

EVALUACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE POLISACARIDOS TIPO
GLUCANO PRESENTES EN LA *Ganoderma lucidum* A NIVEL LABORATORIO
PARA NUTRISETAS S.A.S

LAURA ALEXANDRA AMAYA SIERRA
JULIANA ANDREA ARDILA RODRIGUEZ

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D.C.
2016

EVALUACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE POLISACARIDOS TIPO
GLUCANO PRESENTES EN LA *Ganoderma lucidum* A NIVEL LABORATORIO
PARA NUTRISETAS S.A.S

LAURA ALEXANDRA AMAYA SIERRA
JULIANA ANDREA ARDILA RODRIGUEZ

Proyecto integral de grado para optar el título de
INGENIERO QUIMICO

Director:

Diego Fajardo Gómez
Microbiologo Industrial

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D.C.
2016

Nota de Aceptación

Ing. Edgar Fernando Moreno Torres
Firma del presidente del Jurado

Ing. Oscar Darío Camacho
Jurado 1

Ing. Elizabeth Torres
Jurado 2

Bogotá D.C., (Agosto 18 de 2016)

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del claustro

Dr. JAIME POSADA DIAZ

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCIA-PEÑA

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Ing. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Secretario General

Dr. JUAN CARLOS POSADA GARCIA-PEÑA

Decano Facultad de Ingenierías

Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI

Director Programa Ingeniería Química

Ing. LEONARDO DE JESUS HERRERA GUTIERREZ

Las directivas de la
Universidad de
América, los jurados
calificadores y el Cuerpo
docente no son responsables
por los criterios e ideas
expuestas en el Presente

Dedicamos de manera especial este trabajo de grado a nuestros padres por su apoyo incondicional y por saber formarnos con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual contribuyó a salir adelante en momentos difíciles.

A Dios por darnos la sabiduría, paciencia e inteligencia para llevar a cabo este proyecto.

Agradecimientos

Agradecemos de manera especial a Dios por brindarnos las capacidades, la inteligencia y la fuerza para llevar a cabo la realización del presente trabajo.

A nuestras familias por su apoyo incondicional pues ellos fueron el principal cimiento para la construcción de nuestra vida profesional, a quien agradecemos además por sembrar en nosotras bases de responsabilidad y deseos de superación de esta tesis.

A Tecnoparque Sena nodo Bogotá por brindarnos los equipos y laboratorios para llevar a cabo la experimentación y parte fundamental de este trabajo.

A todas las personas que de uno u otro modo colaboraron en realización de este proyecto especialmente a los profesores Iván Ramírez e Isaac Huertas por su valiosa tutoría y seguimiento en el proceso de realización de esta tesis.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	22
OBJETIVOS	23
1.GENERALIDADES	24
1.1 HONGO <i>Ganoderma lucidum</i> (Reishi)	24
1.1.1 Taxonomía	24
1.1.2 Cultivo	24
1.1.3 Morfología	25
1.1.4 Clasificación de <i>Ganoderma lucidum</i>	26
1.1.5 Beta-glucanos	27
1.1.6 Composición Nutricional	29
1.1.7 Propiedades medicinales	30
1.2 INFUSIÓN	31
1.2.1 Infusión acuosa	31
1.2.2 Infusión alcalina	32
1.3 DETERMINACIÓN DE GLUCANOS	32
1.3.1 Método DNS	32
1.3.2 Método Fehling	33
1.3.3 Microscopía de fuerza atómica	33
1.3.4 Espectroscopia Infrarroja	34
2.MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1 MATERIALES	35
2.1.1 Materia prima	35
2.1.2 Reactivos	35
2.2 ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA	36
2.3 EQUIPOS EMPLEADOS	36
2.4 METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN	37
2.4.1.2 Objetivo de la pre-experimentación	39
2.4.1.3 Caracterización pre-Experimentación	40
2.4.2 Infusión acuosa-alcalina	41
2.4.2.1 Purificación	42
2.4.2.2 Filtración a Vacío	42
2.4.2.3 Concentración	42
2.4.2.4 Centrifugación	42

2.5 CARACTERIZACIÓN	45
2.5.1 Método de Fehling	45
2.5.2 Método DNS	46
2.5.3 Microscopio de fuerza atómica	48
2.5.3 Espectroscopia Infrarroja	49
2.6 MODELO EXPERIMENTAL	50
2.6.1 Construcción del diseño factorial	51
3.DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	53
3.1 ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA	53
3.1.1 Análisis de granulometría	54
3.2 EXTRACCIÓN SOXHLET	54
3.2.1 Pre-experimentación Extracción	54
3.2.2 Caracterización	55
3.2.2.1 Prueba Fehling	56
3.2.2.2 Análisis ANOVA	59
3.2.3 Extracción Soxhlet	61
3.2.4 Caracterización	64
3.2.4.1 Desarrollo Método DNS	64
3.2.4.2 Espectroscopia infrarroja	66
3.3 INFUSIÓN ACUOSA-ALCALINA	68
3.3.1 Infusión acuosa fría	68
3.3.2 Infusión acuosa caliente	71
3.3.3 Infusión alcalina	73
3.3.4 Caracterización	75
3.3.4.1 Método DNS	75
3.3.4.1 Microscopio de fuerza atómica	79
3.3.4.2 Espectroscopia Infrarroja	80
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	83
4.1 DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA	83
4.2 MÉTODO SOXHLET	84
4.2.1 Extracción	84
4.2.2 Balance de masa	85
4.3 INFUSIÓN FRÍA	86
4.3.1 Precipitado insoluble	86
4.3.2 Fracción soluble	87
4.3.3 Balance de masa	88
4.3.3.1 Infusión fría (120 minutos)	88
4.3.3.2 Infusión fría (180 minutos)	89
4.4 INFUSIÓN CALIENTE	89

4.4.1 Fracción soluble	89
4.4.2 Balance de masa	90
4.4.2.1 Infusión caliente (120 minutos)	90
4.4.2.2 Infusión caliente (180 minutos)	91
4.5 INFUSIÓN ALCALINA	91
4.6.1.2 Infusión caliente	95
4.6.1.3 Infusión alcalina	95
4.6.2 Microscopio de fuerza atómica	95
4.7 DISEÑO EXPERIMENTAL	96
4.7.1 Desarrollo del diseño experimental	98
4.7.2 Interpretación de resultados	99
4.7.3 Análisis de varianzas	100
5. CONCLUSIONES	104
6. RECOMENDACIONES	106
BIBLIOGRAFÍA	107
ANEXOS	111

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Parámetros de crecimiento del Ganoderma	24
Tabla 2. Composición química Ganoderma lucidum	31
Tabla 3. Reactivos empleados en el proceso	36
Tabla 4. Niveles de las variables	51
Tabla 5. Análisis de granulometría	54
Tabla 6. Volúmenes de alícuotas	58
Tabla 7. Volumen del Titulante	59
Tabla 8. Concentración de azúcares reductores	59
Tabla 9. Tabla ANOVA para concentración por relación	59
Tabla 10. Volumen de los extractos obtenidos	62
Tabla 11. Volúmenes después de concentrar	63
Tabla 12. Volúmenes después de evaporar los extractos	63
Tabla 13. Preparación de soluciones patrones	64
Tabla 14. Absorbancia de soluciones patrón.	65
Tabla 15. Concentración azúcares reductores	66
Tabla 16. Extractos filtrados	70
Tabla 17. Extracto Concentrado y etanol recuperado	70
Tabla 18. Cantidad de polisacárido puro y extracto acuoso	71
Tabla 19. Volúmenes de extracto	72
Tabla 20. Volúmenes de extractos	72
Tabla 21. Extracto acuoso final y etanol recuperado	73
Tabla 22. Volumen extracto alcalino obtenido evaluado por 2 y 3 horas	74
Tabla 23. Preparación de soluciones patrones	75
Tabla 24. Absorbancias de soluciones	76
Tabla 25. Absorbancia de muestras resultantes de la extracción acuosa-	78
Tabla 26. Concentración de azúcares en muestras de la extracción acuosa	78
Tabla 27. Productividad de los extractos obtenidos	79
Tabla 28. Rendimiento de extractos obtenidos	79
Tabla 29. Residuos de hongos	85
Tabla 30. Porcentaje de rendimiento de infusión	97
Tabla 31. Matriz para la determinación de experimentos	97
Tabla 32. Datos experimentales de rendimiento de extracción.	99
Tabla 33. Efectos estimados para el rendimiento.	99
Tabla 34. Análisis de varianza ANOVA según modelo lineal de rendimiento	100

LISTA DE IMÁGENES

	pág.
Imagen 1. Partes del hongo	26
Imagen 2. Molécula de glucosa tipo Beta	27
Imagen 3. Diagrama de orientación y ubicación de los Beta-glucanos	28
Imagen 4. Estructura de B-glucanos y esquemas de distintas	28
Imagen 5. Microscopio de fuerza atómica	34
Imagen 6. Cuerpo Fructífero Ganoderma Lucidum	35
Imagen 7. Hongo cortado y molido	53
Imagen 8. Pre-experimentación: relación de solvente	55
Imagen 9. Filtración a Vacío de los extractos	56
Imagen 10. Titulación Fehling	57
Imagen 11. Extracción de las tres muestras variando	61
Imagen 12. Concentración en el Rotavaporador	62
Imagen 13. Muestra Infusión Fría 2	80
Imagen 14. Muestra obtenida con solución acuosa a 25°C en el AFM	96
Imagen 15. Cadenas de <i>Lentinan</i> a 25°C	96

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Diagrama de flujo de la Extracción Soxhlet y	40
Figura 2. Scheme of extraction and purification of insoluble β -D-glucans from	41
Figura 3. Infusión fría y caliente	43
Figura 4. Diagrama de flujo de la Infusión Acuosa-Alcalina y concentración de	44
Figura 5. Diagrama de flujo para análisis por método Fehling	46
Figura 6. Diagrama de flujo Método DNS	47
Figura 7. Diagrama de lectura de muestras DNS	48
Figura 8. Diagrama de flujo para análisis por Microscopio	49
Figura 9. Diagrama de flujo para análisis por	50
Figura 10. Balance de masa	53
Figura 11. Esquema para extracción con agua caliente	71
Figura 12. Esquema de extracción alcalina	74

LISTA DE DIAGRAMAS

	pág.
Gráfica 1. Dispersión por código de nivel	60
Gráfica 2. Cajas y bigotes	61
Gráfica 3. Curva de calibración 1	65
Gráfica 4. Espectro infrarrojo 1.4R	67
Gráfica 5. Espectro infrarrojo 2.4R	67
Gráfica 6. Espectro Infrarrojo 3.4R	68
Gráfica 7. Curva de calibración 2	76
Gráfica 8. Espectro Infrarrojo Acuoso Frío 2	80
Gráfica 9. Espectro Infrarrojo Acuoso Frío 4	81
Gráfica 10. Espectro Infrarrojo Precipitado Frío 2	81
Gráfica 11. Espectro Infrarrojo Acuoso Caliente 4	82
Gráfica 12. Espectro Infrarrojo Acuoso Caliente 5	82
Gráfica 13. Curva de distribución granulométrica	83
Gráfica 14. Balance de masa SOXHLET	85
Gráfica 15. Repeticiones vs. Productividad y Rendimiento (Agua Fría)	86
Gráfica 16. Repeticiones vs. Productividad y Rendimiento (Agua Fría)	87
Gráfica 17. Balance de masa infusiones acuosas frías	88
Gráfica 18. Repeticiones vs. Productividad y Rendimiento (Agua Caliente)	89
Gráfica 19. Balance de masa extracciones acuosas calientes	90
Gráfica 20. Espectro Infrarrojo muestra Soxhlet	93
Gráfica 21. Espectro Infrarrojo acuoso fría	94
Gráfica 22. Diagrama de Pareto del rendimiento por factores	101
Gráfica 23. Diagrama de superficie para el rendimiento	101
Gráfica 24. Diagrama de contorno del rendimiento	102

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Título de Fehling	57
Ecuación 2. Concentración de azúcares	58
Ecuación 3. Ajuste Lineal	78
Ecuación 4. Productividad	78
Ecuación 5. Balance de masa	85
Ecuación 6. Diseño 2 ^K	98
Ecuación 7. Modelo de Regresión	102
Ecuación 8. Modelo de Regresión STATGRAPHICS	103

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Características del diseño	98
Cuadro 2. Interacción entre factores	103

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A.	112
ANEXO B.	114

ABREVIATURAS

°C: Grados Celsius

cm⁻¹ : lambda

CO₂: Dioxido de carbono

C-O: Cetonas

C-C: Alcanos

C-X: Compuestos clorados

CO-NH: Aminas

C-N: Grupo nitro

DNS: Método del acido 3,5 dinitrosalicilico

g/L: Gramos por litro

g: Gramos

mL: mililitros

mm: mililitros

NaCL: Cloruro de sodio

nm: Nanometros

OH: Grupo Hidroxi

GLOSARIO

ASEPSIA: ausencia de microorganismos patógenos, corresponde a un conjunto de procedimientos realizados con el fin de conseguir la ausencia de microorganismos, lo que es fundamental para la realización del cultivo y crecimiento del hongo

CEPA: grupo de organismos emparentados, como las bacterias, los hongos o los virus, cuya ascendencia común es conocida.

EFICIENCIA BIOLÓGICA MEDIO: es la medida aritmética de la relación entre el peso fresco de los hongos cosechados y el peso seco del sustrato de las bolsas productivas, multiplicadas por 100 $(FF/SS)*100$.

GLUCANO: tipo de polisacárido formado por unidades monómeras de monosacárido D-glucosa, unidos mediante enlaces glucosídicos.

Ganoderma lucidum: hongo comestible, conocido como Reishi por su traducción en japonés. Es usado tradicionalmente como alimento y medicamento debido al contenido de constituyentes de polisacáridos.

INTERRUPTOR BIOLÓGICO: es el mecanismo o cambio de condiciones en el ambiente que hace que el micelio cese su crecimiento e inicie la formación del hongo.

MACRÓFAGOS: son fagocitos de gran tamaño que tienen una importante influencia en el sistema linfático y que viajan por todos los tejidos corporales y se encargan de ingerir bacterias.

NUTRACÉUTICO: termino asociado a un agente bioactivo el cual se encuentra generalmente en forma concentrada que posee características nutritivas, componentes del alimento y complejas sustancias químicas, fisiológicamente activas que cumplen una función igual que los nutrientes presentes en los alimentos, contribuyendo a reducir la incidencia de ciertas enfermedades crónicas.

POLISACÁRIDO: biomoléculas formadas por la unión de gran cantidad de monosacáridos.

PRODUCTIVIDAD: es la relación entre la concentración obtenida en un método de método de extracción y el volumen obtenido para obtener dicha concentración.

MICA: es un mineral que está formado por silicatos de alúmina, hierro, calcio, magnesio y minerales alcalinos, los cuales se caracterizan por su fácil exfoliación en delgadas láminas flexibles, elásticas y muy brillantes.

CANTILÉVER: es el soporte al cual esta adherido la punta sensorial que está en contacto con una muestra y el cantiléver soporte, que genera el movimiento en el microscopio de fuerza atómica.

RESUMEN

El principal objetivo de este trabajo tiene la evaluación de un proceso de extracción de polisacáridos tipo glucano en la *Ganoderma lucidum* con el fin de establecer cuál es el mejor método para extraer el extracto.

Partiendo de un previo estudio para determinar la selección de parámetros se establecieron los métodos de extracción y las variables. Se definieron las condiciones de extracción tales como el tiempo de contacto, la temperatura y la elección de solvente requeridos para la obtención del polisacárido de los métodos: Extracción Soxhlet, infusión con agua caliente y agua fría durante 2 y 3 horas para cada uno y finalmente extracción alcalina.

En la extracción Soxhlet se llevó a cabo la pre-experimentación con el fin de elegir entre tres relaciones de etanol:agua cual daba mejores concentraciones para posteriormente realizar la extracción con la mejor relación, variando el número de recirculaciones. También se realizaron tres extracciones secuenciales primero con agua fría, luego agua caliente evaluando el tiempo y por último la extracción alcalina utilizando como solvente hidróxido de potasio, en las dos últimas extracciones se utilizó el residuo obtenido en el proceso con agua fría.

Los extractos obtenidos se caracterizaron mediante la prueba Fehling (pre-experimentación), método DNS para determinar la concentración de azúcares reductores, microscopio de fuerza atómica para identificar cadenas de Lentinan y por último el microscopio de fuerza atómica con el fin de determinar el tipo de enlace de los glucanos u otras sustancias. Finalmente se calcularon las productividades y rendimientos de cada extracto para establecer que proceso dio mejores resultados.

INTRODUCCIÓN

Los hongos poseen propiedades que ayudan al organismo a combatir enfermedades, ayudando en la restauración del equilibrio natural y contribuyendo en el funcionamiento correcto del sistema inmunológico para eliminar agentes externos que pueden afectar la salud. Existen variedad de hongos con muchos beneficios para la salud humana, uno de ellos es la *Ganoderma lucidum* que aporta una gran cantidad de proteínas y vitaminas, lo que los hace especialmente buenos para personas que tengan las defensas bajas, padezcan de cáncer o diabetes y que deseen reforzar un su sistema inmune. Las sustancias que aportan dichas propiedades medicinales son los polisacáridos que están presentes en los hongos principalmente como glucanos y que brindan funciones de almacenamiento energético, forman estructuras en la célula y son medicamento importantes. La obtención de dichos glucanos se realiza generalmente mediante un proceso de extracción con el cuerpo fructífero, ya que la fuente principal de estos polisacáridos está en las paredes celulares de los hongos¹. Por tales razones en este proyecto se pretende evaluar diferentes métodos de extracción con el propósito de identificar mediante cual proceso y que variables favorecen un mayor contenido de polisacáridos en el extracto.

Debido a que los glucanos tienen un papel fundamental en la medicina tradicional china por sus propiedades y uso, la empresa Nutrisetas S.A.S quiere llevar a cabo un proceso de investigación para determinar el mejor proceso de extracción de polisacáridos tipo glucano presentes en la *Ganoderma lucidum* que tengan funciones medicinales y al mismo tiempo que sea rentable, bajo costo y fácil extracción con el fin de incursionar en el mercado nutracéutico.

¹ CURVETTO, Nestor Raul. Grifola frondosa (Maitake): Su valor nutracéutico, nutricéutico, farmacéutico y cosmeceútico. Tecnología de producción. 2009. Bahía Blanca. p 24

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el proceso de obtención de polisacáridos tipo glucano presentes en la *Ganoderma lucidum* a nivel laboratorio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar parámetros y variables que inciden en el proceso de obtención de los polisacáridos tipo glucano de la *Ganoderma lucidum*.
2. Extraer los polisacáridos tipo glucano presentes en la *Ganoderma lucidum* por medio de un desarrollo experimental.
3. Determinar el rendimiento, efecto de las variables y parámetros en los procesos de obtención de polisacáridos tipo glucano.

1. GENERALIDADES

En este capítulo se describen las principales características, funciones, parámetros de crecimiento y tipos de *Ganoderma lucidum*. También la definición e importancia de los glucanos.

1.1 HONGO *Ganoderma lucidum* (Reishi)

1.1.1 Taxonomía. Su nombre en japonés Reishi y en chino Ling Zhi. Su nombre científico es *Ganoderma lucidum*, el cual traduce en latín como “brillante”, proviene de la división Basidiomycota y subdivisión Basidiomiceto; es perteneciente a la clase Homobasidiomycetes la cual corresponde a la familia Ganodermataceae.² El género *Ganoderma* hace parte de un complejo de alrededor de 10 especies casi indistinguibles.

1.1.2 Cultivo. El cultivo del hongo Reishi inició en 1937, aunque su producción en masa se logró hasta 1971 utilizando técnicas basadas en recipientes con aserrín. El cultivo del hongo Reishi se ha extendido a lo largo de los años por taiwan, China, Corea, Tailandia y Vietnam, usando diferentes formulaciones en las que se incluye además de aserrín, salvado de trigo y sacarosa.

Para el cultivo del Reishi se deben tener en cuenta las condiciones ambientales y los requerimientos nutricionales necesarias durante cada etapa de crecimiento del hongo. Dichas condiciones se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de crecimiento del *Ganoderma*

Fase	Duración	Humedad (%, R.H.)	Luz (lux)	CO ₂ (%)	O ₂ (Ventilación)	Temperatura (°C)
Colonización del micelio (Corrida del spawn)	Hasta 2 meses	60 -70%	Ninguna	Tolerable/ alta conc.	0-1 intercambio	25-30* o menor (20)
Inicio de primordios	50-60 días después de la inoculación	90-95%	100-200	0.1-0.5% o menor	O ₂ es positivo	25-30* o menor (20)
Formación del pedúnculo (tallo)	10-14 días en desarrollo	70-80% o mayor	150-200	0.1-1% alta conc. (ramificación)	baja	25-30* o menor (20); más gruesos
Diferenciación del píleo (sombrero)	25 días o más desde primordio hasta cosecha	85-95%	150-200 12hr (on/off)	<0.1%	Circulación de aire a baja conc.	25-30* o menor (20); más gruesos
Para crecimiento posterior	7-10 días	85% 50-60%	Incubación adicional después de maduración de sombrero			

Fuente: Cultivo de hongos *Ganoderma lucidum*

² MUSHWORLD. Manual de cultivo de hongos comestibles y medicinales. Handbook2. Corea. 2005. Capítulo 11.

El cultivo inicia desde la fase vegetativa (formación de micelio) hasta la fase reproductora (obtención de cuerpos fructíferos). La propagación del micelio del hongo se realiza en bolsas con sustrato que consiste en diversas formulaciones generalmente a base de aserrín, salvado de trigo, sacarosa, carbonato de calcio y agua previamente autoclavado. Casi todas las cepas de *G lucidum* tienen una temperatura óptima de crecimiento micelial de 30°C¹.

La fase vegetativa culmina cuando el micelio coloniza todo el sustrato en las bolsas, posterior a ello inicia la activación de la formación de primordios durante la cual el hongo debe someterse a estrés por medio del cambio en las condiciones ambientales tales como la exposición a luz, oxígeno, humedad relativa alta. La última fase del cultivo es el desarrollo y la fructificación en la cual se forman las sombrillas características de la morfología del hongo como respuesta a un estímulo ambiental.

Los factores ambientales requeridos en cada fase de cultivo se pueden controlar si el procedimiento se realiza en ambientes donde la temperatura sea elevada, cerca de los 30°C ya que favorece el crecimiento del hongo y disminuye el tiempo de colonización en el sustrato, además es importante tener en cuenta que la primera etapa del cultivo se realiza en oscuridad y que existen etapas cruciales durante el crecimiento como la diferenciación del sombrero del hongo (pileo), como se aumenta la ventilación con el fin de reducir la concentración de CO₂ ya que esto determinara la formación del pileo.

1.1.3 Morfología. *Ganoderma lucidum* se caracteriza por tener una estructura morfológica basada en un sistema hifal dimitico, con dureza estructural y esporas de color café. El cuerpo fructífero del hongo está constituido principalmente por: sombrero (pileo), píe (estípide) y láminas (himeno). La morfología del cuerpo fructífero se describe a continuación³:

Carpóforo: Se caracteriza por ser al principio irregularmente nudoso, aunque durante su madurez adquiere una estructura definida similar a la de una oreja o riñon, mide de 2-20 cm de largo; con una superficie a menudo entre lisa y rugosa de apariencia brillante barnizada, en la madurez presenta un color castaño rojizo con zonas amarillo brillante y blanco. Alcanza 5 cm de espesor en la etapa final de su crecimiento.

Himeno: Compuesto por tubos de 2 cm de profundidad y de 4-7 poros por mm, tiene una superficie de poro color entre blanca y castaño oscuro a medida que envejece.

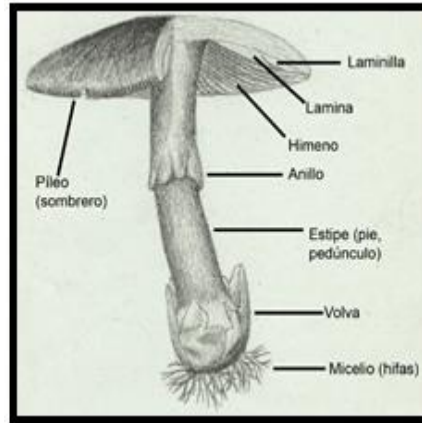
Estípide: Mide de 3 a 14 cm de longitud con 3cm de espesor, presenta el mismo color del carpóforo y por lo general crece de forma lateral.

³ NIÑO ARIAS, Fabián. 2010. Evaluación de metabolitos secundarios del hongo *ganoderma lucidum* con actividad antifúngica frente a *fusarium spp.* de interés clínico. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. pág. 10-12

Rasgos microscópicos: En cuanto a rasgos microscópicos contiene esporas más o menos elípticas con un extremo truncado; sin embargo con ampliificaciones más grandes pueden parecer de forma áspera.

Dichas partes explicadas se pueden apreciar en la Imagen 1.

Imagen 1. Partes del hongo



Fuente: <http://www.fungipedia.org/hongos/ganoderma-lucidum>. Consultado el 20 de abril del 2016

1.1.4 Clasificación de Ganoderma lucidum⁴. De acuerdo a su forma y color cumplen una función específica en el organismo

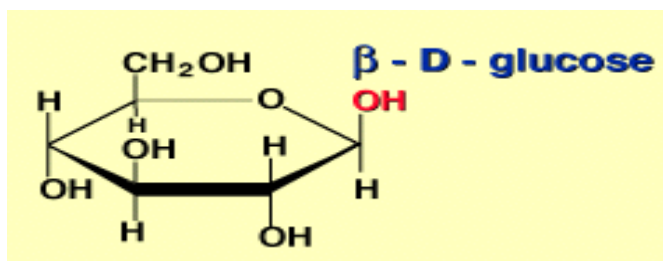
1. **Rojo:** Ayuda al sistema cardíaco y cardiovascular
2. **Púrpura:** Huesos, articulaciones, artritis y artrosis
3. **Verde:** Cirrosis, hepatitis y cáncer en el hígado
4. **Blanco:** Piel y pulmones
5. **Amarillo:** El bazo
6. **Negro:** Riñones y cerebro

⁴ [Citado el 20 de Abril de 2016] FUNGIPEDIA. Ganoderma lucidum. Disponible en: <<http://www.fungipedia.org/hongos/ganoderma-lucidum.html>>.

1.1.5 Beta-glucanos. Los β -glucanos promueven la salud porque actúan como fibra intestinal, lo cual puede ayudar a disminuir los altos niveles de colesterol en la sangre y regular mediante la formación de bultos, para reducir la posibilidad de desarrollar enfermedades relativas al colon.

Son polímeros de glucosa ligados por medio de enlaces glucosídicos tipo beta, posee cadenas de D-glucosa de seis caras que pueden estar conectados unos a otros. Posee ligaciones laterales de cadenas de glucosa unidas a otras posiciones de la cadena principal de D-glucosa. Estas pequeñas cadenas laterales pueden ser separadas de la "columna vertebral" del beta-glucano (en el caso de la celulosa, la columna vertebral serían cadenas de D-glucosa unidas en la posición (1,4),(1,3) y (1,6) los cuales identifican los átomos de carbono en cada extremo del enlace glucosídico; es el principal componente estructural de la pared celular de algunas plantas, algas marinas, pared celular externa de bacterias hongos y levadura⁵. Los beta-glucanos presentan diferentes tamaños, estructuras, frecuencias de ramificación, modificación estructural, conformación y solubilidad⁶ lo que hace que tenga efectos fisiológicos positivos; se pueden observar las moléculas y orientaciones en las Imágenes 3, 4 y 5.

Imagen 2. Molécula de glucosa tipo Beta

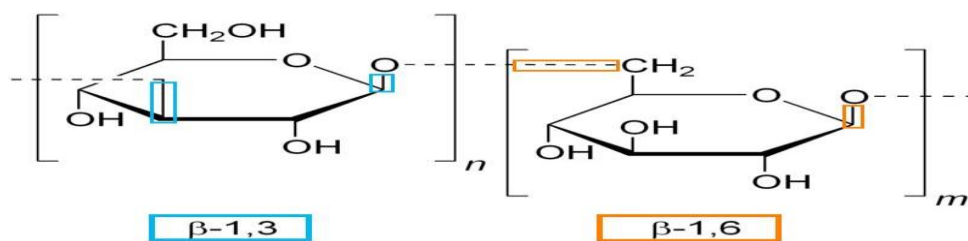


Fuente: <http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/Glucosa.html>. Consultado el 29 de enero de 2016

⁵ CARUFFO, Maria.LOPEZ, Paulina, NAVARRETE, Natalia, DIAZ, Angelica, NAVARRETE, Paola. Uso de B-glucanos como inmunoestimulante en la Acuicultura. Chile. Universidad de Chile. Laboratorio de Biotecnología. 2013, pg. 120

⁶ CARUFFO, Op.cit. Pg 120.

Imagen 3. Diagrama de orientación y ubicación de los Beta-glucanos




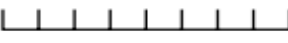

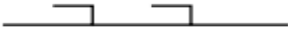




Fuente: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3d/Beta_GlucanReference.jpg>. Consultado el 29 de enero del 2016

Imagen 4. Estructura de B-glucanos y esquemas de distintas fuentes de Beta-glucanos

Estructura de β Glucanos de Levaduras y Esquema de Distintas Fuentes de β Glucanos

The diagram illustrates the structure of β -glucans from yeast and various sources. It shows two main types of linkages: β -1,3 and β -1,6. The β -1,3 linkage is shown as a linear chain of glucose units, and the β -1,6 linkage is shown as a branch point. The diagram also shows a branched structure with β -1,3 linkages and β -1,6 linkages. The text below the diagram reads: **β -glucanos de levaduras** Polímeros de unidades de β -(1 \rightarrow 3)-D-glucopiranosil con ramificaciones de unidades de β -(1 \rightarrow 6)-D-glucopiranosil.

Tipo de β -glucano	Estructura	Descripción
 Bacteriano		β -(1 \rightarrow 3) glucanos lineales
 Hongo		β -(1 \rightarrow 3) con ramificaciones β -(1 \rightarrow 6) cortas
 Levadura		β -(1 \rightarrow 3) con ramificaciones β -(1 \rightarrow 6) largas
 Cereal		β -(1 \rightarrow 3)/ β -(1 \rightarrow 4) glucanos lineales

Fuente: http://www.dinta.cl/wp-dintacl/content/uploads/Beta_glucanos.pdf. Consultado el 29 de enero de 2016

1.1.6 Composición Nutricional

1. Principios Activos: Se reconocen dos sustancias responsables de sus principales efectos: los polisacáridos β -glucanos y los triterpenoides⁷ aunque también se han identificado proteínas bioactivas, adenosinas, ácidos nucleicos entre otras sustancias.

- **Polisacáridos.** Las funciones más importantes fisiológicas beneficiosas de los oligosacáridos en humanos: no estimulan un incremento en la glucosa sanguínea, disminuye la absorción de la glucosa liberada; aportan pequeñas cantidades de energía, mejoran el medio intestinal y mejoran y suprimen la diarrea.
- **Glucanos como polisacáridos moduladores.** Los polisacáridos del tipo de los glucanos ocupan un importante papel, ya sean en su forma pura o en formas heterogéneas como sustancias complejas⁸. En diversos estudios, los glucanos han sido caracterizados como sustancias con propiedades inmunomoduladoras, ya que son capaces de activar mecanismos de inmunidad natural y específica⁹. Los glucanos, junto con otros polisacáridos forman la matriz básica de la pared celular tanto en levaduras, hongos microscópicos y hongos superiores formando un esqueleto protector de la célula, también los glucanos forman un grupo de polisacáridos que actúan como fuente energética de reserva de los sistemas vivos.
- **Triterpenoides.** El fruto de *Ganoderma* es muy amargo una característica no encontrada en ningún otro hongo; estos componentes amargos son los triterpenos, compuestos altamente oxidados

2. Lentinan: Es un beta-glucano formado por los enlaces β -1, 3, β -1, 6. Extracto de azúcar usado como anticancerígeno, productor de linfocitos y control de células muertas por infecciones cancerosas.

3. Eritadenina: Reduce la concentración de colesterol en la sangre

⁷ Lindequist, U. 1995. Structure and biological activity of triterpenes, polysaccharides and other constituents of *Ganoderma lucidum*, en Kim B.K., Kim I.H. and Kim Y.S. (ed.) Recent advances in *Ganoderma lucidum* research. Pharmaceutical Society of Korea, Seoul: 61-69

⁸ Miyazaki T, Nishijima M. 1981. Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. ChemPharmacol Bull 29:3611-3616

⁹ Chang, R. 1996. Potential Application of *Ganoderma* Polysaccharides in the Immune Surveillance and Chemoprevention of Cancer. 153-160 In: Royse, D.J (ed). Mushroom Biology and Mushroom Products. Proceedings of the Second International Congress.

4. Interferón: Impide la multiplicación de células cancerosas y retarda el crecimiento de un tumor¹⁰.

5. Ergosterol: Presente en células fúngicas, se convierte en vitamina D cuando se expone a rayos ultravioleta por lo que tiene efectos positivos en el tratamiento de cáncer de colon.

6. Antioxidantes: Ayuda a la oxigenación celular por lo tanto ayuda a combatir los efectos del envejecimiento.

8. Aminoácidos: Contiene 17 aminoácidos esenciales, por ejemplo la Arginina estimula la producción de linfocitos T y la pérdida de nitrógeno.

9. Sales Minerales: Poseen funciones específicas en la regulación del metabolismo.

1.1.7 Propiedades medicinales. El Reishi contiene polisacáridos β -glucanos que estimulan la inmunidad por mediación de las células¹¹, también ofrece un mayor control del índice de azúcar en la sangre, tratamiento del cáncer y otras degeneraciones inmunológicas, es efectivo en el tratamiento de la artritis, sus propiedades antivirales combaten el resfriado, la hepatitis y VIH, reduce los efectos secundarios de la quimioterapia y la radioterapia, es un antioxidante eficaz ya que protege a las células del envejecimiento, mejorar las alergias y mejorar el flujo de sangre al corazón y reduce la cantidad de oxígeno que este consume.

En la Tabla 2 se pueden ver los efectos de los principales componentes presentes en la *Ganoderma lucidum*

¹⁰ INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. Diccionario del cáncer [En línea].<<http://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=45324>>[Citado en 23 de Febrero de 2015]

¹¹ PERRICONE, Nicolas.La promesa de la eterna juventud.Traducido por Carme Gerones y Carletz Urrits.Alternativas Robin Book. pg. 158

Tabla 2. Composición química *Ganoderma lucidum*

Actividad	Principios responsables
Antitumoral	Polisacáridos/triterpenoides
Hipoglucemiante	Polisacáridos
Inmunomodulación y estimulación de la producción de citocinas	Polisacáridos
Inmunomodulación	Proteínas (LZ-8)
Citotoxicidad frente a células de hematoma	Triterpenoides
Hepatoprotección	Triterpenoides
Inhibición de la liberación de histamina	Triterpenoides
Inhibición de la absorción de colesterol	Triterpenos
Inhibición de la síntesis de colesterol	Triterpenoides
Inhibición de la farnesin-protein-transferasa (Ras)	Triterpenoides
Estimulación de la agregación plaquetaria	Triterpenoides
Inhibición de la agregación plaquetaria	Adenosina/triterpenoides
Antiviral HIV	Triterpenoides
Inducción de la apoptosis	Triterpenoides
Inhibición de la ECA	Triterpenos
Amargor	Triterpenos

Fuente:<http://www.ganodermalucidum.es/composicion-quimica/>. Consultado el 29 de enero de 2016

1.2 INFUSIÓN

La extracción con disolventes es una técnica de separación de un compuesto a partir de un sólido o líquido aprovechando las diferentes solubilidades de los componentes que se vayan a extraer utilizando un disolvente adecuado.

Para determinar el proceso ideal de infusión se hace una larga revisión bibliográfica con el fin de encontrar procesos simples, eficaces y que se puedan llevar a cabo en los laboratorios de Tecnoparque.

1.2.1 Infusión acuosa. Operación unitaria utilizada para disolver un grupo de componentes con agua o algún solvente, generalmente etanol, acetona o mezclas cloroformo-metanol con el objetivo de remover los componentes apolares como los lípidos, fenoles y terpenos. El solvente orgánico facilita una completa separación de los polisacáridos de otros componentes que están presentes.

1.2.2 Infusión alcalina. Operación unitaria en el cual el residuo de la extracción acuosa puede ser extraída posteriormente con soluciones acuosas como NaOH o KOH 2% w/v a 100°C, pero estas condiciones pueden variar. Este residuo se separa por centrifugación y el sobrenadante da lugar al extracto alcalino¹². Nuevamente el residuo es separado por centrifugación y el sobrenadante da lugar al extracto alcalino. Las extracciones con soluciones básicas acuosas casi siempre son hechas usando NaBH₄ con el propósito de evitar que se degraden los polisacáridos.

1.3 DETERMINACIÓN DE GLUCANOS

Al obtener el extracto de polisacáridos es necesario saber si este contiene moléculas de glucosa, cadenas de Lentinan y enlaces glucosídicos característicos de los glucanos presentes en la *Ganoderma lucidum*.

1.3.1 Método DNS. El método DNS es una técnica colorimétrica que aplica la ley de Beer Lambert, por lo cual también es conocido como el método de Miller, el cual se introdujo en 1959.

La técnica es utilizada para detectar azúcares reductores mediante una oxido-reducción, donde el ácido 3,5 dinitrosalicílico es reducido y el grupo aldehído presente en el monosacárido es oxidado. El DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) se utiliza para la hidrólisis de polisacáridos presentes en una muestra debido a que reacciona únicamente con los azúcares reductores. La reducción del ácido genera una coloración amarilla la cual es proporcional a la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra¹³, lo que permite la lectura de absorbancias en el espectrofotómetro y de este modo la cuantificación de azúcares usando una curva de calibración patrón.

Los azúcares reductores son aquellos que tienen un carbono libre en su estructura el cual se puede reducir; entre dichos azúcares se encuentra la glucosa, fructosa y maltosa; este tipo de azúcares son fundamentales en la aplicación del método DNS, el cual resulta una técnica fácil, rápida y eficaz.

¹² RUTHES, Andres. RIVEIRO, Fernanda. IACOMINI, Marcello. D-glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. 2014. pg.754

¹³ BUITRAGO JOHANNA, TENJO DOLLY. Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia universidad javeriana. Bogotá. 2007. p13

1.3.2 Método Fehling. El método de Fehling es una técnica de óxido-reducción que se utiliza para identificar azúcares reductores presentes en una muestra. Este método se fundamenta en la capacidad que tienen los azúcares de ser reducidos debido a la presencia de grupos carbonilo y también a su capacidad para oxidar de grupo carbonilo a grupo carboxilo con la presencia de agentes oxidantes como los que se usan en el método fehling.

Los azúcares reductores, en medio alcalino, pueden reducir el ion Cu^{+2} de color azul a Cu^{+} de color rojo ladrillo, el cual es el indicador visual de la presencia de azúcares reductores durante la prueba experimental¹⁴.

1.3.3 Microscopía de fuerza atómica. La microscopía de fuerza atómica es una técnica que utiliza un instrumento mecano-óptico el cual detecta la fuerza atómica cuando una punta se acerca a la superficie de la muestra que se quiere analizar (ver imagen 3); este instrumento puede realizar medidas de imagen y de fuerza, por lo que resulta muy útil en la identificación de compuestos.

La microscopía de fuerza atómica se ha convertido en la técnica líder en lo que respecta al barrido con sonda¹⁵ ya que tiene alcances únicos para la caracterización a escala nanométrica y micrométrica. Los modos de operación más usados se describen a continuación:

Modo de contacto: En este modo de operación la punta barre la superficie de la muestra aplicando una fuerza constante y sin levantar la punta de la superficie. Se da un movimiento vertical sobre la muestra del tubo de barrido que permite obtener una imagen de la muestra la cual recibe el nombre de imagen de alturas.

Modo de contacto intermitente (tapping): Con este modo de operación se aplica se aplica una señal sinusoidal. El barrido se realiza con un escáner, que sube y baja en forma de z con el fin de generar la imagen de alturas.

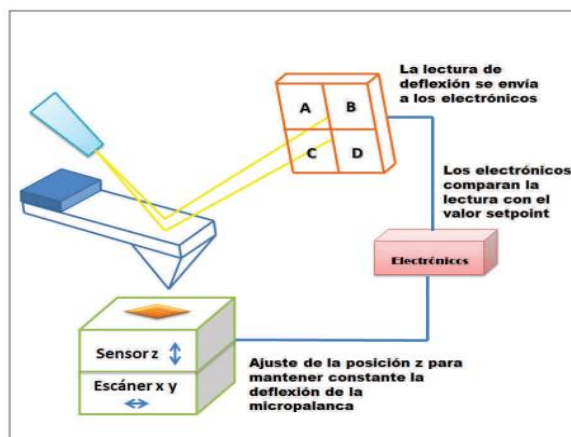
Modo de no-contacto: Este modo de operación también aplica una onda sinusoidal pero no hay contacto con la superficie de la muestra. Este modo de operación se utiliza para muestras líquidas, ya que no se aplica ninguna fuerza sobre la muestra.

La punta que sondea la muestra está situada en el extremo de un cantiléver el cual se dobla o se deflecta; mediante un detector se mide la forma en que la punta sondea la muestra y la deflexión generada en el cantiléver que permiten obtener un mapa de la topografía de la superficie de la muestra que se está analizando. Esto se puede ver en la Imagen 5.

¹⁴ SUAREZ,Ruben.DOMINGUEZ, GLoria.TELLO,Isaac.GONZALEZ,Jose.Ganoderma lucidum Extract as Corrosion Inhibitor for Carbon Steel in H_2SO_4 .Chemical Science Review and Letters.(Noviembre,2014).pg.426.ISSN 2278-6783

¹⁵ OLMOS DANIA, GONZALEZ JAVIER. Microscopía de fuerza atómica. Modos básicos de operación. 2008-2009. Universidad carlos III de madrid. Madrid. p9

Imagen 5. Microscopio de fuerza atómica



Fuente: Revista Universidad del Valle

1.3.4 Espectroscopia Infrarroja. El uso del espectroscopio infrarrojo es una técnica muy utilizada para realizar análisis cualitativos e identificar moléculas, enlaces y grupos funcionales presentes en una muestra o material. La espectroscopia infrarroja se fundamenta en la absorción de radiación infrarroja de moléculas que se encuentran en vibración. Debido a que una molécula pasa de su estado de reposo a un estado de excitación al absorber luz infrarroja se pueden generar dos tipos de vibraciones: de alargamiento o de flexión; el tipo de vibración de la molécula depende de la energía que se suministre.

Gracias a las vibraciones de las moléculas se puede generar el espectro infrarrojo con el cual se identifica la molécula teniendo como referente de tablas las longitudes de onda del mismo compuesto. Cabe destacar que solo se puede observar un pico en el espectro de infrarrojo en el caso de que el movimiento de vibración, alargamiento o flexión, vaya acompañado de un cambio en el momento dipolar¹⁶ por ello para compuestos con enlaces muy polares se generan picos más pronunciados.

En cuanto al cumplimiento del primer objetivo se puede decir que se ha cumplido pues se han seleccionado los procesos, variables y parámetros para llevar a cabo la extracción de polisacáridos de la *Ganoderma Lucidum*.

¹⁶ [Citado 4 Febrero del 2016] Disponible <<http://ocw.um.es/ciencias/experimentacion-en-quimica-organica-avanzada/material-de-clase-1/eqoa-tema-1.pdf>>

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describen los materiales y metodologías utilizadas para llevar a cabo el proyecto de investigación.

2.1 MATERIALES

2.1.1 Materia prima. El hongo *Ganoderma Lucidum*, es adquirido en la ciudad de Manizales a la empresa Reishi Colombia, este proveedor se escoge porque es una de las empresas que venden la seta fresca y en cuerpo fructífero del Reishi rojo como se observa en la Imagen 6.

Para mantener el hongo en buenas condiciones es necesario almacenarlo en la nevera a 14°C¹⁷ y sellado para evitar la contaminación con otros hongos.

Imagen 6. Cuerpo Fructífero *Ganoderma Lucidum*



2.1.2 Reactivos .En la Tabla 3 se pueden ver los reactivos que se van a emplear en los métodos de extracción y caracterización.

¹⁷ PROTOCOLO DE HONGOS. Protocolo para la recolecta, descripción, identificación y mantenimiento de hongos.<http://www.inbio.ac.cr/web_herbarios/web/pdf/protocolo-hongos.pdf>[citado en 16 de abril de 2016]

Tabla 3. Reactivos empleados en el proceso extracción

Reactivo	Grado
Etanol 98%	Analítico
Ácido Acético 99%	Analítico
Agua Destilada	Agua Destilada de laboratorio
Glucosa	Analítico
Reactivo DNS	Analítico
Hidróxido de Sodio	Analítico
Hidróxido de Potasio 85%	Analítico
Fehling A	Analítico
Fehling B	Analítico
Tartrato de Sodio y Potasio	Analítico

2.2 ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

El hongo se corta en trozos de 2 cm y se procede a evaporar el agua presente en esté en una mufla a 65° C durante 8 horas, posteriormente se realiza un proceso de molienda y tamizado, la molienda se hace para aumentar el área superficial y de contacto con el solvente.

2.3 EQUIPOS EMPLEADOS

Los equipos empleados para la extracción se explican a continuación:

Extractor Soxhlet: En este equipo se lleva a cabo una obtención con solvente en un equipo de vidrio diseñado para la extracción de componentes lipídicos en un sólido a través de un disolvente afín. Su objetivo principal es realizar un lavado sucesivo al sólido con un solvente determinado que va ir extrayendo los componentes más solubles de él.

Mufla: Horno que permite alcanzar temperaturas muy altas para llevar a cabo procesos de control, tratamientos térmicos y secado.
Rango de trabajo 30° C-300° C.

Bomba al vacío: Se encarga de extraer moléculas de gas de un volumen sellado, formando un vacío parcial.

Rotavaporador: Se utiliza para extraer el solvente ya sea de un compuesto o de una mezcla, el funcionamiento del rotavaporador y el proceso a que da lugar a una destilación a presión disminuida.

Espectrofotómetro: Instrumento usado para análisis químico en función de la longitud de onda, permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto.

Rango: 300 nm-100 nm.

Resolución: 1nm

Rango de Absorbancia: 0.300 - 1.99

Microscopio de Fuerza Atómica: Instrumento mecano-óptico capaz de detectar fuerzas del orden de los nanonewtons. Al rastrear una muestra, es capaz de registrar continuamente su topografía por medio de una punta afilada de forma piramidal.

Amplitud media: 38 μm

Longitud: 225 μm

Fuerza Constante: 48 N/m²k

Frecuencia de Resonancia: 190 KHz

Baño Termostataado: Se utiliza para mantener una solución a una temperatura constante durante el tiempo que nos interesa.

Rango: 0° C-100° C

Infrarrojo: Equipo que permite la identificación de grupos funcionales de materiales orgánicos, pinturas y determinadas estructuras de muestras sólidas y líquidas por transmisión espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier, en el rango espectral comprendido entre 400 y 4.000 cm^{-1} .

2.4 METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN

La realización repetitiva de ensayos de métodos de extracción de polisacáridos se desarrollará de modo que se puedan comparar los resultados obtenidos en cada uno de ellos.

2.4.1 Extracción con Soxhlet. Para la extracción se debe tener en cuenta: la selección del solvente, características de la muestra, la condiciones de operación. El proceso a utilizar se basa en la metodología del artículo “Comparative chemical and biological investigations of β -glucan-containing products from *shiitake* mushrooms”¹⁸. La metodología se puede observar en la Figura 2.

2.4.1.1 Selección del solvente. Debe seleccionarse un solvente adecuado de tal forma que el soluto se pueda disolver en el solvente caliente y ser insoluble en solvente frío. Este debe contener la siguientes características que ofrecen un mejor balance de varias características deseables: alto límite de saturación y

¹⁸CARSTEN, Grundenmanna. KAUFERA, Manuel. SAUERA, Barbara. BETTING, Philip. MERDIVANC, Simon. ROMAN, Hubera. Comparative chemical and biological investigations of β -glucan-containing products from shiitake mushrooms. Journal of Functional Food. Vol 18 (Octubre, 2015).pg 2.

selectividad respecto al soluto por extraer, capacidad para producir el material extraído con una calidad no alterada por el disolvente, estabilidad química en las condiciones del proceso, baja viscosidad, baja presión de vapor, baja toxicidad e inflamabilidad, baja densidad, baja tensión superficial, facilidad y economía de recuperación de la corriente de extracto y bajo costo¹⁹.

El solvente más utilizado para extraer polisacáridos de los cuerpos fructíferos de los hongos es el etanol, es capaz de remover componentes como lípidos, fenoles y terpenos; este tiene una temperatura de ebullición de 78°C es un excelente solvente para remover polisacáridos con respecto a su solubilidad y facilidad de recuperación. La extracción con solventes orgánicos facilita una separación completa de polisacáridos de otros componentes²⁰ es llevada a cabo comúnmente con agua a temperaturas altas por encima de los 80°C porque los β -glucanos obtenidos varían con la temperatura del agua durante el proceso de extracción. Generalmente una temperatura alta arriba de 100°C produce un mayor rendimiento²¹.

• **Condiciones de Trabajo**

- **Características de la muestra.** La extracción depende en gran parte de las características físicas de la muestra y dimensiones de la partícula puesto que la difusión interna puede ser un paso limitante durante la extracción, pues entre menos tamaño de partícula va a tener mayor rendimiento, el hongo debe quedar en partículas finas.
- **Temperatura de Calentamiento.** La temperatura de extracción tiene un efecto significativo en la calidad de los productos, en este caso se emplean temperaturas entre 75-100° C²² debido a los puntos de ebullición de la relación de etanol-agua trabajada.

¹⁹ DAHLSTROM, D.A. Liquid -Solid Operation and equipment. 7 ed: McGraw-Hill, 1999. p. 58-59

²⁰ RUTHES, Carolina Andrea. RIBEIRO, Fernanda. IACOMINI, Marcelo. D-glucans from edible mushrooms: A review on extraction, purification and chemical characterization approaches. (2014). p. 754

²¹ COMPARATIVE CHEMICAL AND BIOLOGICAL INVESTIGATIONS OF β -GLUCAN CONTAINING PRODUCTS FROM SHIITAKE MUSHROOMS. Gracelinc Limited. Inventor MORGAN, Keith, Raymond. Fecha de Solicitud: 1, Julio, 2004. ESPAÑA, Patente de Investigación 2 210 577. 1, Julio, 2004.

²² LANCHEROS, Jeimmy. ROJAS, Lorena. Obtención de un extracto de polisacáridos a base del hongo *Lentinula Edodes* en Tecnoparque Colombia. Trabajo de Grado de Ingenieros Químicos. Bogotá D.C.: Fundación Universidad de América. Facultad de Ingeniería Química. 2013. pg 42.

- **Tiempo de contacto con la muestra.** Se van a evaluar el número de recirculaciones por lo que el tiempo de contacto va a cambiar, este tiempo tiene un aproximado de 2 a 5 horas ya que esto depende del equipo y el tamaño de este.
- **Cartucho.** Se utiliza un papel filtro cualitativo, para que la muestra no quede en el sifón y no haga contacto con el extracto recirculado y el solvente.
- **Montaje Soxhlet.** Los equipos Soxhlet a emplear poseen un volumen de balón de 500 y 1000 mL y un volumen de sifón de 50 mL, 150 mL y 500 mL.

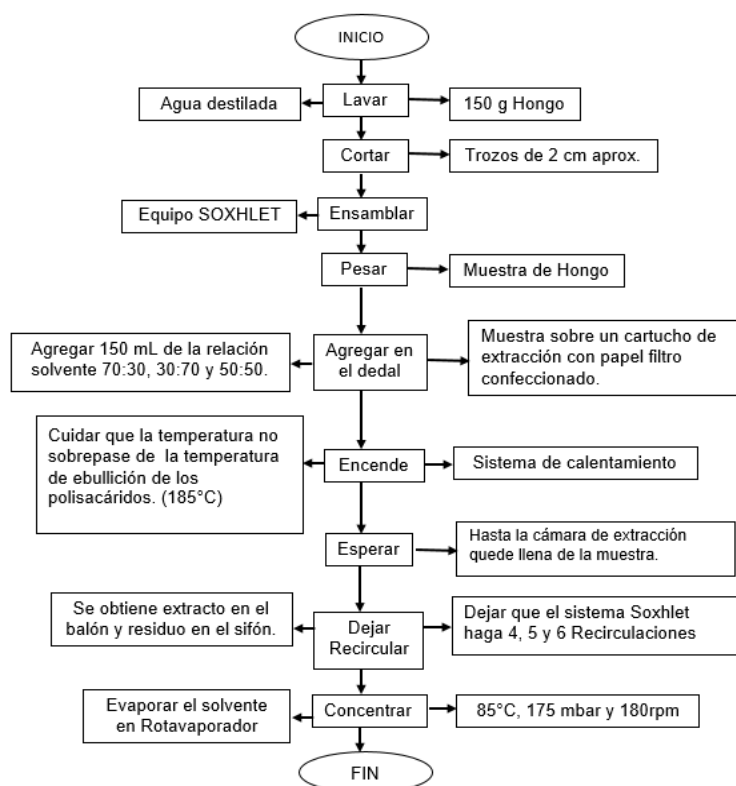
2.4.1.2 Objetivo de la pre-experimentación. Es importante realizar una extracción pre-experimental variando la relación de solvente pues puede mostrar en primera instancia que relación solvente-agua genera un mayor rendimiento para que la técnica de extracción sea flexible, sencilla y de fácil implementación. Se van a evaluar relaciones etanol-agua: 30:70,70:30 y 50:50²³.

- **Concentración.** La separación del solvente y el extracto se realiza por un proceso de evaporación donde por medio de la diferencia de los puntos de ebullición se logra recuperar el solvente utilizado y obtener un extracto mucho más puro. Este proceso se lleva a cabo en una rotavaporador que genera calor permitiendo que el solvente sea evaporado, las condiciones son: temperatura de 92°C, presión al vacío de 175 mbar y 180 revoluciones²⁴ por minuto durante 15 minutos.
- **Evaporación.** El extracto que se obtiene contiene gran cantidad de agua, es necesario retirar parte de ella por medio de una evaporación a 100°C en una mufla durante 3 horas.

²³ PEREZ, Jhony Leonardo, QUITIAN, Lilian Andrea. Evaluación de métodos de extracción de saponinas de los residuos del beneficio del fique. Trabajo de grado de Ingenieros Químicos. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. 2009. pg .

²⁴ LANCHEROS, Jeimmy. ROJAS, Lorena. Op. cit., p. 38.

Figura 1. Diagrama de flujo de la Extracción Soxhlet y Concentración de polisacáridos



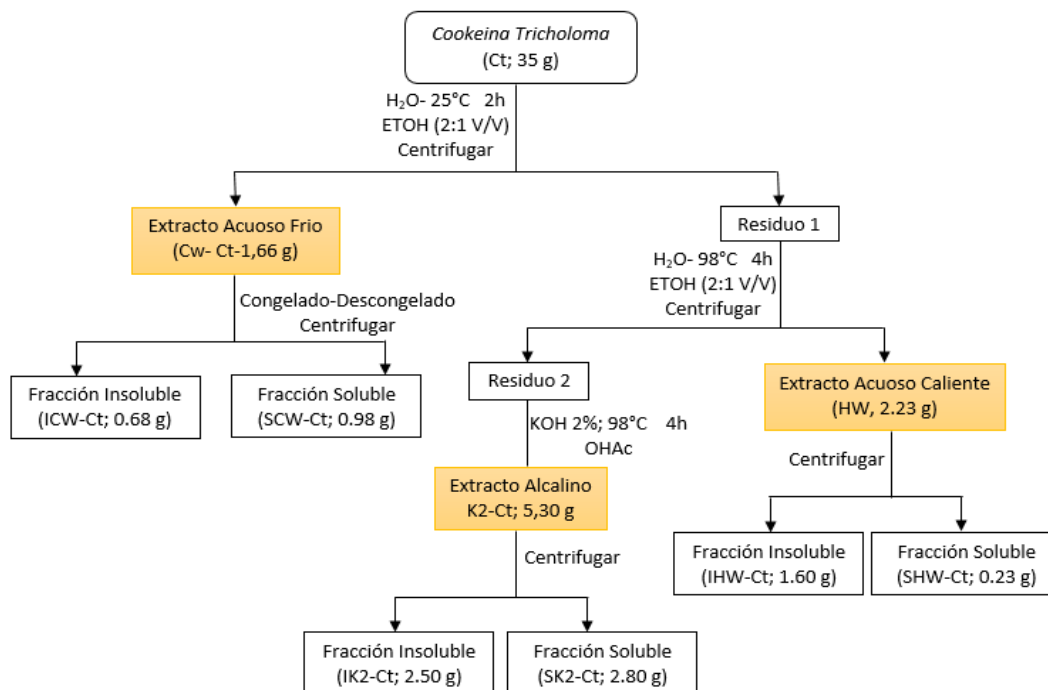
2.4.1.3 Caracterización pre-Experimentación. Al obtener el extracto de polisacáridos es necesario saber si este contiene o no las moléculas que se están determinando, para ello se debe realizar el Test Fehling para determinar los azúcares reductores.

- **Método de Fehling.** Antes de iniciar el proceso se debe filtrar la muestra dos veces en vacío usando un embudo Buhner y papel filtro cualitativo con el fin de remover los sedimentos de tal modo que la muestra no quede turbia. En este método de caracterización se usa el azul de metileno como indicador.

En un Erlenmeyer añadir 1mL de Fehling A, 1mL de Fehling B y 30mL de agua destilada y calentar hasta que empiece a ebulir. En una bureta colocar la muestra, empezar a titular y al evidenciar un cambio de color a gris añadir 2 gotas de azul de metileno y volver a titular hasta que se vea un color carmín, estos indica la presencia de glucosa. Anotar el volumen gastado

2.4.2 Infusión acuosa-alkalina. Este método de extracción se hace de manera similar a como está planteado en el artículo Structure and antinociceptive effects of β -D-glucans from *Cookeina tricholoma*²⁵. La metodología se puede ver en la Figura 2.

Figura 2. Scheme of extraction and purification of insoluble β -D-glucans from *C. tricholoma*



²⁵ MORENO,Roberta., RUTHES,Andrea, BAGGIO,Christiane. VILLAPLANA,Francisco., DKOMURA,Dirce. IACOMINI,Marcelo. Op. cit., p. 3.

2.4.2.1 Purificación. Para eliminar algunas proteínas presentes en el extracto se lleva a cabo una precipitación por desnaturalización selectiva usando un solvente miscible con el agua como el etanol que permite la precipitación de proteínas. Las principales causas de agregación de las moléculas proteicas son las fuerzas electrostáticas y dipolares. La desnaturalización por solventes se debe a que las moléculas de los solventes interfieren con las interacciones hidrofóbicas en el interior de las proteínas. Este proceso se ve favorecido a temperaturas mayores a 0°C. A las muestras se les agregaron 2 volúmenes de etanol a 4°C durante 12 horas²⁶.

2.4.2.2 Filtración a Vacío. Es la fuerza impulsora para que permite que el líquido atraviese el filtro es la que ejerce la presión atmosférica cuando se aplica vacío al sistema, permite la filtración de aquellas suspensiones en las que la fuerza de gravedad no es suficiente para el proceso. Para eliminar las proteínas que quedaron precipitadas y eliminar las dos fases que se forman es necesario realizar una separación de estas fases, llevando a cabo una filtración a vacío la cual emplea un embudo Buhner y papel filtro cualitativo de 90 mm, este proceso se lleva a cabo con una bomba a vacío.

2.4.2.3 Concentración. La separación del solvente y el extracto se realiza por un proceso de evaporación donde por medio de la diferencia de los puntos de ebullición se logra recuperar el solvente utilizado y obtener un extracto mucho más puro. Este proceso se lleva a cabo en una rotavaporador que genera calor permitiendo que el solvente sea evaporado, las condiciones son: temperatura de 82°C, presión al vacío de 175 mbar y 180 revoluciones²⁷ por minuto durante 30 minutos.

2.4.2.4 Centrifugación. El proceso de centrifugación se realiza en equipos que utilizan la fuerza centrífuga y la diferencia de densidades entre el agua y el extracto para la obtención de glucanos, se realiza a temperaturas menores de 45°C, lo que permite que no se modifiquen las propiedades. El extracto se centrifuga a 800 rpm durante 20 minutos²⁸ a temperatura ambiente para precipitar las sustancias insolubles en el extracto.

²⁶ HAOKI, Nabna. HAMAGUCHI, Astuko. KURODA, Histora. The Chemical Structure of an Antitumor Polysaccharide in Fruit Bodies of *Grifola frondosa* (Maitake). *Chem Pharma Bull.* Vol 35 (Agosto; 1987). pg 1.

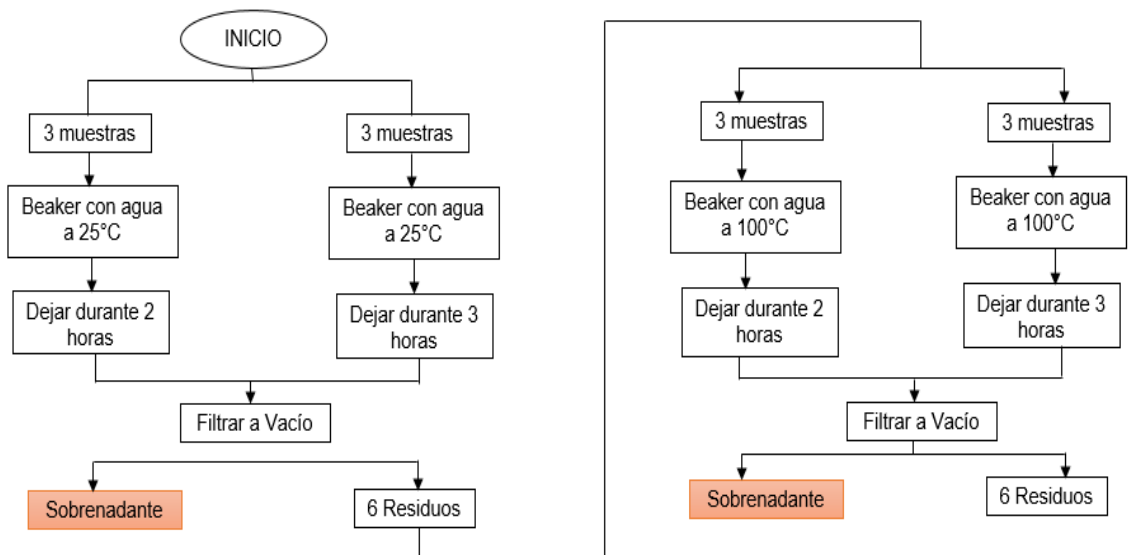
²⁷ LANCHEROS, Jeimmy. ROJAS, Lorena. Obtención de un extracto de polisacaridos a base del hongo *Lentinula Edodes* en Tecnoparque Colombia. Trabajo de Grado de Ingenieros Químicos. Bogotá D.C.: Fundación Universidad de America. Facultad de Ingeniería Química. 2013. pg 42.

²⁸ LEE, Chum. JUN, Bae. HYEONG, Pyo. TAE, Choe. SANG, Kim. HYE, Hwang. Biological Activities of the polysaccharides produced from submerged culture of edible Basidiomycete *Grifola Frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*. [base de datos en línea] (Septiembre, 2002) p.3. [Citado en 22 de marzo de 2016] Disponible en SCIENCE DIRECT.

- **Infusión fría.** Se toma una relación de 15 g de hongo molido por cada 150 mL, cada muestra se debe llevar a un baño termostático a 25°C durante 2 y 3 horas para cada muestra por triplicado. Del anterior proceso se forman dos fases compuestas por los residuos y el extracto frío acuoso, para eliminar estas fases es necesario realizar una filtración al vacío durante 3 minutos utilizando papel filtro cualitativo con el fin de obtener un sobrenadante más puro y retener los sólidos.
- **Infusión caliente.** El segundo paso es la extracción agua caliente se hace con el residuo sólido obtenido separado en la operación anterior, agregar 240 mL de agua destilada y calentar las muestras a 98°C durante 2 y 3 horas para cada muestras por triplicado , dejar enfriar a temperatura ambiente y realizar los mismos pasos de la extracción anterior.

El proceso para el proceso de infusión fría y caliente se muestra en la Figura 3.

Figura 3. Infusión fría y caliente



- **Infusión Alcalina.** Luego se procede a realizar extracción alcalina de los residuos de la extracción con agua caliente, por lo que se debe agregar hidróxido de potasio con una concentración del 1%, 1.5% y 2% P/V, proceder a calentar en una plancha las 6 muestras durante 2 y 3 horas (2 repeticiones por cada muestra). Para precipitar las proteínas se deben agregar 10 mL de ácido acético 1M durante 24 horas y por último centrifugar durante 30 minutos a 800 rpm para precipitar la fase insoluble.

La importancia de este proceso es que incluye tres métodos de extracción dentro del mismo proceso secuencialmente se hace primero con agua fría luego con agua caliente y la última preparando una solución de KOH. La Figura 4 muestra en secuencia de la infusión acuosa-alcalina.

Figura 4. Diagrama de flujo de la Infusión Acuosa-Alcalina y concentración de polisacáridos.

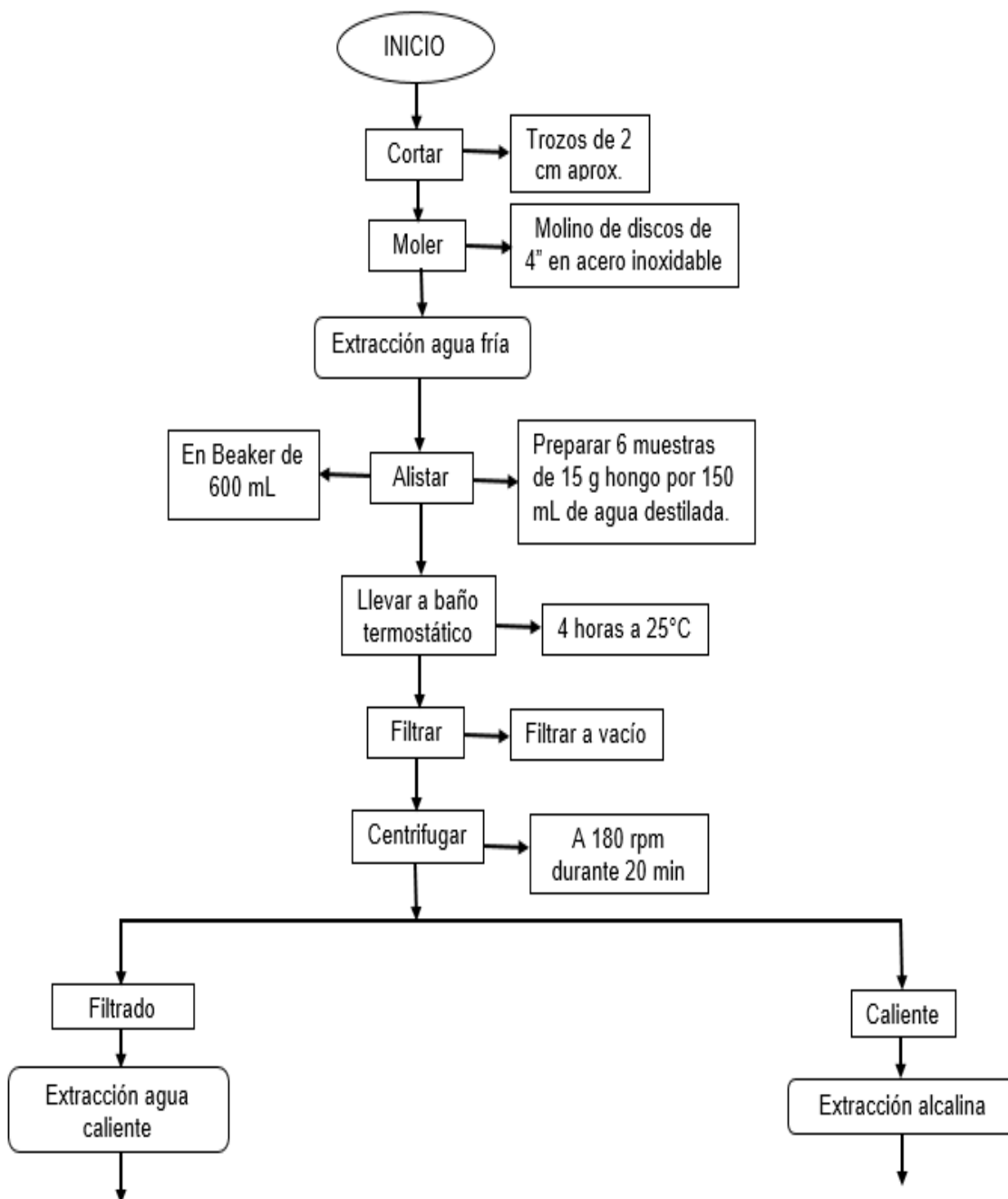
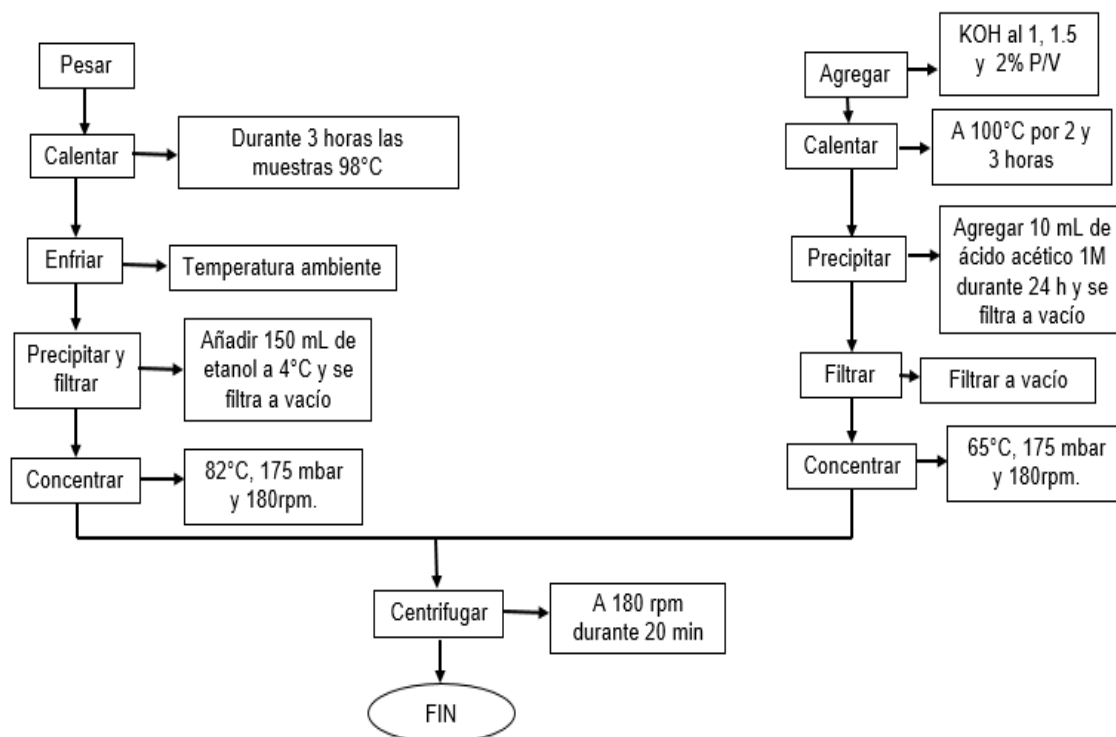


Figura 4. (Continuación)



2.5 CARACTERIZACIÓN

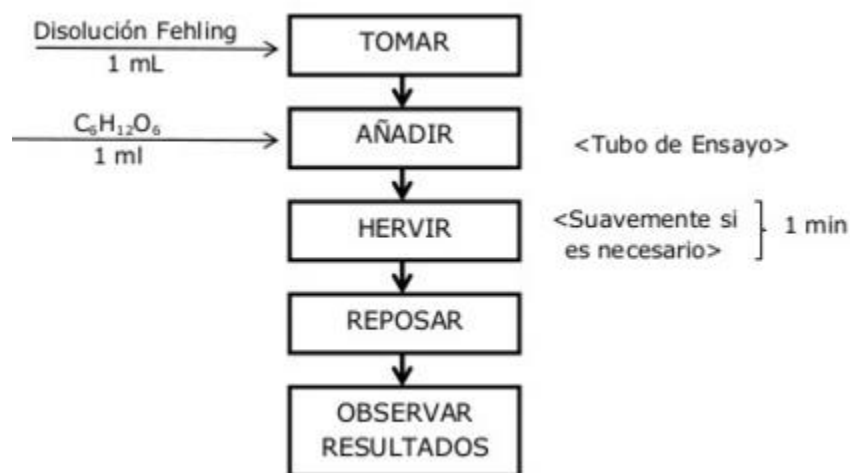
La primera es una prueba de azúcares reductores para saber que muestras tienen la mayor cantidad de glucosa, en la segunda se usa el microscopio de fuerza atómica en el que se puede ver la topografía de la muestra y se determina la presencia de uno de los activos de la *Ganoderma lucidum* como son las cadenas de Lentinan que son de la familia de β -glucanos; y por último la espectroscopia infrarroja la cual indica la presencia de enlaces glucosídicos que pueden ser β -(1,3),(1,6),(1,4) dan lugar a bandas en determinados intervalos de frecuencia que permiten identificar el tipo de enlaces.

2.5.1 Método de Fehling. Antes de iniciar el proceso se debe filtrar la muestra dos veces en vacío usando un embudo Buhner y papel filtro cualitativo con el fin de remover los sedimentos de tal modo que la muestra no quede turbia. En este método de caracterización se usa el azul de metileno como indicador.

En un Erlenmeyer añadir 1mL de Fehling A, 1mL de Fehling B y 30mL de agua destilada y calentar hasta que empiece a ebullición. En una bureta colocar la muestra, empezar a titular y al evidenciar un cambio de color a gris añadir 2 gotas de azul de metileno y volver a titular hasta que se vea un color carmín, este indica la

presencia de glucosa. Anotar el volumen gastado. En la Figura 5 se puede ver el procedimiento para llevar a cabo la determinación de azúcares reductores.

Figura 5. Diagrama de flujo para análisis por método Fehling



2.5.2 Método DNS. Preparar 200 mL de solución base DNS así: agregar 20 mL NaOH 2N, 30 g de tartrato de sodio y potasio y 1 g de DNS dejar calentar, enfriar y almacenar en un lugar oscuro.

Para la elaboración de la curva de calibración: Preparar una solución de glucosa de 2 g/L, agregando 0.1 g de dextrosa en 50 mL de agua en un balón aforado. La solución resultante corresponde a la solución madre.

Posteriormente se realizan diluciones de la solución madre con el fin de obtener concentraciones que estén en el rango de 0.5 y 2 g/L²⁹, para ello, preparar soluciones de 0.2, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, y 2 g/L en tubos de ensayo con tapa y con una micropipeta de 2 mL.

Preparar el blanco correspondiente para la calibración del espectrofotómetro agregando 2 mL de agua y 1 mL de solución DNS, a cada dilución realizada anteriormente adicionar también 1 mL de solución DNS. Calentar todas las muestras durante 5 min en un baño termostático y enfriar en un baño de hielo por 5 min. A continuación, leer en el espectrofotómetro a 540 nm el blanco y calibrar a 0, después leer cada solución a las concentraciones diluidas intercalando siempre la calibración del equipo antes de cada lectura

²⁹ GONZALEZ, Viviana. HERRERA, Carolina. Determinación de parámetros cinéticos y pruebas preliminares de tratabilidad para colorantes y metales empleando una cepa de *Ganoderma lucidum*. Bogotá D.C. Trabajo de Grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología

Tomar 1 mL de muestra obtenida de extracto en un tubo de ensayo con tapa y agregar 1 mL de solución base DNS, agitar cada muestra y dejar ebullición en baño termostático por 10 min, luego enfriar rápidamente en un baño de hielo y realizar las lecturas en el espectrofotómetro. Anotar las absorbancias registradas.

Con solo los datos de las absorbancias en las disoluciones de glucosa registradas en el espectrofotómetro graficar la absorbancia vs la concentración (Curva de calibración), ajustar los datos a una tendencia lineal y calcular la ecuación de la recta. Después interpolar las absorbancias de las muestras en la curva con ayuda de la ecuación y calcular la concentración de azúcares reductores en cada muestra. En la Figura 6 se puede ver el procedimiento para llevar a cabo el método DNS y en la Figura 7 es para saber cómo se deben leer las muestras usando el espectrómetro.

Figura 6. Diagrama de flujo Método DNS

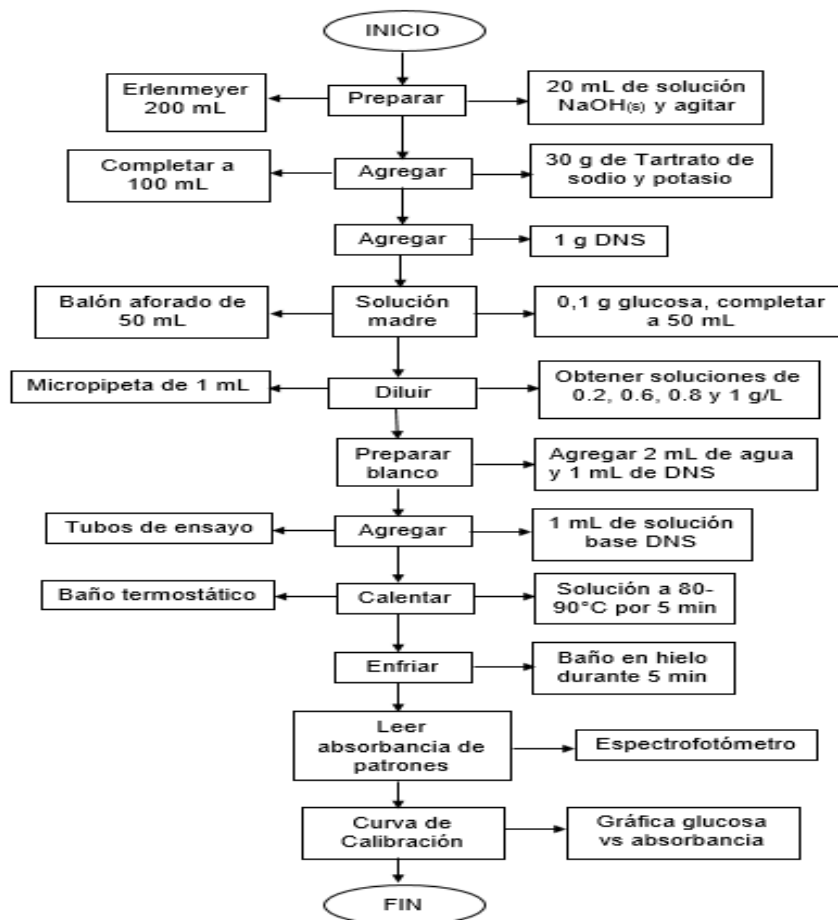
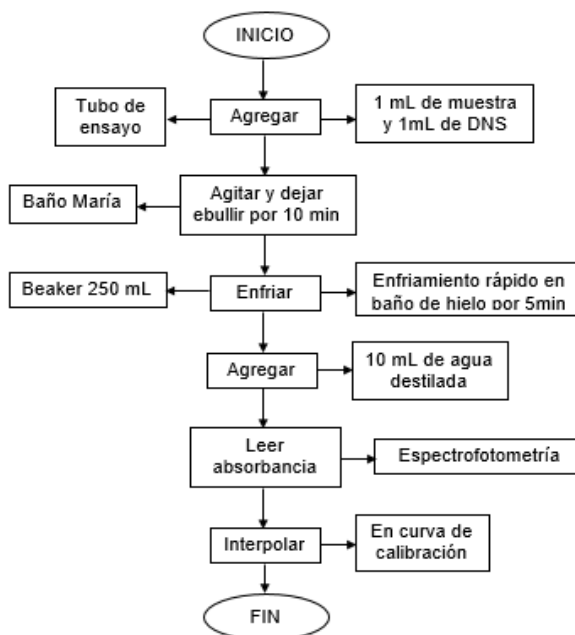


Figura 7. Diagrama de lectura de muestras DNS



2.5.3 Microscopio de fuerza atómica. Antes de analizar el extracto en el microscopio de fuerza atómica se debe poner 1 gota del extracto en 1cm^2 de la mica con una pipeta de Pasteur y dejar secar durante 24 horas en una caja de Petri a temperatura ambiente.

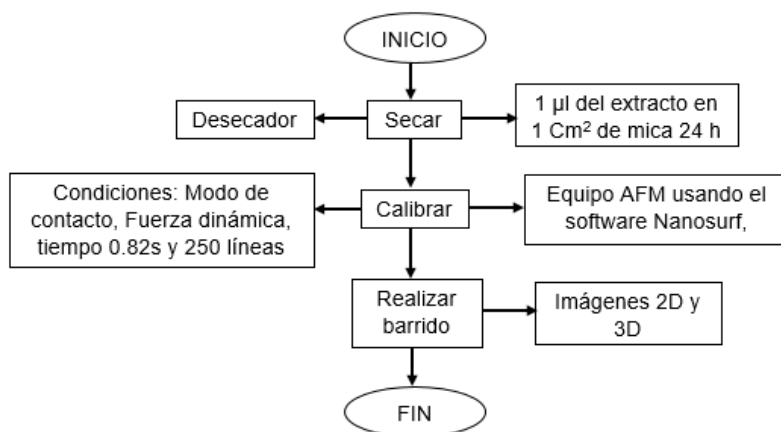
La muestra se coloca en microscopio de fuerza atómica a las siguientes condiciones:

- Modo de No contacto, ya que es el más indicado utilizado para muestras líquidas.
- Frecuencia de 300 kHz de resonancia
- 0.75 s de escaneo continuo

Después del barrido se obtienen imágenes de la muestra en 2D y 3D. Las cuales se comparan con las imágenes encontradas en literatura con el fin de identificar las cadenas de polisacárido en la muestra³⁰. En la Figura 8 se observa el procedimiento para analizar las muestras por el microscopio de fuerza atómica.

³⁰ LANCHEROS, Jeimmy.ROJAS,Lorena. Op. cit., p. 43.

Figura 8. Diagrama de flujo para análisis por Microscopio de fuerza atómica



2.5.3 Espectroscopia Infrarroja. Limpiar las placas de NaCl, previamente almacenadas en un desecador, con un disolvente orgánico anhidro (acetona o cloroformo) y secarlas, evitar al máximo que los disolventes tengan agua.

Añadir unas gotas de acetona a la superficie de una de las placas y colocar la otra por encima para evitar su volatilidad. Posteriormente fijar todo el conjunto en el portamuestras y llevarlo al espectroscopio.

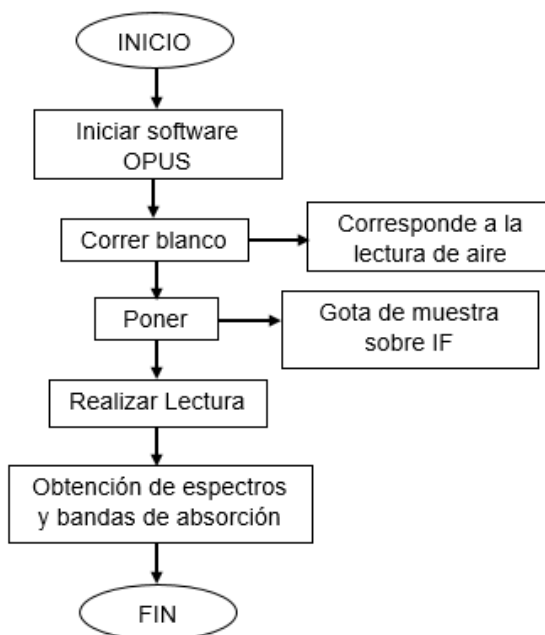
Hacer el análisis de la placa de NaCl limpias y sin muestras para generar el espectro conocido como “Espectro de fondo (Background)” con el fin de eliminar las bandas de absorción de gases y residuos presentes en el solvente.

Depositar la muestra en el portamuestras y realizar el barrido para obtener el espectro. El barrido debe ser igual o inferior al número de barridos del Background.

Con ayuda del software auxiliar del espectroscopio infrarrojo realizar las correcciones que se requieran al espectro, como la eliminación de señales de ruido, sustracción del espectro de agua, etc.

Las bandas generadas en el espectro se pueden interpretar con ayuda bibliográfica para identificar las principales frecuencias de absorción de los B-glucanos. En la Figura 9 se puede ver el diagrama de flujo para la lectura de muestras usando el equipo infrarrojo.

Figura 9. Diagrama de flujo para análisis por Espectroscopia Infrarroja.



2.6 MODELO EXPERIMENTAL

Para conocer el efecto de las variables respecto al rendimiento de cada extracción se relacionan una serie de experimentos enfocados a modelar las diferentes características de los procesos de extracción trabajados.

Cuando se necesita saber cómo influyen k factores en un proceso y determinar si hay interacción entre ellos, el diseño factorial 2^k es una estrategia eficiente para interpretar los resultados significativos. Este diseño permite elegir una zona escogida de los datos experimentales y encontrar una dirección prometedora para la mejora del proceso; para este caso, se utilizará un diseño factorial 2^k para estudiar cómo la variación del método de extracción y el tiempo de contacto del mismo con la muestra, afectan directamente el rendimiento de cada extracción de los polisacáridos tipo glucano³¹.

³¹ FERRÉ, joan. Diseño factorial completo 2^k . Grupo de quimiometría y cualimetría. Departamento de Química analítica y química orgánica. Universidad Rovira i Virgili. Tarragona. Disponible en: <<http://rodi.urv.es/quimio/general/doecast.pdf>>

2.6.1 Construcción del diseño factorial. Este diseño consta de una matriz sencilla en donde cada factor se estudia a dos niveles únicamente y sus experimentos contemplan dos factores que se muestran en la Tabla 5 en donde se muestran la variable respuesta, los niveles y factores correspondientes.

Para el análisis factorial lo primero que se realiza es determinar la productividad para cada muestra, por medio de las concentraciones y el volumen final del extracto y por último se obtiene el rendimiento a partir de la masa cargada inicialmente.

Este análisis se va a llevar a cabo en programa Stargraphics Centurión que realizar pruebas F en tabla Anova, que permite identificar los factores más importantes, también realiza pruebas de rango múltiples que se encargan de informar cuál medida es significativamente diferente a las otras, este programa además realiza gráficas de medias y de interacciones que ayudan a interpretar los efectos significativos.

El diseño de experimentos se va a realizar con los dos métodos de extracción con mejores rendimientos.

- Número de repeticiones: Debido a la cantidad de materia prima que se tiene para la experimentación se realizaron tres repeticiones por cada ensayo.
- Variable de respuesta: La variable considerada de estudio es el rendimiento de extracción de los polisacáridos con respecto al cuerpo fructífero molido.

En la Tabla 4 se observan los niveles y factores que se van a trabajar en diseño factorial.

Tabla 4. Niveles de las variables

NIVELES	FACTORES
Tiempo de extraccion	120 min 180 min
Metodo de extraccion	Infusion Caliente Infusion Fria

VARIABLE RESPUESTA

RENDIMIENTO DE EXTRACCION

En este capítulo se evidencia el cumplimiento del primer objetivo ya que se seleccionan los parámetros y las condiciones de las metodologías que se escogieron para realizar la evaluación.

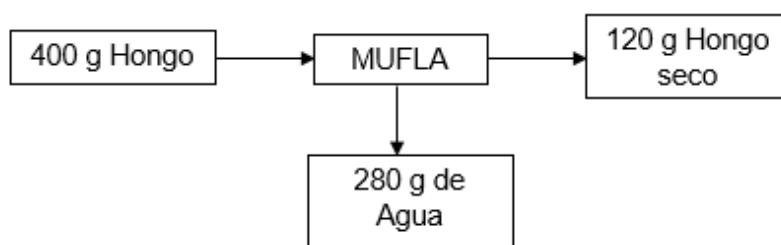
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

En este capítulo se evidencia el paso a paso del proceso de extracción de los polisacáridos tipo glucano.

3.1 ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

El hongo se cortó en trozos de 2 cm y se evaporó el agua presente en este en una mufla a 65° C durante 8 horas, posteriormente se realizó un proceso de molienda y tamizado, como se muestra en la Figura 9, con el fin de aumentar el área superficial y mejorar el contacto con el solvente. A continuación se puede ver el balance de masa correspondiente a la deshidratación del hongo.

Figura 10. Balance de masa



El hongo se corta en trozos de aproximadamente 2 cm para su posterior deshidratación, como se observa en la Imagen 7, y posterior reducción de tamaño después de haber hecho la operación de molienda.

Imagen 7. Hongo cortado y molido



3.1.1 Análisis de granulometría. El análisis granulométrico tiene como objetivo la determinación cuantitativa de la distribución de tamaños de partículas del hongo después del proceso de molienda debido a que la muestra no era completamente homogénea. Se llevó a cabo el procedimiento y cálculos para análisis granulométrico con 100,4 g de hongo previamente molido para determinar el diámetro promedio de partícula.

Este análisis se evidencia en la Tabla 5.

Tabla 5. Análisis de granulometría

	Tamiz	Abertura Promedio (mm)	Peso retenido sobre tamiz pequeño (g)	Dpi	Xi
				(Diámetro de Partícula)	(Fracción másica de cada tamiz)
	3,5	5,6	-	-	
	4	4,75	10	5,175	0,1010101
	8	2,36	24,7	3,555	0,24949495
	12	1,7	10,6	2,03	0,10707071
	16	1,18	14,1	1,44	0,14242424
	20	0,85	8,3	1,015	0,08383838
	30	0,6	10,57	0,725	0,10676768
	50	0,3	14,21	0,45	0,14353535
	70	0,212	3,07	0,256	0,0310101
	100	0,150	2,8	0,181	0,02828283
	120	0,125	0,37	0,1375	0,00373737
Fondos	140	0,106	0,28	0,1155	0,00282828
			99		

El diámetro medio de partícula es 0.89 mm equivalentes a 890 µm.

3.2 EXTRACCIÓN SOXHLET

3.2.1 Pre-experimentación Extracción. Se realizó la pre-experimentación con el fin de determinar qué relación de solvente-agua es la más eficiente en términos de concentración de azúcares reductores. Para ello se realizó el siguiente procedimiento:

Se colocaron 15 g de hongo en un dedal hecho con papel filtro cualitativo y se colocaron en el sifón Soxhlet. Posteriormente se prepararon tres soluciones de 150 mL de etanol-agua en un balón de 500 mL variando su relación así: 70:30, 30:70 y 50:50. Se ensambló el sifón junto con el condensador y el matraz (Equipo soxhlet) como se muestra en la Imagen 10 y se calentó a 120°C, dejando ebulir la solución etanol-agua para que el condensado de los vapores recirculará el

extracto de interés. Se realizaron tres repeticiones con cada relación de solvente y se dejó el sistema de extracción por arrastre recircular 4 veces. (Ver imagen 8)

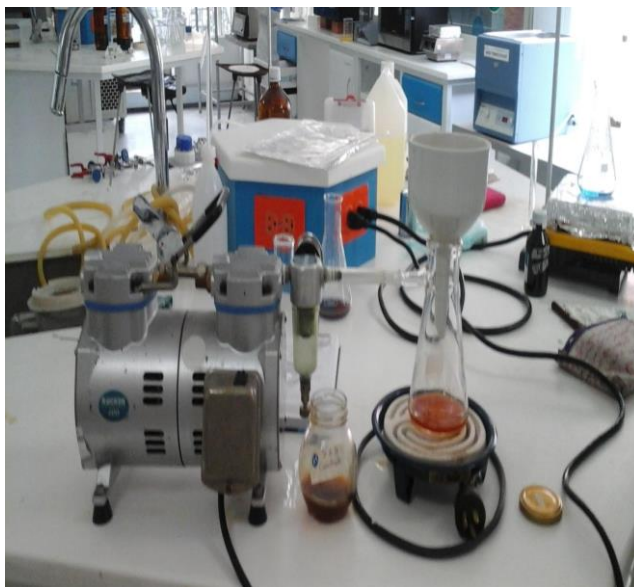
Imagen 8. Pre-experimentación: relación de solvente



3.2.2 Caracterización. Se caracterizaron los extractos obtenidos para determinar las concentraciones de glucosa resultantes en cada extracción.

Para llevar a cabo la prueba de azúcares reductores “Test de Fehling”, se filtró a vacío la muestra 3 veces con papel filtro cualitativo para eliminar los sólidos suspendidos ya que se veía turbiedad en la muestra y en el momento de titular no se podía apreciar fácilmente el cambio de color. (Ver Imagen 9)

Imagen 9. Filtración a Vacío de los extractos



3.2.2.1 Prueba Fehling. Para la cuantificación e identificación de azúcares reductores se realizó la prueba de Fehling tomada del procedimiento de la NTC³²:

Se prepararon las siguientes soluciones:

- **Fehling A:** Se pesaron 34,639 g de Sulfato de cobre pentahidratado en un balón aforado de 500 mL, se agitó y se dejó reposar hasta observar la clarificación de la solución. Luego se realizó una filtración a vacío para posteriormente almacenar en un frasco ámbar.
- **Fehling B:** Se mezclaron 179 g de tartrato de sodio, 50 g de NaOH y se aforó con agua destilada en un balón aforado de 500 mL. Nuevamente se agitó, dejó reposar y se filtró la solución.
- **Cálculo del Título de Fehling (TF).** El título de Fehling corresponde a la cantidad de solución de dextrosa de concentración conocida requerida para titular la solución Fehling. Este volumen se necesitará en cálculos posteriores.

Se preparó una solución de dextrosa 5% agregando 5 g de dextrosa en 100 mL de agua destilada, Luego se realizó una dilución, tomando una alícuota de 10mL con el fin de obtener una solución de dextrosa 0.5%. La solución diluida se agregó en una bureta de 50 mL.

³² Norma Técnica Colombiana. Bebidas alcohólicas, Método para determinar contenido de azúcar. 2003. p3

En un Erlenmeyer de 25 mL se agregó 1mL de Fehling A, 1mL de Fehling B y 30mL de agua destilada. La solución se calentó hasta ebullición y se inició la titulación con dextrosa al 0.5% (Ver imagen 10).

Imagen 10. Titulación Fehling



Este proceso consiste en llevar a cabo una reacción redox en la que el grupo aldehído (reductor) de los azúcares es oxidado a grupo ácido por el Cu^{2+} que se reduce a Cu^+ .³³ Dicha reacción se evidenció cuando el color de la solución paso a gris e inmediatamente se vio el cambio de color se agregaron dos gotas de azul de metileno y se agitó hasta lograr el color rojo cobrizo.

El volumen que se gastó en la titulación con dextrosa es proporcional al porcentaje de azúcares reductores, por lo cual el título de Fehling se puede calcular como se muestra en la ecuación 1.

Ecuación 1. Título de Fehling

$$TF = \frac{VG \times 0.5 \text{ g Glucosa}}{100 \text{ mL}}$$

En la experimentación se gastaron 12 mL de dextrosa que corresponden mediante la aplicación de la ecuación 1 a 0.06 gramos de glucosa, tal como se muestra a continuación:

$$TF = 0.06 = \frac{12\text{mL} \times 0.5 \text{ g Glucosa}}{100 \text{ mL}}$$

³³[En línea] Procedimientos de identificación y cuantificación de azúcares reductores. Disponible en: <<http://acasti.webs.ull.es/docencia/practicas/5.pdf>>

- **Cálculo concentración de azúcares reductores.** Las muestras obtenidas de la extracción soxhlet se obtuvieron en estado líquido como una mezcla de etanol, agua y el extracto de *Ganoderma*.

Las muestras líquidas obtenidas de la extracción soxhlet se filtraron a vacío dos veces para retener sólidos suspendidos y bajar la turbidez en los extractos, después se agregó la muestra de polisacárido en una bureta de 50 mL y se preparó nuevamente la solución acuosa de Fehling A y Fehling B descrita anteriormente. Se realizó la titulación hasta observar cambio de color de la solución agregando dos gotas de azul de metileno hasta lograr el color rojo cobrizo.

La concentración de azúcares reductores presentes en la muestra dada en unidades de gramos/mL se obtiene según la ecuación 2 que se describe en la NTC.

Ecuación 2. Concentración de azucares reductores

$$G \text{ glucosa} / L = \frac{TF}{V_{gastado} \times V_{alícuota}}$$

Donde V Alícuota se calcula a partir de la densidad y el peso de la muestra. El cálculo de la densidad se realizó con un picnómetro y el peso de la muestra se obtuvo de la diferencia entre el peso del picnómetro con la muestra y el picnómetro vacío, los volúmenes de la alícuota para cada muestra se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Volúmenes de alícuotas

V alícuota (L)		
70:30	30:70	50:50
0.04233	0.041723	0.042137
0.025	0.0416469	0.041853
0.042013	0.0418003	0.042431

Los volúmenes gastados en la titulación de cada relación de solvente-agua se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Volumen del Titulante

V gastados (L)		
70:30:00	30:70	50:50:00
0.0165	0.008	0.04
0.0173	0.0113	0.03
0.0051	0.0091	0.0125

Mediante el uso de la ecuación 2 se obtienen las concentraciones de azúcares reductores presentes en cada extracto de muestra obtenido con cada relación solvente-agua. Estos datos se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentración de azúcares reductores

Concentración Glucosa (g/L)		
70:30:00	30:70	50:50:00
0.1539	0.3129	0.0632
0.0867	0.2211	0.0837
0.4943	0.2756	0.2037

3.2.2.2 Análisis ANOVA. La pre-experimentación se evalúa mediante un análisis de varianzas para determinar qué relación de solvente-agua es la mejor y posteriormente realizar el diseño factorial variando otros parámetros en la experimentación.

Se realiza el análisis de varianzas mediante el uso del software STATGRAPHICS, en el cual se genera un ANOVA simple basado en los resultados de la Tabla 8 donde se toma como factor la relación solvente-agua y como variable dependiente la concentración. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Tabla ANOVA para concentración por relación

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,0404386	2	0,0202193	1,09	0,3946
Intra grupos	0,111292	6	0,0185486		
Total (Corr.)	0,15173	8			

Fuente: STATGRAPHICS

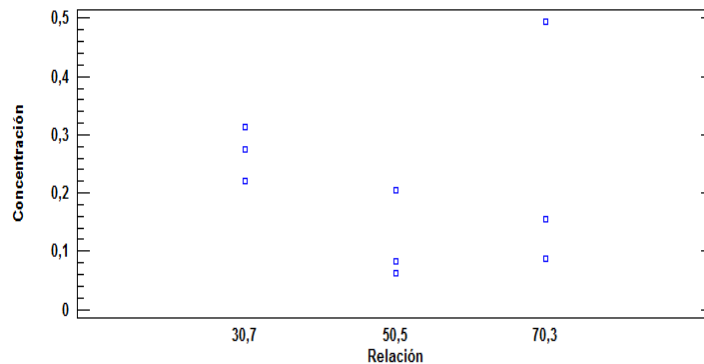
El análisis de varianzas requiere del planteamiento de las siguientes hipótesis:

1. Hipótesis Nula: No hay diferencias significativas entre las relaciones etanol-agua.
2. Hipótesis Alternativa: Hay diferencias significativas entre las relaciones etanol-agua.

La tabla ANOVA descompone la varianza de concentración en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de grupos. La razón-F es igual a 1,09 que corresponde al cociente del estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos, además la significancia (valor-P) de la razón-F es mayor que 0.05, por lo que se acepta hipótesis nula y no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de concentración de un nivel de relación y otro, teniendo un 95% de confianza. Por ende, se puede afirmar según el análisis de varianzas que no hay mayor diferencia en las concentraciones obtenidas usando relación de etanol-agua de 70:30, 30:70 y 50:50.

Sin embargo, al analizar los datos de concentración obtenidos de cada repetición realizada con cada una de las relaciones establecidas se puede elegir para la experimentación los datos que presentan menor dispersión con respecto a los puntos mostrados en la Gráfica 1 muestran la dispersión de las tres repeticiones realizadas con cada relación de solvente-agua.

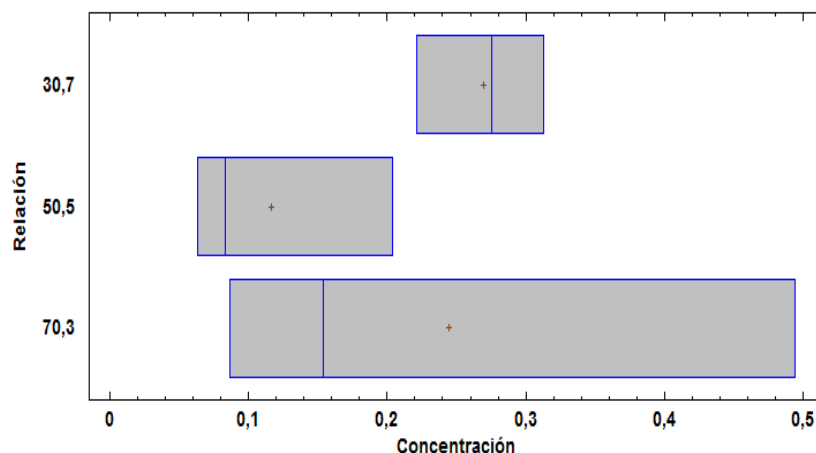
Gráfica 1. Dispersión por código de nivel



Fuente: STATGRAPHICS

Los datos que menor dispersión muestran según la Gráfica 1 son los realizados con relación de etanol-agua 30:70, por lo que será la relación que se elige para realizar la experimentación, además son los datos que menos sesgo tienen ya que como se muestra en la gráfica 2 los demás presentan sesgo a la izquierda. Por ello dado que los datos menos sesgados son los obtenidos en la relación 30:70 se elige para realizar la experimentación y evaluar demás condiciones

Gráfica 2. Cajas y bigotes



Fuente: STATGRAPHICS

3.2.3 Extracción Soxhlet. Se tomaron 9 muestras de 15 g de hongo molido seco y se colocaron en el sifón del extractor Soxhlet (Ver Imagen 11), y en un matraz se llenó con 150 mL de relación agua solvente 30:70 a 150°C. Se realizaron tres repeticiones por cada muestra y se evaluó el número de recirculaciones para determinar con que muestras hay más concentración de glucosa. El número de recirculaciones fueron cuatro, cinco y seis con una duración 4, 5 y 6 horas respectivamente. Los volúmenes de extracto obtenidos se muestran en la Tabla 10.

Imagen 11. Extracción de las tres muestras variando el número de recirculaciones



Tabla 10. Volumen de los extractos obtenidos

Muestras	Repeticiones	Volumen (mL)
1	1	115
	2	113
	3	114
2	1	111
	2	115
	3	108
3	1	100
	2	90
	3	95

Para separar la fracción etanol que se utilizó en la operación anterior, fue necesario volverlo a recuperar mediante el uso del rotavaporador como se ve en la Imagen 12. Los volúmenes de extracto libres de etanol se muestran en la Tabla 11.

Imagen 12. Concentración en el Rotavaporador



Tabla 11. Volúmenes después de concentrar los extractos

Muestras	Repeticiones	Volumen final (mL)
1	1	110
	2	110
	3	91
2	4	91
	5	91
	6	89
3	7	95
	8	78
	9	85

Como las muestras contenían 70% de agua se llevaron a evaporación en una mufla a 100° C durante 3 horas. En la Tabla 12 se pueden ver los volúmenes libres de agua y etanol que corresponden al extracto concentrado.

Tabla 12. Volúmenes después de evaporar los extractos los extractos

Muestra	Repeticiones	Volumen final (mL)
1	1	90
	2	88
	3	92
2	4	75
	5	72
	6	68
3	7	74
	8	62
	9	70

3.2.4 Caracterización. En este proceso se utilizaron varios métodos para determinar las concentraciones de glucosa, cadenas de *Lentinan* y la existencia de enlaces glucosídicos u otros compuestos.

3.2.4.1 Desarrollo Método DNS. Para la determinación y cuantificación de azúcares reductores presentes en los extractos obtenidos de la experimentación se realizó el método DNS con el procedimiento que se describe a continuación³⁴:

Se preparó en un Erlenmeyer 100 mL la solución base de DNS agregando 30 g de tartrato de sodio y potasio, 20 mL de NaOH 2N y 1g de reactivo DNS. La mezcla se calentó para lograr completa dilución.

- **Elaboración curva de calibración.** Se realiza la curva de calibración mediante la preparación de soluciones patrón de glucosa con el fin de obtener los datos de absorbancia a concentraciones conocidas para luego mediante la regresión lineal de los datos y ecuación de la recta correspondiente lograr predecir la concentración de azúcares reductores de cada extracto a partir de datos de absorbancia

Se preparó la solución madre agregando 0.1 g de glucosa y se mezcló con 50 mL de agua destilada en un balón aforado con el fin obtener una solución de concentración de 1 g/L.

Se prepararon soluciones patrones de 2 mL tal como se detalla en la Tabla 13 y a cada patrón y blanco, se agregó 1mL de solución base DNS

Tabla 13. Preparación de soluciones patrones

Solución	Concentración (g/L)	Volumen Solución Madre (mL)	Volumen agua (mL)
Blanco	0	0	2
1	0.2	0.2	1.8
2	0.6	0.6	1.4
3	0.8	0.8	1.2
4	1	1	1

Las soluciones patrones se calentaron en un baño termostático a 80°C por 5 minutos, luego se enfriaron y se pasó cada una de las soluciones por el espectrofotómetro, calibrando el equipo con ayuda del blanco. Las absorbancias obtenidas se muestran en la Tabla 14.

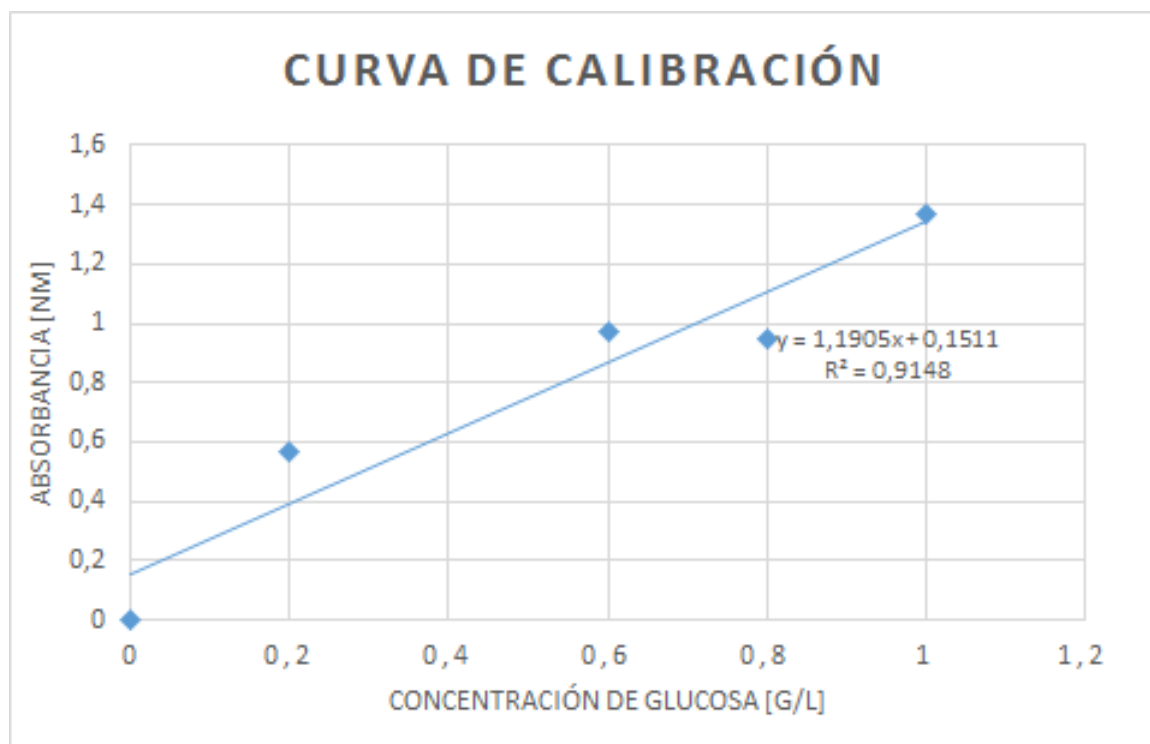
³⁴ MUÑOZ Andrea, VEGA Jhonas. Universidad de la Santa. Determinación de azúcares reductores por espectrofotometría. Perú. 2014

Tabla 14. Absorbancia de soluciones patrón.

Solución	Concentración Glucosa (g/L)	Absorbancia (nm)
Blanco	0	0
1	0.2	0.566
2	0.6	0.969
3	0.8	0.945
4	1	1.371

Con los datos de absorbancia de cada solución se realiza la curva de calibración.

Gráfica 3. Curva de calibración 1



Posteriormente cada una de las muestras obtenidas de la infusión se diluyeron 1:10 para lograr la lectura en el espectrofotómetro. Los datos obtenidos de absorbancia se muestran en la tabla 9.

Un coeficiente de determinación (R^2) mayor del 70% indica una buena asociación lineal entre las variables, luego es confiable bajo este precepto usar la variable X

para predecir Y^{35} . Por ende, con $R^2= 0.9148$ está indicando que el 91,48% de la variabilidad en la concentración se puede explicar por su relación lineal con la absorbancia. Por ello se puede predecir la concentración de azúcares reductores a partir de la absorbancia.

La concentración de azúcares reductores en cada muestra se calcula con ayuda de la ecuación ajustada de regresión lineal obtenida en la curva de calibración dada $Y= 1,1905X + 0,1511$ donde X representa la concentración de glucosa y Y la absorbancia.

Tabla 15. Concentración azúcares reduct

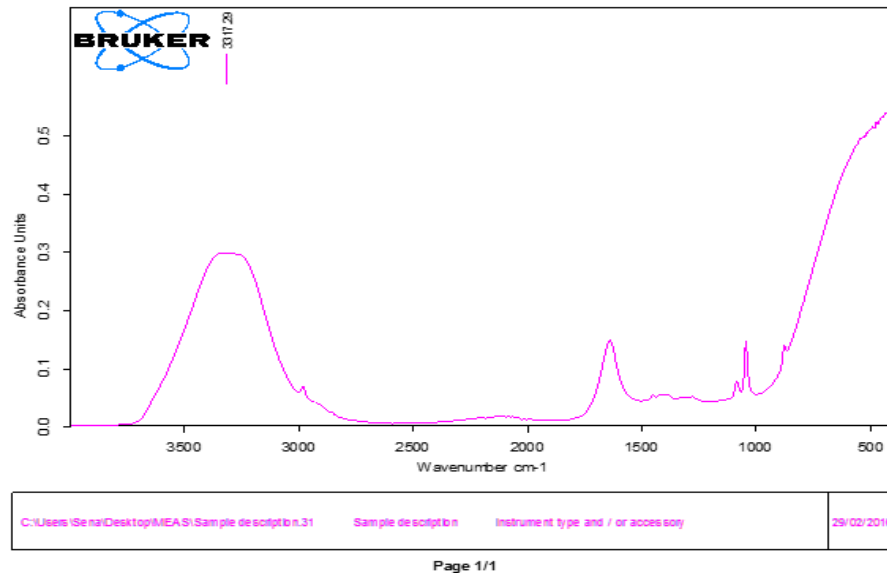
Muestras	Absorbancia [nm]	Concentración Azúcares reductores [g/L]	Productividad extracto (g)
1. 4R	0,414	0,221	0.0198
2. 4R	0,395	0,205	0.0180
3. 4R	0,35	0.167	0.015
1. 5R	-0,012	-0,137	0
2. 5R	0,011	-0,117	0
3. 5R	0	-0.127	0
1. 6R	0,025	-0.106	0
2. 6R	0,045	-0,089	0
3. 6R	0,037	-0,095	0

3.2.4.2 Espectroscopia infrarroja. Las muestras obtenidas de la extracción Soxhlet se analizaron en el espectroscopio infrarrojo, el cual utiliza el software OPUS para generar los espectros. Se escogieron las muestras que dieron valores de concentración altos en la caracterización.

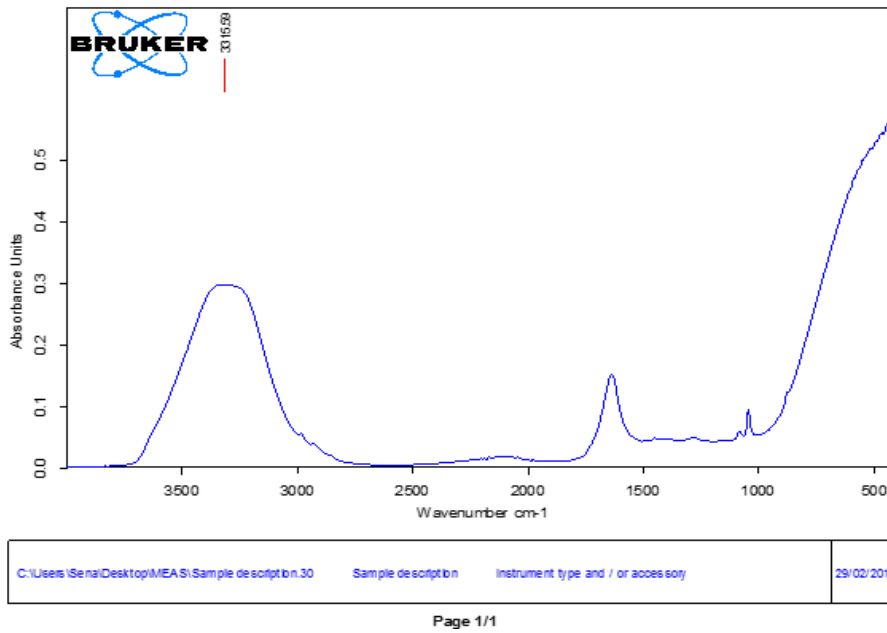
Mediante el uso de OPUS se obtuvieron las bandas en los rangos de longitud de onda de los compuestos presentes en las muestras. Los resultados se muestran a continuación en las imágenes 4, 5 y 6.

³⁵ ACUÑA, Dr. Edgar. Regresión lineal. Universidad de puerto rico, recinto universitario de mayaguez. p 19. Disponible <<http://academic.uprm.edu/eacuna/miniman9sl.pdf>>

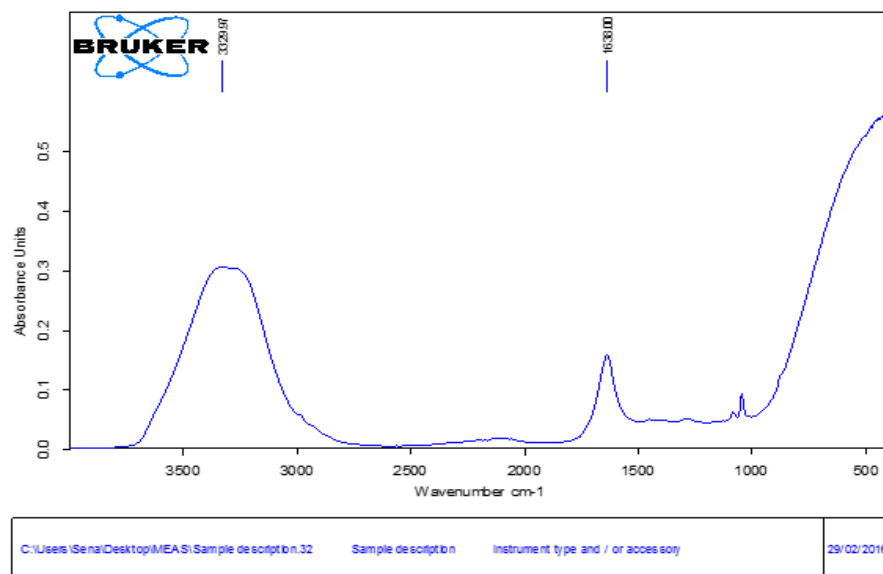
Gráfica 4. Espectro infrarrojo 1.4R



Gráfica 5. Espectro infrarrojo 2.4R



Gráfica 6. Espectro Infrarrojo 3.4R



3.3 INFUSIÓN ACUOSA-ALCALINA

Se prepararon 6 muestras de hongo para realizar la evaluación a 12 tratamientos teniendo en cuenta que las variables independientes corresponden al método de extracción y el tiempo de calentamiento. Los niveles son 2 correspondiendo a Extracción acuosa fría y extracción acuosa caliente, para el caso del método de extracción y para el tiempo 120 y 180 min.

3.3.1 Infusión acuosa fría. Se prepararon 6 muestras con 15 g de hongo y se mezclaron con 150 mL de agua a 25° C.

Las muestras se dividieron con el fin de evaluar el efecto del tiempo. Tres muestras se dejaron con agua fría por 2 y las tres restantes durante 3 horas (Imagen 16), posteriormente las muestras se filtraron a vacío, como se muestra en la Imagen 17, obteniéndose el residuo sólido y el filtrado en fase Líquida.

Imagen 13. Hongo molido con Agua



Imagen 14. Filtración a vacío



El filtrado que se obtuvo se mezcló con 150 mL de etanol a 0° C por 12 horas con el fin de deshidratar el polisacárido y precipitar las proteínas presentes en el extracto, ver Imagen 18.

Imagen 15. Muestras purificadas



Las muestras con las proteínas precipitadas se filtraron utilizando papel filtro cuantitativo de 90 mm obteniéndose como resultado un extracto libre de proteínas ver Tabla 16.

Tabla 16. Extractos filtrados

Muestra	Extracto Filtrado (mL)
1	220
2	205
3	277
4	180
5	208
6	205

A continuación, las muestras se concentraron en el rotavaporador a 175 mbar, 180 rpm y 82° C, el etanol recuperado y extracto concentrado se muestra en la Tabla 17. El extracto puro se obtuvo de la centrifugación por 20 min de las muestras libres de proteínas y concentradas tal como se muestra en la Imagen 19.

Tabla 17. Extracto Concentrado y etanol recuperado

Muestra	Extracto Concentrado (mL)	Etanol Recuperado (mL)
1	114	106
2	108	108
3	148	114
4	65	100
5	98	97
6	86	139

Imagen 16. Muestra en centrífuga



Se calculó el peso promedio de un frasco de centrífuga de 15 mL, el cual correspondió a 6,5 g. Luego se pesó cada tubo únicamente con el precipitado el cual corresponde al polisacárido insoluble presente en el extracto. La diferencia corresponde a la cantidad en masa de polisacárido puro obtenido.

El sobrenadante contiene también polisacárido de bajo peso molecular, los volúmenes se muestran en la Tabla 18.

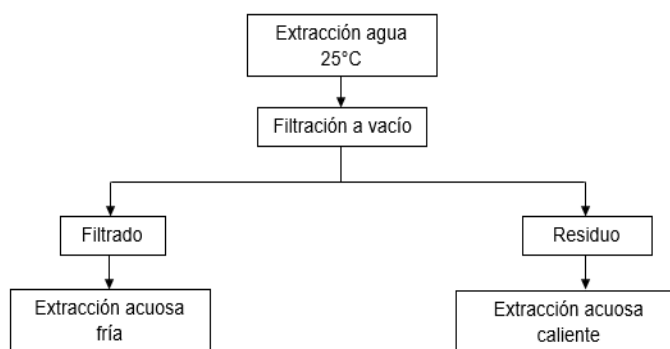
Tabla 18. Cantidad de polisacárido puro y extracto acuoso

Muestra	Polisacárido Insoluble (g)	Extracto acuoso (mL)
1	3.66	108
2	3.48	103
3	9.37	113
4	1.92	64
5	3.80	93
6	2.89	83

3.3.2 Infusión acuosa caliente

El residuo que se obtuvo de la filtración realizada en la réplica del proceso se utilizó para evaluar la extracción con agua caliente, tal como se muestra en la figura 10.

Figura 11. Esquema para extracción con agua caliente



El residuo de las 6 muestras se mezcló con 240 mL de agua destilada; Nuevamente las muestras se dividieron, las tres primeras se calentaron a 100°C durante 2 horas y las restantes durante 3 horas. Las muestras se filtraron con

papel cualitativo, los volúmenes que se obtuvieron de extracto se muestran la tabla 19.

A continuación, se agregaron 150 mL de etanol a cada muestra durante 24 horas con el fin de precipitar las proteínas y finalmente se filtró nuevamente a vacío usando filtro cuantitativo de 110 mm. El volumen de extracto libre de proteínas se muestra en la tabla 20.

Tabla 19. Volúmenes de extracto

Muestra	Volumen extracto (mL)
1	68
2	70
3	20
4	76
5	84
6	28

Tabla 20. Volúmenes de extractos sin proteínas

Muestra	Volumen extracto (mL)
1	126
2	151
3	125
4	151
5	165
6	65

Las muestras de extracto obtenido con agua caliente se concentraron con el fin recuperar el etanol utilizado para precipitar proteínas en el rotavaporador, la cantidad de extracto concentrado final y etanol recuperado se muestra en la tabla 21.

Estas muestras se centrifugaron en tubos de 15 mL durante 30 min con el fin de separar el polisacárido insoluble presente en cada muestra, sin embargo, como se muestra en la Imagen 19 estas muestras no mostraron precipitación de

polisacárido, a diferencia de la extracción acuosa con agua fría de la que se obtuvo una cantidad apreciable de polisacárido (ver Tabla 18).

Tabla 21. Extracto acuoso final y etanol recuperado

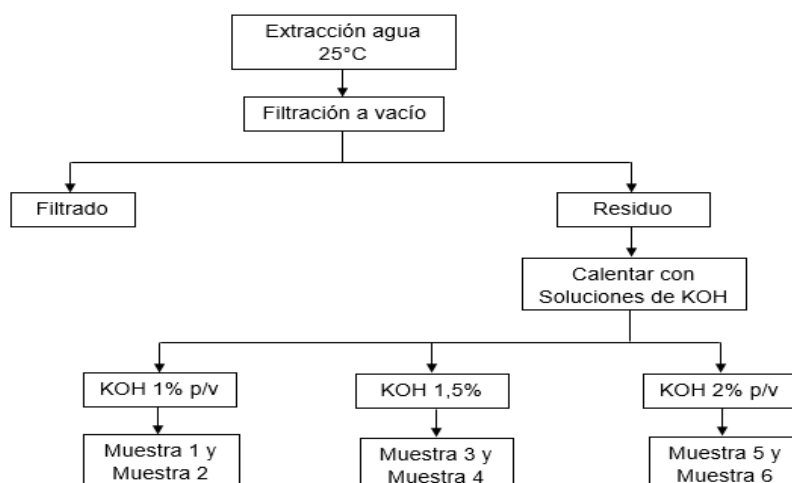
Muestra	Volumen Extracto concentrado (mL)	Volumen Etanol recuperado (mL)
1	94	37
2	124	30
3	55	60
4	123	61
5	124	47
6	36	24

Imagen 17. Extracto acuoso caliente Centrifugadas



3.3.3 Infusión alcalina. El residuo sólido que se obtuvo del proceso de extracción anterior, se mezcló con 250 mL de soluciones de KOH al 1, 1.5 y 2% p/v tal como se muestra en la Figura 12.

Figura 12. Esquema de extracción alcalina



Las muestras en solución con KOH se calentaron a 100°C; este procedimiento se repitió dos veces con diferentes muestras para evaluar la influencia del calentamiento durante 2 horas y 3 horas en el extracto resultante. Los volúmenes resultantes de cada extracción se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Volumen extracto alcalino obtenido evaluado por 2 y 3 horas

Muestra	Volumen Extracto (2 horas)	Volumen Extracto (3 horas)
	(mL)	(mL)
1	45	119
2	51	136
3	65	100
4	93	138
5	43	70
6	88	110

Luego las muestras se filtraron a vacío y a cada muestra se agregó 10 mL de ácido acético con el fin de precipitar las proteínas por 24 horas. (Ver Imagen 20). Las muestras se filtraron con papel filtro cuantitativo de 110 mm y posteriormente se centrifugaron

Imagen 18. Extractos alcalinos



3.3.4 Caracterización

3.3.4.1 Método DNS. El método para determinar la cantidad de azúcares reductores presentes en las muestras se llevó a cabo en base al procedimiento ya descrito en el capítulo de materiales y métodos que se detalla en la Figura 4.

- **Curva de calibración** Se realiza la curva calibración mediante la preparación de soluciones patrón de glucosa con el fin de obtener datos de absorbancias a concentraciones conocidas y posteriormente mediante la ecuación de la recta de la curva de calibración predecir la concentración de azúcares reductores en los extractos obtenidos.

Se prepararon muestras patrones a partir de la solución madre de glucosa 2 g/L para obtener concentraciones de 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 y 1 g/L tal como se muestra en la tabla 23. A cada solución se agregó 1 mL de solución base DNS se calentaron todas las muestras durante 5 minutos a baño maría y se enfriaron en un baño de hielo durante 5 minutos.

Tabla 23. Preparación de soluciones patrones

Solución	Concentración (g/L)	Volumen solución madre (mL)	Volumen de agua destilada (mL)
Blanco	0	0	2
1	0.2	0.2	1.8
2	0.4	0.4	1.6
3	0.5	0.5	1.5
4	0.6	0.6	1.4
5	0.7	0.7	1.3
6	0.8	0.8	1.2
7	1	1	1

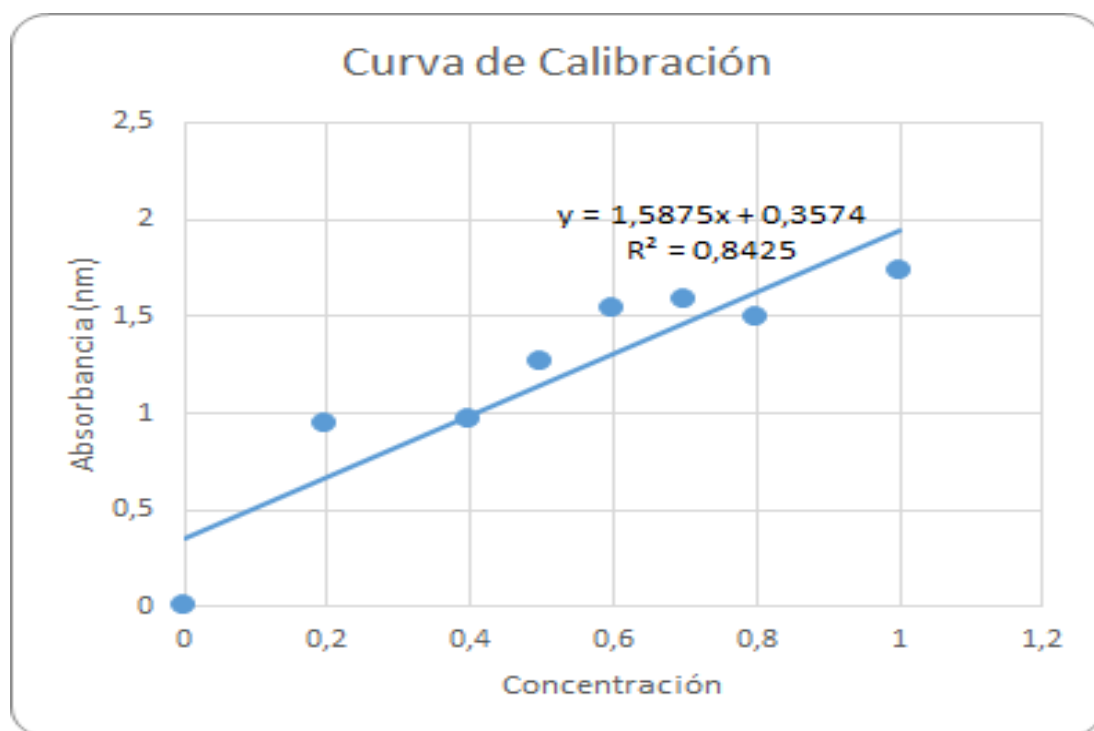
Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a 540 nm, los datos de

absorbancia de cada solución se muestran en la tabla 24, y son útiles para la elaboración de la curva de calibración que se muestra en el Grafico 4.

Tabla 24. Absorbancias de soluciones Patrones

Concentración (g/L)	Absorbancia (nm)
0.2	0.947
0.4	0.966
0.5	1.260
0.6	1.542
0.7	1.589
0.8	1.489
1	1.734

Gráfica 7. Curva de calibración 2



La regresión lineal que se realizó para la curva de calibración presenta un coeficiente de determinación del 0,8425. Como se dijo anteriormente es confiable utilizar R^2 mayor al 70% ya que indica una buena asociación de las variables³⁶.

³⁶ ACUÑA, Op.cit, p. 19

Por ende, se puede decir del gráfico 5 que el 84.25% de variabilidad en la absorbancia se explica por su relación lineal con la concentración.

Las muestras obtenidas de la extracción acuosa con agua fría, caliente y la extracción alcalina se prepararon para leerlas en el espectrofotómetro. Las muestras de la extracción alcalina se obtuvieron con mucha turbiedad, ver Imagen 21 por lo que se realizaron diluciones 1:20 para lograr la lectura en el espectrofotómetro.

Imagen 19. Extractos alcalinos



Las muestras acuosas no hubo necesidad de diluirlas. De todas las muestras se tomó un 1 mL de muestra y se agregó 1 mL de solución base DNS, las muestras se calentaron como se muestra en la imagen 23 durante 5 minutos y rápidamente se enfriaron en un baño de agua fría y hielo (Ver Imagen 22).

Imagen 20. Muestras con DNS calentándose



Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a longitud de onda de 540 nm, los resultados de la longitud de onda para las muestras obtenidas por los tres métodos de extracción anteriores se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Absorbancia de muestras resultantes de la extracción acuosa-alcalina

Muestra	Extracción acuosa fría (nm)	Extracción acuosa caliente (nm)	Extracción Alcalina 2h (nm)	Extracción alcalina 3h (nm)
1	0.858	0.928	0.266	0.032
2	1.212	0.922	0.270	0.108
3	0.821	0.403	0.376	0.089
4	0.870	1.681	0.242	0.108
5	0.533	1.347	0.176	0.037
6	0.543	0.752	0.271	0.111

Como se observa en el gráfico 4, la ecuación del ajuste lineal para los datos de absorbancia de los patrones es la que muestra en la ecuación 4, donde el eje de las abscisas y de las ordenadas corresponde a la concentración de azúcares y absorbancia respectivamente.

Ecuación 3. Ajuste Lineal

$$y = 1.5875x + 0.3574$$

Mediante el despeje de la variable x se obtiene la concentración de cada muestra. Dichas concentraciones se muestran la Tabla 26 y la productividad en la Tabla 27 la cual se calcula con la ecuación 4.

Ecuación 4. Productividad

$$P = [C] \times V_{Final}$$

Tabla 26. Concentración de azúcares en muestras de la extracción acuosa alcalina

Muestra	Extracción acuosa fría (g/L)	Extracción acuosa caliente (g/L)	Extracción Alcalina 2h (g/L)	Extracción alcalina 3h (g/L)
1	0.315	0.359	-0.057	-0.204
2	0.538	0.355	-0.055	-0.157
3	0.292	0.028	0.011	-0.169
4	0.322	0.833	-0.072	-0.157
5	0.110	0.623	-0.114	-0.201
6	0.116	0.248	-0.054	-0.155

Tabla 27. Productividad de los extractos obtenidos

Muestra	Extracción acuosa fría (g)	Extracción acuosa caliente (g)	Extracción Alcalina 2h (g)	Extracción alcalina 3h (g)
1	0.034	0.031	0	0
2	0.055	0.042	0	0
3	0.032	0.0014	0.00121	0
4	0.021	0.094	0	0
5	0.010	0.072	0	0
6	0.00962	0.0074	0	0

En la Tabla 28 se muestran los rendimientos obtenidos de la infusión acuosa fría y acuosa caliente con respecto a la masa inicial.

Tabla 28. Rendimiento de extractos obtenidos

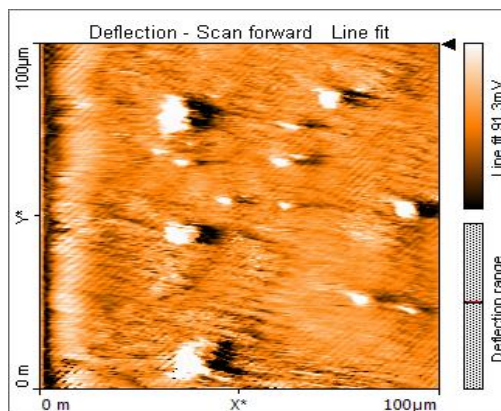
Muestra	Extracción acuosa fría (%)	Extracción acuosa caliente (%)
1	0.226	0.208
2	0.369	0.277
3	0.220	0.093
4	0.137	0.627
5	0.068	0.481
6	0.064	0.096

3.3.4.1 Microscopio de fuerza atómica

Sobre una mica de aproximadamente 1 cm² se pone una gota como se muestra en la imagen 14 del segundo extracto de 4 recirculaciones ya que es la muestra que tiene el mayor contenido de azúcares reductores y se deja secar la muestra a temperatura ambiente en un desecador por 24 horas.

Posteriormente se calibra el microscopio de fuerza atómica ubicando el láser, la punta del cantiléver (modo no contacto) y la muestra en las posiciones adecuadas. Posteriormente se hace el corrido en modo de no contacto, con fuerza estática, en 0,82 s y realizando 250 líneas. En la Imagen 24 se evidencia la lectura obtenida de la muestra 2 con la infusión fría.

Imagen 13. Muestra Infusión Fría 2

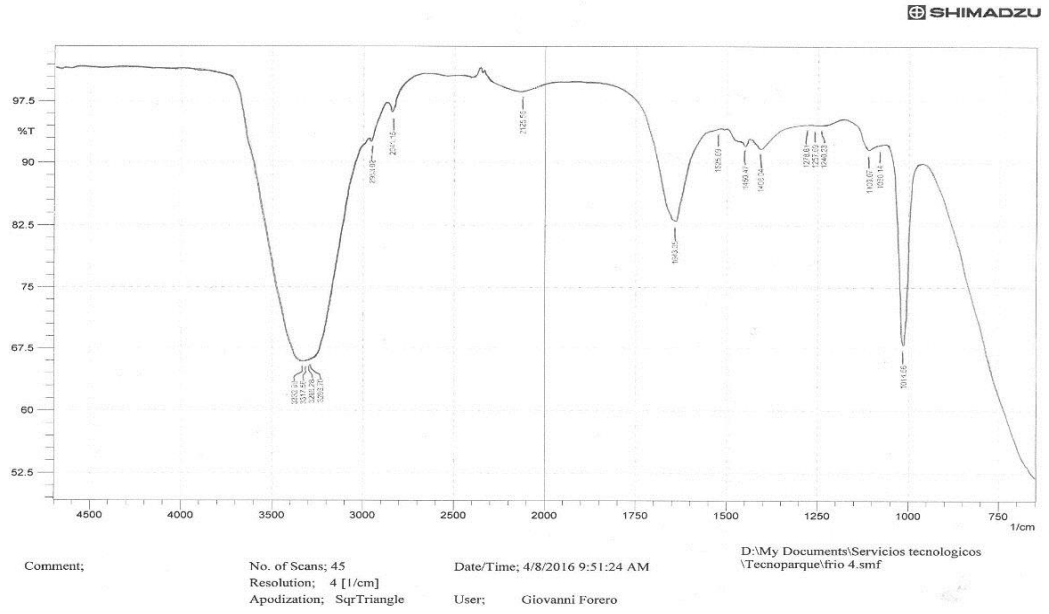


3.3.4.2 Espectroscopia Infrarroja

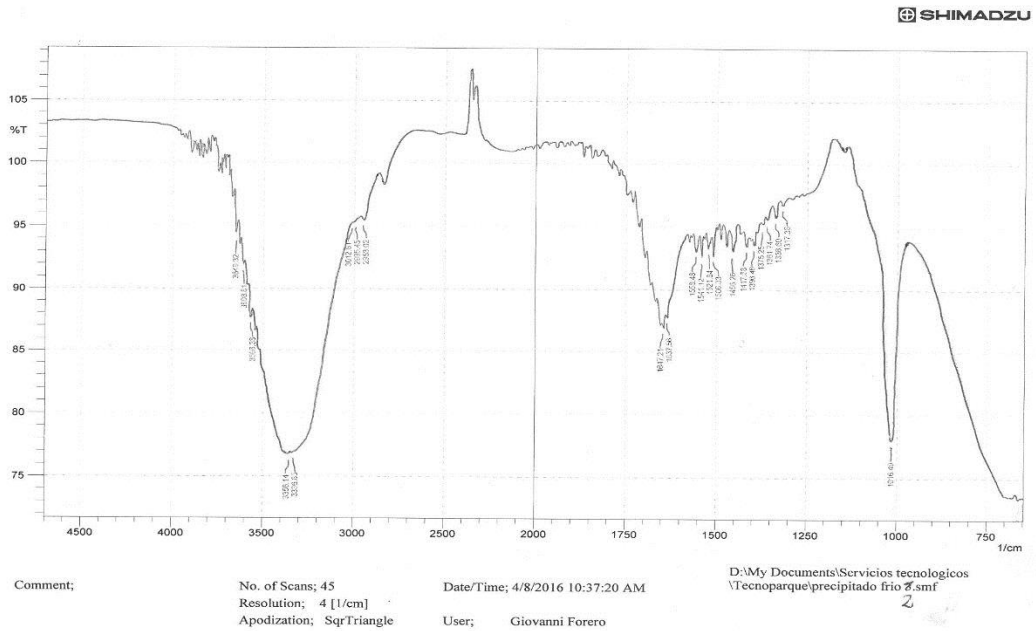
Gráfica 8. Espectro Infrarrojo Acuoso Frío 2



Gráfica 9. Espectro Infrarrojo Acuoso Frío 4



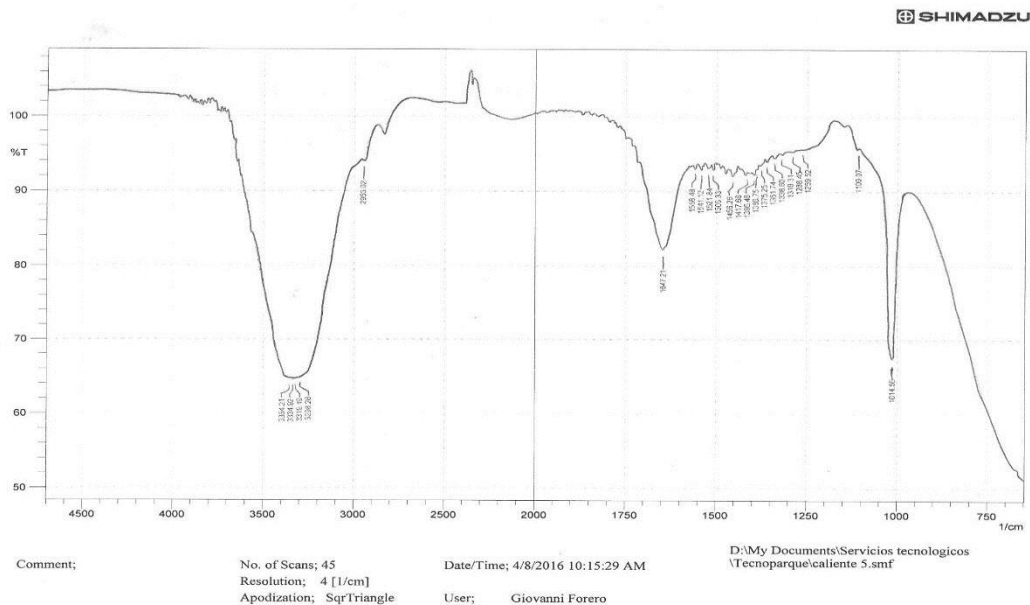
Gráfica 10. Espectro Infrarrojo Precipitado Frío 2



Gráfica 11. Espectro Infrarrojo Acuoso Caliente 4



Gráfica 12. Espectro Infrarrojo Acuoso Caliente 5



En este capítulo se evidencia el cumplimiento del segundo objetivo el cual es “Extraer los polisacáridos tipo glucano presentes en la *Ganoderma lucidum* por medio de un desarrollo experimental” donde se llevaron a cabo los procesos de obtención y caracterización del extracto obtenido.

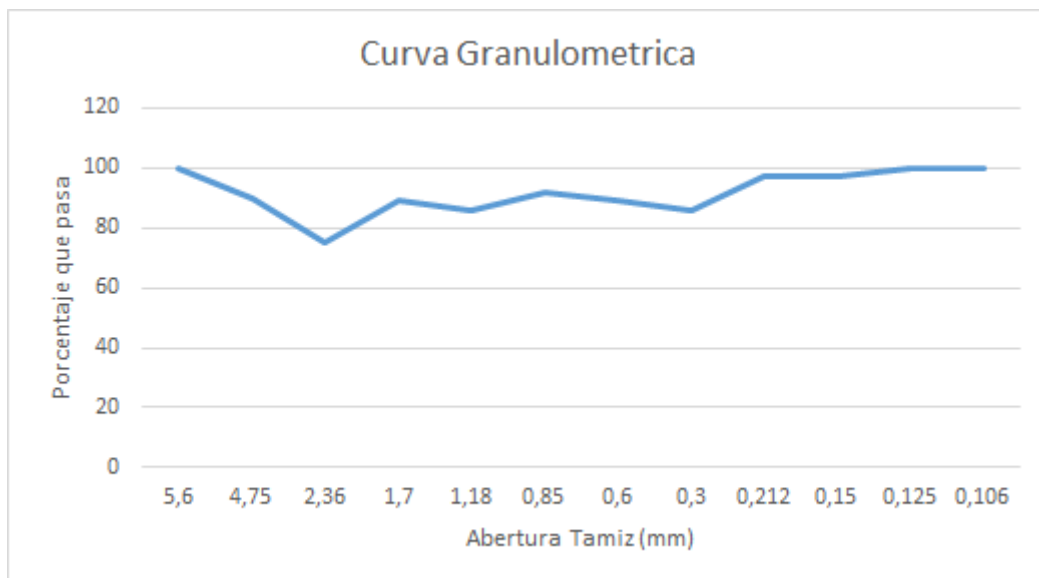
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

En este capítulo se presentan los resultados de los análisis realizados siguiendo los métodos descritos en el capítulo anterior; así mismo, al final se realiza una evaluación comparativa y estadística de los distintos métodos de extracción.

4.1 DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

Además del tamaño de partícula es importante conocer su distribución, es decir si todas las partículas tienen un tamaño similar son monodispersas pero si por el contrario difieren entre sí son polidispersos.

Gráfica 13. Curva de distribución granulométrica



Según la USP (Convención de Farmacopea de Estados Unidos)³⁷ las partículas entre 355 y 1000 μm son consideradas polvo grueso. Analizando la Tabla 5 y la Gráfica 5, se observa que un elevado porcentaje se sitúa en la fracción 2.36 y 0.3 mm, quedando más del 20% de partículas retenidas en la malla de 8 y más del 10% en la malla 50, se puede afirmar que entre 2.36 y 0.3 mm es donde se puede encontrar el diámetro medio de superficie que es lo mismo que diámetro de partícula y es válido porque según los cálculos este valor fue de 0.89 mm; la mayoría de tamaños se pueden considerar polidispersos.

Es importante conocer la granulometría y el tamaño máximo de partícula agregado ya que afectan el tiempo de extracción, economía del proceso, cantidad de extracto, reducen pérdidas y aumentan las posibilidades de obtener un extracto

³⁷ ARCHBOLD Joseph, Análisis del tamaño de partícula. p.3.

mucho más concentrado; sino se hacen un buen análisis puede provocar problemas en la extracción, producción y afectar los rendimientos.

4.2 MÉTODO SOXHLET

4.2.1 Extracción. De acuerdo a los resultados que se muestran en la Tabla 15, se observa que solo se obtuvo azúcares reductores en las muestras que se realizaron con cuatro recirculaciones, mientras que en los extractos obtenidos con cinco y seis recirculaciones no se encontraron azúcares reductores. La presencia de azúcares en las primeras recirculaciones se debe a que al inicio hay mucho material para extraer y dentro de él cartucho con material fúngico hay fracciones de fácil separación, pero a medida que avanza el proceso y se aumenta el número de recirculaciones cada vez es más difícil extraer la pequeña fracción remanente, hasta que en las etapas finales no se extrae nada más³⁸.

Las extracciones para las que se evaluaron cinco y seis recirculaciones, al llevar a cabo el método DNS no mostraron concentración de azúcares, debido a que el calentamiento del montaje soxhlet se realizó con un mechero en donde la temperatura no era controlada y alcanzó valores entre 180-200°C lo que implica que al sobrepasar los 185 °C se descomponen las unidades de glucosa³⁹ y por ende durante cinco y seis horas de exposición a una temperatura elevada genera descomposición del monosacárido característico de los polisacáridos tipo glucano. No obstante, hay que tener en cuenta las pérdidas que se generaron debido a los recambios de agua de circulación en el condensador ya que estos aumentan con el número de recirculaciones y ello se evidencia en la Tabla 10 porque disminuyen los volúmenes de extracto obtenido.

Los residuos del proceso corresponden a la cantidad final que se obtiene del hongo después de dejar en el desecador las muestras durante 24 horas. La diferencia entre la masa fúngica inicial y los residuos corresponde a la cantidad en peso de extracto que se logró extraer de la operación. Los pesos de residuo obtenido se muestran en la Tabla 28.

³⁸ NÚÑEZ, Carlos Eduardo. Extracciones con equipo soxhlet. Disponible en <<http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-extraccinconequipo-soxhlet.pdf>>

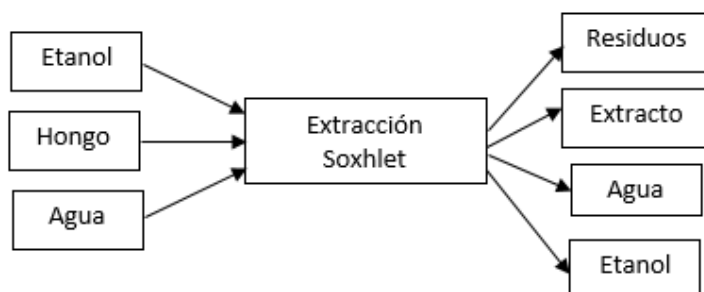
³⁹ IPS. Curso de introducción a las ciencias físicas. En: Editorial Reverté. Introductory physical science teacher's guide. 1967. Madrid. P 92

Tabla 29. Residuos de hongos

Muestras (g) 4 recirculaciones	Muestras (g) 5 recirculaciones	Muestras (g) 6 recirculaciones
11.71	10	8.8
9.2	9.08	10.2
11.5	11.7	13.6

4.2.2 Balance de masa. El balance de masa que se muestra en la Ecuación 5 y que se representa en la Gráfica 6 se realiza con la primera repetición con 4 recirculaciones porque fue la que más productividad dio y su respectivo análisis.

Gráfica 14. Balance de masa SOXHLET



Ecuación 5. Balance de masa

$$\boxed{Entrada - Salida = Pérdidas}$$

$$(Etanol + Agua + Hongo) - (Residuo + Extracto + Agua + Etanol) = Pérdidas$$

$$(35,505 \text{ g} + 105 \text{ g} + 15 \text{ g}) - (45,9 \text{ g} + 0,01989 \text{ g} + 20 \text{ g} + 3,945 \text{ g})$$

$$Pérdidas = 85,64 \text{ g}$$

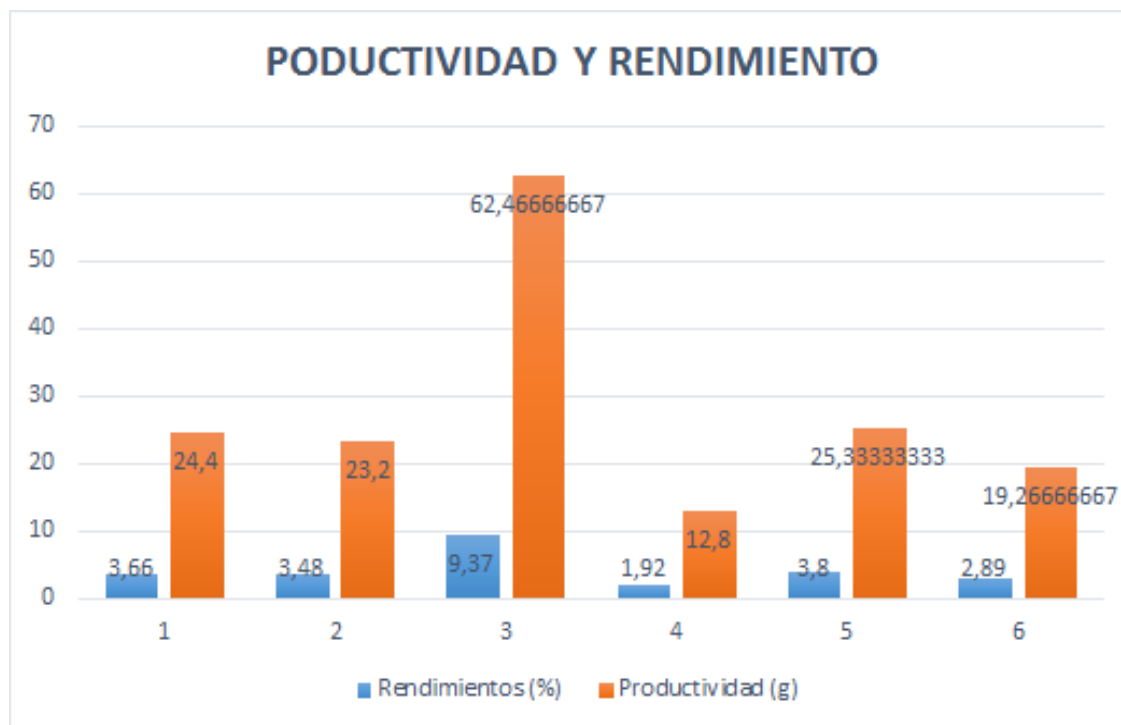
Al realizar el balance de masa con estos componentes se obtienen unas pérdidas de 85.64 g que equivalen a un 55.12 %. Se puede decir que la mayoría de sustancias incluyendo el hongo pulverizado que entran al proceso se pierden por muchos factores: el primero es que la temperatura interna en el balón fondo plano donde estaba el solvente estaba alrededor de 190° C la cual sobrepasaba la temperatura de ebullición tanto del etanol como del agua se iban perdiendo entonces al momento de recuperar etanol en el rotavaporador se obtenía un 10%

del volumen inicial, el segundo es porque la temperatura de ebullición de las unidades de glucosa es de 185° C⁴⁰ en el momento de recircular el extracto se calienta a una temperatura mayor se evaporan y se pierden, por este factor es que en los resultados mostrados por el método DNS con la concentración de azúcares reductores en la 5 y 6 recirculación dieron valores negativos pues entre más recirculaciones y más tiempo de calentamiento se obtendrán menos glucanos ya que estos se van evaporando, y por es importante tener en cuenta que la fuente de agua para el condensador no era constante pues se trabajó con un balde donde se recirculaba para evitar desperdiciar agua.

4.3 INFUSIÓN FRÍA

4.3.1 Precipitado insoluble

Gráfica 15. Repeticiones vs. Productividad y Rendimiento (Agua Fría)

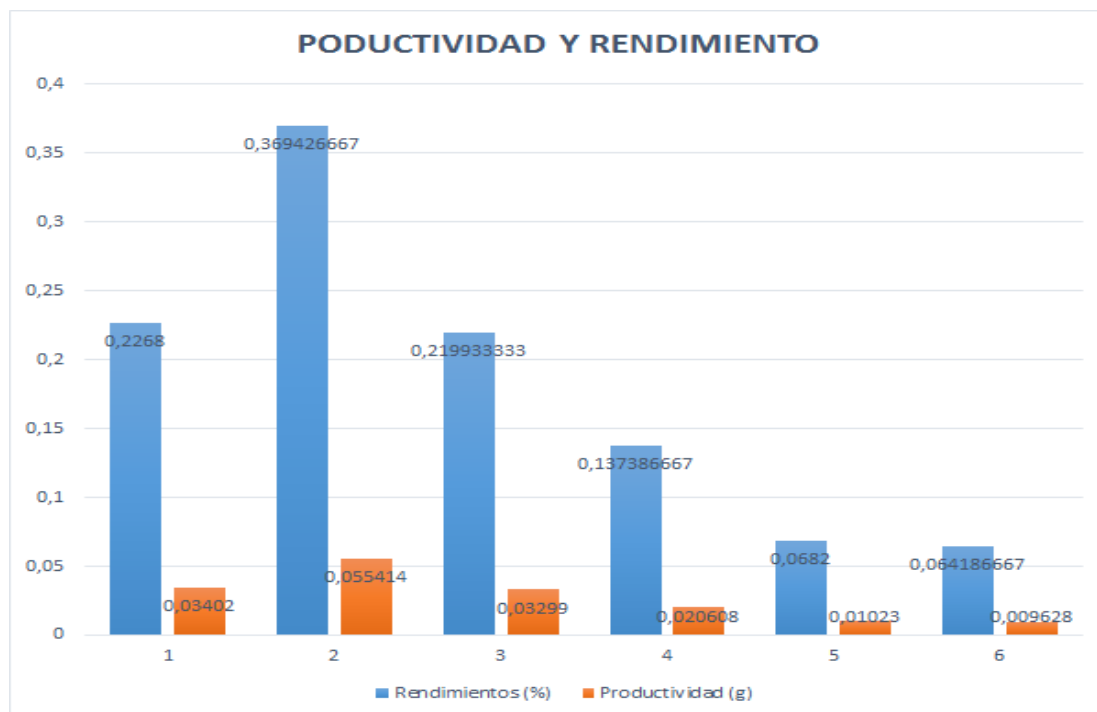


⁴⁰ PAREDES, Juan. EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN CUALITATIVA DE COMPONENTES QUÍMICOS EN EL CUERPO FRUCTÍFERO DE *Pholiota nameko* y evaluación de actividad antimicrobiana. Trabajo de Grado (Químico Farmacéutico). Instituto de Química. Facultad de Microbiología. 2010. pg.10-13.

Según el artículo Structure and antinociceptive effects of D-glucans from *Cookeina tricholoma*⁴¹ el rendimiento obtenido fue de 1.94% y una masa de 0.68 g durante 4 horas en la fracción insoluble con agua, teniendo en cuenta que trabajaron con 35 g de hongo pulverizado, en este proceso de extracción la muestra que más o menos tiene un rendimiento similar es la numero cuatro con un valor de 1.92% y una productividad del 12.8%; se puede afirmar que la *Ganoderma* a esa temperatura presenta mayor desprendimiento de glucanos insolubles en agua los cuales pueden ser los polisacáridos estructurales como la celulosa, quitina, este último es un homopolisacárido derivados de la glucosa, un polímero de la N-acetilglucosamina que es el componente principal del exoesqueleto de los artrópodos; durante 2 y 3 horas la repetición en la cual se obtuvo un mayor rendimiento fue la numero 3 con 9.37% fue durante 2 horas, un factor que incide en este resultado es que el tamaño de partícula no era completamente uniforme y la mayoría de partículas en esta muestra eran más finas lo cual permitio obtener un extracto más concentrado debido a que el contacto del agua con el área superficial es más pequeño.

4.3.2 Fracción soluble

Gráfica 16. Repeticiones vs. Productividad y Rendimiento (Agua Fría)

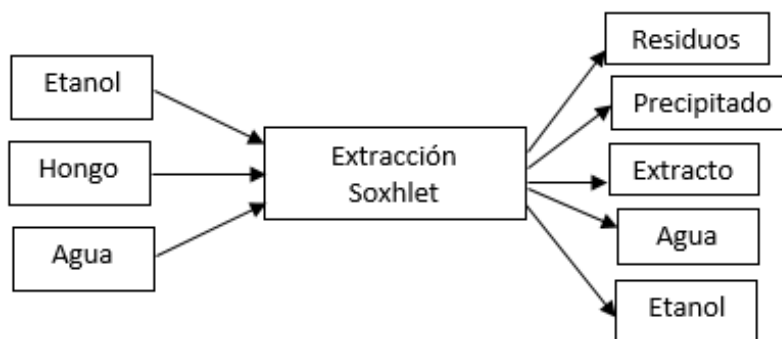


⁴¹ MORENO, Roberta, RUTHES, Andrea, BAGGIO, VILAPLANA, Francisco, KOMURA, Dirce, and IACOMONI, Marcelo. Op.Cit; p.223.

En la infusión fría según el artículo consultado el rendimiento de la fracción soluble fue del 2.8% con una masa final de 0,98 g teniendo en cuenta que la masa inicial fue de 35 g , si se establece una relación y se asume que la masa inicial en la experimentación fue de 15 g el rendimiento sería del 6.53%; la repetición que dio una productividad y rendimiento alto fue la numero 2 a 25°C y 120 minutos seguida de la repetición 3 a las mismas condiciones, lo que se obtuvo de glucanos fue muy poco en comparación al artículo anteriormente referenciado pues en esta fracción obtenida se puede apreciar que a mayor tiempo de extracción menor contenido de glucanos en las muestras trabajadas pues el rendimiento mayor no alcanza a llegar al 6.53% ya que el rendimiento más alto es del 0.36%.

4.3.3 Balance de masa. El balance de masa que se muestra en la Gráfica 9, muestra los compuestos de entrada y salida del proceso de infusión frío con el cual se realizaron lo respectivos cálculos basados en la Ecuación 5.

Gráfica 17. Balance de masa infusiones acuosas frías



4.3.3.1 Infusión fría (120 minutos). Los cálculos del balance se obtienen en base a la Ecuación 5.

$$(Etanol + Agua + Hongo) - (Residuo + Extracto + Precipitado + Agua + Etanol) = Pérdidas$$

$$(118,5 g + 140 g + 15 g) - (53,6 g + 0,055414 g + 3,47 g + 117,072 g + 83,634 g)$$

$$Pérdidas = 15,52 g$$

Al realizar el balance de masa con estos componentes se obtienen unas pérdidas de 15.52 g que equivalen 5,67%. Las pérdidas son pequeñas, pero se pueden haber dado en las operaciones unitarias efectuadas como la filtración, precipitación de proteínas, su posterior filtración y concentración. Al centrifugar como paso último se obtuvo un precipitado para cada muestra en este paso se pueden ver representadas las pérdidas pues el extracto soluble fue al que se le hizo la respectiva caracterización de azúcares.

4.3.3.2 Infusión fría (180 minutos). El balance de masa que se muestra en la Gráfica 9, muestra los compuestos de entrada y salida del proceso de extracción acuoso frío con el cual se realizaron lo respectivos cálculos.

$$(Etanol + Agua + Hongo) - (Residuo + Extracto + Precipitado + Agua + Etanol) = Pérdidas$$

$$(118,5 g + 140 g + 15 g) - (62,5 g + 0,020608 g + 1,92 g + 69,376 g + 78,9 g)$$

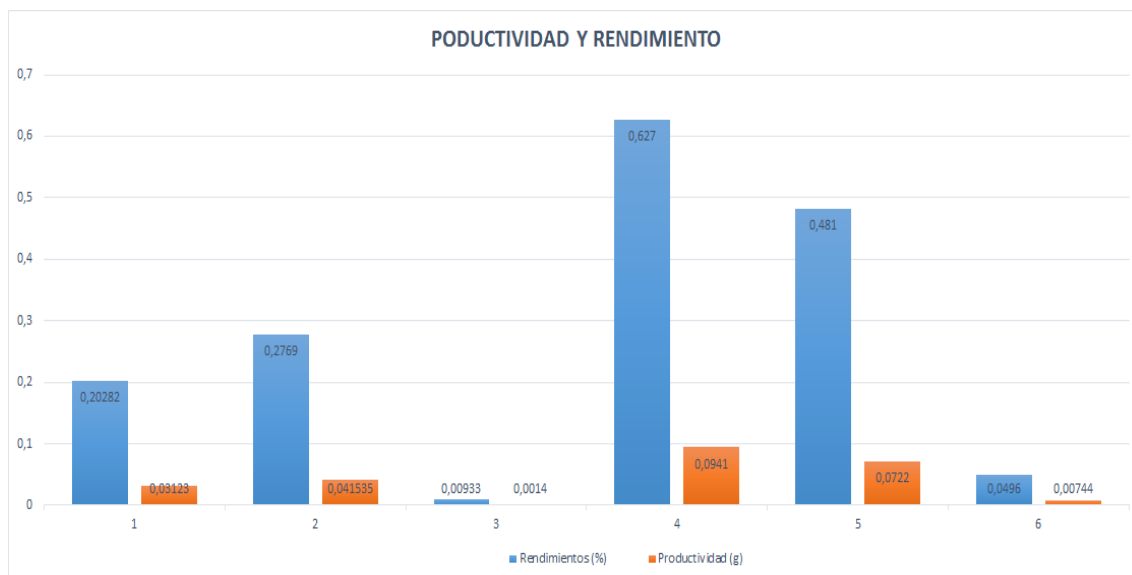
$$Pérdidas = 60,63339 g$$

Al realizar el respectivo balance de masa teniendo en cuenta los componentes de entrada y de salida se obtienen unas pérdidas de 60.63 g que equivalen al 22.17%. El porcentaje de diferencia en comparación con la extracción de 2 horas es del 16.57%, debido a estas pérdidas la concentración de azúcares reductores también fue baja, estas pérdidas se pueden ver representadas en la filtración, precipitación de proteínas y centrifugación. En este método se evidencia que entre más tiempo se deje la muestra en contacto con agua menos concentración de glucosa y más pérdidas.

4.4 INFUSIÓN CALIENTE

4.4.1 Fracción soluble

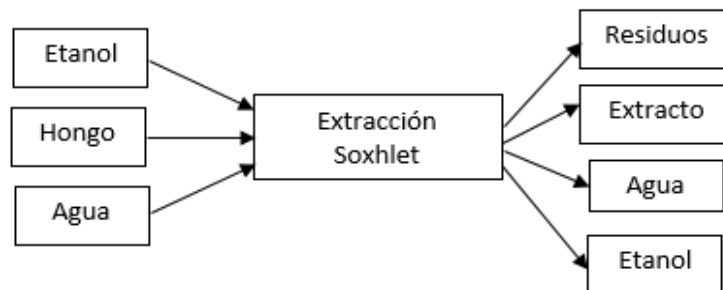
Gráfica 18. Repeticiones vs. Productividad y Rendimiento (Agua Caliente)



Según el artículo “La *Ganoderma* en la salud de hoy”⁴² en un estudio que se hizo se pusieron a hervir 15 gramos de hongo en 300 mL de agua y la cantidad de polisacáridos obtenidos son de 0,068 g por el método de ebullición que es el mismo acuoso-caliente por un tiempo de 3 horas, las muestras con mayor productividad similar al artículo son la 4 y 5 repetición con valores 0.0941 y 0.0722 g respectivamente y por ende sus rendimientos fueron los más altos durante 3 horas; se puede afirmar que el proceso con mejores resultados y similares a la literatura es con agua caliente, durante 2 horas los rendimientos y productividad no son tan buenos pero no se descartan. La última repetición durante las 3 horas de calentamiento los gramos fueron 0.00744 con un valor muy bajo con respecto a las otras dos muestras, pudieron existir errores debido a que el tiempo de calentamiento no fue constante en el intervalo trabajado de tiempo pues la plancha de calentamiento estaba fallando y al llegar a temperaturas altas se apagaba; además gran parte del agua se evaporó muy rápido y esto se comprobó ya que al filtrar la muestra fue la que menor volumen de extracto generó y la probabilidad de encontrar glucanos era baja esto se evidencia en la concentración de azúcares reductores que también fue pequeña con un valor de 0.212 con respecto a la muestra 4 y 5.

4.4.2 Balance de masa. El balance de masa que se muestra en la Gráfica 11, muestra los componentes de entrada y salida en la extracción acuosa caliente.

Gráfica 19. Balance de masa extracciones acuosas calientes



4.4.2.1 Infusión caliente (120 minutos)

Los cálculos del balance se obtienen en base a la Ecuación 5.

$$(Etanol + Agua + Hongo) - (Residuo + Extracto + Agua + Etanol) = Pérdidas$$

$$(118,5 g + 140 g + 15 g) - (48,7 g + 0,041535 g + 125,658 g + 20,514 g)$$

⁴² YAMARAİKO, Yuri. La *Ganoderma* en la salud de hoy. Asociación contra el cáncer de mama. Vol.1. pg.23

$$P\acute{e}rdid\acute{a}s = 78,44 \text{ g}$$

Al realizar el balance de masa con los componentes de entrada y salida del proceso se obtienen unas p\acute{e}rdidas de 78.44 g que equivalen a 28.72%. Aunque la temperatura no llego como tal a los 100°C como dec\iacute;a la literatura se mantuvo alrededor de los 90°C, pero el porcentaje de p\acute{e}rdidas es muy similar al que se obtuvo en la tesis "Obtenci\on de un extracto de polisac\aridos a base del hongo *Lentinula Edodes*"⁴³ fue del 27.13% a una temperatura de 90°C durante 1 hora, aunque hay condiciones que variaron en ambas experimentaciones como en el tama\o de part\cula, equipos para calentar las muestras y diferentes m\etodos de purificaci\on.

4.4.2.2 Infusi\on caliente (180 minutos). El balance de masa que se muestra en la Gr\afica 11, muestra los componentes de entrada y salida en la extracci\on acuosa caliente.

$$(Etanol + Agua + Hongo) - (Residuo + Extracto + Agua + Etanol) = P\acute{e}rdid\acute{a}s$$

$$(118,5 \text{ g} + 140 \text{ g} + 15 \text{ g}) - (70 \text{ g} + 0,0941 \text{ g} + 121,362 \text{ g} + 21,303 \text{ g})$$

$$P\acute{e}rdid\acute{a}s = 60,60 \text{ g}$$

Al realizar el balance de masa con los respectivos componentes de entrada y salida la p\acute{e}rdida tiene un valor de 60.6 g que equivalen al 22.2%. En comparaci\on con la extracci\on durante 2 horas en este proceso hay un 6.52% menos de p\acute{e}rdidas, es el proceso donde mejor rendimiento y productividad se obtiene de los tres procesos de obtenci\on de glucanos.

4.5 INFUSI\ON ALCALINA

El procedimiento de Infusi\on alcalina el cual se bas\o en el art\culo "Structure and antinociceptive effects of β -D-glucans from *Cookeina tricholoma*"⁴⁴ se realiz\o a partir del residuo que se obtiene de la extracci\on acuosa fr\ca y acuosa caliente con el fin de obtener la mayor cantidad posible de polisac\arido presente en el hongo. Sin embargo, se puede observar en la Tabla 20, que en la infusi\on evaluada con hidr\oxido de potasio a diferentes concentraciones no se obtuvo presencia de az\cares reductores, lo que conlleva a deducir que casi el 100% de la cantidad de polisac\aridos presentes en una muestra de 15 g de masa f\ngica se obtienen en las infusiones fr\ca y caliente que se realizaron previamente. La temperatura tan alta no favoreci\o la obtenci\on de glucanos pues la productividad fue cero, pues seg\un el art\culo "Optimization of Alkaline Extraction of Polysaccharides from

⁴³ LANCHEROS, Jeimmy. ROJAS, Lorena. Op. cit., p. 74

⁴⁴ MORENO, Roberta. RUTHES, Andrea, BAGGIO, Christiane. VILLAPLANA, Francisco., DKOMURA, Dirce. IACOMINI, MARcelo. Op. cit., p. 3

Ganoderma lucidum and Their Effect on Immune Function in Mic⁴⁵ las condiciones óptimas para realizar una extracción alcalina con NaOH al 5.1% a 60.1°C durante 77.1 minutos.

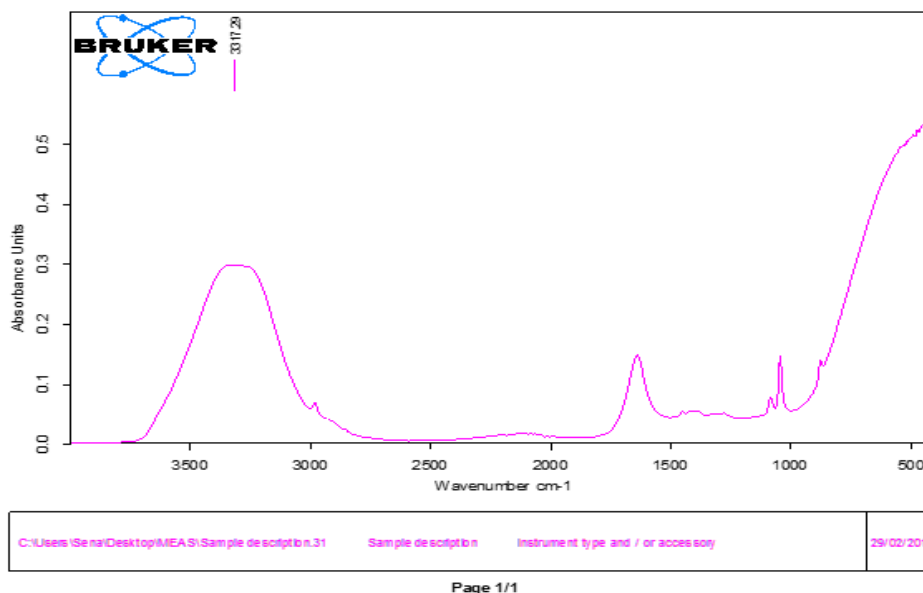
4.6 CARACTERIZACIÓN

4.6.1 Espectros infrarrojos. La determinación de la configuración anomérica de los monosacáridos fue analizada mediante espectroscopía infrarroja. Se analizaron todos los extractos, y se observó que presentaban un patrón similar, por lo cual sólo se presenta el espectro.

4.6.1.1 Extracción Soxhlet. El espectro obtenido para las muestras realizando 4 recirculaciones presentan un comportamiento similar tal como se evidencia en la Imagen 30, hay un pico más extenso alrededor de 3300-3500 cm^{-1} que es característico de los grupos hidroxilo y la presencia del grupo carbonilo debido al alargamiento del enlace O-H. Los picos relativamente fuertes de absorción están cerca de 1640 cm^{-1} indican la presencia de amidas, cetonas, aldehídos, ácidos carboxílicos (1780-1640 cm^{-1}) y el enlace β -(1,4) identificados como quitina que es un carbohidrato que forma parte del tejido estructural de la pared de los hongos. En las Imágenes 13 y 14 se observa un pico pequeño entre 850 cm^{-1} y 920 cm^{-1} pero se ve un poco más marcado en la primera muestra y esto coincide con las concentraciones obtenidas por el método DNS donde la muestra 1(4R) es la que más concentración de glucosa tiene, lo que quiere decir que hasta 890 cm^{-1} hay enlaces glucosídicos que es donde están los polisacáridos más importantes de la *Ganoderma* que son el β -(1,3) y β -(1,6) porque proporcionan beneficios para la salud pero como el pico no es tan marcado es decir que se encuentran en baja proporción porque absorbe menos vibraciones de las moléculas de interés, sin embargo se puede observar en el Anexo B que en ese rango las sustancias que predominan son aromáticos, epóxidos y alcanos.

⁴⁵ HUANG, Shen. WEI, Jin. PAN, Hua-Xin. XIANG, Zhen. Optimization of Alkaline Extraction of Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and Their Effect on Immune Function in Mic.2010. p.2.

Gráfica 20. Espectro Infrarrojo muestra Soxhlet



- **Infusión fría.** El espectro obtenido para el extracto de agua fría 2 a 120 minutos y extracto de agua fría 4 a 180 minutos no fue el esperado para un glucano ya que no muestra una banda de absorción alrededor de 890 cm⁻¹ que indican que los residuos de glucosa están unidos en forma β-(1,3) y pueden aparecer bandas a los 920 cm⁻¹ que identifican a los enlaces β-(1,6), además el espectro carece de las bandas 850 y 930 cm⁻¹ que pertenecen a los alfa glucosídicos⁴⁶. No muestran picos representativos de estructuras glicosídicas pero si otros grupos funcionales con una intensidad de banda fuertes (3400-3700 cm⁻¹)⁴⁷, el pico que se muestra es el 1014,56 cm⁻¹ igual para ambas muestras lo cual indica la presencia enlaces C-O,C-O-C,C-X (1000-1200 cm⁻¹)⁴⁸ también en ese rango sugiere una posible presencia de un anillo de D-piranos, se muestra un pico alrededor de 3300-3298 cm⁻¹ que es característico de lo grupo OH lo cual conlleva a establecer que hay agua, se observan bandas cercanas a 1650 cm⁻¹ por lo que hay dobles enlaces en las uniones C-C y enlaces CO-NH que pueden ser amino polisacáridos relacionados con péptidos o amino-azúcares. Cabe aclarar que los picos con longitud de onda mayor a 1200 cm⁻¹ se encuentran en la región de frecuencia de grupo donde los grupos funcionales rara vez varían de un compuesto a otro, pero la intensidad y la anchura de la banda si varia, además la interacción

⁴⁶ LIMBERGER, Bayer. CHAN, Francisco. Barley β-glucans extraction and partial characterization. *Food chemistry*, 154, 84-89.

⁴⁷ZHANGA, Jianju. MENG B, Gyajunyan. ZHAIC, Guyion. YANG D, Yongheng. ZHAOA, Huajie. JIA, Le. Extr action, characterization and antioxidant activity of polysaccharides of spent mushroom compost of *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol 82. pg.437

⁴⁸ZHANGA, Jianju. MENG B, Gyajunyan. ZHAIC, Guyion. YANG D, Yongheng. ZHAOA, Huajie. JIA, Le. Op. cit., p.437

entre grupos funcionales dentro de una molécula puede dar origen a cambios en la frecuencia e intensidad de las bandas. En ambas muestras se pueden ver unos picos alrededor de 2900 - 2800 cm^{-1} indican la unión de cadenas C-H, en la muestras fría que se extrajo durante dos horas se ven muchos picos entre 1100-1500 cm^{-1} esta región es conocida como la huellas digitales denominada así porque en ella cada compuesto presenta un conjunto de bandas característico que lo diferencia del resto de los compuestos, hay enlaces C-H, C-O, C-N, C-C grupos funcionales como ésteres, alquenos, nitro y ácidos carboxílicos.

Gráfica 21. Espectro Infrarrojo acuoso fría



- Precipitado de la infusión fría.** Después de centrifugar cada repetición se obtuvieron 6 precipitados que eran la fase insoluble. Según el artículo “Structure and antinociceptive effects of β -D-Glucans from *Cookeina tricoloma*”⁴⁹ la fase insoluble es la que contenía solamente glucosa pero en la caracterización en el infrarrojo no se pudo ver reflejado la afirmación hecha en el artículo porque no se evidencio ningún pico de absorbancia antes de 1000 cm^{-1} por lo que no hay presencia de enlaces ni de alfa ni beta glucosídicos. EL pico más cercano a 1000 cm^{-1} es el de 1016 y 1014 para los precipitados durante 2 y 3 horas respectivamente indica la presencia de enlaces C-O, C-C, C-C y C-N, también hay muchos picos seguidos entre 1500 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} lo que indica que en ese rango en vez de glucanos hay anillos aromáticos, alcoholes y aminas.

⁴⁹ MORENO, Roberta. RUTHES, Andrea, BAGGIO, Christiane. VILLAPLANA, Francisco., DKOMURA, Dirce. IACOMINI, MARcelo. Op. cit., p. 4.

4.6.1.2 Infusión caliente. El espectro obtenido para la infusión caliente fueron el 4 y 5 que dieron las concentraciones más altas con respecto a las otras repeticiones no fue el esperado para un β -glucano porque no se ve ningún pico entre el rango anteriormente mencionados. Los espectros arrojados por ambas muestras son similares y lo que caracteriza ambos espectros son los picos cercanos a 1650 cm^{-1} representan la presencia de enlaces a anoméricos característicos de los enlaces β -(1,4) identificados como quitina, en la región de $1600\text{-}1675\text{ cm}^{-1}$ que son características de los anillos aromáticos, alquenos, aminas.⁵⁰

4.6.1.3 Infusión alcalina. En la caracterización por el método DNS las concentraciones son negativas esto quiere decir que no hay presencia de glucosa y este resultado se corrobora con el espectro infrarrojo en el cual no se observa transmitancia pues los enlaces de la muestra no generan suficientes vibraciones alrededor de 850 cm^{-1} que es donde hay mayor absorción de glucanos.

4.6.2 Microscopio de fuerza atómica. La muestra que fue analizada es la repetición 2 de la extracción fría a 25° C no tiene gran similitud con la Imagen 31 del artículo "Thermally Induced Conformational Transition of Triple-Helical Lentinan in NaCl Aqueous Solution-"⁵¹en la cual se observan cadenas de triple hélice en una solución a 25° C , este resultado concuerda con los espectros arrojados pues no hay presencia de enlaces glucosídicos en forma β -(1,3) y β -(1,6) que representan las cadenas de Lentinan. Se puede afirmar que la ausencia de cadenas de Lentinan se debe a que se trabajó con el residuo de la extracción caliente y no directamente con la muestra pulverizada, y además en la bibliografía se acondiciono extracto a unas condiciones específicas para que fuera leído en el AFM.

⁵⁰ UNIVERSIDAD NACIONAL ABIRTA Y A DISTANCIA. Análisis de espectros de la región del IR [En línea] <http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401539/execute-20de%20agosto/leccin_10_analisis_de_espectros_de_la_region_del_IR.html> [Citado en 5 de abril de 2016]

⁵¹ WANG, Xiaohua. Thermally Induced Conformation Transition of Triple-Helical Lentinan in NaCl Aqueous Solution. En: Revista universidad de Wang. Mayo 2008. p.10350

Imagen 14. Muestra obtenida con solución acuosa a 25°C en el AFM

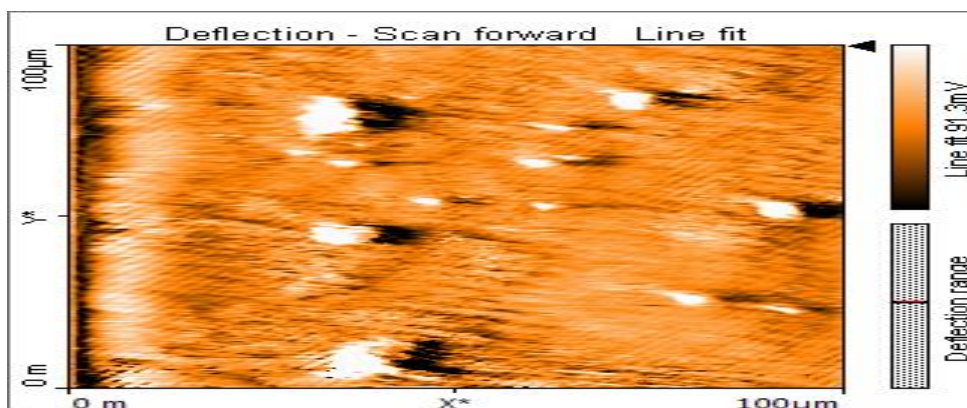
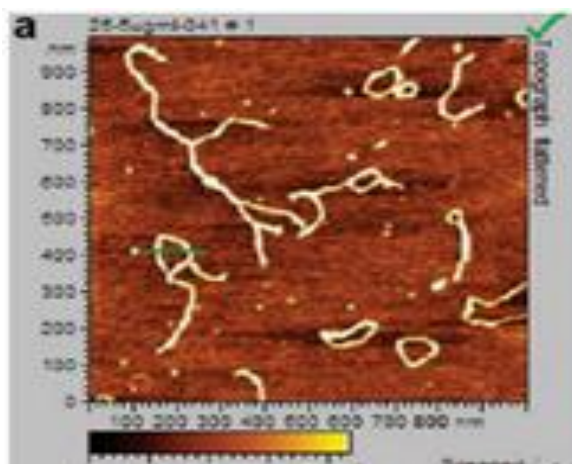


Imagen 15. Cadenas de *Lentinan* a 25°C



Fuente: Thermally Induced Conformation
Transition of Helical Lentinan in NaCl
Aqueous Solution

4.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

La variable respuesta que se consideró para la evaluación del método de infusión es el rendimiento, el cual se calcula a partir de las productividades obtenidas en base a la Ecuación 4 para cada infusión y que se muestran en la tabla de las productividades anteriormente mencionada.

El diseño experimental se realiza con los métodos de infusión frío y caliente, ya que estos dos métodos de extracción tienen una mayor productividad.

El rendimiento corresponde a la cantidad de extracto obtenido en relación con la cantidad de material fúngico inicial en cada proceso, estos rendimientos se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30. Porcentaje de rendimiento de infusión

Infusión fría (%)		Infusión caliente (%)	
120 min	180 min	120 min	180 min
0,2268	0,1373	0,2082	0,627
0,3694	0,0682	0,2769	0,481
0,22	0,0641	0,0933	0,0496

Una vez con los datos determinados se construye una matriz de experimentos para el diseño factorial 2^2 realizando tres repeticiones. Como se ve en la Tabla 31.

Tabla 31. Matriz para la determinación de experimentos

N° de Experimentos	Factor 1 Temperatura de Extracción (°C)	Factor 2 Método de Extracción
1	25	120
2	25	120
3	25	120
4	25	180
5	25	180
6	25	180
7	100	120
8	100	120
9	100	120
10	100	180
11	100	180
12	100	180

Para conocer el efecto que presenta un factor y su interacción con otro, estos deben variarse entre dos valores por lo que para efectuar un cambio en estas variables se debe conocer los extremos de su dominio experimental. Al observar los factores se puede evidenciar que ambas variables son cuantitativas tanto el o como la temperatura, por tal motivo se define un máximo y mínimo para ambas variables, para el tiempo lo extremos mínimo y máximo son 120 min y 180 min respectivamente y para la temperatura son 25° C y 100° C respectivamente.

El número de tratamientos para el desarrollo experimental es de 12, el cual se calcula mediante el uso de la Ecuación 6, teniendo en cuenta que es un diseño de cribado, factorial 2^k que consta de 2 factores y una variable respuesta con 3 repeticiones.

Ecuación 6. Diseño 2^K

$$N_t = 2^2 \times 3 = 12$$

4.7.1 Desarrollo del diseño experimental. El objetivo del diseño experimental es saber cómo influyen 2 factores en el proceso de extracción de polisacáridos tipo glucano y saber la forma en que interaccionan entre sí, teniendo como variable respuesta el rendimiento de cada extracción. Este diseño experimental proporciona información para estudiar cómo el cambio en la temperatura y en el tiempo de contacto con los solventes afectan el rendimiento de la extracción para mediante la interpretación de datos decidir qué método es el mejor en términos del rendimiento de los extractos obtenidos.

La Tabla 32 describe las características del diseño de experimentos en donde se muestran los valores mínimos y máximos de cada factor y los valores de la variable respuesta

Cuadro 1. Características del diseño

		TIEMPO	
		120 min	180 min
TEMPERATURA	25°C	0,226 0,369 0,220	0,137 0,068 0,064
	100°C	0,208 0,277 0,093	0,627 0,481 0,096

Se puede observar que los datos obtenidos de rendimiento de extracción varían entre 0,096 y 0,627. En la Tabla 33 se puede observar los rendimientos obtenidos para cada temperatura y tiempo de extracción.

Tabla 32. Datos experimentales de rendimiento de extracción.

N° de Experimentos	Factor 1 Temperatura (°C)	Factor 2 Tiempo (min)	Rendimiento (%)
1	25	120	0.226
2	25	180	0.137
3	25	120	0.369
4	25	180	0.068
5	25	120	0.220
6	25	180	0.064
7	100	120	0.208
8	100	180	0.627
9	100	120	0.277
10	100	180	0.481
11	100	120	0.093
12	100	180	0.096

4.7.2 Interpretación de resultados. Los tratamientos evaluados mediante las doce respuestas correspondientes al rendimiento permiten analizar la interacción de los factores y mediante el uso del diseño factorial se busca encontrar los experimentos que mejores resultados dan dentro de un dominio de datos experimentales.

El diseño factorial se llevó a cabo mediante el uso del software STATGRAPHICS en donde se creó un diseño simple 2^2 con 3 réplicas, del cual se obtuvo los resultados que se muestran en la Tabla 34.

Tabla 33. Efectos estimados para el rendimiento.

Efecto	Estimado	Error estándar	V.I.F
Promedio	0.2388	0.04422	
Temperatura	0.1163	0.0884	1
Tiempo	0.0133	0.0884	1
Temperatura- Tiempo	0.1953	0.0884	1

La Tabla 34 muestra las estimaciones para cada una de los factores y las interacciones, el error estándar de cada efecto que muestra el error de muestreo y el factor de inflación de varianza.

Se puede observar de la Tabla 34 que entre los factores que afectan la variable respuesta, el efecto que mayor estimado genera es la relación temperatura tiempo, ya que genera un estimado sobre el rendimiento de 0.1953. Además se

puede observar que el error estándar de los estimados para los factores corresponde al 8,8% y no hay ninguna diferencia entre ellos, por lo que la elección del mejor método y las condiciones que más influyen sobre el rendimiento se pueden realizar solo con el análisis de los estimados. El factor de inflación de varianza en todos los casos es 1, lo cual quiere decir que no hay multicolinealidad en los factores, es decir no hay un aumento en la varianza de los coeficientes de regresión y por ello el análisis de regresión es estable y se puede interpretar fácilmente.

4.7.3 Análisis de varianzas. Se realiza un análisis de varianza (Tabla 35) calculado por el software Stargraphics con una serie de datos y usando el modelo de regresión lineal.

Tabla 34. Análisis de varianza ANOVA según modelo lineal de rendimiento

Fuente	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Valor F	Valor crítico de F
Modelo corregido	3	0.156	2.24	0.161
Intersección	1	0.685	29.567	0.001
Temperatura	1	0.041	1.749	0.223
Tiempo	1	0.023	0.023	0.884
Interacción	1	0.115	4.948	0.057
Error	8	0.185		
Total	12	1.026		
Total Corregido	11	0.341		

Se puede observar de la tabla 35, que ningún valor crítico de F está por debajo de 0.05, este valor corresponde al nivel de significancia al cual se realizó el análisis de varianza en el software y es el que indica el rechazo o no rechazo de la hipótesis nula.

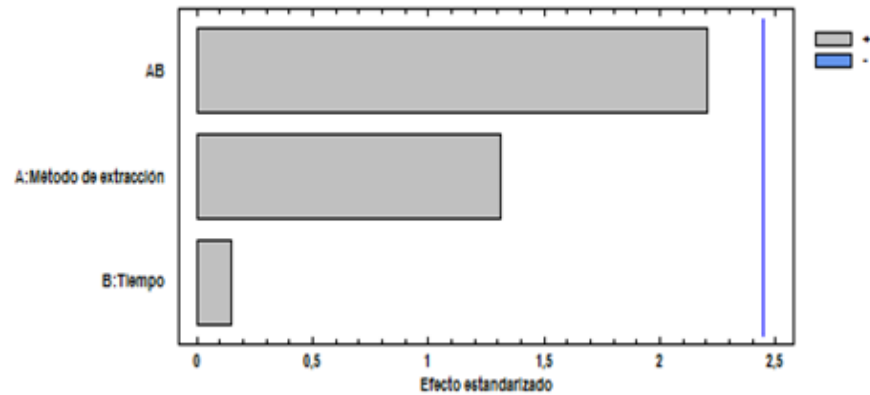
Teniendo en cuenta que la hipótesis nula es que no hay efecto de un factor sobre la variable respuesta, ya que las varianzas se asumen iguales; los valores críticos de F que se encuentran por debajo del nivel de significancia indican que la hipótesis nula se rechaza.⁵²

Como se observa en la Tabla 35 ningún valor crítico de F es menor a 0.05 lo que quiere decir que la hipótesis nula no se rechaza y ningún método de extracción sería el mejor ya que no hay efecto de ninguno de los dos factores y la interacción sobre la variable respuesta a un nivel de significancia del 5%. En la Gráfica 12 se muestra una línea vertical azul que representa el nivel de significancia y verifica

⁵² [Citado el 23 de Abril de 2016] Disponible en <<http://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/DDE%20-%20Disenos%20de%20Cribado.pdf>>

que, aunque tiene mayor influencia la interacción tiempo y temperatura, la línea no está sobre ningún factor y verifica lo anteriormente dicho.

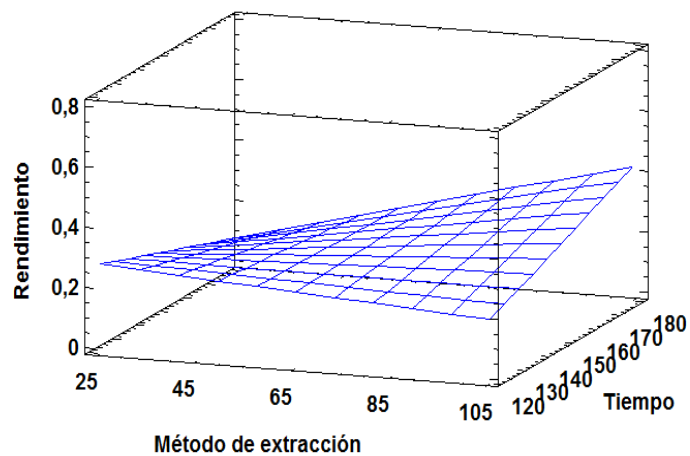
Gráfica 22. Diagrama de Pareto del rendimiento por factores



Fuente: STATGRAPHICS

El diagrama de superficie de respuesta es una técnica de optimización basada en planteamientos factoriales⁵³. A continuación, se muestran los gráficos en donde se representan el tiempo, el método de extracción (Temperatura) y rendimiento en los ejes X, Y y Z respectivamente.

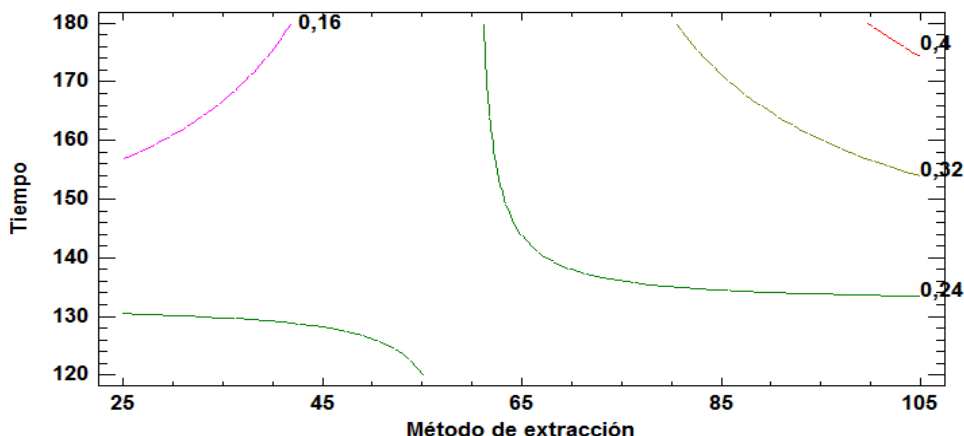
Gráfica 23. Diagrama de superficie para el rendimiento



Fuente: STATGRAPHICS

⁵³ KUELH, Robert. Diseño de experimentos. Segunda 00 Edición. Arizona. Thomson learning.2004

Gráfica 24. Diagrama de contorno del rendimiento



Fuente: STATGRAPHICS

En el Gráfico 14, se representa el contorno de superficie del rendimiento de la Gráfica 13, se puede observar que el mayor rendimiento que se puede obtener basado en los datos experimentales es del 40%, que es la línea roja que se muestra en el Gráfico 14. Este valor de rendimiento máximo se obtiene cuando se realiza el método de infusión caliente a 100°C y durante un tiempo de 180 minutos.

El modelo de regresión que se muestra en la ecuación 7, es un modelo matemático que se usa para aproximar la dependencia entre una variable Y con las variables independientes X, este modelo se puede expresar como:

Ecuación 7. Modelo de Regresión

$$Y_{v.rta} = B_0 + B_1X_T + B_2X_t + B_3X_TX_t + e$$

Donde B₀, B₁, B₂ Y B₃ son los coeficientes no estandarizados y X_T, X_t son los factores codificados, teniendo en cuenta que -1 y 1 son los niveles bajo y alto respectivamente como se muestra en la Tabla 36.

Cuadro 2. Interacción entre factores

	120 min (-1)	180 min (1)
25°C (-1)	0,226 0,369 0,220	0,137 0,068 0,064
100°C (1)	0,208 0,277 0,093	0,627 0,481 0,096

El modelo de regresión que se obtiene del software es:

Ecuación 8. Modelo de Regresión STATGRAPHICS

$$Y = 0.239 + 0.058 XT + 0.07Xt + 0.098 XT Xt + e$$

Si se reemplazan los valores de XT (temperatura) y Xt (tiempo), con todas las combinaciones de 1 y -1 que se obtienen de la Tabla 35, el mayor número que se puede obtener para el rendimiento es cuando se calcula la interacción alto(1) - alto(1), que corresponde a la extracción acuosa a 100°C durante 3 horas. Esto corrobora lo anteriormente dicho en el diagrama de superficie de contorno.

Por otro lado la regresión lineal presenta un error e debido a que en el momento de la experimentación pudo existir errores experimentales como la filtración a vacío, concentración del extracto y centrifugación que afectaron directamente el valor de los resultados; además otro tipo de error es el de factores no controlados como la calibración de los equipos como la balanza analítica, rotavaporador y el espectrofotómetro.

Con este último capítulo se lleva a cabo el cumplimiento del tercer objetivo el cual es “Determinar el rendimiento y efecto de las variables y parámetros que inciden en los procesos de obtención de polisacáridos tipo glucano”.

5. CONCLUSIONES

- La deshidratación y tamaño de partícula de la muestra de hongo influyen en cada proceso de extracción primero porque el hongo está constituido en gran parte de agua al eliminarla aumentan las posibilidades de obtener un extracto más y disminuir el tiempo de extracción, segundo es que al trabajar con un menor diámetro de partícula aumenta el área superficial y por ende mejora el contacto con el solvente, lo que afecta positivamente el tiempo de extracción, economía energética del proceso, y concentración de azúcares reductores en los extractos obtenidos
- El tamaño promedio de partícula después del proceso de molienda y tamizado esta entre 2.36 y 0.3 mm, pero también hay valores tanto encima como por debajo de ese rango por lo que se consideran partículas polidispersas.
- Es suficiente para la extracción Soxhlet realizar 4 recirculaciones con una cantidad de 15 g de hongo molido, ya que con durante 4 horas de proceso se obtiene 0.20 g/L de polisacáridos presentes en el hongo.
- Al evaluar los procesos de extracción teniendo en cuenta las variaciones de solventes, temperatura y tiempo se logró identificar que los mayores rendimientos se obtuvieron utilizando agua caliente a 100°C durante 3 horas, dando como promedio 0.2% de rendimiento sobre la masa inicial cargada, además el diagrama de contornos arroja el valor máximo de 0.4 y se corrobora con el modelo de regresión con un valor de 0.465.
- Se obtuvieron en pequeña cantidad los β -glucanos con propiedades medicinales en la extracción Soxhlet con 4 recirculaciones lo que cual se corrobora en el espectro infrarrojo el cual muestra un pico de alrededor de 960 cm^{-1} , por otro lado en la infusión fría y caliente se obtuvieron glucanos de tipo estructural que son los enlaces β (1,4).
- Al realizar la extracción con KOH utilizando el residuo de la infusión caliente, por el método DNS arrojo valores negativos lo que conlleva a afirmar que no hay presencia de glucanos por lo que no se puede comparar con los rendimientos del artículo "*Structure and antinociceptive effects of β -D-glucans from *Cookeina tricholoma**"⁵⁴ pues en esta bibliografía se obtiene glucanos de la fase precipitada.

⁵⁴ MORENO, Roberta, RUTHES, Andrea, BAGGIO, VILAPLANA, Francisco, KOMURA,Dirce, and IACOMONI, Marcelo. Op.Cit; p.224.

- En la caracterización por espectroscopia infrarroja los espectros obtenidos por infusión fría y caliente son similares al que se muestra en el artículo “Producción de polisacáridos a partir de *Ganoderma*, aislado en la región andina”⁵⁵ donde el espectro carecen de las bandas 850 y 930 cm^{-1} que son bandas normalmente atribuidas a los alfa y beta glicosídicos, también se observan bandas alrededor de 1650 cm^{-1} que son características de los enlaces CO-NH atribuidos a la quitina⁵⁶.
- En la caracterización con el microscopio de fuerza atómica no se logra obtener una imagen como la mostrada en la literatura, debido a que en la bibliografía manejan unas condiciones de extracción y caracterización para que la muestra sea leída en el AFM.

⁵⁵ LÓPEZ, Xiomara. ARBOLEDA, Carolina. FREIMAR, Segura. Producción de polisacáridos a partir de *Ganoderma* sp., aislado en la región andina. p.16.

⁵⁶ LÓPEZ, ARBOLEDA, FREIMAR. Op; Cit; p.18.

6. RECOMENDACIONES

- Examinar la posibilidad de realizar la extracción Soxhlet pero con mayor cantidad de masa cargada, cuatro recirculaciones o menos, temperatura no mayor a 100°C para saber con cual se puede obtener mayor cantidad de azúcares reductores y glucanos medicinales.
- Para extracciones futuras con hongos comestibles cortar, deshidratar el hongo para eliminar la mayor cantidad de agua posible ya que si no se hace se puede extender el proceso de extracción.
- Llevar a cabo la extracción alcalina, pero trabajando la muestra directamente con los solventes y variando diferentes condiciones con el fin de determinar la productividad en este proceso.
- Realizar ensayos a nivel de planta piloto llevando a cabo la extracción con agua caliente para observar el comportamiento de la productividad del extracto y observar la viabilidad de producción a nivel industrial.
- Estudiar la factibilidad técnica y económica de la realización de un producto proveniente del extracto de *Ganoderma* debido a las propiedades de su composición y como alternativa de mercado actual para la prevención y mejora la salud de personas enfermas.

BIBLIOGRAFÍA

ACUÑA, Dr.Edgar. Regresión lineal. Universidad de puerto rico, recinto universitario de mayaguez. p 19. Disponible <<http://academic.uprm.edu/eacuna/miniman9sl.pdf>>

BUITRAGO JOHANNA, TENJO DOLLY. Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia universidad javeriana. Bogotá. 2007. p13

[Citado el 23 de Abril de 2016] Disponible en <<http://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/DDE%20-%20Disenos%20de%20Cribado.pdf> >

[Citado el 20 de Abril de 2016] FUNGIPEDIA. *Ganoderma lucidum*. Disponible en: <<http://www.fungipedia.org/hongos/ganoderma-lucidum.html>>.

CARSTEN,Grundenmanna.KAUFERA,Manuel.SAUERA,Barbara.BETTING,Philip. MERDIVANC,Simon.ROMAN, Hubera.Comparative chemical and biological investigations of β -glucan-containing products from shiitake mushrooms.Journal of Functional Food.Vol 18 (Octubre,2015). p2.

CARUFFO,Maria.LOPEZ,Paulina, NAVARRETE, Natalia,DIAZ,Angelica,NAVARRETE, Paola.Uso de B-glucanos como inmunoestimulante en la Acuicultura.Chile.Universidad de Chile.Laboratorio de Biotecnología.2013, pg.120

Chang, R. 1996. Potential Application of *Ganoderma* Polysaccharides in the Immune Surveillance and Chemoprevention of Cancer. 153-160 In: Royse, D.J (ed). Mushroom Biology and Mushroom Products. Proceedings of the Second International Congress.

COMPARATIVE CHEMICAL AND BIOLOGICAL INVESTIGATIONS OF β -GLUCAN CONTAINING PRODUCTS FROM SHIITAKE MUSHROOMS.Gracelinc Limited.Inventor MORGAN, Keith, Raymond. Fecha de Solicitud: 1 Julio, 2004. ESPAÑA, Patente de Investigación 2 210 577. 1, Julio, 2004.

DAHLSTROM,D.A. Liquid -Solid Operation and equipment.7 ed: McGraw-Hill ,1999. p. 58-59

[En línea] Procedimientos de identificación y cuantificación de azúcares reductores. Disponible en: <<http://acasti.webs.ull.es/docencia/practicas/5.pdf>>

FERRÉ, Joan. Diseño factorial completo 2k. Grupo de quimiometría y cualimetría. Departamento de Química analítica y química orgánica. Universidad Rovira i Virgili. Tarragona. Disponible en: <<http://rodi.urv.es/quimio/general/doecast.pdf>>

GONZALEZ,Viviana. HERRERA,Carolina. Determinación de parámetros cinéticos y pruebas preliminares de tratabilidad para colorantes y metales empleando una

cepa de *Ganoderma lucidum*. Bogota D.C. Trabajo de Grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología.

HAOKI, Nabna. HAMAGUCHI, Astuko. KURODA, Hitora. The Chemical Structure of an Antitumor Polysaccharide in Fruit Bodies of *Grifola frondosa* (Maitake). *Chem Pharma Bull.* Vol 35 (Agosto; 1987). p 1.

HUANG, Shen. WEI, Jin. PAN, Hua-Xin. XIANG, Zhen. Optimization of Alkaline Extraction of Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and Their Effect on Immune Function in Mic. 2010. p.2.

INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. Diccionario del cáncer [En línea]. <<http://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=45324>> [Citado en 23 de Febrero de 2016]

INSITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CETIFICACION. Documentacion. Presentacion de tesis trabajos de grados y otros de investigación. NTC 1486. Sexta actualización. Bogota D.C: El instituto, 2008. 110 p

_____. Referencias bibliográficas, contenido, forma y estructura. NTC 5613 Bogotá D.C: El instituto, 2008. 38 p

_____. Referencias documentales para fuentes de informaciones electrónicas. NTC 4490. Bogota D.C: El instituto, 2008. 30 p

IPS. Curso de introducción a las ciencias físicas. En: Editorial Reverté. *Introductory physical science teacher's guide*. 1967. Madrid. P 92

KUELH, Robert. *Diseño de experimentos*. Segunda Edición. Arizona. Thomson learning. 2004

LANCHEROS, Jeimmy. ROJAS, Lorena. Obtencion de un extracto de polisacaridos a base del hongo *Lentinula Edodes* en Tecnoparque Colombia. Trabajo de Grado de Ingenieros Quimicos. Bogota D.C. Fundacion Universidad de America. Facultad de Ingenieria Quimica. 2013. p 42.

LEE, Chum. JUN, Bae. HYEONG, Pyo. TAE, Choe. SANG, Kim. HYE, Hwang. Biological Activities of the polysaccharides produced from submerged culture of edible Basidiomycete *Grifola Frondosa*. *ENZyme and Microbial Technology*. [Base de datos en línea] (Septiembre, 2002) p.3. [Citado en 22 de marzo de 2016] Disponible en SCIENCE DIRECT.

LIMBERGER, Bayer., CHAN, Francisco. Barley β -glucans extraction and partial characterization. *Food chemistry*, 154, 84-89.

Lindequist, U. 1995. Structure and biological activity of triterpene, polysaccharides and other constituents of *Ganoderma lucidum*, en Kim B.K., Kim I.H. and Kim Y.S. (ed.) *Recent advances in *Ganoderma lucidum* research*. Pharmaceutical Society of Korea, Seoul: p. 61-69.

LOPEZ, Xiomara. ARBOLEDA, Carolina. FREIMAR, Segura. Producción de polisacáridos a partir de *Ganoderma* sp., aislado en la región andina.p.16.

Miyazaki T, Nishijima M. 1981. Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *ChemPharmacol Bull* 29:3611–3616.

MORENO, Roberta, RUTHES, Andrea, BAGGIO, VILAPLANA, Francisco, KOMURA, Dirce, and IACOMONI, Marcelo. "Structure and antinociceptive effects of β -D-Glucans from *Cookeina tricholoma*," *Carbohydrate Polymers*, 2016. p. 19

MUÑOZ Andrea, VEGA Jhonas. Universidad de la Santa. Determinación de azúcares reductores por espectrofotometría. Perú. 2014

MUSHWORLD. Manual de cultivo de hongos comestibles y medicinales. Handbook2. Corea. 2005. Capítulo 11.

NIÑO ARIAS, Fabián. 2010. Evaluación de metabolitos secundarios del hongo *ganoderma lucidum* con actividad antifungica frente a *fusarium* spp. de interés clínico. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. pág. 10-12

Norma Técnica Colombiana. Bebidas alcohólicas, Método para determinar contenido de azúcar. 2003. p3

NUÑEZ, Carlos Eduardo. Extracciones con equipo soxhlet. Disponible en <<http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-extraccinconequiposoxhlet.pdf>>

OLMOS DANIA, GONZALEZ JAVIER. Microscopía de fuerza atómica. Modos básicos de operación. 2008-2009. Universidad Carlos III de Madrid. Madrid. p 9.

PAREDES, Juan. EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN CUALITATIVA DE COMPONENTES QUÍMICOS EN EL CUERPO FRUCTÍFERO DE *Pholiota nameko* Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA. Trabajo de Grado (Químico Farmacéutico). Instituto de Química. Facultad de Microbiología. 2010. pg 10-13.

PEREZ, Jhony Leonardo, QUITIAN, Lilian Andrea. Evaluación de métodos de extracción de saponinas de los residuos del beneficio del fique. Trabajo de grado de Ingenieros Químicos. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. 2009. p. 43

PERRICONE, Nicolas. La promesa de la eterna juventud. Traducido por Carme Gerones y Carletz Urrits. Alternativas Robin Book. p. 158

PROTOCOLO DE HONGOS. Protocolo para la recolecta, descripción, identificación y mantenimiento de hongos. <http://www.inbio.ac.cr/web_herbarios/web/pdf/protocolo-hongos.pdf> [citado en 16 de abril de 2016]

RUTHES, Andres.RIVEIRO,Fernanda.IACOMINI, Marcello.D-glucans from edible mushrooms:A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches.2014. p.754

SALAZAR PEREZ,Luis Eduardo: "Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para producción de biodiesel. Piura, Enero de 2012.Trabajo de Grado (Ingeniero Industrial y de sistemas).Universidad de Piura. Facultad de Ingeniería.

SUAREZ, Ruben.DOMINGUEZ, GLoria.TELLO, Isaac.GONZALEZ, Jose. Ganoderma lucidum Extract as Corrosion Inhibitor for Carbon Steel in H2SO4.Chemical Science Review and Letters.(Noviembre,2014).p.426. ISSN 2278-6783

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA.Análisis de espectros de la región del IR [En línea] <http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401539/exe2%20de%20agosto/leccin_10_analisis_de_espectros_de_la_region_del_IR.html> [Citado en 5 de abril de 2016]

WANG,Xiaohua.Thermally Induced Conformation Trnsition of Triple-Helical Lentinan in NaCl Aqueous Solution. En: Revista universidad de Wang. Mayo 2008. p.10350

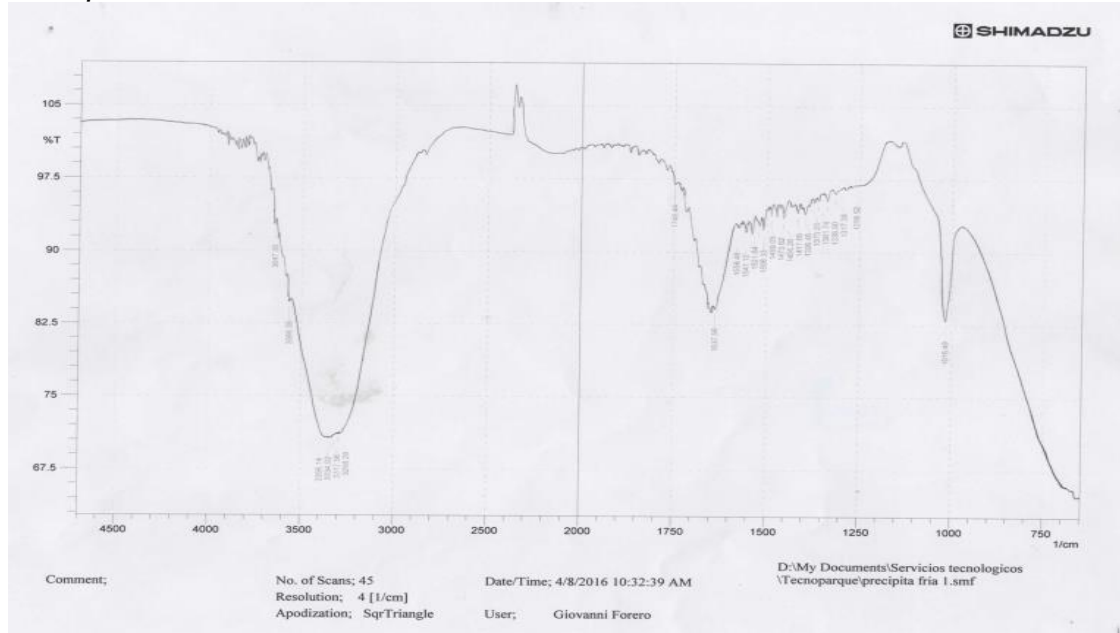
YAMARAIKO,Yuri.La Ganoderma en la salud de hoy. Asociación contra el cáncer de mama.Vol.1.pg.23

ZHANGA,Jianju.MENGB,Gyajunyan.ZHAIC,Guyion.YANGD,Yongheng.ZHAOA,Hu ajie.JIA,Le.Extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides of spent mushroom compost of Ganoderma lucidum.International Journal of Biological Macromolecules.Vol 82. pg.437

ANEXOS

ANEXO A. ESPECTROS INFRARROJOS

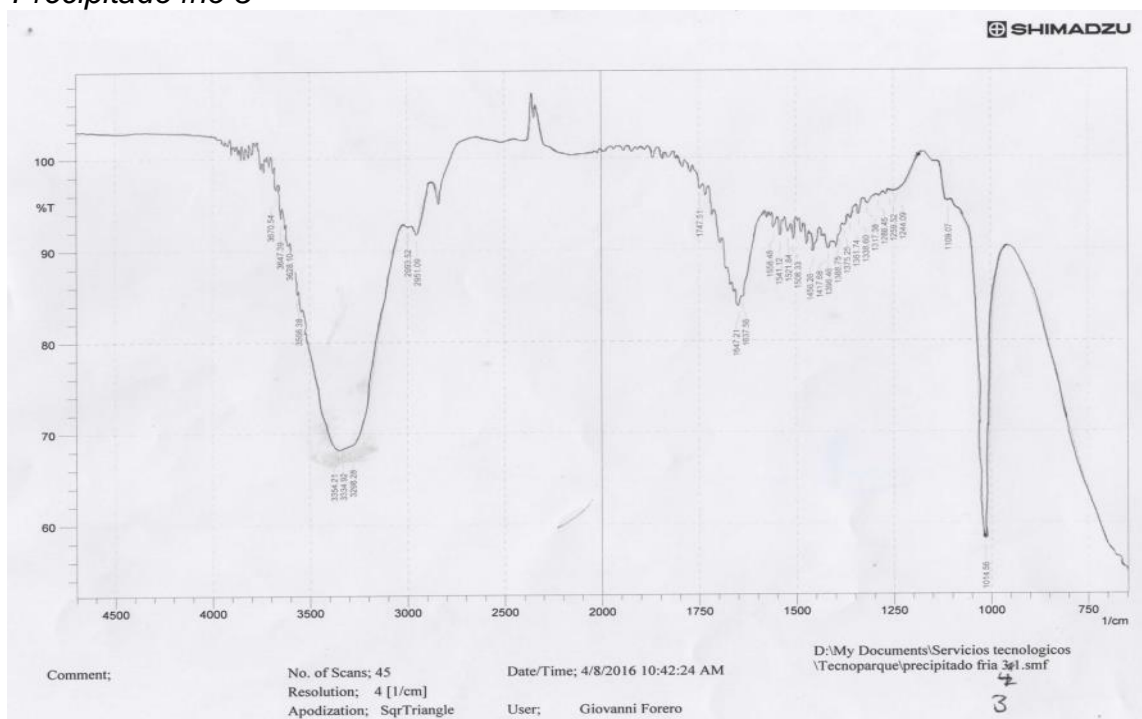
Precipitado frio 1



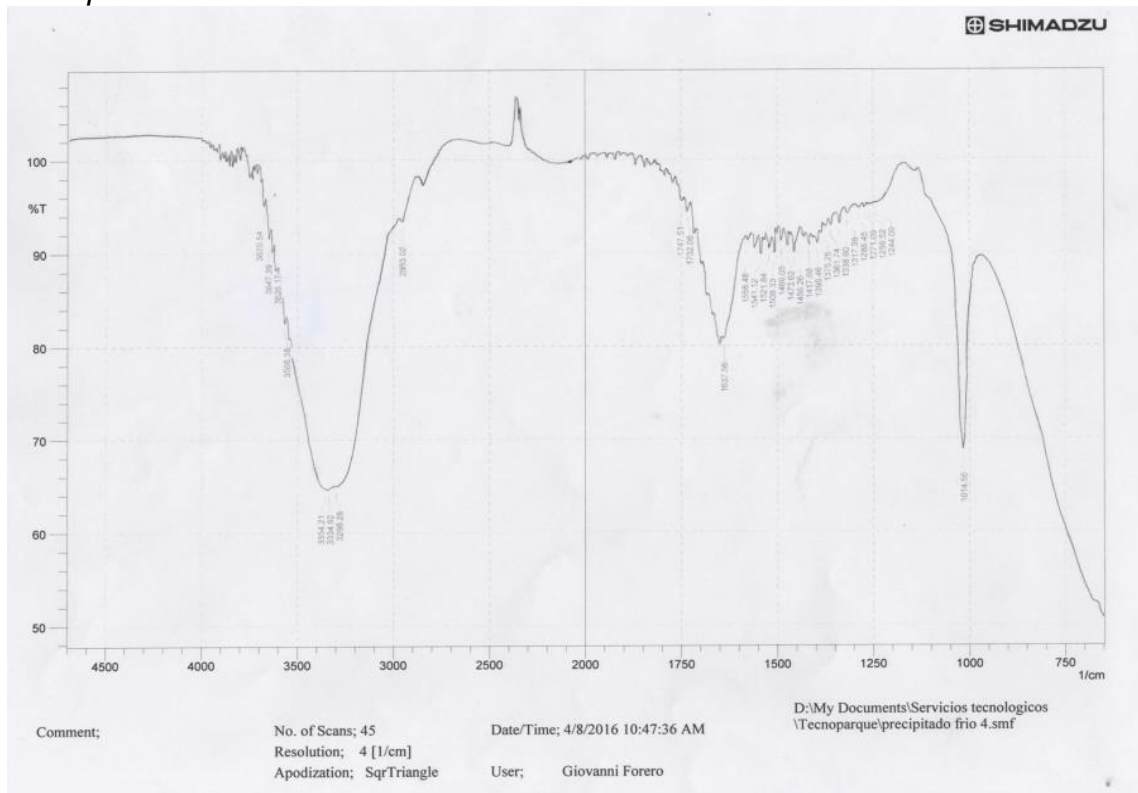
Alcalina 2



Precipitado frio 3

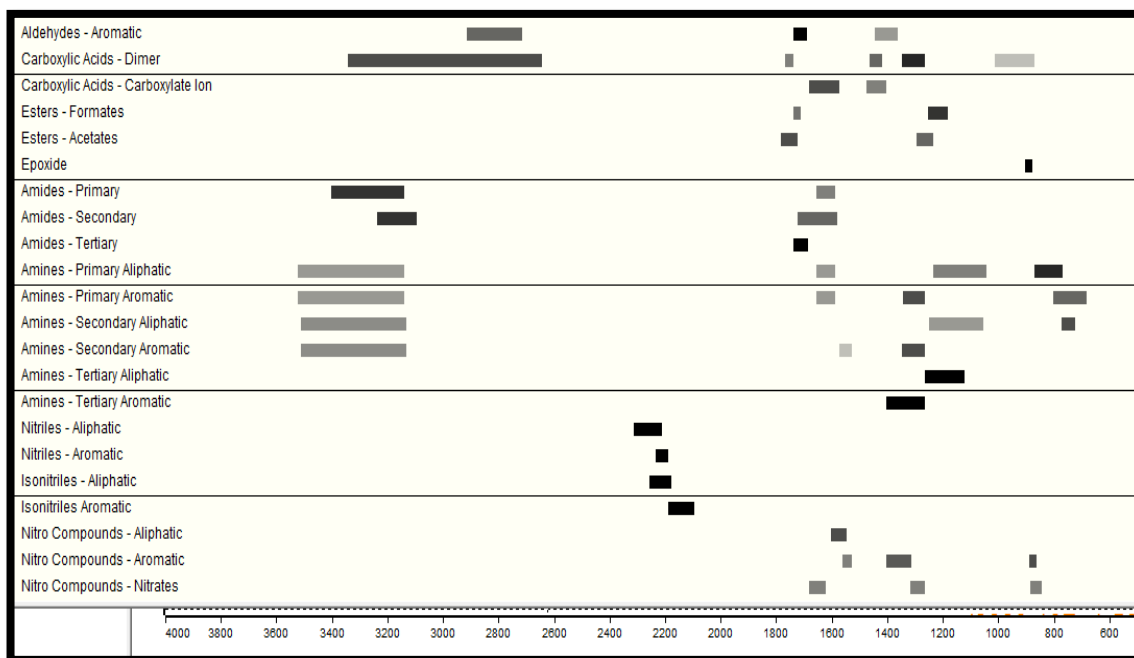
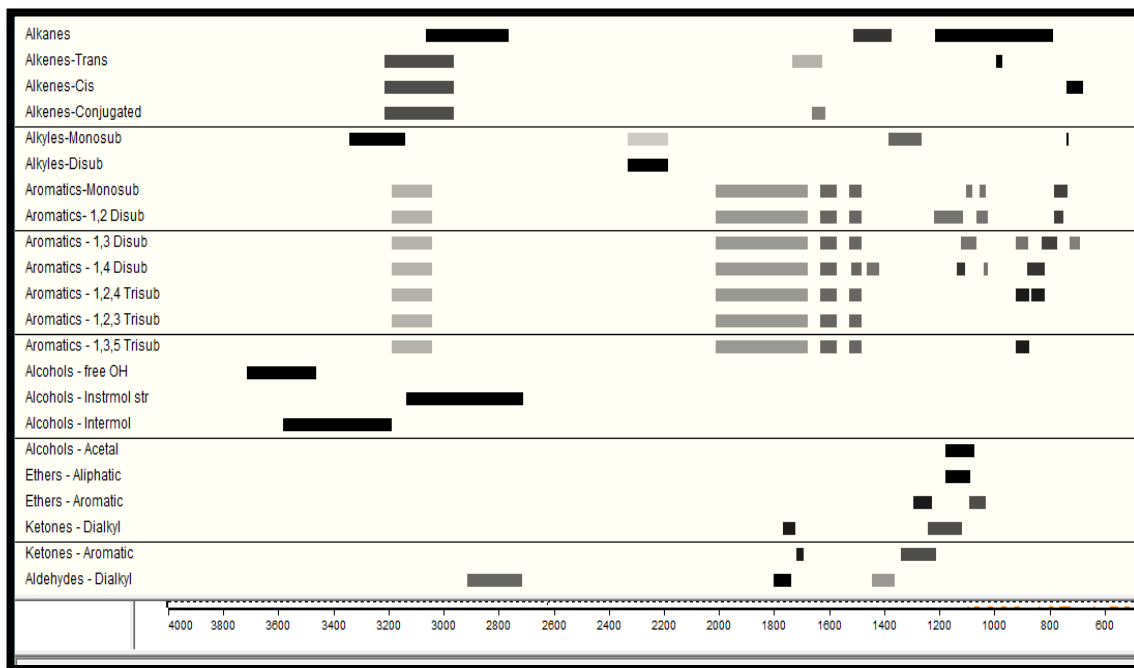


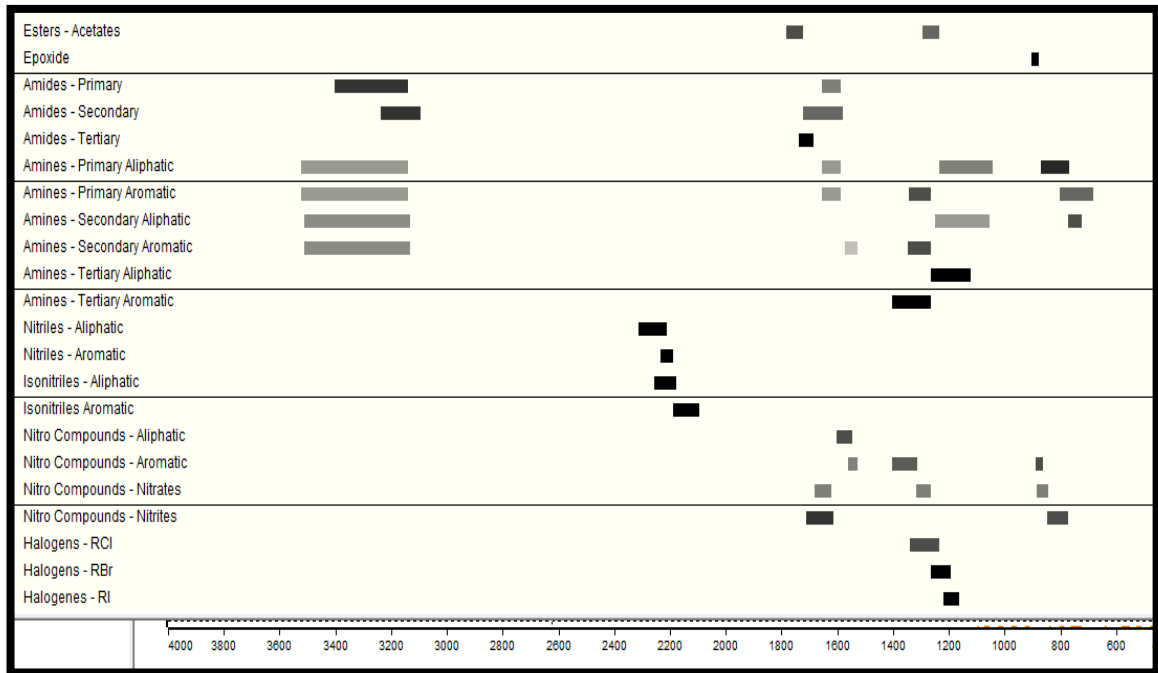
Precipitado frio 4



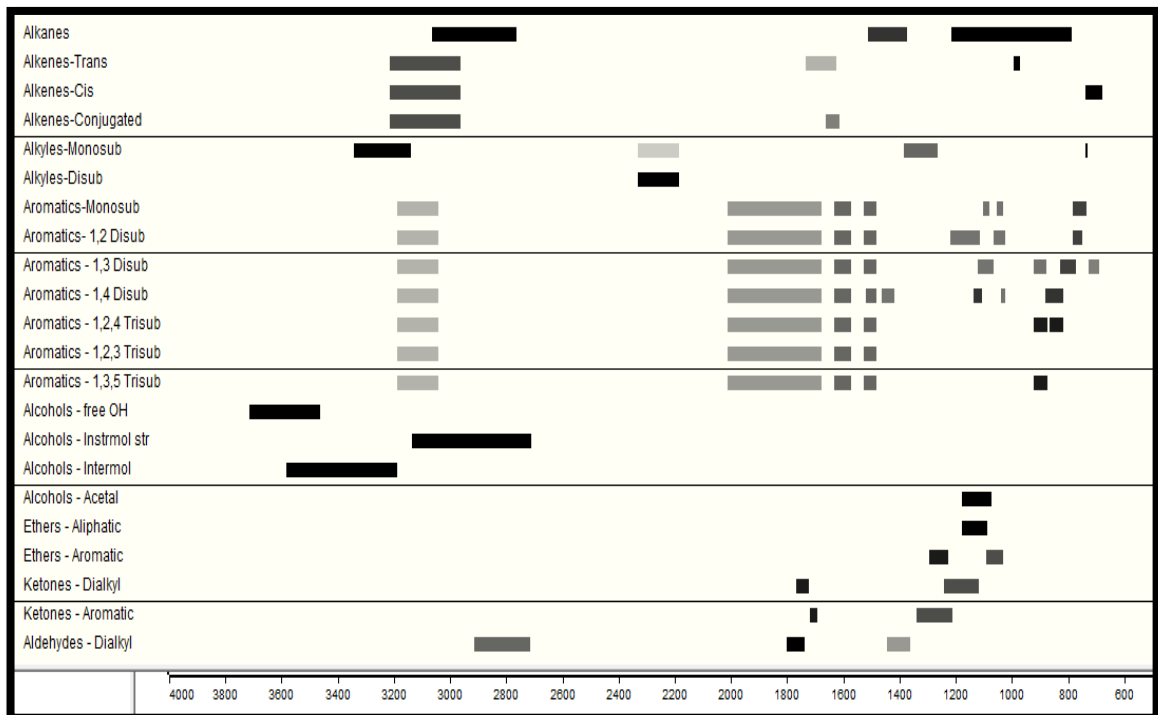
ANEXO B. BANDAS INFRARROJAS DE SUSTANCIAS

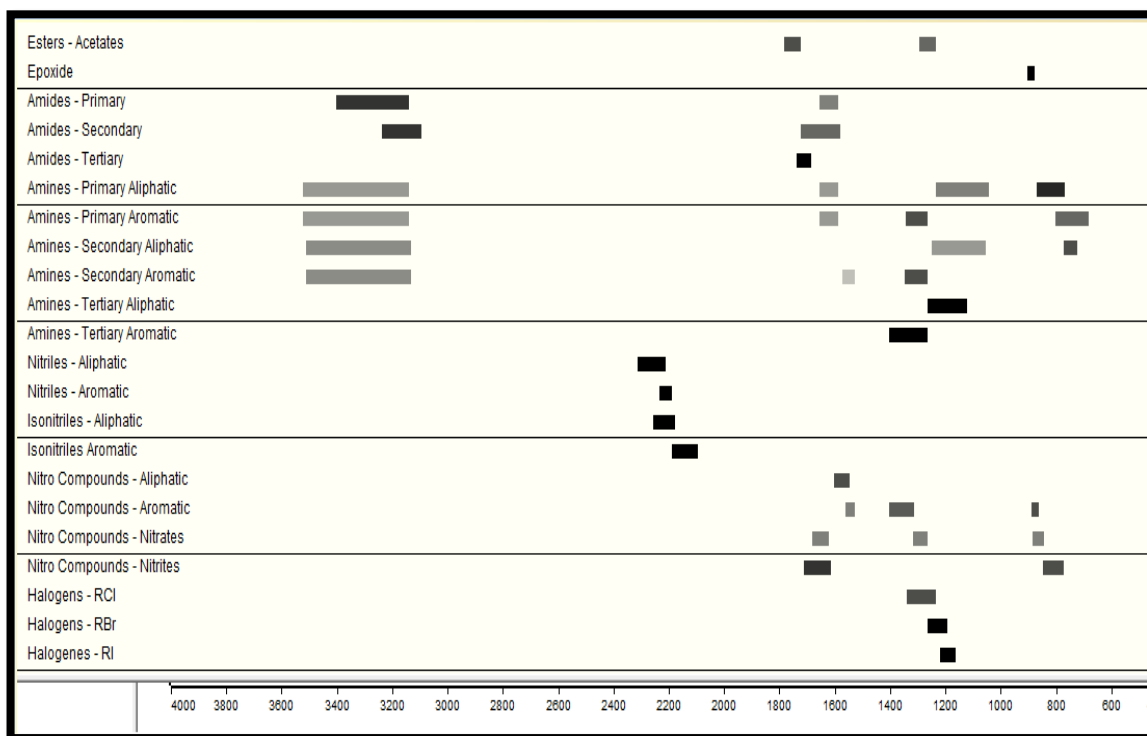
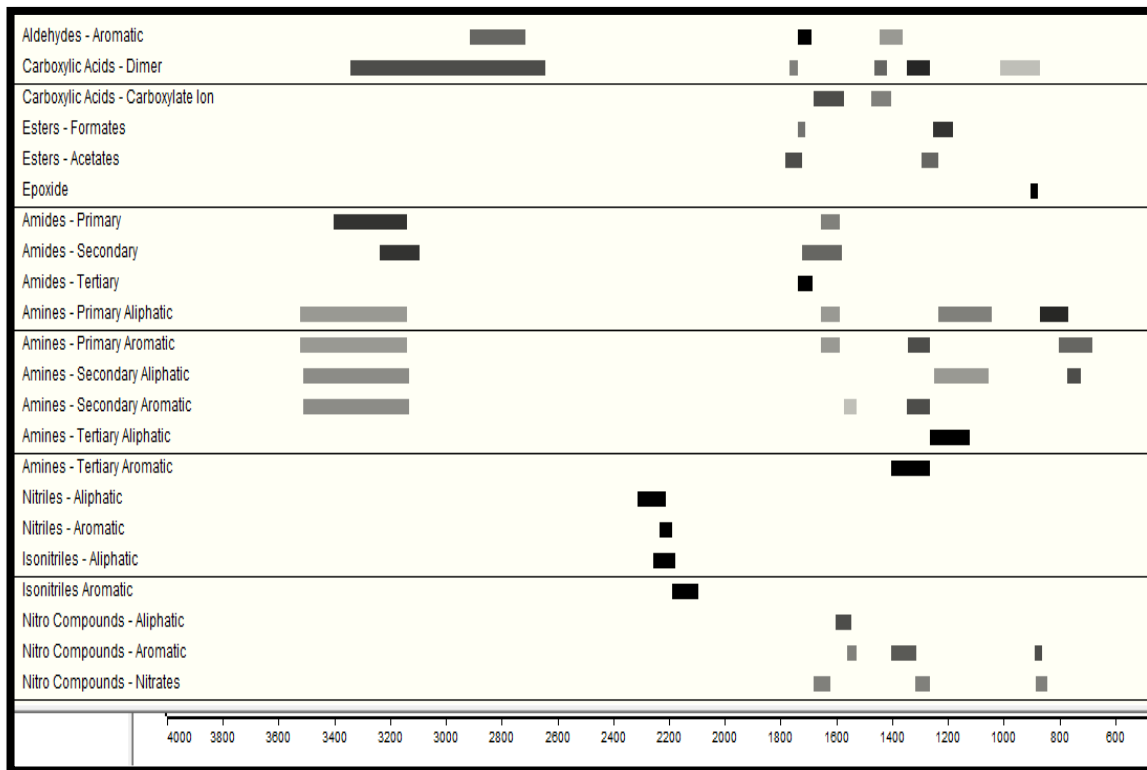
Primera muestra SOXHLET con 4 repeticiones





Segunda muestra SOXHLET con 4 repeticiones





Tercera muestra SOXHLET con 4 repeticiones

