarme siempre con simpatía y buena disposición, entregándome herramientas muy importantes para mi formación como bióloga. Al Dr. Götz Palfner, por inspirarme en aprender más sobre el reino Fungi. Y finalmente, al proyecto FONDECYT regular 1190652 por cooperar con financiamiento.

| | |
|-----------------------------|------|
| ÍNDICE GENERAL | |
| ÍNDICE DE FIGURAS | v |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | vi |
| RESUMEN | vii |
| ABSTRACT | viii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| H ₁ | 10 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 10 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 10 |
| MATERIALES Y MÉTODO..... | 11 |
| RESULTADOS | 18 |
| CONCLUSIONES..... | 34 |
| BIBLIOGRAFÍA | 35 |
| ANEXO..... | 45 |
| ABREVIATURAS..... | 46 |



ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Espécimen de <i>Ganoderma australe</i> sobre <i>Nothofagus obliqua</i> . La barra blanca mide 15 cm. Fuente: Fungachilena. Gentileza Cristian Riquelme. | 8 |
| Figura 2. Procedimiento utilizado para cultivos <i>in vitro</i> de <i>G. australe</i> . Fuente: Elaboración propia. | 13 |
| Figura 3. Espectro infrarrojo (FTIR) de polisacáridos aislados de micelio de <i>Ganoderma australe</i> | 19 |
| Figura 4. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical DPPH de polisacáridos v/s Trolox. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido por test de Tukey ($p < 0.05$). Las barras representan la media (\pm DE) de tres réplicas por tratamiento. Las barras de error no mostradas son más pequeñas que los símbolos. Fuente: Elaboración propia en SigmaPlot versión 11.0 | 20 |
| Figura 5. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical DPPH de extracto total v/s Trolox. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido por test de Tukey ($p < 0.05$). Las barras representan la media (\pm DE) de tres réplicas por tratamiento. Las barras de error no mostradas son más pequeñas que los símbolos. Fuente: Elaboración propia en SigmaPlot versión 11.0. | 21 |
| Figura 6. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical DPPH de extracto total v/s polisacárido. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido por test de Tukey ($p < 0.05$). Las barras representan la media (\pm DE) de tres réplicas por tratamiento. Las barras de error no mostradas son más pequeñas que los símbolos. Fuente: Elaboración propia en SigmaPlot versión 11.0. | 23 |
| Figura 7. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS•+ de polisacáridos v/s Trolox. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido por test de Tukey ($p < 0.05$). Las barras representan la media (\pm DE) de tres réplicas por tratamiento. Las barras de error no mostradas son más pequeñas que los símbolos. Fuente: Elaboración propia en SigmaPlot versión 11.0. | 24 |
| Figura 8. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS•+ de extracto total v/s Trolox. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido por test de Tukey ($p < 0.05$). Las barras representan la media (\pm DE) de tres réplicas por tratamiento. Las barras de error no mostradas son más pequeñas que los símbolos. Fuente: Elaboración propia en SigmaPlot versión 11.0. | 26 |
| Figura 9. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS•+ de extracto total v/s polisacáridos. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido por test de Tukey ($p < 0.05$). Las barras representan la media (\pm DE) de tres replicas por tratamiento. Las barras de error no mostradas son más pequeñas que los símbolos. Fuente: Elaboración propia en SigmaPlot versión 11.0. | 27 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|---|
| Tabla 1. Taxonomía de <i>Ganoderma australe</i> . Fuente: (Ryvarden y Johansen 1981)..... | 9 |
|--|---|



RESUMEN

El género *Ganoderma* se caracteriza por contener numerosos metabolitos de interés con propiedades principalmente antiinflamatorias, antioxidantes e inmunomoduladoras. Estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que las propiedades de *Ganoderma* podrían atribuirse a sus efectos antioxidantes por eliminación o neutralización de radicales libres y a la mejora de la función inmunológica, facilitando la actividad fagocítica de los macrófagos. Por tanto, de acuerdo a los antecedentes del género, este tipo de hongo biosintetiza compuestos activos como polisacáridos, terpenos y fenoles con función antioxidante. En Chile un representante del género es la especie *Ganoderma australe*, de la cual existe escasa información relacionada con sus propiedades terapéuticas. En consecuencia, el presente estudio tiene como objetivo, evaluar la actividad antioxidante de polisacáridos y del extracto total provenientes del cultivo *in vitro* de *G. australe*, mediante el ensayo DPPH y ABTS•+. Para tal efecto, se caracterizó estructuralmente el polisacárido mediante espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Los resultados demostraron enlaces típicos descritos para polisacáridos de *Ganoderma*, evidenciando enlaces de tipo β -glucano. Los resultados indican que el extracto total del medio de cultivo de *G. australe* presentó actividad antioxidante significativa en las distintas concentraciones. La mejor respuesta obtenida fue por el método ABTS•+ con un porcentaje de inhibición del 55% a la concentración (10 mg/mL). Junto con esto, se evidenció que el extracto total del medio de cultivo contiene un alto contenido de fenoles totales (23,418 mg EAG), esto se asocia a su capacidad antioxidante. Por otra parte, la actividad antioxidante de los polisacáridos fue significativa en las distintas concentraciones. Sin embargo, los porcentajes de inhibición no superan el 13%. Esto se debe al tipo de ensayo antioxidante empleado y las bajas concentraciones utilizadas. En conclusión, se sugiere que tanto los polisacáridos y el extracto total del medio de cultivo presentan una actividad antioxidante significativa mediante la neutralización de radicales. En consecuencia, futuros estudios deben ir orientados en dilucidar la constitución monomérica de los polisacáridos y los compuestos específicos que actúan en la actividad antioxidante del extracto total. Finalmente, los cultivos miceliales provenientes de *G. australe*, pueden ser utilizados como una alternativa biotecnológica con fines medicinales con propiedades antioxidantes.

ABSTRACT

The genus *Ganoderma* is characterized by containing many metabolites of interest with mainly anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory properties. In vitro and in vivo studies suggest that the properties of *Ganoderma* could be attributed to its antioxidant effects by eliminating or neutralizing free radicals and to the improvement of immune function, facilitating the phagocytic activity of macrophages. Therefore, according to the antecedents of the genus, this type of fungus biosynthesizes active compounds such as polysaccharides, terpenes and phenols with antioxidant function. In Chile, a representative of the genus is the species *Ganoderma australe*, of which there is little information related to its therapeutic properties. Consequently, the present study aims to evaluate the antioxidant activity of polysaccharides and of the total extract from the in vitro culture of *G. australe*, by means of the DPPH and ABTS•+ assay. For this purpose, the polysaccharide was structurally characterized by Fourier transform infrared spectrometry (FTIR). The results demonstrated typical bonds described for *Ganoderma* polysaccharides, evidencing β -glucan type bonds. The results indicate that the total extract of the *G. australe* culture medium presented significant antioxidant activity at the different concentrations. The best response obtained was by the ABTS • + method with an inhibition percentage of 55% at the concentration (10 mg/mL). Along with this, it was shown that the total extract of the culture medium contains a high content of total phenols (23.418 mg EAG), this is associated with its antioxidant capacity. On the other hand, the antioxidant activity of the polysaccharides was significant in the different concentrations. However, the inhibition percentages do not exceed 13%. This is due to the type of antioxidant assay used and the low concentrations used. In conclusion, it is suggested that both the polysaccharides and the total extract from the culture medium have significant antioxidant activity through radical neutralization. Consequently, future studies should be oriented towards elucidating the monomeric constitution of the polysaccharides and the specific compounds that act on the antioxidant activity of the total extract. Finally, mycelial cultures from *G. australe* can be used as a biotechnological alternative for medicinal purposes with antioxidant properties.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la ingesta de hongos con fines nutricionales y medicinales, ha sido utilizada por culturas antiguas que incluían en su dieta los hongos, como un beneficio a la salud humana. En este sentido, en las últimas décadas estudios han demostrado que los hongos presentan diversas propiedades benéficas, de las cuales se destacan principalmente por ser antioxidantes, antiinflamatorios e inmunomoduladores (Wasser *et al.* 2000; Mau *et al.* 2002). Esto ha permitido la aplicación de hongos con fines industriales, biotecnológicos, nutricionales, terapéuticos o medicinales (Hyde *et al.* 2019).

Uno de los grupos de mayor interés medicinal, son los hongos del orden Polyporales, que corresponde a un grupo diverso de Agaricomycetes que incluye doce familias, 437 géneros y aproximadamente 1800 especies descritas (Kirk *et al.* 2008). Son macrohongos xilófagos de hábito solitario o gregario, la mayoría de estos hongos crecen sobre árboles y pueden persistir en el ambiente por meses e incluso años (Buchanan 2001). Son organismos clave en el ciclo del carbono, produciendo pudrición blanca y café. Los miembros de este grupo se encuentran entre los degradadores de lignina más eficientes de la biosfera. La gran mayoría de los Polyporales son hongos saprótrofos de la descomposición de la madera, mientras que algunos son parásitos de árboles (Floudas *et al.* 2012). Dentro de este gran orden, encontramos el género *Ganoderma* (P. Karst), descrito por Karsten (1881), con más de 300 especies reportadas en todo el mundo (Bhosle *et al.* 2010). Habitan desde las selvas hasta los bosques templados del cono sur, estos hongos se caracterizan por presentar un sombrero coriáceo de forma semicircular o arriñonada

con tonos caoba a café oscuro. Se caracteriza por su himenóforo con tubos alargados que se ven como pequeños poros de color blanco (Tortella *et al.* 2008). El carpóforo es persistente y va aumentando su tamaño, aparecen en la base de troncos vivos o muertos. Dentro de las características micro morfológicas posee basidiósporas pequeñas (<10 µm) con papilas irregulares y truncadas (Buchanan 2001). Estos hongos son aquellos que producen pudrición blanca, capaces de descomponer tanto la lignina como los compuestos celulósicos. Se alimentan de la biomasa vegetal lignocelulósica, que se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina presente en la pared celular de la célula vegetal, la síntesis de estas moléculas deja restos blancos en la madera atacada, la cual presenta una textura fibrosa y con poca densidad (Eastwood *et al.* 2011). Las especies de podredumbre blanca permiten que el carbono presente en la lignina se incorpore en forma de CO₂ a la atmosfera, participando así, en el desarrollo de los procesos biogeoquímicos y sirviendo como sustrato para otros organismos (Binder *et al.* 2013). Por otra parte, se han descrito variados compuestos químicos o metabolitos bioactivos provenientes de los hongos del género *Ganoderma*. Lo que ha permitido que sean candidatos principales para diferentes aplicaciones industriales, producción de biocombustibles, biorremediación y productos nutracéuticos y/o medicinales (Ayala *et al.* 2016; Wang & Ng 2006; Han *et al.* 2005; Agosín *et al.* 1990).

Metabolitos bioactivos de hongos Polyporales y aplicaciones

Los hongos del orden Polyporales se han caracterizado por contener numerosos componentes activos. Dentro de los más estudiados encontramos: proteínas, oligoelementos, polisacáridos, compuestos fenólicos y triterpenoides. Se destacan

por tener diferentes actividades biológicas y fisiológicas (Hyde *et al.* 2019). Dentro de las propiedades descritas se ha reportado como antioxidantes, inmunoestimulantes, antitumoral, hepatoprotectora, hipoglucemiante, hipocolesterolemia, entre otras (Batra *et al.* 2013). Entre la diversidad de especies del orden Polyporales, *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, ha sido la especie más estudiada y se ha utilizado durante mucho tiempo en la medicina tradicional China para prevenir y tratar diversas enfermedades humanas como la bronquitis, hepatitis, hipertensión, enfermedades tumorales y trastornos inmunológicos (Cheng *et al.* 2013; Weng & Yen 2010; Hang *et al.* 2005). En este sentido, estudios realizados por Dudhgaonkar *et al.* (2009), evidenciaron que el extracto de triterpenos provenientes de *Ganoderma lucidum*, suprimió significativamente la secreción de citoquinas inflamatorias (Dudhgaonkar *et al.* 2009). Esto ha provocado que sean potenciales para ser usados como materia prima de nutraceuticos y fármacos (Hyde *et al.* 2019).

Polisacáridos bioactivos y sus propiedades terapéuticas

Entre todos los compuestos bioactivos presentes en las células biológicas, los polisacáridos son los más abundantes y biológicamente activos. Están presentes en la célula, principalmente en la pared celular, podemos encontrarlos en la forma de heteropolisacáridos, homopolisacáridos y formando glicoproteínas (Portón 2008). Estas moléculas poseen plasticidad biológica relacionada con su composición química y el grado de sulfatación (Figuroa *et al.* 2019; Patel 2012). Se postula que estos biopolímeros interactúan con enzimas y receptores de la superficie celular, lo que resulta en diversas actividades biológicas (Smelcerovic *et al.* 2008). Se ha

reportado que desempeñan funciones cruciales en una variedad de procesos biológicos, como la interacción celular, el desarrollo embrionario, infecciones por bacterias, virus y la modulación del sistema inmune (Liu *et al.* 2015). Debido a las amplias actividades biológicas y las bajas toxicidades asociadas con los polisacáridos, estos biopolímeros han llamado la atención de la comunidad nutracéutica, química y biológica, donde se ha reportado que poseen actividad antioxidante, inmunomoduladora, antiinflamatoria y antitumoral, ya que son capaces de activar mecanismos de inmunidad natural y específica (Shao & Sun 2013; Lai *et al.* 2010).

La gran ventaja de estos productos con respecto a otras drogas antitumorales sintéticas es su inocuidad, siendo medicamentos antitumorales seguros, con mínimos efectos secundarios, ya que básicamente son azúcares de origen natural presentes en todas las células biológicas (Daba & Ezeronye 2003).

Polisacáridos bioactivos de *Ganoderma*

En los últimos años, los polisacáridos del género *Ganoderma*, han generado interés por su potencial actividad terapéutica medicinal. Estos metabolitos primarios, han sido estudiados en diversas investigaciones, donde se han probado sus efectos sobre el sistema inmune, propiedades antioxidantes y antitumorales (Lai *et al.* 2010; Sliva *et al.* 2003). Además, es importante destacar que estos polímeros pueden aislarse de cuerpos fructíferos, micelio y medios de cultivo líquido (Lagarda *et al.* 2015). Los polisacáridos más estudiados del género *Ganoderma* por presentar bioactividad son los glucanos. Son un tipo de fibra soluble que se le atribuyen efectos beneficiosos sobre la glicemia, los niveles de insulinemia, el colesterol y la

inmunidad. Asimismo, sus propiedades parecen estar relacionadas con su peso molecular y estructura química (Volman *et al.* 2010). Existen dos tipos, los α -glucanos, son el grupo de polisacáridos que se forman a partir de D-glucosas unidas entre sí por medio de enlaces glucosídicos. Se reporta que intervienen en el proceso de metabolización de los azúcares, controlando la absorción de azúcares presentes en la dieta. (Wagner *et al.* 2008). Por su parte, los β -glucanos son principalmente homopolisacáridos lineales de glucosa unidos a través de enlaces β -(1 \rightarrow 3) y β -(1 \rightarrow 4) y pueden presentar ramificaciones (Santos-Neves *et al.* 2008). También se pueden encontrar en forma de heteropolímeros o formando complejos con elementos de la célula como proteínas o polifenoles (Synytsya & Novak 2013). Son aquellos que tienen actividad inmunomoduladora mediante la inducción de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y de quimioquinas (Wagner *et al.* 2008). También se ha estudiado que poseen efecto hipoglucemiante y neuroprotector (Pandya *et al.* 2019). Polisacáridos aislados de *Ganoderma lucidum* han demostrado ser inhibidores del crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo* (Chen *et al.* 2004). Los extractos de *Ganoderma tsugae* son capaces de inhibir el crecimiento de células de cáncer colon *in vitro* (Hsu *et al.* 2008). Además, tienen el potencial de suprimir la motilidad celular, inhibiendo la proliferación de la célula cancerígena, induciendo apoptosis y suprimiendo la angiogénesis en células de cáncer de mama y próstata (Stanley *et al.* 2005; Hu *et al.* 2002). La extracción de polisacáridos bioactivos también se ha realizado en otras especies como *Ganoderma applanatum* y *Ganoderma capense*, mostrando resultados significativos en ensayos antitumorales *in vitro*, inhibiendo la proliferación de sarcoma subcutáneo (Yan *et al.* 2013; Sasaki *et al.* 1971).

Cultivos *in vitro* de *Ganoderma*

Cultivos líquidos de *Ganoderma*, han llamado la atención de los investigadores, técnicamente son fáciles de controlar y se obtiene producción de biomasa en poco tiempo (Lagarda *et al.* 2015). En consecuencia, este procedimiento provoca que el hongo cultivado *in vitro* exude numerosos metabolitos de interés (Goyal *et al.* 2016). Dentro de la diversidad de metabolitos presenten en estos hongos, se encuentran los polisacáridos, estos pueden ser obtenidos del cuerpo fructífero y de cultivos líquidos. Los intrapolisacáridos se encuentran principalmente en la pared celular fúngica y los exopolisacáridos son polisacáridos extracelulares liberados al medio de cultivo (Donot *et al.* 2012).

Por otra parte, también se han descrito otros metabolitos secundarios provenientes de cultivos líquidos de *Ganoderma* (Hyde *et al.* 2019). Dentro de la diversidad de metabolitos, los compuestos fenólicos han sido estudiados en ensayos antioxidantes (Islas-Santillán *et al.* 2017). Se ha reportado que poseen actividad antioxidante demostrada en ensayos principalmente *in vitro*, a partir de extractos acuosos y metanólicos. Un estudio de Mau *et al.* (2002) relaciona la cantidad de fenoles totales provenientes de extractos metanólicos de de *Ganoderma tsugae* y *Ganoderme lucidum* con una mayor actividad antioxidante mediante la capacidad de eliminación o neutralización de radicales libres (Mau *et al.* 2002).

Técnicas para la determinación de la actividad antioxidante

Se han descrito variadas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de metabolitos aislados de cuerpos fructíferos y de medio de cultivo de *Ganoderma*.

Las más utilizadas son las técnicas de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y ABTS•+ (ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico). Ambos ensayos se basan en la decoloración de sus radicales, estos cambios de coloración se monitorean mediante un espectrofotómetro. Pertenecen a ensayos basados en la transferencia de electrones que involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción y el antioxidante actúa como agente reductor (Aguirre *et al.* 2015). El radical DPPH es un radical libre de color violeta que puede obtenerse directamente sin una preparación previa y se absorbe en metanol a 517 nm. Se puede neutralizar por reducción directa a través de la transferencia de electrón (Deng *et al.* 2011). Mientras que en el ensayo del radical catiónico ABTS•+, tiene que ser generado tras una reacción con persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) y posee una coloración verde-azul. La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS. Presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm (Re *et al.* 1999). Islas-Santillán *et al.* 2017, evaluó la actividad antioxidante de extractos etanólicos de tres especies del género *Ganoderma*, mediante el ensayo del radical catiónico ABTS•+, los resultados indican que la actividad antioxidante se asocia a la presencia de fenoles, polisacáridos y esteroides (Islas-Santillán *et al.* 2017).

Un estudio de Chen *et al.* (2008), evaluó la actividad antioxidante de polisacáridos aislados de cuerpos fructíferos de *Ganoderma atrum*, mediante la técnica del radical DPPH, donde se reportó que los polisacáridos mostraron una notoria actividad de eliminación de radicales aniónicos (Chen *et al.* 2008).

***Ganoderma australe* (Fr.)**

En Chile, uno de los representantes del género *Ganoderma* es la especie nativa *Ganoderma australe* (Fr.), también conocida comúnmente como “Oreja de palo” (Tabla 1). Es un hongo leñoso y perenne (Buchanan 2001). Su morfología presenta un basidioma grande de 30-50 cm de diámetro x 15-20 cm aproximadamente (Figura 1). El píleo se aplana de adulto y es muy duro, presenta un corte vertical rojizo con líneas negruzcas y su sombrero es marrón-rojizo, con margen grueso redondeado y blanco. De himenio blanquecino, pequeños poros blanquecinos y tubos rojizos (Martínez *et al.* 1990). Respecto a sus caracteres micro morfológicos, sus esporas son de color marrón, forma ovoide, con ápice truncado, rodeadas por verrugas y desarrolla hifas blanquecinas (Ubillos 2002). Degrada madera de árboles vivos o muertos y la podemos encontrar todo el año, tanto en parques, jardines de zonas bajas y en bosque nativo-mixto de zonas más altas, frecuentemente en rincones en penumbra. Su distribución es amplia desde Chile central hasta el sur austral (Furci 2007).



Figura 1. Especimen de *Ganoderma australe* sobre *Nothofagus obliqua*. La barra blanca mide 15 cm. Fuente: Fungachilena. Gentileza Cristian Riquelme.

Existen pocos estudios taxonómicos que detallen a profundidad a la biología de *G. australe*, lo que ha provocado que su taxonomía no esté correctamente definida. Las primeras aproximaciones taxonómicas establecieron la separación entre *G. applanatum* y *G. australe*, ya que anteriormente se consideraba a *G. australe* como subespecie de *G. applanatum*, se analizó el porcentaje de ácidos grasos, especialmente el ácido linoleico, encontrando diferencias significativas entre las dos especies (Martínez *et al.* 1990; Steyaert, 1972, 1975). Sin embargo, no se reportan estudios recientes que contribuyan a la taxonomía de *G. australe*. Más bien, se han realizado estudios a nivel de género, los cuales han sido productivamente estudiados en el área farmacológica, donde la química nos dicta indicios taxonómicos (Wang *et al.* 2020).

Tabla 1. Taxonomía de *Ganoderma australe*. Fuente: (Ryvarden y Johansen 1981).

| | |
|-----------------|------------------------|
| Reino | Fungi |
| Filo | Basidiomycota |
| Clase | Agaricomycetes |
| Subclase | Aphyllorphoromycetidae |
| Orden | Polyporales |
| Familia | Ganodermataceae |
| Género | <i>Ganoderma</i> |
| Especie | <i>G. australe</i> |

Actualmente el estado taxonómico del género en Chile, sigue siendo poco definido. *Ganoderma* al contener numerosas especies y cosmopolitas, se ha reportado que

forman complejos de especies, las cuales aún no se encuentran correctamente delimitadas (Fryssouli *et al.* 2020; Moncalvo *et al.* 1995). La limitada información sobre la especie *G. australe*, permite explorar sus posibles propiedades bioactivas, que confirmen las propiedades atribuidas a este género. Dado los antecedentes del género *Ganoderma* y la presencia de compuestos activos con función antioxidante se plantea la siguiente pregunta: ¿Los polisacáridos aislados de micelio y el extracto total de *G. australe* revelarán actividad antioxidante?

H₁

- Los polisacáridos y el extracto total aislados de cultivos *in vitro* de *Ganoderma australe* presentan propiedades antioxidantes mediante la neutralización de radicales libres.



OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antioxidante de polisacáridos y extracto total aislados desde cultivos *in vitro* de *Ganoderma australe*.

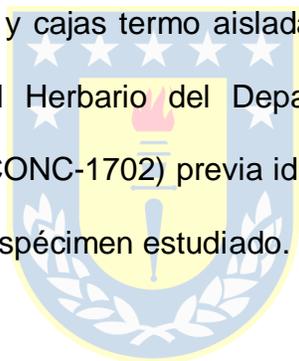
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar estructuralmente los polisacáridos aislados de *G. australe*.
- Determinar el contenido de compuestos fenólicos presentes en el medio de cultivo de *G. australe*.
- Comparar la actividad antioxidante de polisacáridos aislados de micelio de *G. australe* y extracto total aislado de su medio de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODO

Área de muestreo

Las muestras de esporas y carpóforos fueron colectadas en el Parque Nacional Cerro Castillo (46°03'00"S 72°11'00"O) a 64 kilómetros al sur de la ciudad de Coyhaique, Región de Aysén. La obtención del material de estudio se realizó mediante la recolección de la cantidad de cuerpos fructíferos necesarios para la viabilidad de su cultivo. Para el almacenamiento y transferencia del material desde el sitio de recolección hacia el Laboratorio de Química de Productos Naturales, se dispuso de papel de aluminio y cajas termo aisladas. El material recolectado fue secado y almacenado en el Herbario del Departamento de Botánica de la Universidad de Concepción (CONC-1702) previa identificación y registro completo de datos relacionados con el espécimen estudiado.



Reactivos y solventes

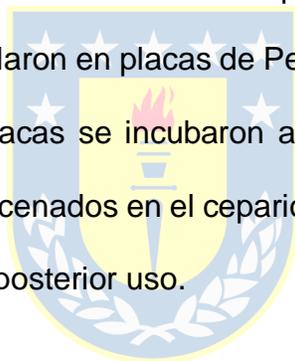
- Agua destilada (H₂O)
- Dimetilsulfóxido (CH₃SOCH₃), Merck. Germany
- Persulfato de Potasio (K₂S₂O₈) Merck. Germany
- Acetato de etilo (CH₃-COO-CH₂-CH₃) Merck. Germany
- Folin-Ciocalteu 20%, Merck. Germany
- Carbonato de sodio (Na₂CO₃) Merck. Germany
- Ácido gálico (C₇H₆O₅), Merck. Germany
- Etanol 96% (C₂H₆O), Merck. Germany
- Metanol 99% (CH₃OH), Merck. Germany
- Radicales: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y ABTS•+ (ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico).

Equipos de laboratorio

- Balanza analítica (Shimadzu, AUX220)
- Agitador orbital (Combi-Shaker, NB-101MT)
- Vortex (SeouLin, Korea)
- Ultrasonido (Machtig PS-30A, China)
- Estufa (Kottermann, Alemania)
- Bomba de vacío (Buchi V-100, Suiza)
- Rotaevaporador (Heidolph VV2000)
- Liofilizador (Cryodos, Telstar)
- Micropipetas
- Espectrofotómetro (Bio-Tek instrument, Inc; Winooski, United State)
- Centrífuga (Thermo Fisher, Alemania)

Cultivo *in vitro* de la cepa

Los cultivos miceliales puros se obtuvieron a partir de trozos de carpóforos recolectados, las cuales se aislaron en placas de Petri con Agar (70% de agarosa y 30% de agarpectina). Las placas se incubaron a 20° C (Figura 2). Los cultivos puros fueron replicados y almacenados en el cepario del Laboratorio de Química de Productos Naturales hasta su posterior uso.



Cultivo en medio líquido

Bajo condiciones estériles, cultivos en medio sólido fueron traspasados a cultivos en medio líquido YMG (0.4% de extracto de levadura, 1% de extracto de malta, 0.4% de glucosa) y agua destilada. Matraces de un litro fueron inoculados y se depositaron en un agitador orbital (Combi-Shaker, NB-101MT) por aproximadamente 14 días y a 16°C, con el fin de aumentar la biomasa fúngica. Posteriormente, el cultivo líquido es filtrado para separar el micelio del medio de cultivo. Desde el micelio se obtuvieron los polisacáridos y el medio de cultivo se reservó para separar el extracto total.

La muestra de micelio fue liofilizada (Lyophilizer Cryodos, Telstar) a una temperatura de (-55 C°) aproximadamente, durante dos días. Se obtuvo 20,5 gramos de peso seco de micelio (Figura 2).

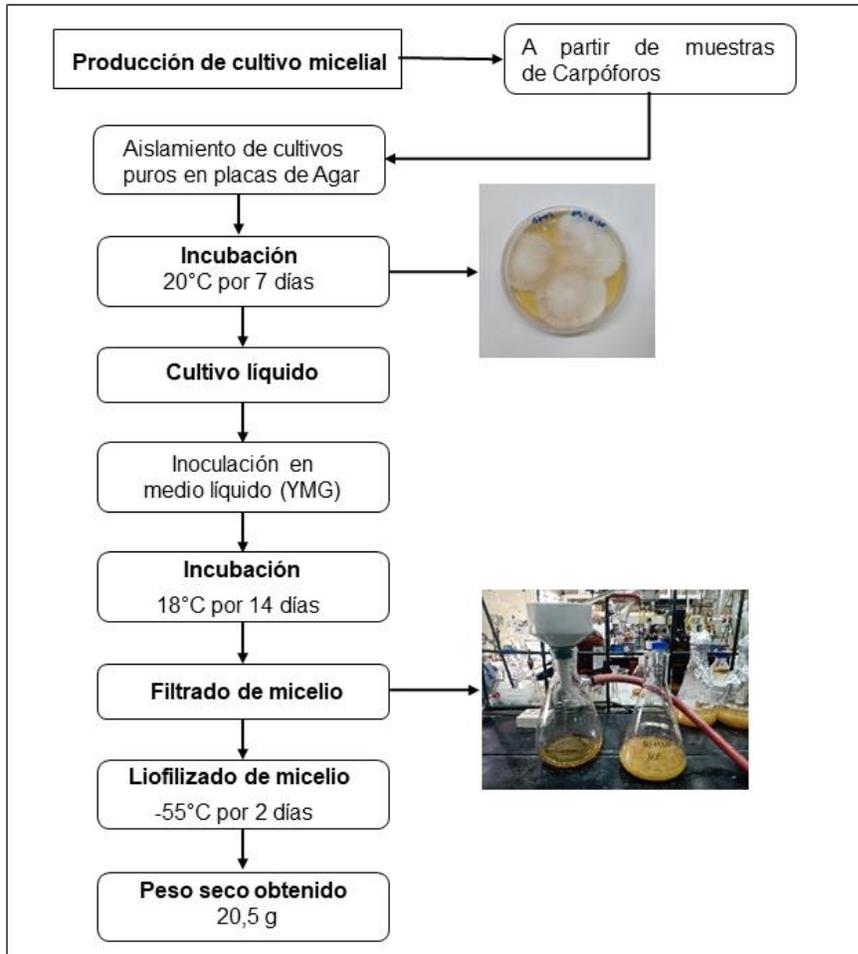


Figura 2. Procedimiento utilizado para cultivos *in vitro* de *G. australe*. Fuente: Elaboración propia.

Purificación de la muestra

El micelio fue depositado en un matraz que contenía etanol al 90% con la finalidad de despigmentar la muestra, se mantuvo a temperatura ambiente (18°C) por unos 15 min y luego se filtró, este proceso se realizó cuatro veces. Se precipitó la muestra en agua destilada, dejándola hervir por 1 hora, posteriormente la muestra se

centrifugó (4.000 x g, 5 min), el sobrenadante se descartó. Este proceso se realizó dos veces.

Extracción de polisacáridos

Se procedió a concentrar la muestra, haciendo uso de un rotavapor (Heidolph VV2000), a partir de 1.100 mL de muestra, este proceso redujo el volumen de la muestra a 300 mL. Luego se agregó 600 mL de etanol al 90% para precipitar los polisacáridos, se depositó en la congeladora por unos 30 min, para separar el etanol del precipitado, la muestra se centrifugó. Posteriormente, la muestra se depositó en una membrana de diálisis, a la cual se le agregó una solución salina de 2,1 M NaCl. Esta membrana se colocó en un vaso precipitado con 2 L de agua destilada, el principio de este proceso fue extraer el agua de la muestra por diferencia de potencial osmótico. Este proceso dura 12 horas aproximadamente, finalmente la muestra fue extraída desde la membrana y se volvió a precipitar con etanol al 90%. La muestra fue centrifugada y reservada en la congeladora (-15 °C) (Anexo 1). Los polisacáridos puros se liofilizaron (Lyophilizer Cryodos, Telstar), obteniendo una muestra pura y seca (Figura 2) (Abdala *et al.* 2010).

Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros infrarrojos se determinaron usando un FTIR. El análisis de los polisacáridos de *G. australe* se llevó a cabo generando discos de mm preparados con un polisacárido y bromuro de potasio (1% p / p) mezcla prensada a 15.0 t de presión hidrostática durante 5 min. Posteriormente, los discos se midieron con un

espectrofotómetro infrarrojo (Thermo Nicolet OMNIC) en el rango de frecuencia de 4000–500 cm^{-1} (Figuroa *et al.* 2019).

Extracción de metabolitos bioactivos del medio de cultivo

Se realizó una extracción líquido-líquido del medio de cultivo con acetato de etilo como solvente orgánico. El extracto total del medio de cultivo fue extraído con acetato de etilo (6 x 250 mL) para separar la fase orgánica (solvente) de la fase acuosa (cultivo), se utilizó un embudo de decantación. Se recupera la fase orgánica y se añade sulfato de sodio. Se obtuvo 3,5 L de fase orgánica. El extracto total fue concentrado a la sequedad en un rotavapor (Heidolph VV2000).

Evaluación antioxidante de polisacáridos y extracto total

Con el fin de determinar las propiedades antioxidantes de los polisacáridos y del extracto total provenientes del cultivo *in vitro* de *Ganoderma australe*, fueron realizados los ensayos DPPH y ABTS•+.

Ensayo de neutralización de radical (DPPH)

El ensayo se realizó de acuerdo a la metodología propuesta con modificaciones (Kozarski *et al.* 2011). El radical fue preparado en metanol a una concentración 6×10^5 M. Se prepararon diferentes concentraciones de polisacáridos (0,1- 4 mg/mL). La mezcla se agitó vigorosamente durante 30 seg en vortex (SeouLin, Korea). 180 μL de radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), fueron añadidos a cada pocillo 20 μL de las distintas concentraciones de la muestra Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2- ácido carboxílico), fue utilizado como control positivo.

Para la evaluación antioxidante del extracto total se masó 10 mg de extracto que fue diluido en 1 ml de metanol. Se utilizaron las concentraciones (0,1-10 mg/mL). Las microplacas se mantuvieron en oscuridad y a temperatura ambiente (18°C) durante 30 min. La absorbancia se determinó a los 515 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición (% Inh) usando la ecuación $\%=(AbsC-AbsM)/(AbsC)*100$, donde AbsC corresponde a absorbancia control y AbsM corresponde a absorbancia de la muestra.

Ensayo de decoloración del catión radical (ABTS•+)

El ensayo se realizó de acuerdo a la metodología propuesta con modificaciones (Kozarski *et al.* 2011). Se preparó el radical ABTS•+ (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico). Persulfato potásico (6,6 mg) fueron diluidos en 20 mL de agua destilada. Luego 38,8 mg de radical ABTS se diluyó en 20 mL de agua destilada. Se transfirió el contenido de persulfato de potasio al recipiente que contenía el radical. Para así, formar los cationes radicales de ABTS•+, a partir de la reacción que produce el oxidante persulfato de potasio. Se extrajo 4 mL de la mezcla del radical y se diluyó en 40 mL de agua destilada. El radical preparado sobrante se reservó. Se prepararon diferentes concentraciones de polisacáridos (0,1-4 mg/mL). Se tomaron alícuotas de 180 µL de radical ABTS•+, donde se adicionó 20 µL de las distintas disoluciones.

Para la evaluación antioxidante del extracto total se masó 10 mg de extracto que fue diluido en 1 ml de metanol. Se utilizaron las concentraciones (0,1-10 mg/ml). Las microplacas se mantuvieron en oscuridad y a temperatura ambiente (18°C) durante 30 min. La absorbancia de la solución resultante se midió espectrofotométricamente a 750 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición (% Inh) usando la ecuación

$\% = \frac{(\text{AbsC} - \text{AbsM})}{(\text{AbsC})} * 100$, donde AbsC corresponde a absorbancia control y AbsM corresponde a absorbancia de la muestra.

Determinación del contenido fenoles totales

Para determinar el contenido de fenoles totales del extracto total proveniente del medio de cultivo de *Ganoderma australe*, fue utilizada la metodología de (Islas-Santillán *et al.* 2017) con modificaciones. La curva estándar se realizó preparando una solución stock de 10 mg de ácido gálico diluida en 1 mL de DMSO, a partir de ello se hicieron las siguientes concentraciones: 1000, 800, 400, 200, 100, 50 µg/mL. Luego se rotuló viales ámbar correspondiente a cada concentración, donde se le agregó 10 µL de las distintas concentraciones de ácido gálico más 20 µL de reactivo Folin Ciocalteu al 20% y 200 µL de agua destilada. Se incubó por 5 min en la estufa (40°C). Posteriormente se añadió a cada vial ámbar 100 µL de carbonato de sodio al 15%, para incubarlos por 1 hora a temperatura ambiente (18°C) para el desarrollo del color. Para la cuantificación de fenoles totales del extracto total, se utilizó la concentración 100 µg. Luego se realizó la lectura en espectrofotómetro a 750 nm en un lector de microplacas (Bio-Tek instrument, Inc; Winooski, United State). Con los resultados obtenidos se hizo la curva estándar, concentración vs absorbancia. El valor de cuantificación de polifenoles de la muestra se expresó en mg equivalentes de ácido gálico.

Análisis estadístico

Los datos se presentarán como promedios de desviación estándar (DE) de tres experimentos (n = 3). Los ensayos se harán por triplicado para aplicar el análisis

estadístico. Para evaluar los cambios de % de inhibición de la actividad antioxidante se realizará un análisis de varianza factorial (ANOVA) con medidas repetidas a lo largo del tiempo. Para comparar las diferencias entre cada tratamiento, también se realizará un (ANOVA) unidireccional, seguido de una prueba de Tukey a posteriori. Antes de estos análisis, se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistical versión 10.0.

RESULTADOS

Rendimientos

A partir de 8 litros de cultivo *in vitro* de *G. australe*, se obtuvo 20,5 g de micelio seco y 300 mg de extracto total. Del micelio se obtuvo 360 mg de polisacáridos puros.

Análisis químico de polisacáridos mediante caracterización infrarroja

El espectro FT-IR de polisacáridos aislado de micelio de *G. australe*, mostró una banda ancha en 3382 cm^{-1} característico de los grupos hidroxilo (O-H) y una banda a los 2922 cm^{-1} asociada a grupo metileno (CH_2) (Zhao *et al.* 2010). Las bandas de absorción en 890 cm^{-1} , 1046 cm^{-1} y 1080 cm^{-1} indican enlaces beta-glucósido, correspondiente a polisacáridos de tipo β -glucanos (Kozarski *et al.* 2011). Bandas en 1654 cm^{-1} y 1243 cm^{-1} están asociadas a una pequeña cantidad de proteína. Se observa estiramiento en la banda 1535 cm^{-1} lo cual se reporta la presencia de compuestos fenólicos y aromáticos (Kozarski *et al.* 2012). Las bandas en el rango

de 400-750 cm^{-1} son asignadas a anillos de piranosa (Yang & Zhang 2009) (Figura 3).

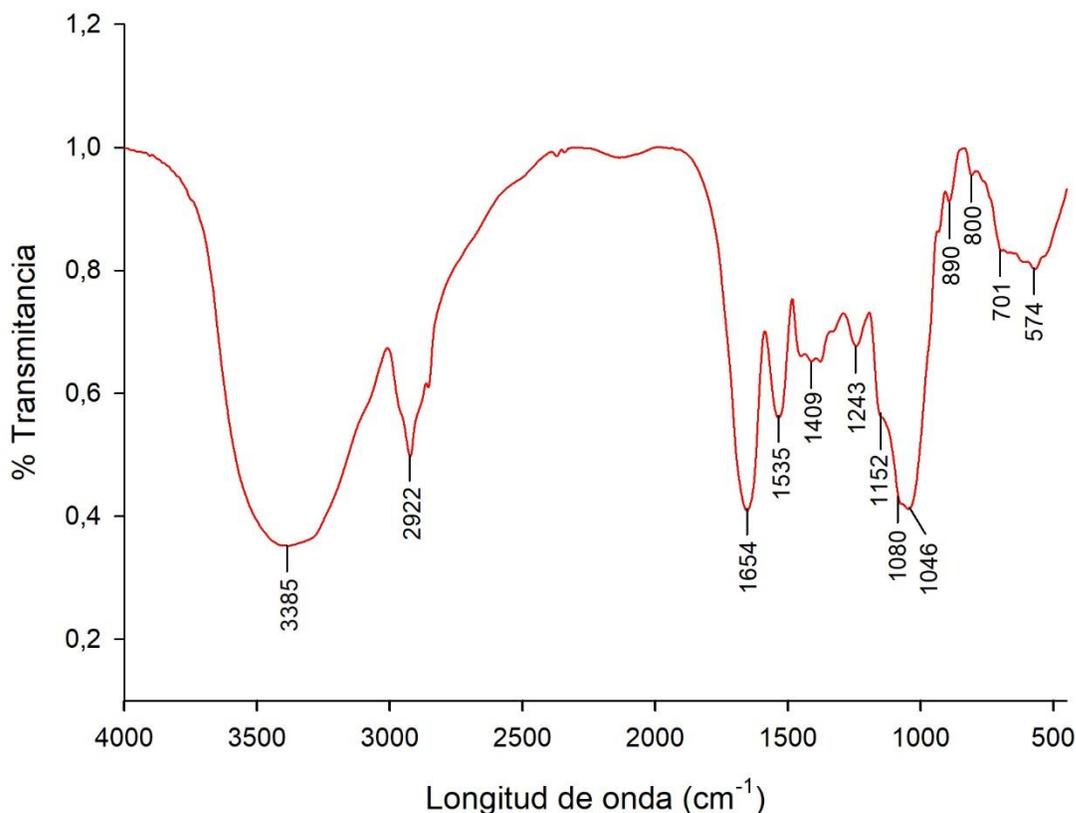


Figura 3. Espectro infrarrojo (FTIR) de polisacáridos aislados de micelio de *Ganoderma australe*.

Ensayo de neutralización de radical (DPPH)

De acuerdo, a los datos obtenidos del porcentaje de neutralización del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), se construyó una curva de referencia (Figura 4). Se reportan diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). Se obtuvo una baja representación de la bioactividad por parte de los polisacáridos en comparación a Trolox en las diferentes concentraciones. Se reporta un leve aumento de la bioactividad por parte de los polisacáridos a la concentración (4 mg/mL) con un

porcentaje de inhibición del 9%. Sin embargo, los valores de porcentaje inhibitorio son bajos en general, pero a su vez difieren entre sí significativamente, formándose dos grupos (A) y (AB). Se visualiza un incremento de la bioactividad de los polisacáridos en las distintas concentraciones, mientras que Trolox se mantiene estable sin diferencias significativas entre las concentraciones con un 67% de inhibición (Figura 4).

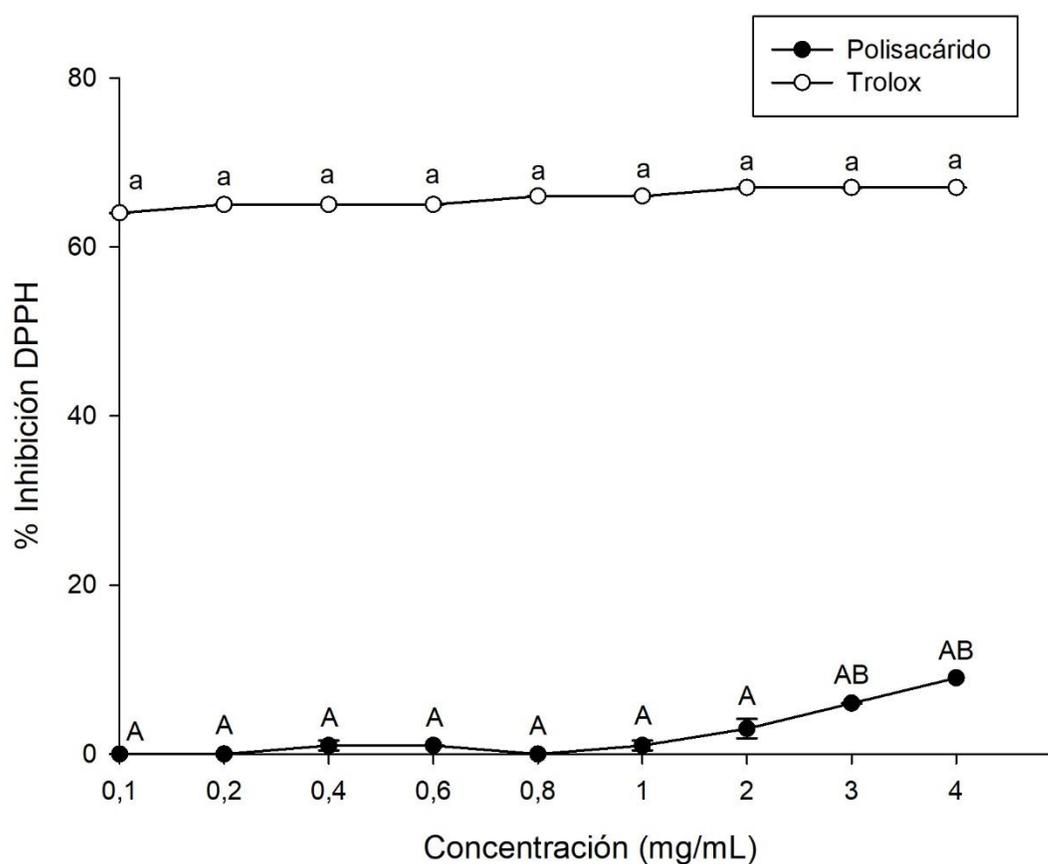


Figura 4. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical DPPH de polisacáridos v/s Trolox. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido por test de Tukey ($p < 0.05$). Las barras representan la media (\pm DE) de tres réplicas por tratamiento. Las barras de error no mostradas son más pequeñas que los símbolos. Fuente: Elaboración propia en SigmaPlot versión 11.0.

Por otra parte, la actividad antioxidante del extracto total reveló mayores porcentajes de inhibición del radical DPPH, con valores que alcanzan el 36% de inhibición a la concentración más alta (10 mg/mL), la misma concentración para Trolox mostró un porcentaje de inhibición del 84%. Se reporta que los porcentajes de inhibición del extracto total se incrementan de forma gradual de acuerdo a las distintas concentraciones, con diferencias significativas entre las concentraciones. Mientras que el porcentaje inhibitorio de Trolox se mantiene estable en las distintas concentraciones sin diferencias significativas entre las concentraciones con un 84% de inhibición (Figura 5).

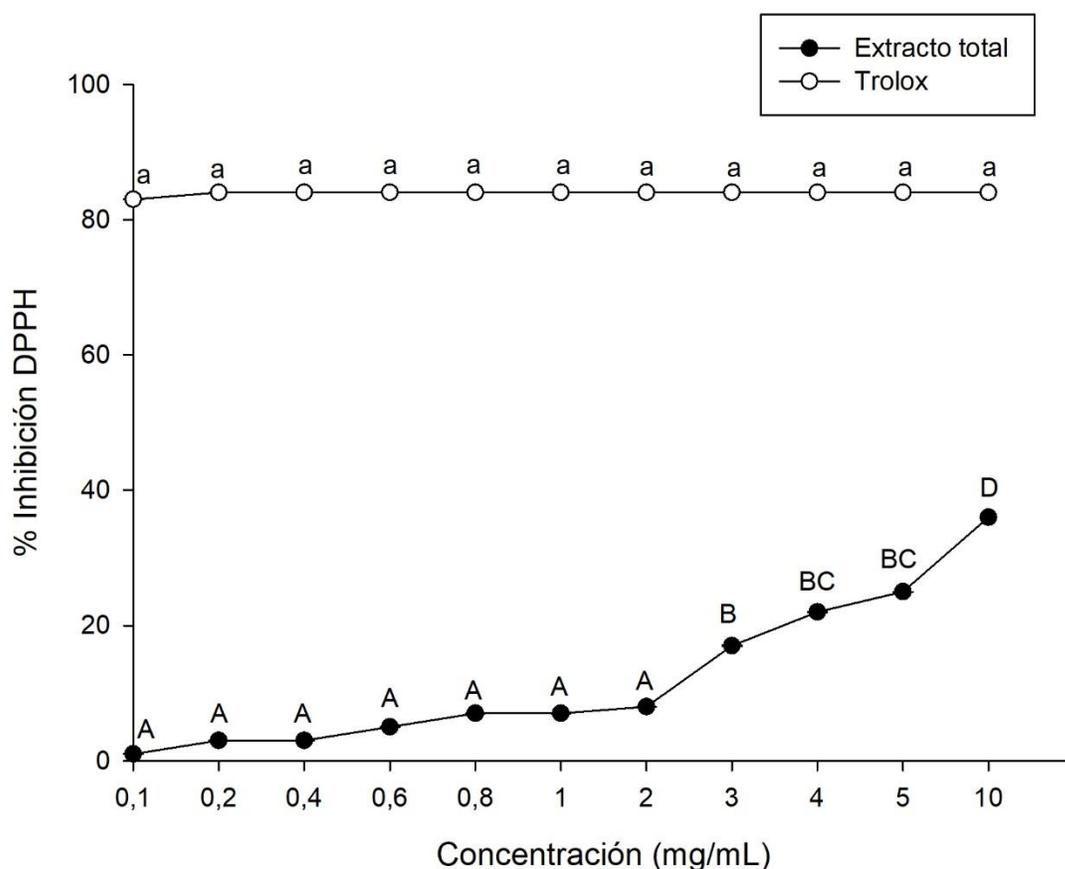


Figura 5. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical DPPH de extracto total v/s Trolox. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido por test de Tukey ($p < 0.05$). Las barras representan la media (\pm DE) de tres

réplicas por tratamiento. Las barras de error no mostradas son más pequeñas que los símbolos. Fuente: Elaboración propia en SigmaPlot versión 11.0.

Comparación de la actividad antioxidante de polisacáridos y extracto total

En la gráfica se visualiza que en ambas muestras (polisacárido y extracto total) hay un incremento gradual de la actividad antioxidante en las diferentes concentraciones. De esto se extrae que existe una relación antioxidante-dependiente al aumento de la concentración. Sin embargo, la muestra de extracto total presenta mayores porcentajes de inhibición. Si comparamos la concentración más alta (4 mg/mL) de ambas muestras, se visualiza que el ET alcanza el 22% de inhibición, más del doble que los polisacáridos que presentan un 9% a la misma concentración. Para las concentraciones bajas (0,1-0,6 mg/mL). En ambas muestras se forman grupos similares (A), (a) y en las siguientes concentraciones difieren de las bajas al formarse otros grupos como (AB), (C) para los polisacáridos y (ab), (bc), (d) para el ET, también existen diferencias significativas entre grupos de concentraciones (Figura 6).

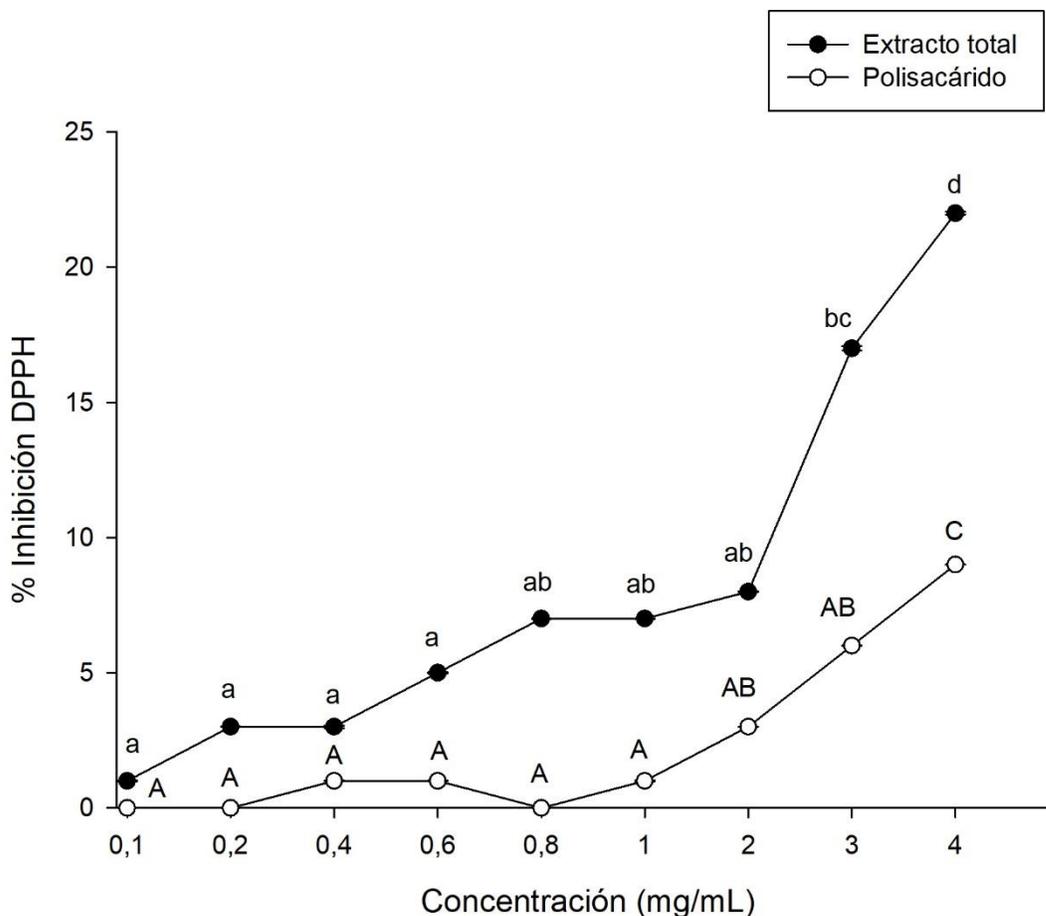


Figura 6. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical DPPH de extracto total v/s polisacárido. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido por test de Tukey ($p < 0.05$). Las barras representan la media (\pm DE) de tres réplicas por tratamiento. Las barras de error no mostradas son más pequeñas que los símbolos. Fuente: Elaboración propia en SigmaPlot versión 11.0.

Ensayo de decoloración del catión radical (ABTS \cdot^+)

Con los datos obtenidos del porcentaje de captación del radical catiónico ácido (2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ABTS \cdot^+ , se construyó una curva de referencia (Figura 7). Se reportan diferencias significativas entre las concentraciones ($p < 0.05$). Se obtuvo una baja representación de actividad por parte de los polisacáridos en comparación a Trolox. Se observa un incremento gradual de la actividad en los polisacáridos, llegando a los 13% de inhibición a la concentración

(4 mg/mL). En las concentraciones (0,1 mg/mL) y (0,4- 3 mg/mL) no hubo diferencias significativas. Por su parte, Trolox reveló un notorio incremento del porcentaje de inhibición a la concentración (0,4 mg/mL) y (0,6 mg/mL) alcanzando los porcentajes de 51% y 83% respectivamente. Para las siguientes concentraciones se mantiene constante, sin diferencias significativas. Se reporta una baja bioactividad antioxidante por parte de los polisacáridos, si comparamos la capacidad de captación de radicales de los polisacáridos del antioxidante conocido Trolox.

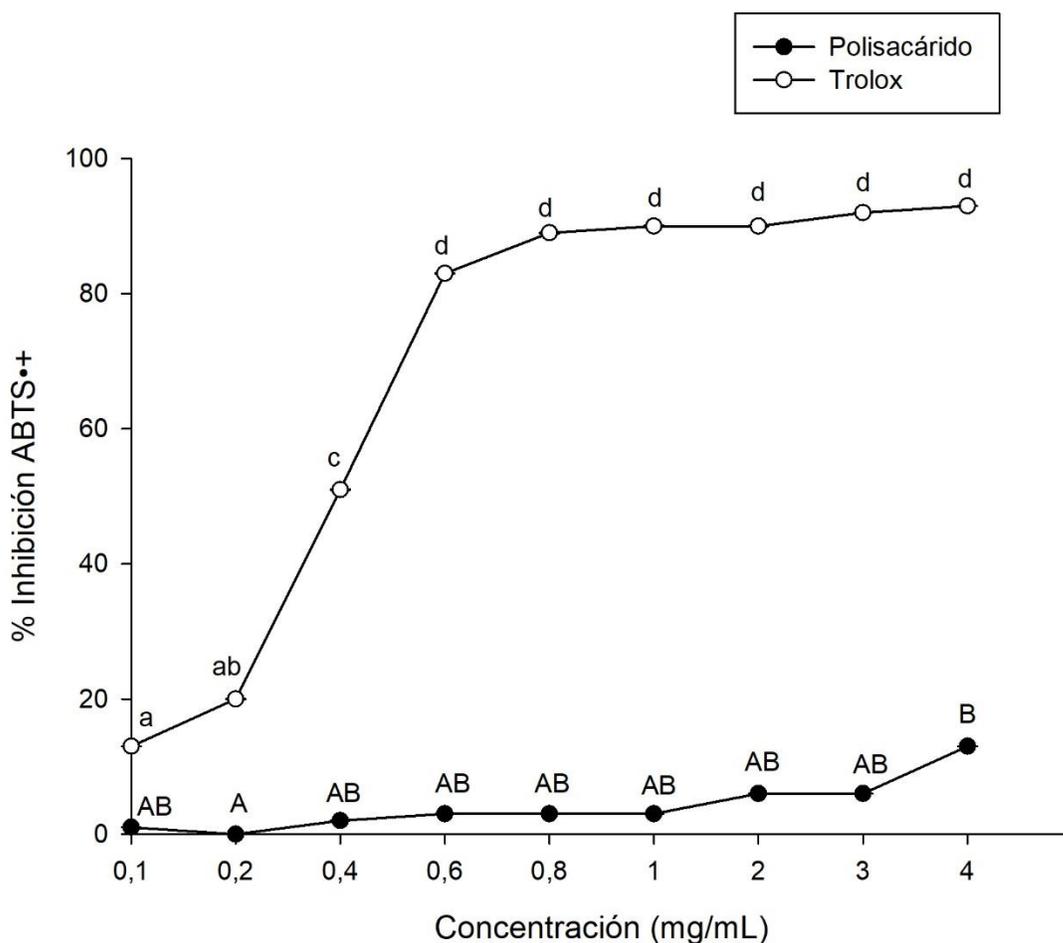


Figura 7. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS•+ de polisacáridos v/s Trolox. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido por test de Tukey ($p < 0.05$). Las barras representan la media (\pm DE) de tres

réplicas por tratamiento. Las barras de error no mostradas son más pequeñas que los símbolos. Fuente: Elaboración propia en SigmaPlot versión 11.0.

Por otra parte, la actividad antioxidante del extracto total mostró mayores porcentajes de captación de radicales catiónicos ABTS•+, con valores que alcanzan un 55% de inhibición en la concentración más alta (10 mg/mL). Se observa un incremento gradual del % de inhibición en las diferentes concentraciones con diferencias significativas ($p < 0.05$). Se reporta un notorio incremento de la actividad desde la concentración (2 mg/mL) con un 28%. Mientras que Trolox se reporta un incremento de la actividad a la concentración (0,2 mg/mL) con un porcentaje del 94% que se mantiene sin diferencias significativas en las siguientes concentraciones (Figura 8).



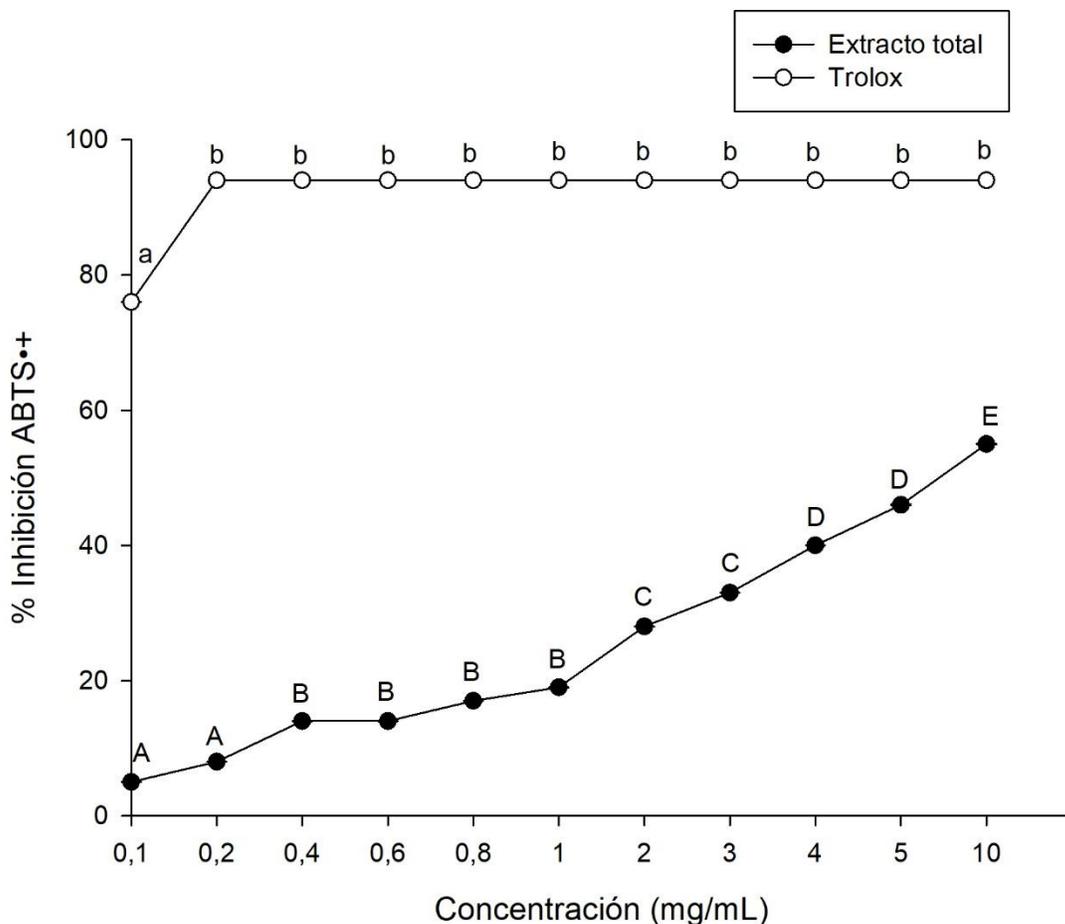


Figura 8. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS•+ de extracto total v/s Trolox. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido por test de Tukey ($p < 0.05$). Las barras representan la media (\pm DE) de tres réplicas por tratamiento. Las barras de error no mostradas son más pequeñas que los símbolos. Fuente: Elaboración propia en SigmaPlot versión 11.0.

Comparación de la actividad antioxidante de polisacáridos y extracto total

En la gráfica se visualiza que en ambas muestras (polisacáridos y extracto total) hay un incremento gradual de la actividad antioxidante en las diferentes concentraciones (Figura 9). Lo que se infiere que existe una relación de antioxidante-dependiente al aumento de la concentración. Sin embargo, la muestra de extracto total presenta mayores porcentajes de inhibición. Si comparamos la concentración más alta (4 mg/mL) de ambas muestras, se visualiza que el ET alcanza el 40% de inhibición,

mientras que los polisacáridos alcanzan un 13% en la misma concentración. Se reporta que el ET presentó una actividad del 27% más que los polisacáridos para esa concentración. En ambas muestras se observa un incremento gradual de la actividad antioxidante, y esto también se demuestra porque existen diferencias significativas entre las distintas concentraciones. Para los polisacáridos con cinco grupos diferentes (A, B, C, D, E) y el extracto total con siete grupos diferentes (a, b, c, d, e, f, g) (Figura 9).

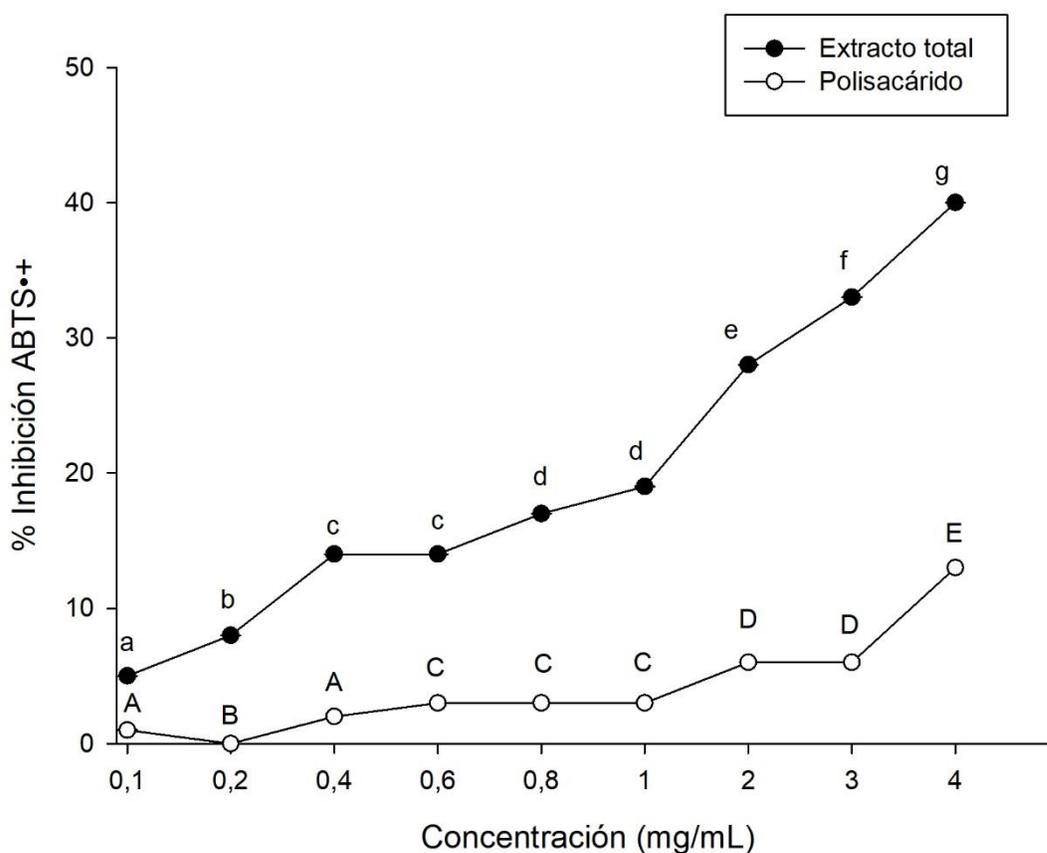


Figura 9. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS•+ de extracto total v/s polisacáridos. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido por test de Tukey ($p < 0.05$). Las barras representan la media (\pm DE) de tres replicas por tratamiento. Las barras de error no mostradas son más pequeñas que los símbolos. Fuente: Elaboración propia en SigmaPlot versión 11.0.

Determinación del contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales (CFT) fue determinado en el medio de cultivo *in vitro* de *G. austale*. El CFT fue estimado usando ácido gálico como patrón y expresado como miligramos de ácido gálico equivalente (GAE). El medio de cultivo muestra un contenido de fenoles totales de 23,418 mg equivalentes de ácido gálico/ 100µg de muestra de extracto total.

DISCUSIÓN

La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad que protege a la célula de diferentes tipos de estrés ambiental y que está constituida por glucanos, quitina y glicoproteínas. En este sentido, la integridad de las células fúngicas esta proporcionada por los enlaces polisacáridos-proteínas (Pontón 2008). Por esta razón, los polisacáridos se encuentran en gran cantidad en la pared celular, ya que también interaccionan con enzimas y receptores de la superficie celular (Pizarro 2014).

En este estudio se aislaron y purificaron los polisacáridos del micelio de *G. australe*, y mediante espectroscopía FTIR se reportaron estiramientos entre los 3000–3500 cm^{-1} asociados a grupos hidroxilo, metileno y metilo, característicos de polisacáridos de células fúngicas (Zhao *et al.* 2010). Además, se reportaron estiramientos a los 890 cm^{-1} , 1046 cm^{-1} y 1080 cm^{-1} característicos de enlaces β -glucosídicos, correspondiente a polisacáridos de tipo β -glucanos (Kozarski *et al.* 2011). En esta

línea, este tipo de polisacárido ha sido ampliamente estudiado, debido a sus características bioactivas (Yan *et al.* 2013; Volman *et al.* 2010). En este sentido, la literatura señala que los polisacáridos que predominan en las células fúngicas son los β -glucanos (Ye *et al.* 2010; Sliva *et al.* 2003). Estos polisacáridos se caracterizan por ser polímeros de glucosa de elevado peso molecular que se encuentran en forma natural en la pared celular (Pizzarro 2014). Además, se han reportado variados efectos fisiológicos asociados a este tipo de polímeros, entre los que se destacan antioxidante, hipoglucemiante y hipolipídico (Lai *et al.* 2010; Wagner *et al.* 2008). Sin embargo, su principal propiedad corresponde a su efecto inmunomodulador, lo cual se asocia a su actividad antitumoral (Sliva *et al.* 2003). Por otra parte, estudios realizados por Synytsya & Novak (2013) y Chen *et al.* (2008), han reportado asociaciones de proteínas y fenoles a los polisacáridos de *Ganoderma*, sugiriendo que el efecto sinérgico entre estas moléculas potenciaría sus atributos bioactivos.

Actividad antioxidante de polisacáridos

En este estudio, los resultados de los ensayos antioxidantes DPPH y ABTS•+ demuestran que distintas concentraciones de polisacáridos aislados y purificados de *G. australe* presentan actividad antioxidante significativa estadísticamente ($p < 0,05$). Sin embargo, los porcentajes de inhibición reportados son bajos en comparación con el control Trolox. Esto se debe a que Trolox es un análogo de la vitamina E, por tanto, es un potente antioxidante conocido y eficaz (Aguirre *et al.* 2015). Además, la baja actividad antioxidante reportada en este estudio se puede atribuir a las bajas concentraciones de polisacáridos empleadas en estos ensayos (0,1-4 mg/mL), ya que de acuerdo a lo reportado por Kozarski *et al.* (2012), utilizó

mayores concentraciones de polisacáridos aislados de *G. lucidum* y *G. applanatum* (10,0-20 mg/mL) en el ensayo antioxidante del radical DPPH, se evidencia una actividad antioxidante que alcanza hasta un 77,3% de porcentaje inhibitorio. De esto se infiere que, al aumentar las concentraciones de polisacáridos, también incrementarían los porcentajes de inhibición. Por otra parte, un estudio realizado por Saltarelli *et al.* (2009), no reporta actividad antioxidante DPPH de los polisacáridos intracelulares aislados del micelio de *Ganoderma lucidum*. Esto se atribuyó a diversos factores destacando aspectos de degradación. Esto debido a que las etapas de los cultivos *in vitro* conllevan distintos procesos, donde factores como: la radiación UV, la temperatura, la elección de solventes, etc., puede afectar los componentes de la muestra. Sin embargo, cabe destacar que en el presente estudio la metodología empleada para la obtención de polisacáridos se incluyó un proceso de purificación con la finalidad de eliminar interferentes como proteínas y fenoles asociados al polisacárido, lo que podría proporcionar un efecto sinérgico entre las moléculas aumento su bioactividad (Figueroa *et al.* 2019; Abdala *et al.* 2010). Esto en comparación con metodologías usadas en otras investigaciones, donde se utiliza el concepto de “polisacárido crudo” o “extracto de polisacárido” al polisacárido no purificado (Islas-Santillán *et al.* 2017). En este sentido, estos estudios al no contemplar una purificación de los polisacáridos la actividad antioxidante que reportan se atribuye al efecto sinérgico de los compuestos que actúan en conjunto con el polisacárido. Además, es importante destacar que existen polisacáridos que forman glicoproteínas, es decir, la unión entre polisacárido-proteína, que han sido sometidos a ensayos antioxidantes, mostrando mayor bioactividad (Chen *et al.* 2008). Esto indica que las propiedades antioxidantes reportadas en otros estudios

en hongos, no solo se atribuye al polisacárido, sino que también a los aminoácidos asociados a esta molécula. En esta misma línea, Chen *et al.* (2008) describe los aminoácidos ácido glutámico, ácido aspártico, alanina, glicina, treonina y serina, que formaban parte de los polisacáridos aislados de *Ganoderma atrum*, revelando una alta actividad antioxidante.

Por otra parte, diversas investigaciones nos indican que la principal propiedad de los polisacáridos de *Ganoderma*, no se debe a su actividad antioxidante, sino por presentar actividad inmunomoduladora asociada a los β -glucanos (Ayeka 2018; Zhao *et al.* 2010). Estos polisacáridos estimulan la inmunidad humoral y celular en general, activando enzimas degradadoras como la lisozima (Lin & Zhang 2004). También, se ha demostrado que facilitan la fagocitosis, mediante la producción de macrófagos o linfocitos T en ensayos *in vitro* en células tumorales (Chen *et al.* 2004; Gu *et al.* 1990). El efecto antitumoral de los polisacáridos de *Ganoderma* también está relacionado con la mediación de citoquinas que inhiben la angiogénesis, de esta manera se induce la apoptosis en células tumorales (Wang *et al.* 2020). Lo anterior indica la importancia de continuar evaluando los polisacáridos de *G. australe*, donde se determine su capacidad antitumoral y si su efecto es inmunomodulador como han demostrado otras investigaciones, considerando la evidencia reportada para polisacáridos de tipo β -glucano.

Dentro de otras propiedades asociadas a los polisacáridos de *Ganoderma*, se destaca la capacidad de actuar como fibra dietética, ya que no son digeribles en el tracto intestinal humano, provocando una reducción glucosa y de colesterol en sangre (Zhang *et al.* 2007). Además, se ha demostrado que polisacáridos de *G.*

lucidum, posee efector hipoglucemiante aumentando la renovación de las células beta en el páncreas o permitiendo la recuperación de células beta parcialmente destruidas por la estimulación masiva de insulina pancreática (Pandya *et al.* 2019; Li *et al.* 2012). También su capacidad hipolipídica ha sido demostrada en ensayos *in vivo* e *in vitro* en ratones con triglicéridos altos, disminuyendo esta condición significativamente (Li *et al.* 2011).

Actividad antioxidante extracto total

El extracto total aislado del medio de cultivo de *G. australe*, presentó una mayor actividad antioxidante DPPH y ABTS•+ en comparación con los polisacáridos del micelio. Esto se debe, a que el polisacárido aislado es un compuesto puro, mientras que el extracto total contiene un “pool” de metabolitos secundarios bioactivos, como compuestos fenólicos y terpenos, lo que podrían actuar en sinergia demostrando mayores actividades antioxidantes (Islas-Santillán *et al.* 2017).

En nuestro estudio, se observó un efecto antioxidante-dependiente al aumento de concentración del extracto total. Paralelamente, nuestros resultados demuestran diferencias significativas en la actividad antioxidante ABTS•+ a distintas concentraciones de extracto total, en comparación con el ensayo DPPH. Esto se explicaría debido a que en el extracto total se encuentran presentes compuestos antioxidantes donadores de hidrógeno o electrones que pueden neutralizar el radical catiónico ABTS•+. En esto se fundamenta el bajo porcentaje de inhibición DPPH obtenido en este estudio, podría ser el mecanismo de reacción del radical DPPH con los antioxidantes, lo cual está directamente relacionado con la conformación estructural de los mismos, es decir, un antioxidante pequeño con

mayor acceso al radical mostrará mayor actividad antioxidante (Guija-Poma *et al.* 2015). Cabe destacar que el radical DPPH tiene la propiedad de presentar impedimento estérico, lo cual impide o retarda la reacción con otra molécula o sustrato antioxidante en este caso (Beserra *et al.* 2011). También, se reporta que el radical DPPH provoca una reacción reversible cuando está en contacto con fenoles como eugenol y sus derivados, lo cual llevaría a bajas lecturas de actividad antioxidante (Brand-Willians & Berset 1997). En contraste, el radical ABTS+ tiene la ventaja de poseer solubilidad en medios polares y apolares y no es afectado por la fuerza iónica, por lo que, evalúa antioxidantes de naturaleza hidrofílica y lipofílica (Aguirre *et al.* 2015). Lo cual concuerda con la naturaleza química de los metabolitos descritos en hongos del género *Ganoderma*, como compuestos fenólicos hidrosolubles y terpenos liposolubles (Hyde *et al.* 2019; Batra *et al.* 2013). En consecuencia, la estequiometría de las reacciones y el mecanismo de reacción son importantes elementos a considerar en estas dos técnicas antioxidantes.

Adicionalmente, el extracto total presentó un alto contenido de fenoles totales, a los que se atribuye su alta capacidad antioxidante. En esta investigación, el contenido de compuestos fenólicos presente en el medio de cultivo de *G. australe* fue de 23,418 mg equivalentes de ácido gálico/100µg de muestra de extracto total. Este valor de contenido de fenoles reportado es alto en comparación con lo reportado por Mohsin *et al.* (2011) donde se registran valores de 10.488 mg/g y 9.872 mg EAG/g de extracto metanólico de *Ganoderma lucidum* (Mohsin *et al.* 2011).

Sin embargo, Huerta *et al.* (2016), reportan altos contenido de fenoles en extractos hidroalcohólicos y etanólicos provenientes de cuerpo fructífero de *Ganoderma*

curtisii con valores de 35.63 mg/g y 49.14 mg/g respectivamente. Esto nos permite inferir que los polifenoles son compuestos que están mayormente representados en los basidiomas y no a partir de compuestos liberados al medio cultivo.

CONCLUSIONES

Los distintos efectos fisiológicos atribuidos a los polisacáridos de *Ganoderma* dependerán primeramente de la forma de cultivo y purificación de los polisacáridos. También la concentración empleada en los ensayos, y de acuerdo a las características moleculares, el tipo de polisacárido (α o β -glucano), estructura y peso molecular. Es por esto que, los datos de este estudio no resultan ser del todo concluyentes para los ensayos antioxidantes de polisacáridos.

Futuros estudios deben ir enfocados en dilucidar la constitución monomérica de los polisacáridos de *G. australe* y las características químicas de esta molécula asociada a su bioactividad, además de realizar estudios inmunomoduladores o citotóxico que puedan ser relacionados con las actividades antioxidantes reportadas.

Por otra parte, el extracto total proveniente del medio de cultivo *in vitro* de *G. australe*, presentó mayor capacidad antioxidante en comparación a los polisacáridos. Y también presentó un alto contenido de fenoles totales lo que determina su capacidad antioxidante.

En consecuencia, *Ganoderma australe* es una cepa capaz de producir una cantidad importante de metabolitos extracelulares de interés. Esto puede deberse a la

naturaleza silvestre de la especie y su habitat, donde en condiciones adversas es capaz de subsistir por medio de producción de metabolitos secundarios.

Cultivos miceliales provenientes de *G. australe*, pueden ser utilizados como una alternativa biotecnológica con fines medicinales y/o nutracéuticos.

BIBLIOGRAFÍA

ABDALA-DÍAZ, R.T., CHABRILLÓN, M., CABELLO-PASINI, A., LÓPEZ-SOLER, B. & FIGUEROA, F.L. 2010. Effect of *Porphyridium cruentum* polysaccharides on the activity of murine macrophage cell line RAW 264.7. *Ciencias Marinas*, 36(4), 345-353.

AGOSIN, E., BLANCHETTE, R.A., SILVA, H., LAPIERRE, C., CEASE, K.R., IBACH, R.E., ABAD, A. & MUGA, P. 1990. Characterization of “palo podrido”, a natural process of delignification in wood. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(1), 65-74.

AGUIRRE, O.E.R., BARRERIRO, W.A.A. & LÓPEZ, F.E.D. 2015. Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L. (Papaveraceae). *Revista de tecnología*, 14(2), 21-36.

AYALA, N.E., VILLARREAL, L.J., RICO, R. & SORIA, I.E. 2016. Los Hongos como fuente de recursos farmacológicos: *Ganoderma lucidum*; *Grifola frondosa*; y *Pleurotus ostreatus*. REPOSITORIO NACIONAL CONACYT.

AYEKA, P.A. 2018. Potential of mushroom compounds as immunomodulators in cancer immunotherapy: a review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

BATRA, P., SHARMA, A.K. & KHAJURIA, R. 2013. Probing Lingzhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes): a bitter

mushroom with amazing health benefits. International journal of medicinal mushrooms, 15(2).

BESERRA, M., MACHADO, P., CAMPOS, A., DO-PRADO, G., CARVALHO, C., ARRAES, G. & GOMES, T. 2011. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. Food Research International; 44: 2155-2159.

BRAND-WILLIAMS, B. & BERSET, C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. LWT - Food Science and Technology; 30: 609-615.

BINDER, M., JUSTO, A., RILEY, R., SALAMOV, A., LOPEZ-GIRALDEZ, F., SJOKVIST, E., COPELAND, A., FOSTER, B., SUN, H., LARSSON, E., LARSSON, K. H., TOWNSEND, J., GRIGORIEV, I. V. & HIBBETT, D. S. H. 2013. Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales, Mycologia, 105:6, 1350-1373.

BHOSLE, S., RANADIVE, K., BAPAT, G., GARAD, S., DESHPANDE, G. & VAIDYA, J. 2010. Taxonomy and diversity of *Ganoderma* from the Western parts of Maharashtra (India). Mycosphere, 1(3), 249-262.

BUCHANAN, P. K. 2001. A taxonomic overview of the genus *Ganoderma* with special reference to species of medicinal and nutraceutical importance. In Proceedings of the International Symposium on *Ganoderma* Science, Auckland, Nueva Zelanda. 1-8 pp.

CHEN, H.S., TSAI, Y.F., LIN, S., LIN, C.C., KHOO, K.H., LIN, C. H. & WONG, C.H. 2004. Studies on the immuno-modulating and anti-tumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides. Bioorganic & medicinal chemistry, 12(21), 5595-5601.

CHEN, Y., XIE, M. Y., NIE, S.P., LI, C. & WANG, Y.X. 2008. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. Food Chemistry, 107(1), 231-241.

CHENG, P.G., PHAN, C.W., SABARATNAM, V., ABDULLAH, N., ABDULLA, M.A. & KUPPUSAMY, U.R. 2013. Polysaccharides-rich extract of *Ganoderma lucidum* (M.A. Curtis: Fr.) P. Karst accelerates wound healing in Streptozotocin-Induced diabetic rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 671252.

DABA, A.S. & EZERONYE, O.U. 2003. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. African Journal of Biotechnology, 2(12), 672-678.

DENG J., CHENG W. & YAN, G. 2011. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. Food Chemistry; 125: 1430–1435.

DONOT, F., FONTANA, A., BACCOU, J.C. & SCHORR-GALINDO, S. 2012. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. Carbohydrate Polymers, 87(2), 951-962.

DUDHGAONKAR, S., THYAGARAJAN, A. & SLIVA, D. 2009. Suppression of the inflammatory response by triterpenes isolated from the mushroom *Ganoderma lucidum*. International immunopharmacology, 9(11), 1272-1280.

EASTWOOD, D.C., FLOUDAS, D., BINDER, M., MAJCHERCZYK, A., SCHNEIDER, P., AERTS, A., ASIEGBU, F.O, BAKER, S.E., BARYY, K., BENDIKSBY, M., BLUMENTRITT, M., COUTINHO, P. M., CULLEN, D., DE VRIES, R.P., GATHMAN, A., GOODELL, B., HENRISSAT, B.H., IHRMARK, K., KAUSERUD, H., KOHLER, A., LABUTTI, K., LAPIDUS, A., LAVIN, J.L., LEE, Y. H., LINDQUIST, E., LILLY, W., LUCAS, S., MORIN, E., MURAT, C., OGUIZA, J. A., PARK, J., PISABARRO, A. G., RILEY, R., ROSLING, A., SALAMOV, A., SCHMIDT, O., SCHMUTZ, J., SKREDE, I., STENLID, J., WIEBENGA, A., XIE, X., KUES, U., HIBBETT, D. S., HOFFMEISTER, D., HOGBERG, N., MARTIN, F., GRIGORIEV, I. V. & WATKINSON, S. C. 2011. The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. Science 333:762–765.

SMELCEROVIC, A., KNEZEVIC-JUGOVICK, Z. & PETRONIJEVIC, Z. 2008. Microbial polysaccharides and their derivatives as current and prospective pharmaceuticals. Current pharmaceutical design, 14(29), 3168-3195.

FIGUEROA, 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.

FLOUDAS, D., BINDER, M., RILEY, R., BARRY, K., BLANCHETTE, R. A., HENRISSAT, B., MARTÍNEZ, A. T., OTILLAR, R., SPATAFORA, J. W., YADAY, J. S., AERTS, A., BENOIT, I., BOYD, A., CARLSON, A., COPELAND, A., COUTINHO, P. M., DE VRIES, R. P., FERREIRA, P., FINDLEY, K., FOSTER, B., GASKELL, J., GLOTZER, D., GÓRECKI, P., HEITMAN, J., HESSE, C., HORI, C., IGARASHI, K. I., JURGENS, J.A., KALLEN, N., KERSTEN, P., KOHLER, A., KUES., KUMAR, T. K., KUO, A., LABUTTI, K., LARRONDO, L. F., LINDQUIST, E., LING, A., LOMBARD, V., LUCAS, S., LUNDELL, T., MARTIN, R., MCLAUGHLIN, D. J., MORGENSTERN, I., MORIN, E., MURAT, C., NAGY, L.G., NOLAN, M., OHM, R.A., PATYSHAKULIYEVA, A., ROKAS, A., RUIZ-DUEÑAS, F. J., SABAT, G., SALAMOV, A., SAMAJIMA, M., SCHMUTZ, J., SLOT, J. C., JOHN, F., STENLID, J., SUN, H., SUN, S., SYED, K., TSANG, A., WIEBENGA, A., YOUNG, D., PISABARRO, A., EASTWOOD, D. C., MARTIN, F., CULLEN, D., GRIGORIEV, I. V. & HIBBETT, D. S. 2012. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336:1715–1719.

FRYSSOULI, V., ZERVAKIS, G.I., POLEMIS, E. & TYPAS, M. A. 2020. A global meta-analysis of ITS rDNA sequences from material belonging to the genus *Ganoderma* (Basidiomycota, Polyporales) including new data from selected taxa. *MycKeys* 75: 71–143.

FURCI, GEORGE-NASCIMIENTO, GIULIANA. M. 2007. *Fungi Austral: Guía de campo de los hongos más vistosos de Chile*. CORMA. 204pp.

GOYAL, S., RAMAWAT, K.G. & MÉRILLON, J.M. 2016. Different shades of fungal metabolites: an overview. *Fungal metabolites*, 1, p 29.

GUIJA-POMA, E., INOCENTE-CAMONES, M.Á., PONCE-PARDO, J. & ZARZOSA-NORABUENA, E. 2015. Evaluación de la técnica 2, 2-Difenil-1-Picrilhidrazilo

(DPPH) para determinar capacidad antioxidante. Horizonte Medico (Lima), 15(1), 57-60.

GU, L. G. 1990. The effect of *Ganoderma capense* on mouse peritoneal macrophages. Shanghai J Immunol, 10, 205-7.

HAN, J. R., AN, C.H. & YUAN, J. M. 2005. Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Ganoderma lucidum* for degrading starch and upgrading nutritional value. Journal of applied microbiology, 99(4), 910-915.

HSU, S.C., OU, C.C., LI, J.W., CHUANG, T.C., KUO, H.P., LIU, J.Y., CHEN, C.S., LIN, S.C., SU, C.H. & KAO, M.C. 2008. *Ganoderma tsugae* extracts inhibit colorectal cancer cell growth via G2/M cell cycle arrest. Journal of Ethnopharmacology, vol. 120(3), 394-401.

HUERTA, I.J., MOLINA., M.G. GARNICA., B. & YAHUACA. J. 2016. Total polyphenols and antioxidant activity of *Ganoderma curtisii* extracts. Journal of Medicinal Plants Studies 4: 136-141.

HUDE, K.D., XU, J., RAPIOR, S., JEEWON, R., LUMYONG, S., NIEGO, A.G.T. & STADLER, M. 2019. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. Fungal Diversity, 97(1), 1-136.

HU, H., AHN, N.S., YANG, X., LEE, Y.S. & KANG, K.S. 2002. *Ganoderma lucidum* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. International Journal of Cancer, 102(3), 250-253.

ISLAS-SANTILLÁN, M., CASTAÑEDA, O., ÁLVAREZ, A., VALENZUELA, R., ROMERO-BAUTISTA, L. & TORRES-VALENCIA, J. 2017. Estudio preliminar de la actividad antioxidante de tres especies del género *Ganoderma* (Polyporaceae) nativas del estado de Hidalgo, México. Revista mexicana de micología, 46, 37-45.

KIRK, P.M., CANNON, P.F., MINTER, D.W. & J.A. STALPERS. 2008. Dictionary of the fungi. 10th Edition. CAB International, Wallingford. 771 pp.

- KOZARSKI, M., KLAUS, A., NIKSIC, M., JAKOVLJEVIC, D., HELSPER, J.P. & VAN GRIENSVEN, L.J. 2011. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food chemistry*, 129(4), 1667-1675.
- KOZARSKI, M., KLAUS, A., NIKSIC, M., VRVIC, M.M., TODOROVIC, N., JAKOVLJEVIC, D. & Van GRIENSVEN, L.J. 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.
- MARTINEZ, A.T., BARRASA, J.M., ALMENDROS, G. & GONZÁLEZ, A.E. 1990. Fungal transformation of lignocellulosics as revealed by chemical and ultrastructural analyses. In *Advances in biological treatment of lignocellulosic materials*. pp. 129-147. Elsevier Applied Science London.
- MAU, J.L., LIN, H.C. & CHEN, C.C. 2002. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(21), 6072-6077.
- MONCALVO, J.M., WANG, H.F. & HSEU, R.S. 1995. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences: Comparison with traditional taxonomic characters. *Mycological Research* 99:1489-1499.
- MOHSIN, M., NEGI, P.S. & AHMED, Z. 2011. Determination of the antioxidant activity and polyphenol contents of wild Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt. Fr.) P. Karst. (higher Basidiomycetes) from central Himalayan hills of India. *International journal of medicinal mushrooms*, 13(6).
- LAI, C.Y., HUNG, J.T., LIN, H.H., ALICE, L.Y., CHEN, S.H., TSAI, Y.C., SHAO, L., YANG, W. & YU, J. 2010. Immunomodulatory and adjuvant activities of a polysaccharide extract of *Ganoderma lucidum* *in vivo* and *in vitro*. *Vaccine*, 28(31), 4945-4954.

LEGARDA, X.L., ECHAVARRÍA, C.A. & SÁNCHEZS, F. S. 2015. Producción de polisacáridos a partir de *Ganoderma* sp., aislado en la región andina. Revista colombiana de biotecnología, 17(2), 44-54.

LI, F., ZHANG, Y. & ZHONG, Z. 2011. Antihyperglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on streptozotocin-induced diabetic mice. International journal of molecular sciences, 12(9), 6135-6145.

LI, N., LI, L., FANG, J.C., WONG, J.H., NG, T.B., JIANG, Y., WANG, C., ZHANG, N., WEN, T., LI, Y., YUN, P., ZHAO, R., SHI, B., PING, Y., YING, X. & Liu, F. 2012. Isolation and identification of a novel polysaccharide-peptide complex with antioxidant, anti-proliferative and hypoglycaemic activities from the abalone mushroom. Bioscience reports, 32(3), 221-228.

LIN, Z.B., & ZHANG, H. N. 2004. Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms. Acta Pharmacologica Sinica, 25, 1387-1395.

LIU, J., S. WILFÖR, S. & XU, C. 2015. A review of bioactive plant polysaccharides: biological activities, functionalization, and biomedical applications. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 5(1), 31-61.

PADMA, V.V. 2015. An overview of targeted cancer therapy. BioMedicine, 5(4).

PANDYA, U., DHULDHAJ, U. & SAHAY, N.S. 2019. Bioactive mushroom polysaccharides as antitumor: an overview. Natural product research, 33(18), 2668-2680.

PATEL, S. 2012. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. Biotech, 2(3), 171-185.

PIZARRO, S., RONCO, A.M. & GOTTELAND, M. 2014. Beta-glucanos: ¿Qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud? Revista chilena de nutrición, 41(4), 4339-446.

- PORTÓN, J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78-82.
- 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: 1231–1237.
- SANTOS-NEVES, J.C., PEREIRA, M.I., CARBONERO, E.R., GRACHER, A.H.P., GORIN, P.A., SASSAKI, G.L. & LACOMINI, M. 2008. A gel-forming β -glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida*. *Carbohydrate Research*, 343(9), 1456-1462.
- SASAKI, T., ARAR, Y., IKEKAWA, T., CHIHARA, G. & FUKUOKA, F. 1971. Antitumor polysaccharides from some polyporaceae, *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat and *Phellinus linteus* (Berk. et Curt) Aoshima. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 19(4), 821-826.
- SHAO, P., CHEN, X. & SUN, P. 2013. *In vitro* antioxidant and antitumor activities of different sulfated polysaccharides isolated from three algae. *International journal of biological macromolecules*, 62, 155-161.
- SLIVA, D., SEDLAK, M., SLIVOVA, V., VALACHOVICOVA, T., LLOYD, Jr, F.P. & HO, N.W. 2003. Biologic activity of spores and dried powder from *Ganoderma lucidum* for the inhibition of highly invasive human breast and prostate cancer cells. *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, 9(4), 491-497.
- STANLEY, G., HARVEY, K., SLIVOVA, V., JIANG, J. & SLIVA, D. 2005. *Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF- β 1 from prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 330(1), 46-52.
- STEYAERT, R.L. 1972. Species of *Ganoderma* and related genera mainly of the Bogor and Leiden Herbaria. *Persoonia* 7, 55-118.

STEYAERT, R.L. 1975. The concept and circumscription of *Ganoderma lortzalum*. Transactions of the British Mycological Society 65, 451-467.

SYNYTSYA, A. & NOVÁK, M. 2013. Structural diversity of fungal glucans. Carbohydrate polymers, 92(1), 792-809.

SYSTAT SOFTWARE. 2008. SigmaPlot for Windows. Versión 11.0. Recuperado de <https://sigmaplot.software.informer.com/11.0/>

TORTELLA, G.R., RUBILAR, O., GIANFREDA, L., VALENZUELA, E. & DIEZ, M. C. 2008. Enzymatic characterization of Chilean native wood-rotting fungi for potential use in the bioremediation of polluted environments with chlorophenols. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(12), 2805-2818.

UBILLOS, J. 2002. Fichas micológicas. *Ganoderma australe*. Asociación cultural "Baxauri" Kultur elkarte. Mikologia. Bajauri. Recuperado de <http://www.fichasmicologicas.com>. Accesado 2 agosto 2020.

VOLMAN, J.J., MENSINK, R.P., RAMAKERS, J.D., DE WINTHER, MP., CARLSEN, H., BLOMHOFF, R., BUURMAN, W. & PLAT, J. 2010. Dietary (1→3), (1→4)-β-d-glucans from oat activate nuclear factor-κB in intestinal leukocytes and enterocytes from mice. Nutrition Research, 30(1), 40-48.

WANG, L., LI, J.Q., ZHANG, J., LI, Z.M., LIU, H.G. & WANG, Y. Z. 2020. Traditional uses, chemical components and pharmacological activities of the genus *Ganoderma* P. Karst.: a review. RSC Advances, 10(69), 42084-42097.

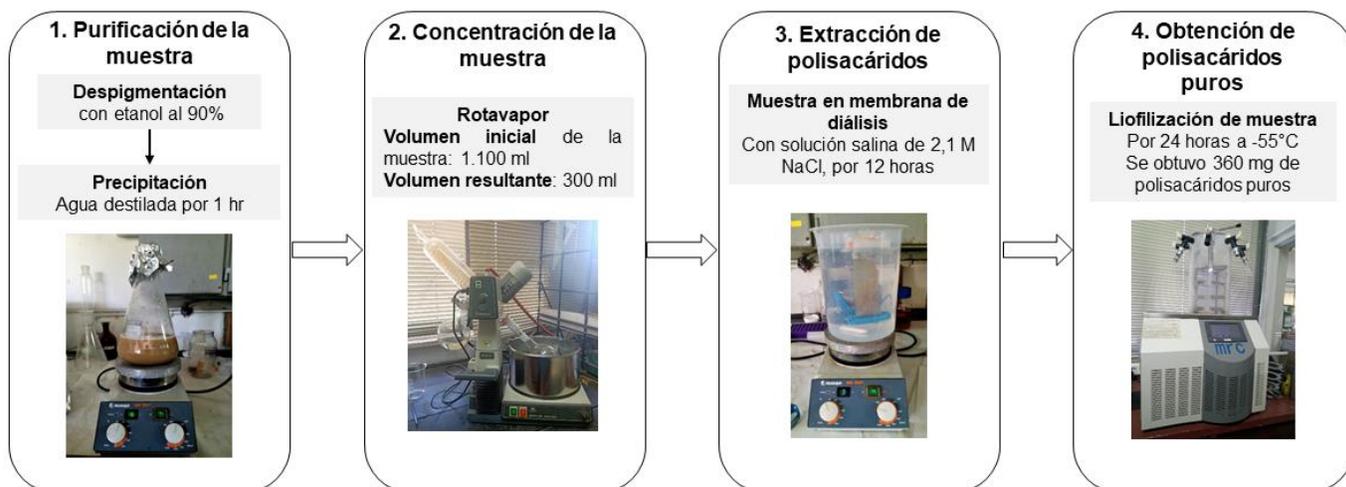
WANG, H.X. & NG, T.B. 2006. A laccase from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. Applied microbiology and biotechnology, 72(3), 508-513.

WAGNER, J., OTERO, M. A., GUERRERO, I., CABELLO, A. J., SCENI, P., GARCÍA, R., SORIANO, J., TOMASINI, A., SAURA, G. & ALMAZÁN, O. 2011. Las levaduras y sus derivados como ingredientes en la industria de alimentos. Biotecnología Aplicada, 28(4), 272-275.

- WASSER, S.P., SOKOLOV, D., RESHETNIKOV, S.V., & TIMOR-TISMENETSKY, M. 2000. Dietary supplements from medicinal mushrooms: diversity of types and variety of regulations. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2(1).
- WENG, C.J. & YEN, G.C. 2010. The *in vitro* and *in vivo* experimental evidences disclose the chemopreventive effects of *Ganoderma lucidum* on cancer invasion and metastasis. *Clinical & experimental metastasis*, 27(5), 361-369.
- YAN, C., KONG, F., ZHANG, D. & CUI, J. 2013. Anti-glycated and antiradical activities *in vitro* of polysaccharides from *Ganoderma capense*. *Pharmacognosy magazine*, 9(33), 23.
- YANG, L. & ZHANG, L. M. 2009. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate polymers*, 76(3), 349-361.
- YE, L., ZHENG, X., ZHANG, J., TANG, Q., YANG, Y., WANG, X., LI, J., LIU, Y. & PAN, Y. 2011. Biochemical characterization of a proteoglycan complex from an edible mushroom *Ganoderma lucidum* fruiting bodies and its immunoregulatory activity. *Food Research International*, 44(1), 367-372.
- ZHANG, M., CUI, S. W., CHEUNG, P.C.K. & WANG, Q. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, 18(1), 4-19.
- ZHAO, L., DONG, Y., CHEN, G. & HU, Q. 2010. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate polymers*, 80(3), 783-789.

ANEXO 1

1. Procedimiento utilizado para la extracción y purificación de polisacáridos de polisacáridos de *G. australe*.



ABREVIATURAS

AbsC: Absorbancia control

AbsM: Absorbancia de la muestra

CFT: Contenido de fenoles totales

ET: Extracto total

FTIR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

GAE: Equivalentes de ácido gálico

