

EVALUACIÓN DE LA FACTIBILIDAD TÉCNICA DE FABRICACIÓN DE UN MATERIAL BIOPOLIMÉRICO COMO
POSIBLE REEMPLAZO DE POLÍMEROS SINTÉTICOS

MARIA ISABEL VÉLEZ ISAZA

ESTUDIANTE DE INGENIERÍA DE PROCESOS

CÓDIGO: 200910001004

ASESOR: MSc WILLIAM URREGO YEPES

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES DE INGENIERÍA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: MATERIALES POLIMÉRICOS

UNIVERSIDAD EAFIT

ESCUELA DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS

MEDELLÍN

2015

Nota de Aceptación

Firma del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Medellín, 1^o de Junio de 2015

"El día que el hombre se diese cuenta de sus profundas equivocaciones, habría terminado el progreso de la ciencia."

Marie Skłodowska-Curie

Agradecimientos

En un intento por comprender el mundo que nos rodea, la ciencia nos acerca un poco a la anhelada luz de la verdad. Gracias a las inspiradoras historias de aquellos que se aventuraron por salirse de lo convencional, es que algún día la idea de ser científicos fue considerada más que un juego de hechicería; y gracias a aquellos que se aventuraron a perseguir el sueño de materializar las ideas “imposibles” es que hoy podemos llamarnos ingenieros.

Quisiera agradecer inicialmente a aquellos que hace algo más de 17 años se aventuraron por darle inicio a nuestra profesión de Ingenieros de Procesos, ya que sin ellos no estaría en este camino. Durante este tiempo en el camino a convertirme una Ingeniera, aprendí que el conocimiento y sobre todo la sabiduría, no se desarrollan de manera individual, sino del compartir los unos con los otros.

Es por esto que utilizo este espacio para agradecer a mi familia por ser mi mayor apoyo durante todos los momentos en los que el camino se hizo más difícil. A mi pareja y amigos por ser el ánimo y esperanza para salir adelante y no decaer, siendo una compañía inigualable durante mi formación como profesional y especialmente como persona. A mis profesores, por ser excelentes guías, que lograron cambiar mi perspectiva del mundo y me acercaron un poco más a alcanzar el sueño de mejorarlo. A la Universidad EAFIT por proporcionarme los medios para cumplir esta meta. A mi asesor William Urrego Yepes y al Profesor Santiago Builes Toro por guiar esta propuesta, dándome la oportunidad de aprender de ellos y de la experiencia de ser una investigadora.

A todos aquellos que me apoyaron con una conversación de ánimo, compartiendo ideas, dudas y soluciones, cuestionándome, retándome a alcanzar un objetivo o compartiendo conmigo de una u otra forma, gracias. Gracias a ustedes, porque su sabiduría me ayudo a comprender que el ingenio es una de las formas más bellas e interesantes para entender y transformar el mundo que nos rodea.

Resumen

Debido a la necesidad de encontrar materiales alternativos a los polímeros sintéticos, se ha incurrido en el desarrollo de materiales biopoliméricos. Esta investigación pretende evaluar la factibilidad técnica de la fabricación de películas biodegradables a partir de los polisacáridos presentes en el cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus pulmonarius*, especie de fácil cultivo en Colombia. Para la obtención de los polisacáridos presentes en el cuerpo fructífero de este hongo, se propuso una metodología de separación de extractos biológicos comprendida inicialmente por la extracción de los β -glucanos, desproteínización y finalmente desacetilación de la quitina presente en los extractos obtenidos en cada etapa anterior. Se determinó una metodología de producción de películas a partir de los polisacáridos de interés, utilizando “solvent casting” para la producción de estas. Finalmente se evaluó la factibilidad de fabricar las películas deseadas a partir de los extractos con β -glucanos y quitosano obtenidos.

A partir de los resultados se puede concluir que se requieren etapas de purificación adicionales a las propuestas para la obtención del quitosano; la calidad y pureza de los extractos obtenidos disminuye la resistencia a la tensión de las películas fabricadas; los β -glucanos obtenidos tuvieron un efecto plastificante en el material.

Palabras clave: Polisacáridos, β -glucanos, quitosano, polímeros, *Pleurotus pulmonarius*, “solvent casting”, plastificante, desproteínización, desacetilación.

Tabla de contenido

Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Planteamiento del problema	1
1.1.1 Hipótesis.....	4
1.1.2 Preguntas de investigación	4
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo general.....	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	4
1.3 Alcance	5
1.4 Justificación.....	5
Capítulo 2. Marco referencial	6
Antecedentes	9
Capítulo 3. Metodología	9
3.1 Metodología seleccionada para la preparación de las películas	10
3.2 Extracción de los polisacáridos	10
3.2.1 Materiales y Métodos	13
3.2.1.1 Extracción de β -glucanos	13
3.2.1.2 Desproteínización	13
3.2.1.3 Desacetilación de la quitina	14
3.3 Fabricación de las películas a partir de los extractos obtenidos con β -glucanos y quitosano	14
Capítulo 4. Resultados	15
4.1 Extracción de los polisacáridos	15
4.2 Fabricación de las películas a partir de los extractos obtenidos con β -glucanos y quitosano	18
Capítulo 5. Análisis y discusión.	25
5.1 Metodología para la fabricación de películas a partir de β -glucanos y quitosano	25
5.2 Extracción de los polisacáridos	26
5.3 Fabricación de las películas a partir de los extractos obtenidos con β -glucanos y quitosano	28
Capítulo 6. Conclusiones y recomendaciones.....	29
Bibliografía	30

Índice de figuras

Figura 1 Estadísticas globales de producción y consumo de petróleo desde el año 2009 al 2013. Adaptado de EIA, 2014.	1
Figura 2 Producción global de plásticos desde el año 1950 al 2012. Adaptado de Plastics Europe-Association of plastics manufacturers, 2013.	2
Figura 3. Estructuras de las moléculas de β -glucanos, quitina y quitosano.	8
Figura 4. Etapas del proceso para la obtención de quitosano a partir de artrópodos y hongos (Chen et al., 2014; Kumari et al., 2015).....	11
Figura 5. Proceso de extracción de β -glucanos y quitosano.....	12
Figura 6. Diagrama del proceso realizado a escala de laboratorio para la extracción de β -glucanos y quitosano	15
Figura 7. Espectro infrarrojo comparativo entre (a) β -glucanos extraídos y (b) heptil- β -D-glucopiranosido	17
Figura 8. Espectro infrarrojo de (a) quitina comercial y (b) extracto de quitosano obtenido.....	18
Figura 9. Ensayo preliminar para la obtención de una película a partir de quitosano, β -glucanos y glicerina.....	19
Figura 10. Comparativo de formación de película.....	20
Figura 11. Resultados del diseño factorial con densidad superficial de 0.056 g/cm^2	22
Figura 12. Ensayo de tensión para la muestra 4 A.....	23

Índice de tablas

Tabla 1. Polímeros más comúnmente utilizados en empaques (Ebnesajjad 2012).....	3
Tabla 2. Peso seco por kilo de cuerpos fructíferos húmedos y porcentaje de humedad	16
Tabla 3. Porcentaje de β -glucanos y extracto con quitina contenidos en el cuerpo fructífero y porcentaje de extracto con quitosano obtenido a partir de la quitina extraída.....	17
Tabla 4. Niveles evaluados para quitosano, % β -glucanos y glicerina durante ensayo preliminar	18
Tabla 5. Promedio de área en recipientes	19
Tabla 6. Densidad superficial de sólidos para la formación de película	20
Tabla 7. Diseño factorial para fabricación de película, con densidad superficial de 0.056 g/cm^2	20
Tabla 8. Esfuerzo máximo y módulo de Young para la muestra 4 A.....	24
Tabla 9. Composición química de los cuerpos fructíferos del genero Pleurotus.....	27

Capítulo 1. Introducción

1.1 Planteamiento del problema

Durante toda la historia de la humanidad, los polímeros, han hecho parte importante de los materiales utilizados por el hombre en su vida diaria (Gerdeen y Rorrer 2012). Sin embargo, sólo desde finales del siglo XIX comenzó la era de los polímeros sintéticos (Sturchio *et al.*, 1993).

A partir del año 1850, con la invención del celuloide, hasta la actualidad se han desarrollado un sinnúmero de polímeros sintéticos, los cuales se derivan en su mayoría del petróleo y el gas natural, y pueden contener compuestos que incluyen cloro, nitrógeno o algunos solventes orgánicos tóxicos como el fenol y el formaldehído (American Chemical Society, 1993; American Chemistry Council, 2005; Gerdeen & Rorrer, 2012; Plastics Europe- Association of plastics manufacturers, 2013). Recursos como el petróleo y el gas natural son considerados como no renovables; la extracción y el procesamiento de estos tiene un gran impacto ambiental debido al amplio consumo de energía y agua para su extracción, disminución de fauna acuática debido a actividad sísmica por perforación de pozos petroleros en áreas oceánicas, contaminación acuífera por derrames de petróleo en altamar, alto consumo energético por el procesamiento del crudo, entre otros (Manning & Thompson, 1995; Fisheries Research Services, 2005; Simanzhenkov & Idem, 2005; Energy Information administration, 2009; Sinding-Larsen & Wellmer, 2012; Speight, 2014).

La Figura 1, muestra las estadísticas globales de producción y consumo de petróleo entre los años 2009 y 2013.

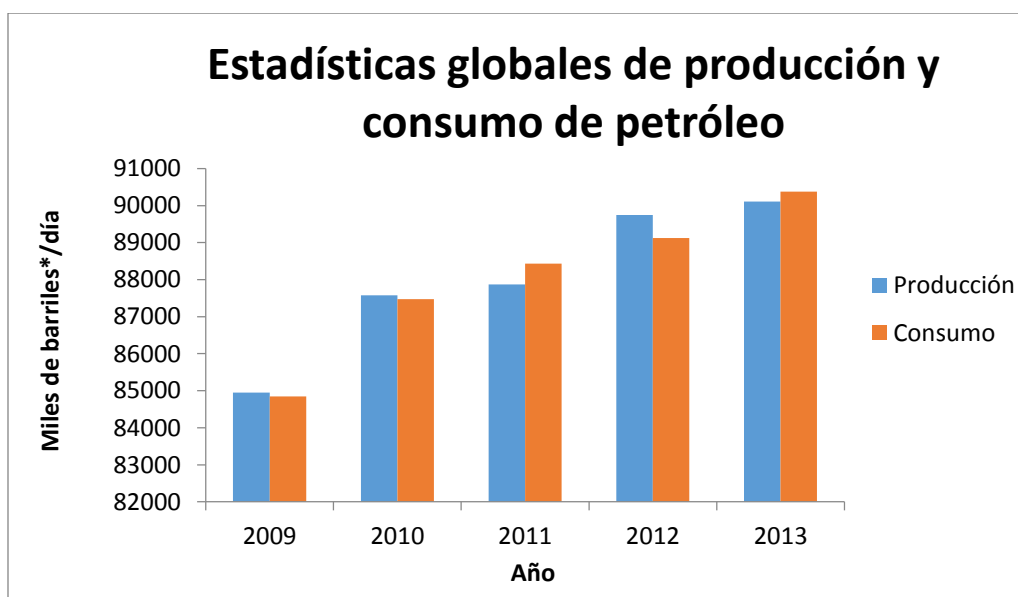


Figura 1 Estadísticas globales de producción y consumo de petróleo desde el año 2009 al 2013. Adaptado de EIA, 2014.

Los valores presentados anteriormente muestran una tendencia ascendente tanto en producción como en consumo del crudo en el mundo, donde en tan solo cuatro años se ha duplicado aproximadamente tanto el consumo como la producción de este. Así mismo se relaciona el aumento de los problemas relacionados al medio ambiente, de acuerdo con Lladó Fernández los hidrocarburos después de su combustión y en forma de crudo generan contaminación que puede afectar tanto la atmósfera como suelos y fuentes de agua, lo cual incrementa el impacto ambiental que esto tiene a nivel global. Debido a lo anterior, una disminución en el uso de estos puede representar en alguna medida una remediación al desequilibrio ambiental causado por el crudo y los hidrocarburos en general.

Según la Federación Británica de Plásticos el 96% del crudo procesado a nivel mundial es utilizado para transporte, energía y calentamiento, industria química y otros, y sólo el 4% restante es utilizado para la producción de plásticos (BPF 2008). Sin embargo, este 4% equivale a procesar aproximadamente 3'600.000 barriles de crudo al día, según el consumo de petróleo en el año 2013.

De acuerdo con lo reportado por Plastics Europe en el año 2013, la industria del plástico ha crecido significativamente desde la década de los años 50, como se muestra en la Figura 2.

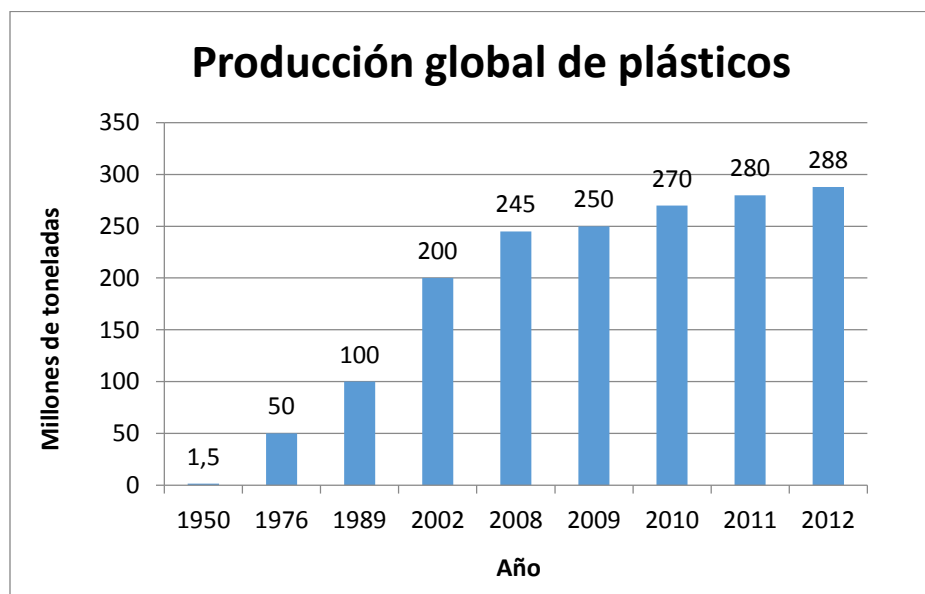


Figura 2 Producción global de plásticos desde el año 1950 al 2012. Adaptado de Plastics Europe- Association of plastics manufacturers, 2013.

Uno de los segmentos con mayor uso de plástico es en empaques y embalaje (American Chemistry Council, 2013; Plastics Europe- Association of plastics manufacturers, 2013), sin embargo los polímeros sintéticos que componen estos productos como por ejemplo el polietileno, polipropileno, poliestireno, PVC y PET son considerados como no biodegradables y su acumulación amenaza el equilibrio ambiental (Tokiwa *et al.*, 2009).

Dentro de los plásticos utilizados en empaques y embalaje, los polímeros más comunes son los que se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Polímeros más comúnmente utilizados en empaques (Ebnesajjad 2012).

Tipo de polímero	Acrónimo
Ácido acrílico de etileno	EAA
Etilacrilato de etileno	EEA
Metilacrilato de etileno	EMA
Vinilacetato de etileno	EVA
Alcohol vinílico de etileno	EVOH
Polietileno de alta densidad	HDPE
Polietileno lineal de baja densidad	LLDPE
Polietileno de baja densidad	LDPE
Poliamida (nylon 6,6)	PA-6,6
Polibutileno	PB
Policarbonato	PC
Polietilentereftalato	PET
Polipropileno	PP
Poliestireno	PS
Polivinil cloruro	PVC
Cloruro de ponilvinilideno	PVDC

A pesar de los múltiples beneficios que estos traen, su degradación es lenta y puede culminar en compuestos como peróxidos, aldehídos, ácidos carboxílicos, cetonas, amoníaco, monóxido de carbono, metano, benceno además de radicales libres (Wypych, 2012).

Adicional al impacto que tiene el crudo sobre el ambiente, es necesario hacer la observación del impacto que tiene el crudo sobre la economía. Este representa hoy en día uno de los activos más importantes de las economías a nivel global, debido a los múltiples derivados que se obtienen de él, así como el alto valor agregado que cada uno de ellos tiene. Economías que cuentan con mayor dominio de sus fuentes petroleras se encuentran actualmente en posiciones dirigentes en la economía global, sin embargo las predicciones que se hacen con respecto al consumo de las fuentes de crudo actuales calculan una rápida disminución de las fuentes disponibles. La disminución en la disponibilidad del petróleo causa además divisas constantemente cambiantes, desequilibrio en las proyecciones financieras y finalmente recesiones económicas (Nariño T. 2014).

Se ha encontrado que los hongos del género *Pleurotus* contienen polisacáridos que pueden comportarse en algunos casos como polímeros sintéticos (Teng *et al.*, 2001; Bayer *et al.*, 2008), con la ventaja de ser además biodegradables, por lo cual tienen un gran potencial de reemplazar a algunos polímeros sintéticos (Bayer *et al.*, 2008).

1.1.1 Hipótesis

Los polisacáridos presentes en el cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus pulmonarius* pueden emplearse para la fabricación de películas biodegradables con el potencial de reemplazar en algunas aplicaciones a polímeros sintéticos.

1.1.2 Preguntas de investigación

- ¿Cómo es una posible metodología de fabricación de películas biodegradables a partir de los polisacáridos presentes en el cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus pulmonarius*, en relación a posibles reemplazos de algunas aplicaciones de diferentes polímeros sintéticos?
- ¿Cómo extraer los polisacáridos presentes en el cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus pulmonarius* para la fabricación de películas biodegradables?
- ¿Es factible fabricar películas biodegradables a partir de los extractos obtenidos, como posible reemplazo a los polímeros sintéticos?

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar la factibilidad técnica de la fabricación de películas biodegradables a partir de los polisacáridos presentes en el cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus pulmonarius* como posibles reemplazos de algunas aplicaciones de polímeros sintéticos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar una metodología de fabricación de películas biodegradables a partir de los polisacáridos presentes en el cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus pulmonarius*, en relación a posibles reemplazos de algunas aplicaciones de diferentes polímeros sintéticos.
- Evaluar una metodología de extracción de los polisacáridos presentes en el cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus pulmonarius* para la fabricación de películas biodegradables.

- Evaluar la factibilidad de fabricar películas biodegradables a partir de los extractos obtenidos, como posible reemplazo a algunos polímeros sintéticos.

1.3 Alcance

Con la presente investigación se pretende evaluar la factibilidad de fabricación de películas biodegradables a partir de los polisacáridos presentes en el cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus pulmonarius*, debido a la facilidad y economía de cultivo de esta materia prima en Colombia, esperando que el producto resultante cuente con propiedades aptas para reemplazar algunas aplicaciones de diferentes polímeros sintéticos.

El enfoque del proyecto se basa en la evaluación de la influencia de los extractos obtenidos a partir del hongo sobre las propiedades del material resultante, de manera que este tenga la posibilidad de ser viable para aplicaciones en las que actualmente se utilizan polímeros sintéticos.

Con este proyecto se pretende establecer un estudio que sirva como base para aprovechar especies fúngicas de fácil cultivo en Colombia en productos alternativos a la industria alimenticia, de manera que además se desarrollen productos que sean compatibles con el medio ambiente durante toda su cadena de consumo y post-consumo. Si bien, la metodología de producción puede incurrir en procesos con algún tipo de impacto ambiental, se realizarán recomendaciones que ayuden a mejorar el proceso de producción en futuras investigaciones para disminuir riesgos ambientales y mejorar la calidad del producto a obtener. Se aclara que el proceso se iniciará con los cuerpos fructíferos del hongo como materia prima y no se profundizará en la parte de cultivo.

En este proyecto, se presenta un informe con los resultados obtenidos y sus respectivos análisis y discusión, se evalúa la influencia de los componentes del material producido sobre sus propiedades, y además se realizan propuestas de mejora para el proceso, de manera que el material producido pueda ser utilizado como alternativa a diferentes usos de polímeros sintéticos.

1.4 Justificación

Ambiental: De acuerdo a las fuentes bibliográficas indagadas, las películas producidas a partir de los polisacáridos tienen un menor impacto ambiental que los materiales empleados en la producción de polímeros sintéticos, gracias a que las materias primas necesarias para realizar el cultivo del hongo provienen de recursos naturales renovables, a diferencia de las materias primas provenientes del petróleo. Se ha observado que el procesamiento del crudo desde su extracción hasta la producción de los plásticos requiere un alto consumo energético (Energy Information Administration 2009), y se espera que la producción de este biomaterial tenga una diferencia significativa en cuanto a los requerimientos de energía para su procesamiento. Adicionalmente, según la literatura, las características de este biopolímero posibilitan la biodegradación en su disposición final, disminuyendo los riesgos de

contaminación en suelos, aguas y/o rellenos sanitarios (Mohanty *et al.*, 2002). Por lo anterior, se espera que esta investigación pueda ayudar a profundizar en el campo de materiales que sean compatibles con el medio ambiente durante toda su cadena de consumo, para incrementar las metodologías y fuentes de fabricación de materiales biodegradables que en un futuro tengan la posibilidad de sustituir los materiales derivados del petróleo.

Económica: Con este proyecto se puede brindar información importante a la empresa "Orellanas" para que esto sirva de base que ayude a aprovechar los subproductos generados como los hongos que no cumplen con los requerimientos de calidad durante la recolección y selección de cuerpos fructíferos, denominados por la empresa como "polvo de hongo", generando así valor agregado a un desecho industrial.

Académica: Mediante este proyecto se está impulsando el estudio de nuevos biomateriales; adicionalmente se están ampliando sus campos de aplicación y creando nuevos conocimientos en cuanto a la integración de diferentes saberes de una manera novedosa. Las materias relacionadas con este proyecto son biología, diseño de procesos, estadística y diseño de experimentos, información científica, ciencia de los materiales, química instrumental, diseño de productos químicos y biotecnológicos, operaciones biotecnológicas, química orgánica y ecología ambiental, las cuales permiten aplicar en gran parte lo aprendido durante el pregrado de Ingeniería de Procesos. Se espera que con los resultados de este proyecto se inicien proyectos relacionados con el área de biología, la cual presenta un gran interés en el trabajo con *Pleurotus pulmonarius* y el desarrollo de biomateriales a partir de esto, de acuerdo con los antecedentes propuestos.

Finalmente, gracias a este proyecto se podrá otorgar el título a una Ingeniera de Procesos.

Capítulo 2. Marco referencial

Cuando se habla de polímeros se hace referencia generalmente a materiales orgánicos derivados de reacciones de polimerización de diferentes monómeros (Vert *et al.*, 2012).

Los Polímeros, al igual que los metales y los cerámicos, constituyen una familia de materiales (Rosato *et al.*, 2004). Los polímeros se caracterizan por ser livianos, resistentes a agentes químicos, buenos aislantes térmicos y eléctricos, por tener la capacidad de ser procesados de diferentes maneras y de adquirir múltiples apariencias estéticas (American Chemistry Council 2005).

También pueden ser clasificados según sus variaciones respecto a la temperatura como termoplásticos, termoestables o elastómeros (Askeland & Phulé, 2004; Rosato *et al.*, 2004), aunque existen también clasificaciones según la familia química a la que pertenecen (Askeland & Phulé, 2004; ASTM, 2010). En el año 2010 la organización ASTM publicó la norma ASTM 7611-*Prácticas estándares para la codificación de artículos manufacturados en plástico para la identificación de resinas*, asignando un número de 1 a 7 correspondiente a una sigla según el tipo de polímero del cual esté hecho un artículo de consumo, esto

ayuda a la separación y reciclaje de aquellos polímeros que sean termoplásticos, puesto que los termoestables y los elastómeros no tienen la capacidad de ser reprocesados (Askeland y Phulé 2004).

Varios polímeros sintéticos pueden ser transformados en películas plásticas a través de diferentes métodos de transformación, dentro de estos los más utilizados a escala industrial son extrusión, moldeo por soplado, calandrado y “fundición” en solvente o por dispersión (McKeen, Production of films, 2012; Felton, 2013). Las películas plásticas se caracterizan por tener algunas de las siguientes características: flexibilidad, resistencia a la tracción, resistencia al impacto, resistencia al desgarro, resistencia a la temperatura, transparencia, resistencia a la abrasión, resistencia química, buena adherencia, estabilidad, degradabilidad e impermeabilidad; además de las anteriores pueden tener la capacidad de pigmentarse, no poseer aroma ni sabor, ser termoformables y poseer propiedades dieléctricas (Headly Pratt Consulting, 1996; Wagner Jr., 2010; McKeen, Introduction to the Properties of Plastic and Elastomer Films, 2012). Las aplicaciones más generales de las películas plásticas son como barreras ya sea en empaques, cubrimientos o guantes (McKeen, Uses of barrier films 2012). Dentro de las diferentes industrias se encuentran múltiples aplicaciones. En construcción, por ejemplo, como barreras de vapor, impermeabilizaciones, revestimientos de suelos y cubiertas (Dietz 2003), en impresiones para plastificado de papeles (Gómez Galán 2013), en agricultura para acolchados de cultivos (Grupo de cultivos hortícolas- Dirección de producción y protección vegetal, 2002), en la industria alimenticia como empaques (Wagner Jr., 2010, Ebnesajjad 2012), entre otros.

Con el fin de seleccionar el material apropiado para determinada aplicación de las películas plásticas, se tienen en cuenta dos tipos de propiedades principales: propiedades de barrera y propiedades mecánicas, ya que son las propiedades funcionales. Dentro de las propiedades mecánicas más importantes está la resistencia a la tracción, ya que materiales con muy poca resistencia no podrán ser fácilmente manejables a escala industrial (Wagner Jr., 2010; Ebnesajjad, 2012).

A pesar de los diversos beneficios que tienen los polímeros sintéticos en la actualidad, son crecientes las preocupaciones relacionadas a su uso; su degradación es lenta y puede tardar entre 100 y 1000 años, la dificultad para reciclar gran parte de estos materiales está generando una significativa acumulación de estos en rellenos sanitarios, mares y océanos (Téllez Maldonado 2012), mayormente las materias primas utilizadas en la producción de diversos polímeros sintéticos son recursos no renovables como el petróleo, gas natural o algunos solventes orgánicos tóxicos como el fenol y el formaldehído (American Chemical Society, 1993; American Chemistry Council, 2005; Gerdeen & Rorrer, 2012; Plastics Europe- Association of plastics manufacturers, 2013). Además de la acumulación de residuos en ambientes marinos, existen también contaminaciones relacionadas con derrames de petróleo en fuentes hídricas, lo cual causa muerte de los organismos por asfixia, aumento de infecciones en las especies, disminución de la reproducción y propagación de flora y fauna, incorporación de agentes cancerígenos en la cadena alimenticia, entre otros (Njobuenwu & Millionaire Abowei, 2008).

Sin embargo, se han desarrollado materiales biopoliméricos a partir de recursos en su mayoría renovables (Chang *et al.*, 2006; Bayer *et al.*, 2008; Gerdeen & Rorrer, 2012). En materiales denominados “Eco-composites” o “Green composites”, se ha profundizado en la utilización de estos; algunos ejemplos son el ácido poliláctico (PLA), polihidroxibutirato (PHB), polisacáridos de origen vegetal, celulosa,

alginatos y quitina, además de algunas proteínas (Mantia & Morreale, 2011; Dicker *et al.*, 2014). Según el estándar EN 13432 estos materiales son biodegradables, una cualidad deseada para prevenir la acumulación de desechos sólidos provenientes de productos de corta vida útil y se han estado desarrollando hace algún tiempo, debido al gran impacto ambiental que representa el consumo del petróleo y sus derivados (Dicker *et al.*, 2014).

Se ha encontrado que las diferentes especies de macromycetes del género *Pleurotus* tienen en la composición de su pared celular principalmente quitina, hemicelulosa, mananos y β -glucanos, lo cual los hace fuente de polisacáridos aptos para usar como componentes de diferentes materiales, gracias a sus cadenas poliméricas (Smiderle *et al.*, 2012; Badole & Bodhankar, 2013).

Las estructuras de las moléculas de β -glucanos, quitina y su derivado, quitosano se muestran en la Figura 3 a continuación:

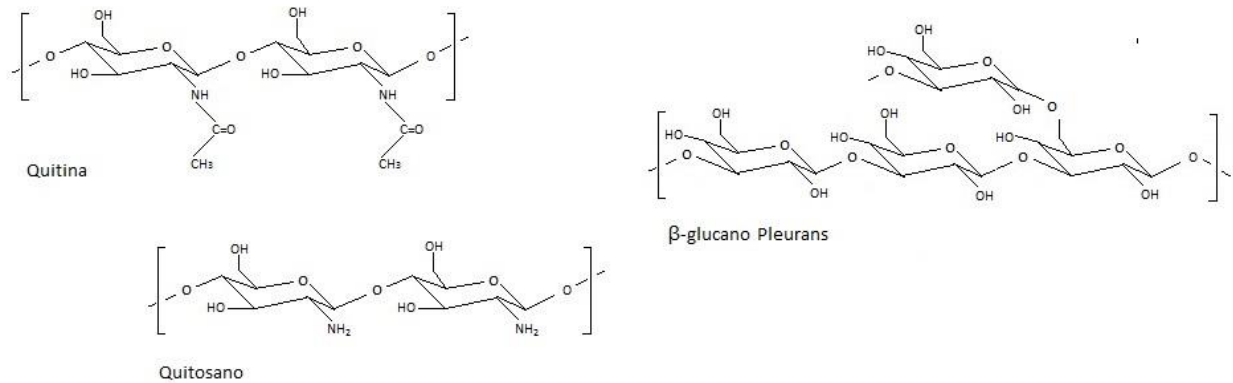


Figura 3. Estructuras de las moléculas de β -glucanos, quitina y quitosano.

Los hongos cuentan con diversas cualidades que han servido de inspiración para los inventores Eben Bayer, Gavin McIntyre además de otros investigadores colaboradores, quienes han desarrollado diferentes métodos para la obtención de un tipo de material producido a partir de diferentes macromycetes. Dicho material es viable para el reemplazo de espumas de polímeros expandidos (a base de petróleo), las cuales no son biodegradables. Entre los beneficios que presentan los hongos están su rápido crecimiento, alta bio-eficiencia, síntesis de múltiples sustratos, pared celular fuerte, y en el caso de los hongos filamentosos, su rápida colonización y penetración del sustrato. Las aplicaciones del desarrollo logrado por estos investigadores también permite el reemplazo de materiales a base de componentes vegetales, los cuales requieren el uso de fertilizantes, grandes áreas de suelo para cultivo, largo tiempo de producción y otros cuidados que incrementan los costos de obtención del material (Stoller, 1974; Bayer *et al.*, 2008).

Antecedentes

En el año 2008 los inventores Eben Bayer, Gavin McIntyre y Burt L. Swersey patentaron un método desarrollado para fabricar materiales cultivados a partir de partículas discretas interconectadas con el micelio de un hongo filamentoso determinado, preferiblemente seleccionado de los filos *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes*, *Oomycetes*, *Zygomycetes* y *Ascomycetes*. Entre el grupo de géneros más opcionados para el desarrollo del método se encuentra el género *Pleurotus* (Bayer *et al.*, 2008), que se caracteriza por tener una pared celular compuesta mayormente por glicoproteínas, quitina y β -glucanos (Facchini *et al.*, 2014), los cuales favorecen la baja difusividad de agua a través de sus cadenas poliméricas (Ying *et al.*, 2013). El material obtenido por esta metodología ha servido como reemplazo, principalmente de espumas de poliestireno (poliestireno expandido), en los sectores de empaque, aislamiento, automotriz, materiales estructurales, entre otros (Ecovative Design 2015)

En dicho método se utiliza la plastificación con glicerol como parte de la obtención del material (Bayer *et al.*, 2008). La plastificación se describe como la incorporación de compuestos de bajo peso molecular en las cadenas poliméricas de diferentes compuestos para modificar propiedades del material, tales como la elasticidad, temperatura de transición vítrea, resistencia a la tracción, entre otras (Immergut & Mark, 1965; Chang *et al.*, 2006).

De acuerdo con las características de la quitina presente en los hongos del género *Pleurotus*, se observó que es necesario tener afinidad química entre esta y el glicerol para su plastificación, por la baja solubilidad que tiene la quitina en diferentes solventes debido al acetyl presente en cada unidad monomérica. Por lo anterior, se realiza una desacetilación de la quitina para transformarla en quitosano, compuesto mayormente soluble en diluciones acuosas y con capacidad de formación de películas (Mármol *et al.*, 2011; Motta de Moura *et al.*, 2011).

Según las investigaciones realizadas por Chang *et al.* en el año 2006, Ifuku *et al.* en el año 2014 y Lopez *et al.* en el año 2014, se han desarrollado películas plastificadas biodegradables a partir de polisacáridos. Entre los polisacáridos más comunes están el almidón y la quitina, la cual en su mayoría es proveniente de desechos de la industria pesquera.

El presente trabajo de grado pretende evaluar la factibilidad del uso de los polisacáridos presentes en la especie *Pleurotus pulmonarius* para la fabricación de un film que tenga propiedades presentes en los materiales plásticos, de manera que se aproveche la biodiversidad colombiana para desarrollar un producto con valor agregado que tenga el potencial de reemplazar algunas aplicaciones de algunos polímeros sintéticos, puesto que se ha encontrado poca información en la literatura acerca del uso de estos polisacáridos provenientes de especies fúngicas en aplicaciones de materiales.

Capítulo 3. Metodología

Los experimentos fueron llevados a cabo en los laboratorios de química orgánica, química instrumental, procesos biotecnológicos y de materiales de la Universidad EAFIT.

3.1 Metodología seleccionada para la preparación de las películas

Para la preparación de la solución de polisacáridos se mezclan a 80°C, en una plancha de calentamiento, el quitosano y los β -glucanos (Pleurans) en una solución de ácido acético al 2% (v/v); posteriormente se adiciona la cantidad correspondiente (5, 12.5 y 20% $w_{\text{Gli}}/w_{\text{Polisacáridos}}$) de glicerina (87%, Panreac). La solución formada se deja en agitación hasta que todos los sólidos sean disueltos. Para la formación de la película se vierte una cantidad estándar de solución (10 ml) en los moldes, previamente tratados con un agente desmoldante. Las películas son secadas al horno a 40°C durante 8h y posteriormente mantenidas a temperatura ambiente durante 48h en un desecador para obtener estabilidad.

3.2 Extracción de los polisacáridos

Existen diferentes fuentes de quitina a partir de organismos vivos, estas fuentes pueden ser organismos marinos, insectos u hongos principalmente, sin embargo la fuente mayormente utilizada para su obtención son los exoesqueletos de animales marinos como cangrejos, camarones, langostas, entre otros subproductos de la industria pesquera. La quitina es utilizada en diferentes aplicaciones, pero por su facilidad de procesamiento y disolución, se emplea generalmente en su forma desacetilada llamada quitosano (Teng *et al.*, 2001; Muzzarelli *et al.*, 2012).

La quitina asociada tanto a artrópodos como hongos, viene de alguna manera ligada a otros compuestos, ya sean minerales, proteínas y/o polisacáridos adicionales (Chen *et al.*, 2014; Kumari *et al.*, 2015). Para la purificación de la quitina y su posterior obtención de quitosano, se utilizan los siguientes pasos:

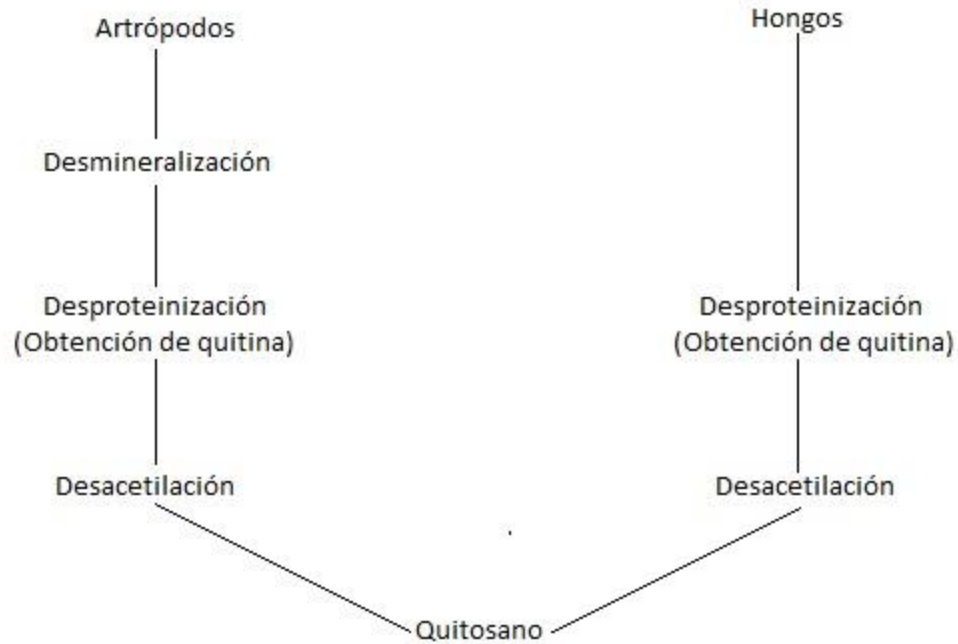


Figura 4. Etapas del proceso para la obtención de quitosano a partir de artrópodos y hongos (Chen et al., 2014; Kumari et al., 2015)

Con el fin de obtener los polisacáridos presentes en el cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus pulmonarius*, se deben realizar varias etapas de hidrólisis alcalinas debido a las interacciones moleculares entre los compuestos que forman parte de la pared celular del hongo. La Figura 5 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** presentada a continuación, muestra el diagrama de flujo de bloques que describe el proceso de extracción de los polisacáridos de interés.

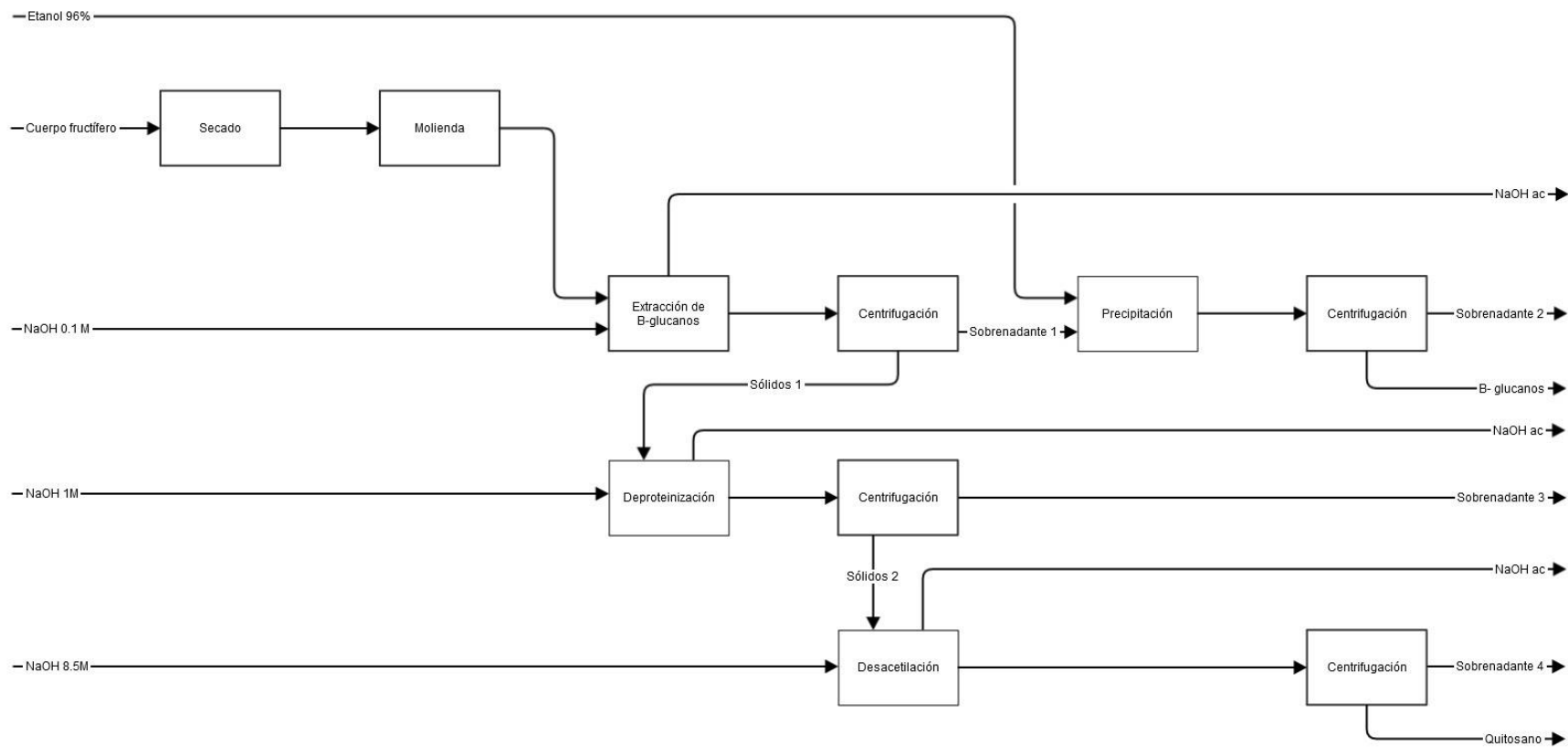


Figura 5. Proceso de extracción de β -glucanos y quitosano

3.2.1 Materiales y Métodos

3.2.1.1 Extracción de β -glucanos

Extracción

Para la extracción de los β -glucanos a partir de los cuerpos fructíferos del hongo *Pleurotus pulmonarius* (cortesía de la compañía Orellanas S.A), estos fueron completamente secados utilizando un horno de convección forzada (Jeio Tech OF-02G) a 45°C por 24 h en una bandeja de aluminio. Posteriormente, los cuerpos fructíferos deshidratados fueron molidos para obtener el hongo pulverizado. El polvo obtenido se llevó a ebullición a 100°C con agitación constante por 30 minutos en una solución 0.1M NaOH, utilizando una plancha de calentamiento (CORNING PC-420D) acondicionada dentro de una campana de extracción (C4 C180X).

Luego de finalizar la extracción, la mezcla fue enfriada a temperatura ambiente y posteriormente centrifugada en tubos falcon de 50 ml por 1 h a 5000 rpm en una centrifuga (Universal 32R GTTH). Se recolectó el sobrenadante resultante en un beaker y fue guardado hasta la etapa de precipitación, mientras los sólidos fueron removidos y refrigerados hasta su posterior uso.

Precipitación

El volumen obtenido de sobrenadante se precipitó utilizando una proporción 3:1 de etanol 96% con respecto al sobrenadante, lo cual después se refrigeró a 4°C durante 18 horas. Los β -glucanos precipitados fueron centrifugados en tubos falcon de 50 ml por 40 minutos a 5000 rpm para asegurar la separación de los sólidos. El sobrenadante resultante fue descartado, mientras los sólidos fueron recuperados y secados en un horno de convección a 50°C por 24 h.

3.2.1.2 Desproteínización

La desproteínización fue llevada a cabo dentro de una campana de extracción, en la cual se adecuó una plancha de calentamiento para mantener la temperatura de la mezcla (1:10 w/v proporción de sólidos obtenidos durante la extracción de β -glucanos con respecto a una solución 1M NaOH) a 65°C con agitación fuerte por 2 h.

Al terminar la desproteínización, la mezcla fue enfriada a temperatura ambiente y posteriormente centrifugada en tubos falcon de 50 ml por 1 h a 5000 rpm en una centrifuga (universal 32R GTTH). El sobrenadante fue descartado y los sólidos refrigerados hasta su posterior uso.

3.2.1.3 Desacetilación de la quitina

Desacetilación

La Desacetilación de la quitina fue llevada a cabo a 115°C en una campana de extracción, en donde se adecuó una plancha de calentamiento con la cual se mantuvo agitación fuerte y constante de la mezcla de sólidos obtenidos luego de la desproteínización junto con una solución 8.5M de NaOH a razón de 1:20 durante 4.5 h. Al finalizar esta etapa, los sólidos obtenidos luego de centrifugación por 1 h a 5000 rpm en tubos falcon de 50 ml fueron recuperados para posterior uso.

Neutralización

Para los sólidos obtenidos después de la etapa de Desacetilación, fue necesario realizar lavados con agua municipal para remover el exceso de NaOH y neutralizar el pH de los sólidos en solución acuosa con ácido acético 33% hasta un valor aproximado de 7.5, lo cual mejoró la solubilidad del quitosano.

3.3 Fabricación de las películas a partir de los extractos obtenidos con β -glucanos y quitosano

Para la fabricación de las películas a evaluar, se utilizó la metodología propuesta en el numeral 3.1. Adicionalmente, para la solubilización del quitosano obtenido después de la desacetilación, fue necesario realizar una dilución acuosa a 80°C con agitación fuerte (1000 rpm) en una plancha de calentamiento, ajustando el pH a un valor de 6.5 con ácido acético 33% v/v; posteriormente se adicionaron los β -glucanos y la glicerina.

Capítulo 4. Resultados

4.1 Extracción de los polisacáridos

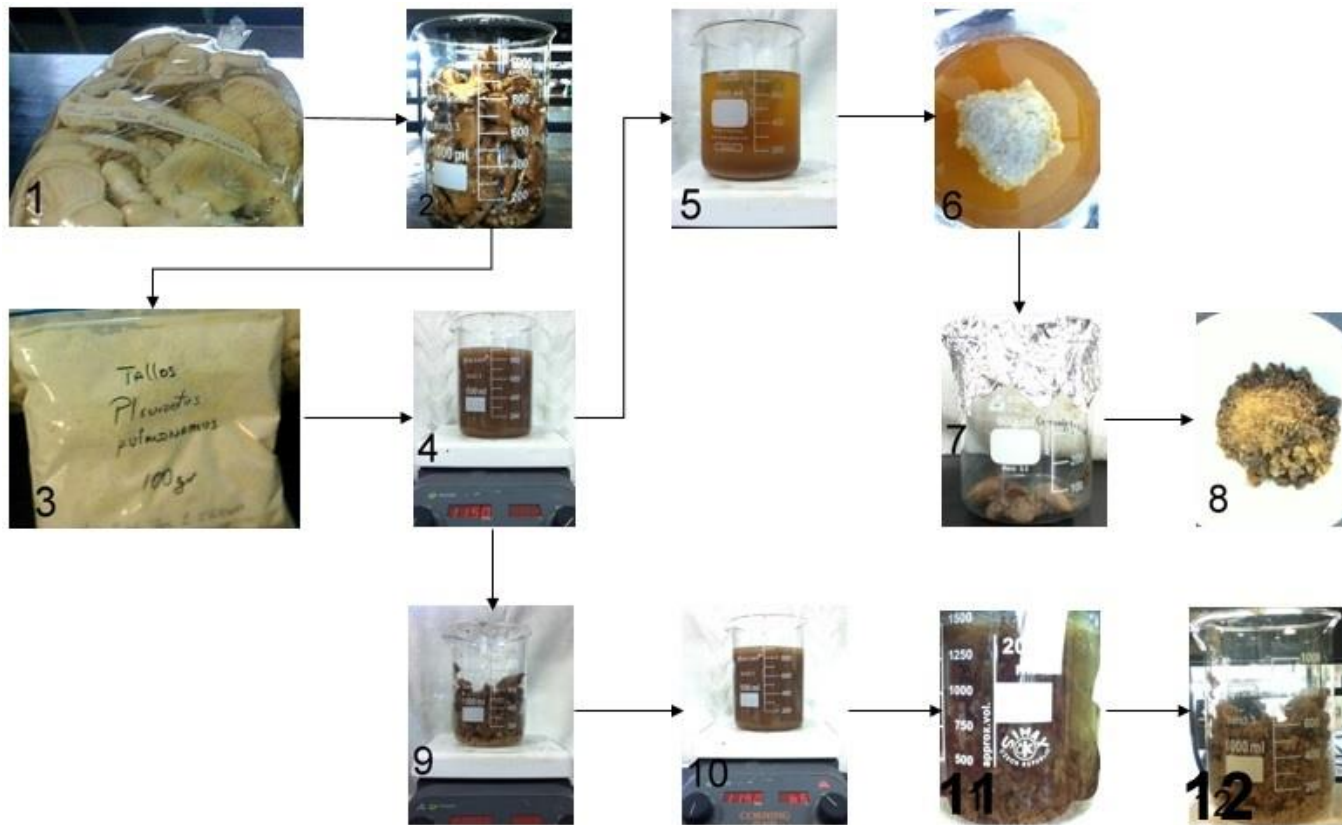


Figura 6. Diagrama del proceso realizado a escala de laboratorio para la extracción de β -glucanos y quitosano

En la Figura 6 se muestran las imágenes del procesamiento de los cuerpos fructíferos y sus correspondientes etapas, las cuales son:

1. Cuerpos fructíferos frescos
2. Cuerpos fructíferos secos
3. Cuerpos fructíferos pulverizados
4. Extracción de β -glucanos
5. Sobrenadante obtenido de la extracción de β -glucanos
6. β -glucanos precipitados
7. β -glucanos húmedos
8. β -glucanos secos y pulverizados
9. Sólidos obtenidos de la extracción de β -glucanos
10. Desproteínezación
11. Desacetilación
12. Extracto con quitosano

En la Tabla 2 se muestran el peso seco con el respectivo porcentaje de humedad contenido en los cuerpos fructíferos frescos de *Pleurotus pulmonarius*. La Tabla 3 presenta los porcentajes de β -glucanos y quitina contenidos en los cuerpos fructíferos secos y el rendimiento del extracto con quitosano, obtenido a partir del extracto con quitina; dichos valores fueron obtenidos midiendo el peso seco de los extractos mencionados y aplicando las siguientes ecuaciones.

$$\% \beta - \text{glucanos en cuerpos fructíferos} = \frac{\text{Peso seco } \beta\text{-glucanos}}{\text{Peso seco de cuerpos fructíferos}} * 100 \quad [1]$$

$$\% \text{ Extracto con quitina en cuerpos fructíferos} = \frac{\text{Peso seco extracto con quitina}}{\text{Peso seco de cuerpos fructíferos}} * 100 \quad [2]$$

$$\% \text{ Extracto con quitosano a partir de extracto de quitina} = \frac{\text{Peso seco extracto con quitosano}}{\text{Peso seco extracto con quitina}} * 100 \quad [3]$$

Tabla 2. Peso seco por kilo de cuerpos fructíferos húmedos y porcentaje de humedad

Peso húmedo de cuerpos fructíferos (g)	Peso seco de cuerpos fructíferos (g)	% Humedad de cuerpos fructíferos
1000	84	91.6

Tabla 3. Porcentaje de β -glucanos y extracto con quitina contenidos en el cuerpo fructífero y porcentaje de extracto con quitosano obtenido a partir de la quitina extraída

% β -glucanos en cuerpos fructíferos	% Extracto con quitina en cuerpos fructíferos	% Extracto con quitosano a partir de extracto de quitina
3.36	73.77	94.89

Los espectros infrarrojos a continuación muestran la transmitancia de grupos funcionales o enlaces moleculares específicos para los compuestos presentes en los extractos con β -glucanos y quitosano respectivamente, además de moléculas de referencia para la comparación de la pureza de los extractos.

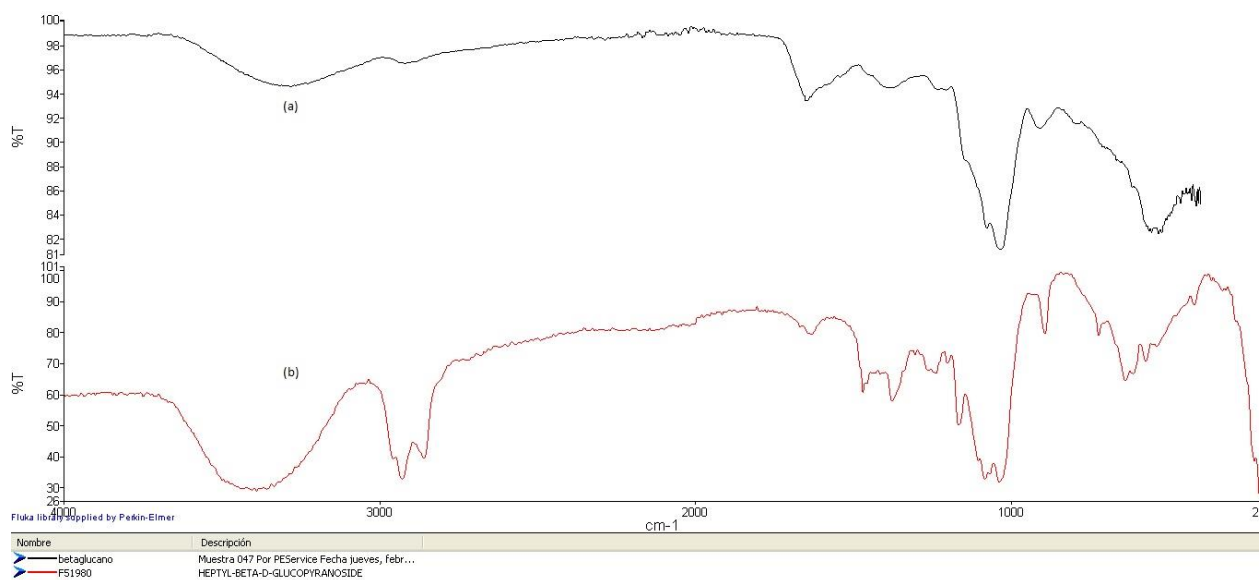


Figura 7. Espectro infrarrojo comparativo entre (a) β -glucanos extraídos y (b) heptil- β -D-glucopiranosido

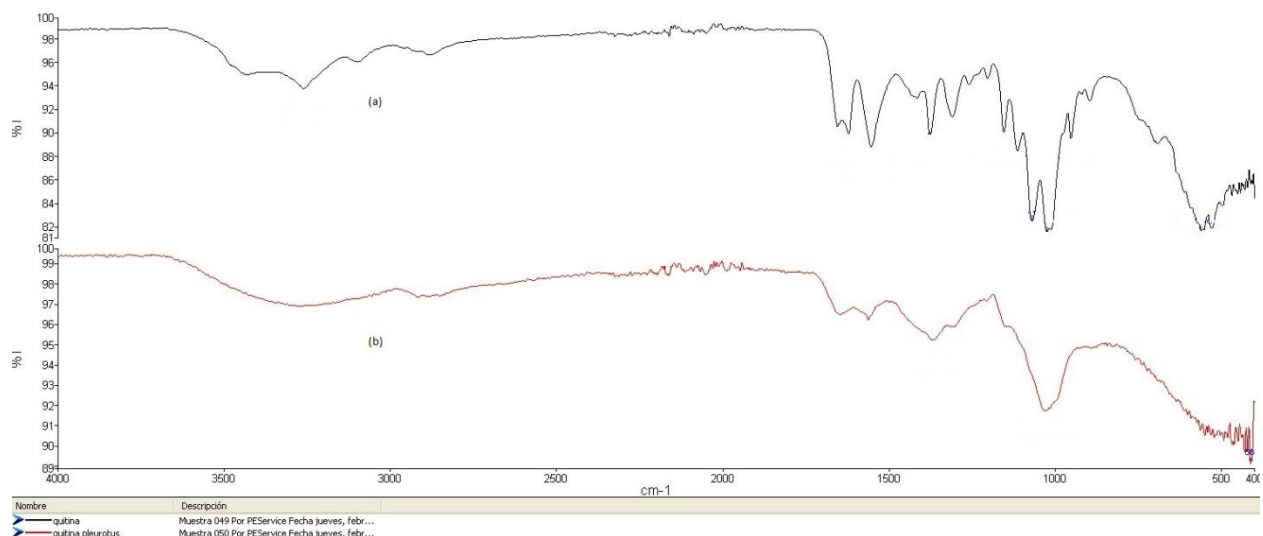


Figura 8. Espectro infrarrojo de (a) quitina comercial y (b) extracto de quitosano obtenido

4.2 Fabricación de las películas a partir de los extractos obtenidos con β -glucanos y quitosano

En la Figura 9 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se pueden observar las películas obtenidas durante un ensayo preliminar con diferentes mezclas de quitosano, β -glucanos y glicerina. Los niveles de cada factor se muestran a continuación:

Tabla 4. Niveles evaluados para quitosano, % β -glucanos y glicerina durante ensayo preliminar

Corrida	% β -glucanos	% quitosano	% glicerina en polisacáridos
1	20	80	5
2	13.5	86.5	5
3	7	93	5
4	20	80	12.5
5	13.5	86.5	12.5
6	7	93	12.5
7	20	80	20
8	13.5	86.5	20
9	7	93	20

Los valores evaluados para el quitosano y los % β -glucanos, fueron calculados en base a un rango de quitosano y β -glucanos en solución de 12-15% y 1-3% respectivamente, seleccionados según datos encontrados en Salarbashi *et al.*, 2013; Tajik *et al.*, 2013; Ifuku *et al.*, 2014 y Shankar *et al.*, 2015.

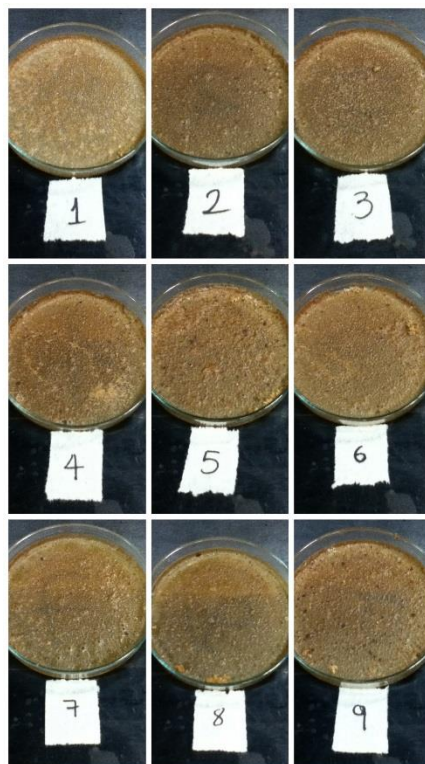


Figura 9. Ensayo preliminar para la obtención de una película a partir de quitosano, β -glucanos y glicerina

De acuerdo con los resultados obtenidos en este ensayo, se observó que las películas aún tenían un comportamiento rígido, frágil y de alta adherencia al molde, puesto que no fue posible obtener fracciones completas de alguna de estas muestras.

Según lo anterior, y para disminuir la cantidad de polisacáridos en solución necesarios para la formación de película, se evaluaron diferentes densidades superficiales. Primero se realizó un promedio de áreas de las cajas Petri en las cuales se evaluaría dicha formación. A continuación se muestra un promedio del área de los recipientes:

Tabla 5. Promedio de área en recipientes

Recipiente	1	2	3	Promedio
Área (cm ²)	18.86	16.62	18.25	17.91

En la Tabla 6 se muestran los valores evaluados para determinar la cantidad mínima de polisacáridos en solución con formación de película, de manera que se trabaje con la menor cantidad de recursos, debido a la disponibilidad limitada del material. Para esta evaluación se utilizó únicamente el extracto con quitosano como polisacárido base, donde la formación de película fue determinada por la cohesión de las partículas como se muestra en la Figura 10. **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** La imagen de la izquierda muestra un recipiente con partículas con muy baja cohesión, mientras la imagen de la derecha presenta una mayor cohesión, formando una película frágil.

Tabla 6. Densidad superficial de sólidos para la formación de película

Concentración de quitosano (g/ml)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.075	0.1
Densidad superficial (g/cm²)	0.006	0.011	0.017	0.022	0.028	0.042	0.056
Formación de film	No	No	No	No	No	No	Si

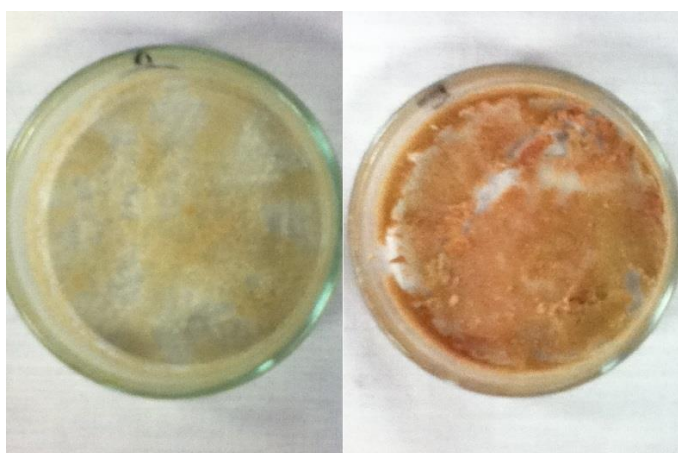


Figura 10. Comparativo de formación de película

Para evaluar el efecto de cada uno de los componentes de la mezcla, se realizó un diseño factorial en el cual se seleccionaron los niveles de cada factor de acuerdo con ensayos preliminares como se muestra en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7. Diseño factorial para fabricación de película, con densidad superficial de 0.056 g/cm²

Corrida	% β-glucanos	% quitosano	% glicerina en polisacáridos
----------------	---------------------	--------------------	-------------------------------------

1 A	30	70	5
1 B	30	70	5
2 A	30	70	12.5
2 B	30	70	12.5
3 A	30	70	20
3 B	30	70	20
4 A	50	50	5
4 B	50	50	5
5 A	50	50	12.5
5 B	50	50	12.5
6 A	50	50	20
6 B	50	50	20
7 A	70	30	5
7 B	70	30	5
8 A	70	30	12.5
8 B	70	30	12.5
9 A	70	30	20
9 B	70	30	20

En la Figura 11 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran los resultados del anterior diseño factorial. Después de ser retiradas del horno, las muestras aún presentaban una superficie un poco viscosa al tacto. Adicionalmente como se puede observar en las imágenes, las muestras 1 B, 2 A, 2 B, 4 B, 5 A, 5 B, 6 B, 7 A, 7 B, 8 A, 8 B, 9 A y 9 B presentaron alto agrietamiento, impidiendo así la formación de películas.

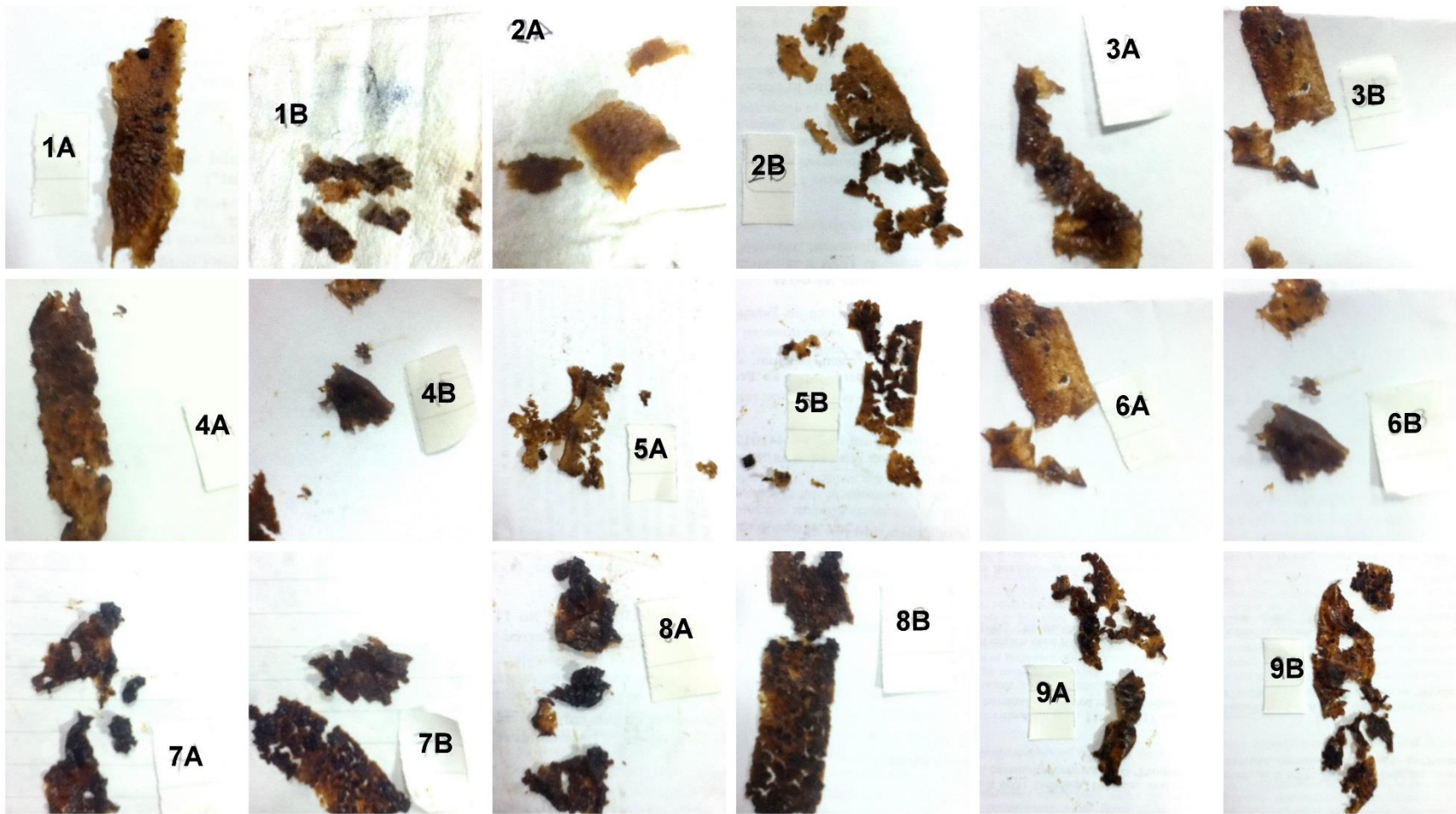


Figura 11. Resultados del diseño factorial con densidad superficial de 0.056 g/cm^2

Después de 48h de estabilización a temperatura ambiente en el desecador, se realizó un ensayo de tensión a la muestra 4 A en la máquina de ensayos universales INSTRON 3366, debido a que fue la única que contó con los requerimientos para su medición (resistencia a la tracción durante manipulación, espesor mínimo: 1 mm, altura mínima: 100 mm y amplitud mínima: 20 mm). El resultado de dicha medición se puede observar en la Figura 12 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y sus resultados y correspondiente modelo de cálculo se pueden observar a continuación.

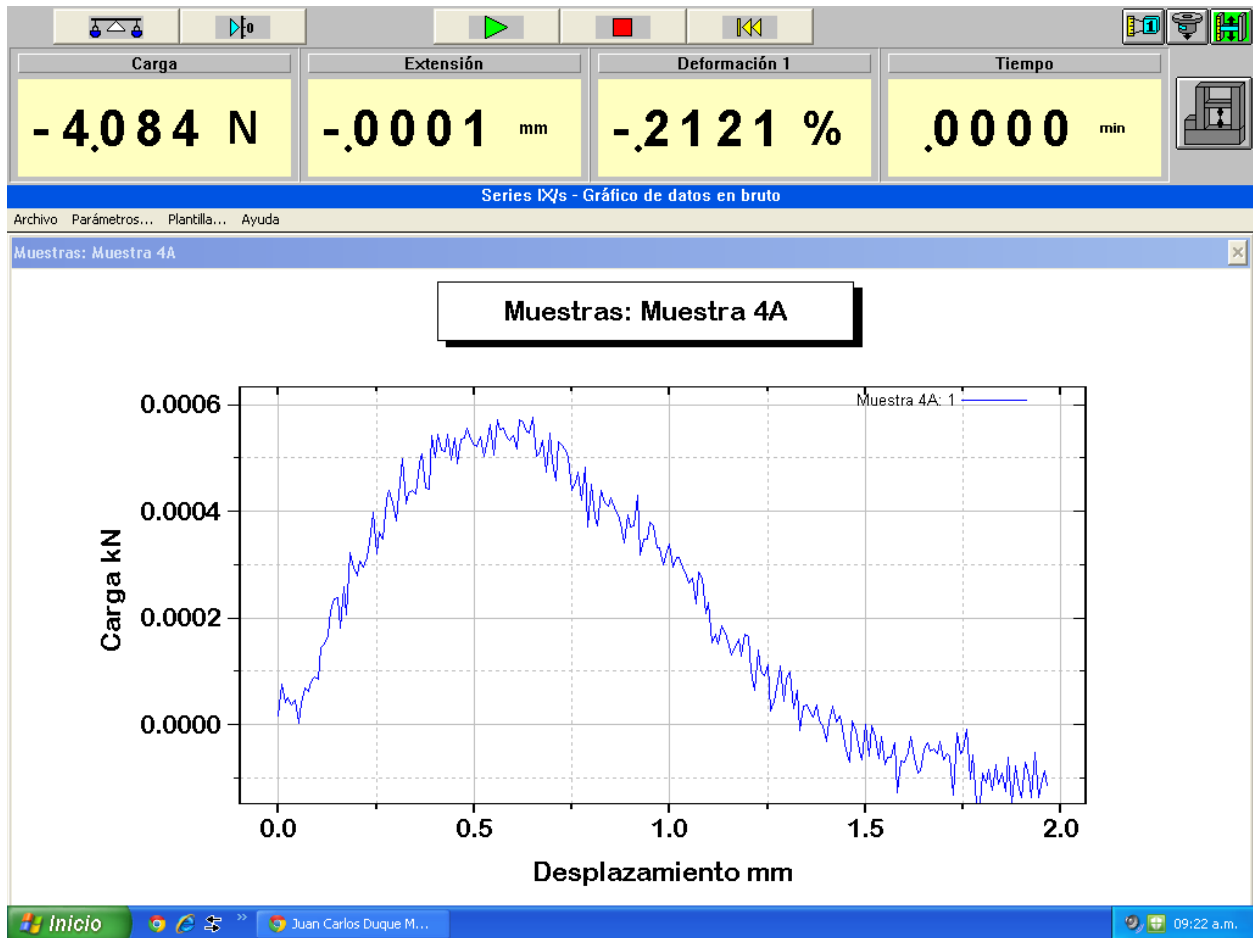


Figura 12. Ensayo de tensión para la muestra 4 A

Modelo de cálculo

A continuación se muestra el modelo de cálculo para el módulo de Young de la muestra 4 A.

$$\text{Área transversal de la muestra} = \text{Ancho de la muestra} * \text{Grosor de la muestra} \quad [4]$$

$$\varepsilon = \frac{\text{Extensión en el punto de carga máxima}}{\text{Longitud de la muestra}} \quad [5]$$

$$\sigma = \frac{\text{Carga máxima}}{\text{Área transversal de la muestra}} \quad [6]$$

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad [7]$$

En la Tabla 8 se muestran los resultados de los cálculos anteriores.

Tabla 8. Esfuerzo máximo y módulo de Young para la muestra 4 A

Longitud de la muestra [mm]	80.000
Ancho de la muestra [mm]	20.000
Grosor de la muestra [mm]	1.000
Área transversal de la muestra [mm ²]	20.000
Extensión en el punto de carga máxima [mm]	0.650
Carga máxima [N]	0.577
Deformación (ε)	0.008
Esfuerzo (σ)	0.029
Módulo de Young (E) [N/mm ²]	3.551

Capítulo 5. Análisis y discusión.

5.1 Metodología para la fabricación de películas a partir de β -glucanos y quitosano

Actualmente para la producción de películas poliméricas, se utilizan las siguientes técnicas: extrusión, extrusión con soplado, “solvent casting”, laminación, extrusión, extrusión en frío, moldeo por inyección, moldeo por soplado, moldeo por rotación, hilado, termoformado, “electrospinning” y “foaming” (Wypych, 2012). De las anteriores técnicas para la producción de polisacáridos se utilizan más comúnmente la termo compresión (Epure *et al.*, 2011; Qiao *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2014) y “solvent casting”, el cual se trata de la dilución de los polímeros, en este caso los polisacáridos, para luego ser vertidos en un recipiente en donde al secarse se formará la película deseada; este método presenta beneficios como: fácil preparación de la solución, esparcimiento homogéneo de las partículas en el molde, capacidad de fabricar cualquier forma de acuerdo con el molde utilizado y posibilidad de obtener grosores de película más finos y variados que mediante otros métodos (Sriupayo *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2006; Cerqueira *et al.*, 2012; Salarbashi *et al.*, 2013; Tajik *et al.*, 2013; Ifuku *et al.*, 2014; Shankar *et al.*, 2015).

Los β -glucanos se han reportado como parcialmente solubles en agua, de acuerdo a su grado de polimerización, puesto que β -glucanos con un grado de polimerización mayor a 100 son completamente insolubles en agua; por lo anterior, es necesario calentar la solución acuosa, de manera que al romperse las cadenas de manera aleatoria se disminuya el grado de polimerización de estos polisacáridos y se aumente así su solubilidad (Karacsonyi & Kuniak, 1994; Lam & Cheung, 2014; Zhu *et al.*, 2015). Por otra parte, la solubilidad del quitosano también se da bajo condiciones especiales, generalmente en diluciones acuosas de ácidos orgánicos (Shahidi & Abuzaytoun, 2005); valores utilizados en la literatura varían entre 1.5-3% v/v (Sriupayo *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2006; Cerqueira *et al.*, 2012; Salarbashi *et al.*, 2013; Tajik *et al.*, 2013; Ifuku *et al.*, 2014; Shankar *et al.*, 2015). Estas ayudas para la solubilización de los polisacáridos se deben a las cargas netas de las moléculas de estos polímeros, que pueden ser equilibradas con la disminución del peso molecular y la disminución del pH (Harris & Angal, 1989).

A pesar de las propiedades del quitosano y los β -glucanos para formar películas, las estructuras y fuerzas intermoleculares de estos polímeros hacen que se obtengan materiales rígidos y frágiles (Motta de Moura *et al.*, 2011; Muzzarelli *et al.*, 2012; Ying *et al.*, 2013). Los plastificantes son sustancias molecularmente más pequeñas que los polímeros, utilizadas para crear espacios libres entre las cadenas poliméricas, disminuyendo las fuerzas intermoleculares como fuerzas de van der Waals y los puentes de hidrógeno; con el aumento del espacio intermolecular, las cadenas de los polisacáridos pueden tener mayor movimiento y rotación de los carbonos de la molécula, dotándola con propiedades de un material plástico al disminuir su fragilidad y aumentar su elasticidad (University of Cambridge, 2010; Epure *et al.*, 2011).

En un estudio realizado por Matet *et al.* en el año 2013, se evaluaron diferentes polioles como plastificantes del quitosano para producir un material termoplástico, entre los que se encontraban el glicerol, xilitol y sorbitol. De los anteriores polioles, aquel con mejores resultados fue el glicerol. Por lo

anterior, este fue seleccionado como plastificante para esta investigación, además de su baja volatilidad, disponibilidad y eficiencia como plastificante (Fishman *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2006; Epure *et al.*, 2011; Qiao *et al.*, 2011; Cerqueira *et al.*, 2012; Dean *et al.*, 2013; Ifuku *et al.*, 2014; Matet *et al.*, 2015). En el año 2013, una investigación conducida por Liu *et al.* evaluó la concentración de glicerol en películas de quitosano y almidón en función de las propiedades mecánicas del material, concluyendo que concentraciones menores al 5% con respecto a los polisacáridos tiene un efecto anti plastificante, mientras que se han evaluado múltiples valores máximos de plastificante entre el 10-50%, siendo los más comunes entre 20-30% (Epure *et al.*, 2011; Salarbashi *et al.*, 2013; Ifuku *et al.*, 2014; Lopez *et al.*, 2014).

5.2 Extracción de los polisacáridos

El complejo quitina-glucano está presente en las paredes celulares del hongo *Pleurotus pulmonarius* como el principal componente. Dicho complejo contiene un enlace covalente entre el polímero N-acetilglucosamina y una molécula de β -1,3-glucano (Roca *et al.*, 2012), por lo cual se requiere una hidrólisis alcalina de baja concentración de álcali para el rompimiento de este enlace sin causar ruptura de las cadenas de los β -glucanos extraídos (Ruthes *et al.*, 2015).

El sobrenadante 1 en la Figura 5 contiene los β -glucanos obtenidos durante la primera hidrólisis alcalina; estos polímeros son precipitados con etanol concentrado. La precipitación se debe a las fuerzas de atracción predominantes entre los β -glucanos con respecto al etanol, de manera que las moléculas del polisacárido forman aglomerados y se precipitan gracias al peso de estos (Dimitriu, 1998). Los sólidos son luego recuperados mediante centrifugación y refrigerados para evitar degradación del compuesto.

La corriente denominada como Sólidos 1, corresponde a una mezcla húmeda principalmente compuesta por proteínas, quitina e hidróxido de sodio, de acuerdo con la composición conocida de los hongos del género *Pleurotus* (Chen *et al.*, 2014); trazas de los β -glucanos pueden estar aún presentes en esta mezcla. Para una adecuada purificación de la quitina, las proteínas deben ser entonces removidas a través de una hidrólisis básica, elevando la temperatura para asegurar desnaturalización de todas las estructuras de las glicoproteínas presentes en el extracto, logrando que los aminoácidos hidrolizados permanezcan presentes en la fase acuosa de la mezcla al final de la desproteización (Harris & Angal, 1989; Fearon, 2014). Una posterior centrifugación permite obtener los sólidos que contienen la quitina y descartar la fracción acuosa con las proteínas hidrolizadas. Las condiciones utilizadas durante la desproteización fueron replicadas del estudio realizado en el año 2012 por Roca *et al.*, en donde a través de este proceso se pretendían eliminar las proteínas y otros componentes solubles de la pared celular de una levadura.

Finalmente, el extracto de quitina (corriente Sólidos 2) debe ser desacetilado para obtener quitosano, el cual a diferencia de la quitina es soluble en medio acuoso (Shahidi & Abuzaytoun, 2005). Para esto se seleccionaron condiciones de operación reportadas por Younes *et al.*, 2014, en donde dichas condiciones reportaron un grado de acetilación de la quitina de 5.4%, lo cual indica alta solubilidad en

medio acuoso. Sin embargo, el quitosano permanece insoluble en medio alcalino, debido al carácter básico que le confieren sus grupos aminos (Pillai *et al.*, 2009).

Las corrientes Sobrenadante 2, Sobrenadante 3 y Sobrenadante 4 son descartadas. Todos los procesos de extracción deben ser cuidadosamente manejados para evitar riesgos por corrosión causados por los vapores de NaOH acuoso proveniente de los procesos de extracción de β -glucanos, desproteínización y desacetilación.

En la Tabla 2 se observa el porcentaje de humedad obtenido después del secado de los cuerpos fructíferos frescos, dicho valor coincide con lo reportado por Badole y Bodhankar en el año 2013, con una ligera diferencia de 1.6%.

En la Tabla 9 a continuación se muestra la composición química de los cuerpos fructíferos del género *Pleurotus*. Los datos fueron tomados en base a los reportes realizados para hongos de las especies *ostreatus*, *sajor-caju* y *pulmonarius*. Del hongo *Pleurotus pulmonarius*, utilizado en esta investigación, no se ha encontrado mucha información disponible en la literatura.

Tabla 9. Composición química de los cuerpos fructíferos del genero *Pleurotus*

Componentes	Porcentaje	Fuente
Glucanos (%)	9-31	Smiderle <i>et al.</i> , 2008 Papaspayridi <i>et al.</i> , 2010 Carbonero <i>et al.</i> , 2012
Quitina (%)	3-13	Tshinyangu & Hennebert, 1995 Vetter, 2007 Papaspayridi <i>et al.</i> , 2010
Proteína (%)	9-44	Papaspayridi <i>et al.</i> , 2010 F. Smiderle <i>et al.</i> , 2012 Badole & Bodhankar, 2013 Khatun <i>et al.</i> , 2014 Fernandes <i>et al.</i> , 2015
Grasas (%)	1-4	Papaspayridi <i>et al.</i> , 2010 Badole & Bodhankar, 2013 Fernandes <i>et al.</i> , 2015
Minerales (%)	5-10	Papaspayridi <i>et al.</i> , 2010 Badole & Bodhankar, 2013

De acuerdo con los valores de la Tabla 3, los resultados no son coherentes con la composición química que se observa en la Tabla 9; sin embargo, se ha reportado que entre los glucanos que componen la pared celular de los hongos del género *Pleurotus* puede diferenciarse entre glucanos solubles e insolubles en medio acuoso, donde la fracción soluble puede tener un valor de 2.5% para *Pleurotus pulmonarius* según F. Smiderle *et al.*, 2012, lo cual se aproxima al valor obtenido (3.36%) en esta investigación. Adicionalmente, según lo reportado por Fernandes *et al.*, 2015, un rango aproximado de 73-79% en la composición de estos hongos está asociada a carbohidratos, los cuales comprenden quitina, glucanos, hemicelulosas, mananos y galactanos (Papaspayridi *et al.*, 2010; F. Smiderle *et al.*,

2012); se ha reportado además que puede obtenerse un contenido de manosa del 28% en extractos de complejos quitina-glucano (Roca *et al.*, 2012).

Los espectros infrarrojos observados en las figuras Figura 7 y Figura 8, para β -glucanos y quitosano respectivamente, presentan similitud con sus respectivas moléculas de referencia. La amplia banda en la región de $3550 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ comprueba la existencia de alcoholes en la molécula y las bandas entre los $1200-1000 \text{ cm}^{-1}$ se relacionan con la presencia de enlaces glicosídicos en moléculas cíclicas, características presentes tanto en la quitina y el quitosano como en los β -glucanos al ser polisacáridos (Merlic *et al.*, 2000; Limberger-Bayer *et al.*, 2014).

La banda presente en la región de $1700-1600 \text{ cm}^{-1}$ en la Figura 7 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, hace referencia al enlace olefinico C=C, esto puede indicar impureza de la muestra debido a proteínas (Socrates, 2001; Barth 2007).

La Figura 8 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra en el espectro (a) para la molécula de referencia, tres bandas características de las amidas en 1650 , 1621 y 1553 cm^{-1} , junto con las bandas en 1070 y 1024 cm^{-1} que denotan los enlaces glicosídicos cíclicos con la presencia de enlaces C-O-C y finalmente una pequeña banda entre $1000-850 \text{ cm}^{-1}$ que indica enlaces glicosídicos β . Estas bandas caracterizan a la molécula de quitina, sin embargo en el espectro (b) las bandas 1650 , 1621 y 1553 cm^{-1} son mucho más reducidas, indicando la disminución del grupo amida, lo cual puede deberse a la desacetilación de la quitina para la obtención de quitosano (Merlic *et al.*, 2000; Hanson, 2002; Limberger-Bayer *et al.*, 2014; Shankar *et al.*, 2015). Adicionalmente, entre los $1480-1300 \text{ cm}^{-1}$ aproximadamente, puede observarse una amplia banda que indica la existencia de alcanos (Hanson, 2002) en la muestra, lo cual puede estar asociado a otros carbohidratos como se reporta en Papaspyridi *et al.*, 2010, Roca *et al.*, 2012 y F. Smiderle *et al.*, 2012.

Debido a la composición del extracto con quitosano, se considera que no es posible determinar la calidad del extracto mediante la medición de su peso molecular, ya que este no correspondería al peso molecular de un compuesto puro, sino de una mezcla.

5.3 Fabricación de las películas a partir de los extractos obtenidos con β -glucanos y quitosano

Los ensayos preliminares no produjeron resultados satisfactorios, debido a que la película obtenida tuvo alta adherencia al recipiente de vidrio, lo cual no permitió la remoción de esta para posteriores análisis. Adicionalmente, los fragmentos que fueron posibles remover, tenían alta fragilidad y rigidez. El comportamiento frágil y rígido de estas muestras se asocia con la longitud de las cadenas y con las fuerzas intermoleculares de los polisacáridos, debido a que moléculas de menor longitud tendrán mayor cantidad de fuerzas de Van der Waals o puentes de hidrógeno con otras moléculas presentes en el medio, que en cualquier caso serán más débiles que los enlaces covalentes que podría tener el

polisacárido con otras unidades monoméricas en casos donde la longitud de cadena fuera mayor (Luis Lafuente *et al.*, 1997; Hill & Holman, 2000; Ashby & Jones, 2009).

La falta de cohesión de las muestras puede deberse a la plastificación del material con los carbohidratos diferentes a la quitina y los β -glucanos en la mezcla, debido a que una alta plastificación de cadenas poliméricas genera distanciamiento de las moléculas de los polisacáridos, por lo cual la energía de cohesión de las partículas y la resistencia a la tensión disminuirán (Ying *et al.*, 2013; Byun *et al.*, 2014). Debido a que las concentraciones de glicerina con respecto a la cantidad de polisacáridos se mantuvieron igual tanto para el ensayo preliminar como para el diseño factorial, se puede observar que la variación en la cantidad de β -glucanos también tiene un efecto plastificante en el material, puesto que hubo disminución en la rigidez de este.

A causa del agrietamiento y la baja resistencia a la tensión de las muestras del diseño factorial, no se pudo realizar una adecuada medición de las propiedades del material, a excepción de la muestra 4 A, la cual permitió determinar que el módulo de las demás muestras fue inferior a 3.551 N/mm^2 , valor que es significativamente menor al módulo del quitosano y de los β -glucanos, los cuales tienen valores de 32.6 N/mm^2 y entre $712\text{-}3340 \text{ N/mm}^2$ respectivamente (Wypych, 2012; Ying *et al.*, 2013). De acuerdo con la investigación conducida por Ying *et al.*, 2013, el módulo obtenido para películas formadas a partir de β -glucanos fue de entre aproximadamente 712 N/mm^2 y 3340 N/mm^2 cuando la película contaba con una humedad de 0.28% y 0.1643% en base seca respectivamente. Se puede observar entonces que para películas de polisacáridos, pequeñas diferencias en la cantidad de plastificante tiene un efecto significativo en la resistencia a la tensión del material resultante. De acuerdo con la literatura, los β -glucanos son quienes mayor aporte tienen en la resistencia a la tensión y flexibilidad del material, mientras el quitosano aporta propiedades antimicrobianas y de rigidez (Wypych, 2012).

Capítulo 6. Conclusiones y recomendaciones

La metodología definida para la fabricación de las películas a partir de los polisacáridos extraídos del hongo *Pleurotus pulmonarius* fue la de solvent casting, diluyendo los extractos en un medio acuoso y adicionando glicerol como plastificante para modificar la rigidez y fragilidad de las cadenas de quitosano.

Durante las etapas del proceso de extracción de los polisacáridos, moléculas consideradas como carbohidratos (diferentes a los polisacáridos de interés) según el análisis de espectrometría de IR, permanecieron en los extractos obtenidos. Adicionalmente, la hidrólisis básica realizada durante la

desacetilación, promovió la cristalización de los carbohidratos diferentes a la quitina y los glucanos y la desnaturalización de las proteínas remanentes en el extracto. Dichos componentes permanecieron en la fracción de sólidos de la mezcla; sin embargo estos componentes, al igual que el quitosano, se solubilizaron en un medio ácido con la adición de ácido acético. Debido a las impurezas presentes en esta mezcla, se disminuyó la energía de cohesión entre las moléculas de quitina y los glucanos, haciendo que el material resultante presentara baja resistencia a la tracción, con una carga máxima de 0.577 N y un bajo módulo de Young de 3.551 N/mm², comparado con valores de 32.6 N/mm² y entre 712-3340 N/mm² para quitosano y β -glucanos respectivamente. Por lo anterior, no fue posible obtener un material apto para reemplazar algunas aplicaciones de polímeros sintéticos.

Al comparar los ensayos para la producción de las películas, aumentando el porcentaje de β -glucanos con respecto al del extracto con quitosano, se puede observar que estos tienen un efecto plastificante en el material. Sin embargo, para conocer el efecto del quitosano sobre el material es necesario realizar una etapa de purificación extra luego de la desacetilación para eliminar los factores no deseados como las proteínas y los carbohidratos remanentes en la solución de quitosano.

Trabajo a futuro

Debido a la falta de información sobre la composición del hongo *Pleurotus pulmonarius*, se considera necesaria una caracterización química del cuerpo fructífero, de manera que se conozcan las proporciones de proteínas y carbohidratos indeseados y se plantee una mejor metodología de purificación de los polisacáridos.

Con respecto a la fracción insoluble de β -glucanos presentes en el hongo *Pleurotus pulmonarius*, se considera pertinente evaluar una metodología de recuperación de estos para determinar si es posible su utilización en este tipo de biomateriales. Adicionalmente, con el fin de obtener una mejor calidad del quitosano extraído, se propone evaluar una metodología de desacetilación menos agresiva, como lo es la desacetilación enzimática, la cual es más específica y más amigable ambientalmente; de manera que se analice si esta tiene influencia en la longitud de cadena del quitosano y por ende en las propiedades del material resultante.

Bibliografía

AENOR. 2001. *Envases y embalajes. Requisitos de los envases y embalajes valorizables mediante compostaje y biodegradación. Programa de ensayo y criterios de evaluación para la aceptación final del envase o embalaje*. Norma estándar, Madrid: AENOR.

AENOR. 2001. *Envases y embalajes. Requisitos de los envases y embalajes valorizables mediante compostaje y biodegradación. Programa de ensayo y criterios de evaluación para la aceptación final del envase o embalaje*. Norma estándar, Madrid: AENOR.

- American Chemistry Council. 2005. *Education and resources: The Basics: Polymer Definition and Properties*. Accessed 11 22, 20014. <http://plastics.americanchemistry.com/Education-Resources/Plastics-101/The-Basics-Polymer-Definition-and-Properties.html#characteristics>.
- Ashby, Michael F., and David R. H. Jones. 2009. *Materiales para ingeniería 2: Introducción a la microestructura, el procesamiento y el diseño*. Oxford: Reverte S.A.
- Askeland, Donald R., and Pradeep P. Phulé. 2004. *Ciencia e ingeniería de los materiales*. México D.F: International Thomson Editors.
- ASTM. 2008. *Práctica para la codificación de artículos fabricados de plástico para la identificación de resinas*. Norma estandar, ASTM.
- Badole, S.L., and S.L. Bodhankar. 2013. "Oyster Mushroom (*Pleurotus pulmonarius*) and Diabetes Care." In *Bioactive Food as Dietary Intervention for Diabetes*, by Ronald Ross Watson and Victor R. Preedy, 215–220. London : Elsevier.
- Barth, Andreas. 2007. "Infrared spectroscopy of proteins." *Biochimica et Biophysica Acta* 1073-1101.
- Bayer, Eben, Gavin McIntyre, and Burt L. Swersey. 2008. United States Patent 20080145577.
- Bayer, Eben, Gavin McIntyre, and Burt L. Swersey. 2008. "Patent, United States 20080145577."
- BPF. 2008. *Press: Oil consumption*. 19 8. Accessed 11 23, 2014. http://www.bpf.co.uk/Press/Oil_Consumption.aspx.
- Byun, Youngjae, Yachuan Zhang, and Xin Geng. 2014. "Plasticization and Polymer Morphology." In *Innovations in Food Packaging*, by Jung H. Han, 87–108. Plano: Elsevier.
- Carbonero, Elaine, Andrea caroline Ruthes, Cristina Setim Freitas, Pillar Utrilla, Júlio Gálvez, Estefânia Viano da Silva, Guilherme Lanzi Sasaki, Philip Albert James Gorin, and Marcello Iacomini. 2012. "Chemical and biological properties of a highly branched B-glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*." *Carbohydrate Polymers* 814–819.
- Cerqueira, Miguel A., Bartolomeu W.S. Souza, José A. Teixeira, and António A. Vicente. 2012. "Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films e A comparative study." *Food Hydrocolloids* 175-184.
- Chang, Y.P., A. Abd Karim, and C.C. Seow. 2006. "Interactive plasticizing–antiplasticizing effects of water and glycerol on the tensile properties of tapioca starch films." *Food Hydrocolloids* 1–8.
- Chen, Bi, Qun Wu, and Yan Xu. 2014. "Filamentous fungal diversity and community structure associated with the solid state fermentation of Chinese Maotai-flavor liquor." *International Journal of Food Microbiology* 80-84.

- Chen, Lei, Wenwen Xu, Shaoling Lin, and Peter C.K. Cheung. 2014. "Cell wall structure of mushroom sclerotium (*Pleurotus tuber regium*): Part 1. Fractionation and characterization of soluble cell wall polysaccharides." *Food Hydrocolloids* 189-195.
- Dean, Katherine, Parveen Sangwan, Cameron Way, Xiaoqing Zhang, Verónica P. Martino, Fengwei Xie, Peter J. Halley, Eric Pollet, and Luc Avérous. 2013. "Glycerol plasticised chitosan: A study of biodegradation via carbon dioxide evolution and nuclear magnetic resonance." *Polymer Degradation and Stability* 1236–1246.
- Dietz, Albert G. H. 2003. *Plásticos para arquitectos y constructores*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Dimitriu, Severian. 1998. *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility*. Nueva York: Marcel Dekker, Inc.
- Ebnesajjad, Sina. 2012. *Plastic Films in Food Packaging: Materials, Technology and Applications*. Norwich: William Andrew Publishing.
- Ecovative Design. 2015. *Products & applications: Ecovative* . Accessed 02 02, 2015. <http://www.ecovatedesign.com/products-and-applications/packaging/>.
- Energy Information Administration. 2009. *Annual Energy Outlook 2009 with projections to 2030*. Estados Unidos: EIA.
- Epure, Virginia, Marie Griffon, Eric Pollet, and Luc Avérous. 2011. "Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading." *Carbohydrate Polymers* 947–952.
- Fearon, William Robert. 2014. *An Introduction to Biochemistry*. Londres: Butterworth Heinemann.
- Felton, Linda A. 2013. "Mechanisms of polymeric film formation." *International Journal of Pharmaceutics* 423–427.
- Fernandes, Ângela, Lillian Barros, Anabela Martins, Paulo Herbert, and Isabel C.F.R. Ferreira. 2015. "Nutritional characterisation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kumm. produced using paper scraps as substrate." *Food Chemistry* 396–400.
- Fishman, M.L., R.P. Konstance D.R. Coffin, and C.I. Onwulata. 2000. "Extrusion of pectin/starch blends plasticized with glycerol." *Carbohydrate Polymers* 317–325.
- Gerdeen, James C., and Ronald A. L. Rorrer. 2012. *Engineering design with polymers and composites*. Boca Raton: Taylor & Francis group.
- Gómez Galán, Aida. 2013. *MF0201_2: Materias y productos en impresión*. Antequera: IC Editorial.
- Grupo de cultivos hortícolas- Dirección de producción y protección vegetal. 2002. *El cultivo protegido en clima mediterráneo*. Roma: FAO.

- Hanson, Professor John. 2002. *Characteristic IR Absorption Frequencies of Organic Functional Groups*. 246. Accessed 4 12, 2015.
<http://www2.ups.edu/faculty/hanson/Spectroscopy/IR/IRfrequencies.html>.
- Harris, E. L. V., and S. Angal. 1989. *Protein purification methods: A practical approach*. Oxford: Oxford University Press.
- Headly Pratt Consulting. 1996. *Understanding plastic film: Its uses, benefits and waste management options*. Informe, Washington D.C: American Plastics Council.
- Hill, Graham, and John Holman. 2000. *Chemistry in Context*. London: Thomas Nelson & Sons Ltd.
- Ifuku, Shinsuke, Akiko Ikuta, Hironori Izawa, Minoru Morimoto, and Hiroyuki Saimoto. 2014. "Control of mechanical properties of chitin nanofiber film using glycerol without losing its characteristics." *Carbohydrate Polymers* 714–717.
- Karacsonyi, S., and L. Kuniak. 1994. "Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: Isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble B-D-glucan." *Carbohydrate polymers* 107-111.
- Khatun, Selima, Aminul Islam, Ugur Cakilcioglu, Perihan Guler, and Narayan Chandra Chatterjee. 2014. "Nutritional qualities and antioxidant activity of three edible oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.)." *Wageningen Journal of Life Sciences* xxx-xxx.
- Kumari, Suneeta, P. Rath, A. Sri Hari Kumar, and T.N. Tiwari. 2015. "Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method." *Environmental Technology & Innovation* 77–85 77–85.
- Lam, Ka-Lung, and Peter Chi-Keung Cheung. 2014. "Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics." *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 45-64.
- Limberger-Bayer, Valéria M., Alicia de Francisco, Aline Chan, Tatiana Oro, Paulo J. Ogliari, and Pedro L.M. Barreto. 2014. "Barley B-glucans extraction and partial characterization." *Food Chemistry* 84–89.
- Liu, Huihua, Raju Adhikari, Qipeng Guo, and Benu Adhikari. 2013. "Preparation and characterization of glycerol plasticized (high-amylose) starch–chitosan films." *Journal of Food Engineering* 588–597.
- Lladó Fernández, Salvador. 2012. *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas*. Doctoral thesis, Barcelona: Universitat de Barcelona.
- Lopez, O., M.A. Garcia, M.A. Villar, A. Gentili, M.S. Rodriguez, and L. Albertengo. 2014. "Thermo-compression of biodegradable thermoplastic corn starchfilms containing chitin and chitosan." *Food Science and Technology* 106e115 106-115.
- Luis Lafuente, Santiago V., Maria Isabel Burguete Azcarate, and Belen Altava Benito. 1997. *Introduccion a la quimica organica*. Castellón: Universitat Jaume I.

- Matet, Marie, Marie-Claude Heuzey, Abdellah Ajji, and Pierre Sarazin. 2015. "Plasticized chitosan/polyolefin films produced by extrusion." *Carbohydrate Polymers* 277-284.
- Matet, Marie, Marie-Claude Heuzey, Abdellah Ajji, and Pierre Sarazin. 2015. "Plasticized chitosan/polyolefin films produced by extrusion." *Carbohydrate Polymers* 177-184.
- Matet, Marie, Marie-Claude Heuzey, Eric Pollet, Abdellah Ajji, and Luc Avérous. 2013. "Innovative thermoplastic chitosan obtained by thermo-mechanical mixing with polyol plasticizers." *Carbohydrate Polymers* 241-251.
- McKeen, Lawrence W. 2012. "Introduction to the Properties of Plastic and Elastomer Films." In *Film Properties of Plastics and Elastomers (Third Edition)*, by Lawrence W. McKeen, 19–55. Oxford: Elsevier Inc.
- McKeen, Lawrence W. 2012. "Production of films." In *Film Properties of Plastics and Elastomers (Third Edition)*, by Lawrence W. McKeen, 57–71. Oxford: Elsevier Inc.
- McKeen, Lawrence W. 2012. "Uses of barrier films." In *Film Properties of Plastics and Elastomers (Third Edition)*, by Lawrence W. McKeen, 73–80. Oxford: Elsevier Inc.
- Merlic, Professor Craig A., Barry C. Fam, and Dr. Jane Strouse. 2000. *Webspectra: Problems in NMR and IR Spectroscopy*. 22 6. Accessed 4 12, 2015.
<http://www.chem.ucla.edu/~webspectra/irtable.html>.
- Muzzarelli, Riccardo A.A., Joseph Boudrant, Diederick Meyer, Nicola Manno, Marta DeMarchis, and Maurizio G. Paoletti. 2012. "Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial." *Carbohydrate Polymers* 995–1012.
- Nariño T., Daniel. 2014. "El mundo en su laberinto." *Semana*, 29 11.
- Papaspyridi, Lefki-Maria, Petros Katapodis, Zacharoula Gonou-Zagou, Evangelia Kapsanaki-Gotsi, and Paul Christakopoulos. 2010. "Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture." *Biochemical Engineering Journal* 131–138.
- Pillai, C.K.S., Willi Paul, and Chandra P. Sharma. 2009. "Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation." *Progress in Polymer Science* 641–678.
- Qiao, Xiuying, Zhongzhu Tang, and Kang Sun. 2011. "Plasticization of corn starch by polyol mixtures." *Carbohydrate Polymers* 659–664.
- Roca, Christophe, Bárbara Chagas, Inês Farinha, Filomena Freitas, Luís Mafra, Filipe Aguiar, Rui Oliveira, and Maria A.M. Reis. 2012. "Production of yeast chitin-glucan complex from biodiesel industry byproduct." *Process Biochemistry* 1670–1675.

- Ruthes, Andrea Caroline, Fhernanda Ribeiro Smiderle, and Marcello Iacomini. 2015. "D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches." *Carbohydrate Polymers* 753–761.
- Salarbashi, Davoud, Sima Tajik, Mehran Ghasemlou, Saeedeh Shojaee-Aliabadi, Mostafa Shahidi Noghabi, and Ramin Khaksar. 2013. "Characterization of soluble soybean polysaccharide film incorporated essential oil intended for food packaging." *Carbohydrate Polymers* 1127–1136.
- Shahidi, Fereidoon, and Reem Abuzaytoun. 2005. "Chitin, chitosan and co-products: Chemistry, production, applications and health effects." *Advances in food and nutrition research* 93-135.
- Shahidi, Fereidoon, and Reem Abuzaytoun. 2005. "Chitin, Chitosan, and Co-Products: Chemistry, Production, Applications, and Health Effects." *Advances in Food and Nutrition Research* 93-135.
- Shankar, Shiv, Jeevan Prasad Reddy, Jong-Whan Rhim, and Hee-Yun Kimb. 2015. "Preparation, characterization, and antimicrobial activity of chitin nanofibrils reinforced carrageenan nanocomposite films." *Carbohydrate Polymers* 468–475.
- Smiderle, F.R., L.M. Olsen, A.C. Ruthes, P.A. Czelusniak, A.P. Santana-Filho, G.L. Sasaki, P.A.J. Gorin, and M. Iacomini. 2012. "Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources." *Carbohydrate Polymers* 368–376.
- Smiderle, Fhernanda R., Lorena M. Olsen, Elaine R. Carbonero, Cristiane H. Baggio, Cristina S. Freitas, Rodrigo Marcon, Adair R.S. Santos, Philip A.J. Gorin, and Marcello Iacomini. 2008. "Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1->3),(1->6)-linked B-glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*." *European Journal of Pharmacology* 86-91.
- Socrates, George. 2001. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and charts*. Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
- Sriupayo, Jitrawadee, Pitt Supaphol, John Blackwell, and Ratana Rujiravanit. 2005. "Preparation and characterization of a-chitin whisker-reinforced chitosan nanocomposite films with or without heat treatment." *Carbohydrate Polymers* 130–136.
- Stone, Bruce A. 2009. "Chemistry of β -Glucans." In *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*, by Antony Bacic, Geoffrey B. Fincher and Bruce A. Stone, 5-46. Victoria: Elsevier.
- Tajik, Sima, Yahya Maghsoudlou, Faramarz Khodaiyan, Seid Mahdi Jafari, Mehran Ghasemlou, and Mehran Aalami. 2013. "Soluble soybean polysaccharide: A new carbohydrate to make a biodegradable film for sustainable green packaging." *Carbohydrate Polymers* 817–824.
- Téllez Maldonado, Alejandra. 2012. *La complejidad de la problemática ambiental de los residuos plásticos: una aproximación al análisis narrativo de política pública en Bogotá*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

- Teng, Wee Lin, Eugene Khor, Teck Koon Tan, Lee Yong Lim, and Su Ching Tan. 2001. "Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi." *Carbohydrate Research* 305–316.
- Tshinyangu, Kandanda K., and Gregoire L. Hennebert. 1995. "Protein and chitin nitrogen contents and protein content in *Pleurotus ostreatus* var. *Colombinus* ." *Food Chemistry* 223-227.
- University of Cambridge. 2010. *DoITPoMS>TLP Library>Polymer Basics>Shape, size & structure II*. 04 08. Accessed 04 11, 2015. <http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/polymerbasics/structure.php>.
- Vetter, Janos. 2007. "Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*." *Food Chemistry* 6–9.
- Wypych, George. 2012. *Handbook of polymers*. Toronto : Elsevier Inc.
- Ying, Ruifeng, Corinne Rondeau-Mouro, Cécile Barron, Frédéric Mabile, Annick Perronnet, and Luc Saulnier. 2013. "Hydration and mechanical properties of arabinoxylans and B-D-glucans films." *Carbohydrate Polymers* 31-38.
- Ying, Ruifeng, Corinne Rondeau-Mouro, Cécile Barron, Frédéric Mabile, Annick Perronnet, and Luc Saulnier. 2013. "Hydration and mechanical properties of arabinoxylans and B-D-glucans films." *Carbohydrate Polymers* 31- 38.
- Younes, Islem, Olfa Ghorbel-Bellaaj, Moncef Chaabouni, Marguerite Rinaudo, Florence Souard, Cécile Vanhaverbeke, Kemel Jellouli, and Moncef Nasri. 2014. "Use of a fractional factorial design to study the effects of experimental factors on the chitin deacetylation." *International Journal of Biological Macromolecules* 385–390.
- Zhu, Fengmei, Bin Du, Zhaoxiang Biang, and Baojun Xu. 2015. "B-Glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities." *Journal of food and composition analysis* 165-173.