



**Universidad Michoacana
de San Nicolás de Hidalgo**



División de estudios de posgrado
Facultad de Ingeniería en Tecnología
de la Madera

**Bioplástico por biodesarrollo micelial de *Pleurotus ostreatus* en
sustratos de residuos lignocelulósicos de encino
(*Quercus castanea neé*) y olote de maíz (*Zea mayz*)**

Tesis presentada por:
Diana Stephanie Ocegueda Vega

Como requisito parcial para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias en Tecnología de la Madera

Directora de tesis: Dra. Nelly Flores Ramírez

Co-director de tesis: Dr. Salomón Ramiro Vázquez García

Morelia, Michoacán, diciembre 2021

RESUMEN

El plástico es un material que en la actualidad forma parte de nuestro modo de vida, no obstante, la producción y el consumo en exceso, sin prever opciones para el descarte apropiado está causando grandes impactos ambientales. Una alternativa para minimizar este problema, es el uso de los bioplásticos, los cuales se degradan en el medio ambiente mucho más rápido, debido a que son elaborados a partir de biomoléculas. Los polisacáridos son biomoléculas que constituyen los micelios de los hongos, estos a su vez utilizan compuestos lignocelulósicos para su crecimiento. Los bioplásticos elaborados a partir de biomasa de micelio/residuos lignocelulósicos son materiales biodegradables que provienen de recursos naturales y pueden presentar propiedades similares a los plásticos tradicionales. En la presente investigación se obtiene un bioplástico moldeable y sustentable, generado de una biomasa formada a partir de micelio de *Pleurotus ostreatus* evaluando para su desarrollo los sustratos de residuos lignocelulósicos forestales aserrín y astilla de encino de la especie *castanea neé* incorporando olores de maíz como residuo agrícola. La caracterización morfológica se llevó a cabo por microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido, realizando un análisis estructural por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier. Además, se evaluó el potencial de producción de los bioplásticos mediante la eficiencia biológica y la pérdida de materia orgánica ocasionada por el hongo. Llevándose a cabo a su vez dos caracterizaciones físicas: densidad y absorción de agua. De acuerdo a los análisis realizados hasta el momento los bioplásticos elaborados pueden presentar alternativas al ser utilizados en construcción no estructural, embalaje y amplio número de aplicaciones en arquitectura, decoración y fabricación de muebles debido a su fácil moldeo.

Palabras clave: biodegradabilidad, residuos agroforestales, hifas, morfología, hongos.

ABSTRACT

Plastic is a material that is currently part of our way of life, however, excessive production and consumption without foreseeing options for proper disposal is causing great environmental impacts. An alternative to minimize this problem is the use of bioplastics, which degrade in the environment much faster, because they are made from biomolecules. Polysaccharides are biomolecules that constitute the mycelium of fungi, these in turn use lignocellulosic compounds for their growth. Bioplastics made from mycelium biomass / lignocellulosic residues are biodegradable materials that come from natural resources and can present similar properties to traditional plastics. In the present research, a moldable and sustainable bioplastic is obtained, generated from a biomass formed from *Pleurotus ostreatus* mycelium, evaluating for its development the substrates of lignocellulosic forest residues, sawdust and oak chips of the *castanea neé* species, incorporating corn cobs as agricultural residue. The morphological characterization was carried out by optical microscopy, scanning electron microscopy, performing a structural analysis by Fourier transform infrared spectroscopy. In addition, the production potential of bioplastics was evaluated through biology efficiency and loss of organic matter caused by the fungus. In turn, two physical characterizations are carried out: density and water absorption. According to the analyzes carried out so far, the bioplastics produced can present alternatives when used in non-structural construction, packaging and a wide number of applications in architecture, decoration and furniture manufacturing due to their easy molding.

Keywords: biodegradability, agroforestry residues, hyphae, morphology, fungi.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con gran amor y satisfacción a mi familia y a cada uno de mis seres queridos, por el apoyo incondicional y por impulsarme a llegar tan alto como lo desee.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Javier Ocegueda García y Maricruz Vega Gonzales, a mi esposo Marco Antonio Vilchis García y a mi hija Jade Airin Vilchis Ocegueda por su apoyo incondicional e impulsarme a dar lo mejor de mí.

A mis directores de tesis Dra Nelly Flores Ramírez y Dr Salomón Ramiro Vázquez García gracias por su apoyo, las enseñanzas y por ser mi guía a lo largo del proyecto de investigación.

A los integrantes de mi mesa sinodal Dra Lada Domratcheva Lvova, Dr Héctor Eduardo Martínez Flores y al Dr Crisanto Velázquez Becerra gracias a cada uno de ustedes por sus apoyo, enseñanzas y aportaciones brindadas para el desarrollo y culminación del proyecto.

A mis amigos y compañeros por su apoyo y por enseñarme que en equipo se puede llegar más lejos.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, especialmente a la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la madera y a la Facultad de Ingeniería Química por los recursos e instalaciones prestadas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el recurso económico otorgado.

Diana Stephanie Ocegueda Vega.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I.....	1
1.1 Introducción	1
1.2 Justificación de la investigación	3
1.3 Hipótesis	4
1.4 Objetivos	5
1.4.1 Objetivo General.....	5
1.4.2 Objetivos Específicos	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Antecedentes	6
2.2 Generalidades.....	8
2.2.1 Bioplásticos.....	8
2.2.2 Hongos	11
2.2.3 Residuos agroforestales	13
2.2.4 Métodos de caracterización	14
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	18
3.1 Tipo de sustrato seleccionado	18
3.2 Tipo de hongo seleccionado	19
3.3 Cuadro metodológico.....	19
3.4 Material	20
3.5 Caracterización química de los sustratos	21
3.5.1 Sustancias extraíbles	21
3.5.2 Sustancias inorgánicas o cenizas	22
3.5.3 Holocelulosa	22
3.5.3 Lignina	23
3.5.4 Celulosa	24
3.6 Desarrollo de los bioplásticos	24
3.6.1 Formación de tratamientos	25

3.6.2 Preparación de los sustratos.....	25
3.6.3 Hidratación por medio de álcalis	26
3.6.4 Pasteurización de los sustratos por inmersión en agua caliente.....	26
3.6.5 Siembra, incubación e inhibición del hongo.....	26
3.7 Examinación de endo-crecimiento micelial por medio de análisis morfológico	28
3.7.1 Análisis morfológico por microscopía óptica (MO).....	28
3.7.2 Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	29
3.8 Identificación de los grupos funcionales.....	29
3.9 Análisis del potencial de producción del bioplástico micelial por medio de la eficiencia biológica (EB) y pérdida de materia orgánica (PMO)	30
3.10 Caracterización física.....	30
3.10.1 Densidad	30
3.10.2 Absorción de agua	31
3.11 Diseño experimental	31
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1 Bioplásticos obtenidos	32
4.2 Caracterización química de la materia prima.....	33
4.3 Análisis morfológico por MO.....	34
4.3.1 Tratamientos control	34
4.3.2 Tratamientos inoculados con <i>P. ostreatus</i>	35
4.4 Análisis morfológico por SEM.....	36
4.4.1 Tratamientos control	36
4.4.2 Tratamientos inoculados con micelio colonizados durante 15 días.....	38
4.4.3 Tratamientos inoculados con micelio colonizados durante 30 días.....	39
4.5 Composición química mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	41
4.6 Potencial de producción del bioplástico micelial.....	47
4.6.1 Análisis de EB	47

4.6.2 Análisis de PMO.....	48
4.7 Caracterización física.....	50
4.7.1 Densidad	50
4.7.2 Absorción de agua	51
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	53
5.1 Conclusiones particulares	53
5.2 Conclusión general	53
5.3 Perspectiva	54
PROPUESTAS.....	55
BIBLIOGRAFÍA	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Longitud de onda de distintos rangos de IR.	15
Tabla 3.1. Formación de tratamientos.....	25
Tabla 3.2. Tamaño de partícula de los sustratos.	25
Tabla 4.1. Composición química del olote y encino.....	34
Tabla 4.2. Frecuencias FTIR de los grupos funcionales presentes en el T1.....	42
Tabla 4.3. Frecuencias FTIR de los grupos funcionales presentes en el T2.....	43
Tabla 4.4. Frecuencias FTIR de los grupos funcionales presentes en el T3.....	45
Tabla 4.5. Frecuencias FTIR de los grupos funcionales presentes en el T4.....	46
Tabla 4.6. Análisis de varianza para la EB con una $\alpha=0.05$	47
Tabla 4.7. Comparación de medias prueba de Tukey con 0.05 de significancia.....	48
Tabla 4.8. Análisis de varianza para la PMO con una $\alpha=0.05$	49
Tabla 4.9. Comparación de medias prueba de Tukey con 0.05 de significancia.....	49
Tabla 4.10. Análisis de Varianza de densidad con una $\alpha=0.05$	50
Tabla 4.11. Comparación de medias prueba de Tukey con 0.05 de significancia.....	50
Tabla 4.12. Análisis de Varianza para la absorción de agua con una $\alpha=0.05$	51
Tabla 4.13. Comparación de medias prueba de Tukey con 0.05 de significancia.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Clasificación de bioplásticos.....	9
Figura 2.2. Usos de los bioplásticos de micelio en la industria (Jones et al., 2020).	10
Figura 2.3. Constitución del hongo. Elaboración propia.....	11
Figura 2.4. Esquema de la pared celular fúngica (Khalaf, 2004)	12
Figura 2.5. Estructura química de la quitina (Alzate & Arias, 2002).....	12
Figura 2.6. Hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> . Elaboración propia.	13
Figura 3.1. Residuos de un taller en Ocampo Michoacán: a) astilla de encino en copiadora de cabo, b) aserrín de encino en recortadora de raja, cuadro y cabo.	18
Figura 3.2. Cultivo de maíz de la comunidad de Los Pilares Michoacán: a) siembra, b) olotes.....	18
Figura 3.3. Cuadro metodológico.	19
Figura 3.4. Extracciones solido-liquido en equipos soxhleth.....	22
Figura 3.5. Calcinación de las muestras en placa de calentamiento para la determinación de cenizas.	22
Figura 3.6. Baño maría de las muestras para la determinación de holocelulosa.	23
Figura 3.7. Sistema de reflujo para la determinación de lignina.	24
Figura 3.8. Pasteurización de sustratos en tanque de calentamiento presurizado.	26
Figura 3.9. Tratamientos en incubación día 10 a) aserrín-micelio, b) aserrín-olote-micelio, c) astilla-micelio, d) astilla-olote-micelio.....	27
Figura 3.10. Remoción de sustrato y cambio de molde.....	27
Figura 3.11. a) desarrollo de biomasa de micelio en bolsas, b) inhibición del hongo y eliminación de exceso de humedad.	28
Figura 3.12. Estereoscopio Rossbach Kyowa No. 805570.....	29
Figura 3.13. Equipo de SEM JEOL JSM 6400.	29
Figura 3.14. Equipo FTIR Perkin Elmer Spectrum 400.....	30
Figura 3.15. Inmersión de los bioplásticos en recipientes con agua destilada.	31
Figura 4.1. Bioplásticos obtenidos de los diferentes tratamientos colonizados con <i>P. ostreatus</i> . T1: astillas-micelio, T2: astillas/olote-micelio, T3: aserrín-micelio, T4: aserrín/olote-micelio.....	32

Figura 4.2. Tratamientos control sin colonización de los diferentes sustratos. T1: astilla, T2: astilla/olote, T3: aserrín, T4: aserrín/olote.	33
Figura 4.3. Imágenes topográficas realizadas en microscopia óptica a 80x de los tratamientos control. T1: astillas, T2: astillas-olote, T3: aserrín, T4: aserrín-olote.	35
Figura 4.4. Imágenes topográficas realizadas en microscopía óptica a los 15 y 30 días de desarrollo de biomasa micelial de <i>P. ostreatus</i> en sustratos de T1: astillas, T2: astillas-olote, T3: aserrín, T4: aserrín-olote.	36
Figura 4.5. Micrografías de los tratamientos control T1 y T2 (astillas y astillas/olote). a ₁ : astillas 500X, a ₂ : astillas 1000X, a ₃ : astillas 2500X, b ₁ : astillas/olote 500X, b ₂ : astillas/olote 1000X, b ₃ : astillas/olote 2500X..	37
Figura 4.6. Micrografías de los tratamientos control T3 y T4 (aserrín, aserrín/olote). a ₁ : aserrín 500x, a ₂ : aserrín 1000x, a ₃ : aserrín 2500x, b ₁ : aserrín/olote 500x, b ₂ : aserrín/olote 1000x, b ₃ : aserrín/olote 2500x. Las flechas muestran R: radios y EV: elementos de vaso.	37
Figura 4.7. Micrografías SEM de hifas de <i>P. ostreatus</i> colonizadas durante 15 días en los sustratos de T1 Y T2 (astillas y astillas/olote). a ₁ : astillas 500x, a ₂ : astillas 1000x, a ₃ : astillas 2500x, b ₁ : astillas/olote 500x, b ₂ : astillas/olote 1000x, b ₃ : astillas/olote 2500.	38
Figura 4.8. Micrografías SEM de hifas de <i>P. ostreatus</i> colonizadas durante 15 días en los sustratos de T3 y T4 (aserrín y aserrín/olote). a ₁ : aserrín 500x, a ₂ : aserrín 1000x, a ₃ : aserrín 2500x, b ₁ : aserrín/olote 500X, b ₂ : aserrín/olote 1000x, b ₃ : aserrín/olote 2500.	39
Figura 4.9. Micrografías SEM de hifas de <i>P. ostreatus</i> colonizadas durante 30 días en los sustratos de T1 y T2. a ₁ : astillas 500x, a ₂ : astillas 1000x, a ₃ : astillas 2500x, b ₁ : astillas/olote 500x, b ₂ : astillas/olote 1000x, b ₃ : astillas/olote 2500x.	40
Figura 4.10. Micrografías SEM de hifas de <i>P. ostreatus</i> colonizadas durante 30 días en los sustratos de T3 y T4. a ₁ : aserrín 500x, a ₂ : aserrín 1000x, a ₃ : aserrín 2500x, b ₁ : aserrín/olote 500x, b ₂ : aserrín/olote 1000x, b ₃ : aserrín/olote 2500x..	40
Figura 4.11. Espectros de FTIR de control y bioplástico del T1.	42
Figura 4.12. Espectros de FTIR de control y bioplástico del T2.	43
Figura 4.13. Espectros de FTIR de control y bioplástico del T3.	44
Figura 4.14. Espectros de FTIR de control y bioplástico del T4.	46

NOMENCLATURA

La nomenclatura utilizada más importante se muestra a continuación:

SEM	Microscopia electrónica de barrido
MO	Microscopia óptica
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
C.H	Contenido de humedad
EB	Eficiencia biológica
PMO	Pérdida de materia orgánica
T1	Tratamiento 1
T2	Tratamiento 2
T3	Tratamiento 3
T4	Tratamiento 4
T	Temperatura
Hr	Humedad relativa
°C	Grados centígrados
g	Gramos
Kg	Kilogramos
%	Por ciento

CAPÍTULO I

1.1 Introducción

La presente investigación surge del interés de desarrollo de nuevos materiales (bioplásticos) respetuosos con el medio ambiente, a partir de microorganismos biológicos como los hongos y la reutilización de residuos originados por la industria agroforestal como sustratos para su desarrollo.

El reino fungí consta de una extensa gama de especies con morfologías y propiedades muy variables (Byung-Keun et al., 2007, García & Benítez 2017). La especie *Pleurotus ostreatus* es un hongo saprofito que se alimenta de materia orgánica descomposición, conformado por micelio, siendo este, su parte vegetativa más importante que a su vez está constituido por una red de células filamentosas interconectadas llamadas hifas (Reyes, 2017). El micelio de esta especie de hongo, tiene la capacidad de crecer en materia orgánica en descomposición con un alto contenido en carbohidratos estructurales como la celulosa y hemicelulosa, utilizándolos como fuente de nutrientes (Colmenares et al., 2018). El aporte ecológico de este hongo, así como el de otros microorganismos, es trascendental para evitar la acumulación de materia orgánica en el ecosistema y, en consecuencia, sus nutrientes no podrían ser absorbidos (Byung-Keun et al., 2007, Ha-Thi et al., 2015).

La capacidad del *P. ostreatus* para colonizar y entrelazar residuos lignocelulósicos agroforestales ha sido explorada, con el fin de conformar bioplásticos compuestos entre micelio-materia orgánica (Colmenares et al., 2018). Estos biomateriales tienen características atractivas, debido a su facilidad de ser moldeados de manera programada para diversas aplicaciones, como el embalaje, decoración, construcción, fabricación de muebles entre otros. Estos materiales además de ser biodegradables, son compostables y se degradan de forma natural en la intemperie dejando sus nutrientes generando un ciclo ecológico (Huynh, 2017). Son sostenibles, ya que se desarrollan a partir de fuentes económicas de residuo creciendo rápidamente sin altos consumos de energía, con altos rendimientos en un proceso de elaboración simple (Byung-Keun et al., 2007). Dependiendo de los parámetros de crecimiento, el producto final adquiere buenas propiedades físico-mecánicas que están relacionadas con la composición de la pared celular de los hongos, siendo su principal componente la quitina, el cual es el segundo polisacárido

más abundante en la naturaleza, con resistencia mayor que muchos materiales sintéticos debido al enlace de hidrógeno a lo largo de las cadenas que les dan rigidez (Byung-Keun et al., 2007). El micelio formado por este polisacárido funge como matriz otorgando a los bioplásticos adhesión, plasticidad y resistencia (García & Benítez, 2017).

Por otra parte, la utilización de los sustratos de origen agroforestal ayuda al aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos generados en grandes cantidades dándoles un valor agregado, como el bagazo de agave, rastrojo y olote de maíz, paja de trigo, avena, sorgo, aserrín, astilla entre otros (Jackson, 2018). Residuos provenientes de aserraderos, plantas de celulosa, plantas y talleres de transformación física de la madera y al momento de la cosecha en el caso de los residuos agrícolas (Peña & Acuña, 2015).

Por todo lo anterior, el desarrollo de micelio de la especie *P. ostreatus* sobre sustratos lignocelulósicos, presentes en residuos agroforestales, son una alternativa para la obtención de bioplásticos a base de quitina, con la posibilidad de ser moldeados, de bajo costo y tiempo de obtención, además de ser amigables con el medio ambiente a diferencia de los plásticos convencionales.

1.2 Justificación de la investigación

La mayor parte del plástico que se produce hoy en día se utiliza en envases de un solo uso, que se desechan inmediatamente una vez que han cumplido su propósito, generando inevitables contaminaciones que se degradan a largo plazo, contrario a los plásticos elaborados por polímeros biodegradables. Debido a esta problemática se ha propuesto crear un bioplástico a partir de materiales orgánicos que tengan un aporte ecológico, se desintegren fácilmente en la intemperie y no sea dañino para el medio ambiente.

Polisacáridos y proteínas forman parte de la pared celular de los hongos como el *P. ostreatus*, este a su vez se alimenta de residuos lignocelulósicos agrícolas y/o forestales en descomposición, dando como resultado una biomasa no tóxica con la facilidad de ser moldeada conformando un bioplástico y fungiendo como matriz otorgando buenas propiedades físico-mecánicas.

Por otra parte, los residuos de madera de encino de la especie *castanea* que se encuentran comúnmente en plantas de transformación física de la madera, como aserraderos, talleres de cabo, carpinterías, etc. así como el olote obtenido de la cosecha del maíz, se generan en grandes cantidades, la mayoría de ellos sin un uso adicional. Ambos compuestos lignocelulósicos son una fuente rica en carbohidratos, que son ideales como sustrato en la siembra de micelio, además de funcionar como material de auto-ensamblaje.

Por lo que la obtención de bioplásticos a partir del uso de residuos lignocelulósicos y el desarrollo de micelio fúngico, conllevan un proceso de obtención simple en cortos periodos de tiempo, ya que los hongos son de crecimiento rápido, en costos bajos, no se requiere altos consumos de energía asíéndolo sostenible, sin la necesidad de aditivos químicos ni maquinaria pesada.

1.3 Hipótesis

Bioplásticos moldeables y con buenas propiedades físicas (densidad y absorción de agua) son obtenidos a partir del micelio de *Pleurotus ostreatus*, desarrollados en sustratos de residuos lignocelulósicos de encino y olote.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Evaluar el desarrollo y características de un bioplástico, mediante el análisis de crecimiento de biomasa micelial de *Pleurotus ostreatus* en residuos lignocelulósicos de encino (*Q. castanea*) y olote (*Z. Mays*), para la obtención de artículos moldeables.

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la composición de la madera de encino de la especie *castanea* y olotes de maíz, a través de un análisis elemental y establecer el aporte benéfico para el desarrollo micelial.
2. Identificar las relaciones de crecimiento y morfología micelial por medio de la examinación del endo-crecimiento de biomasa a través de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido por extracción másica.
3. Conocer la composición química de los bioplásticos por la identificación de los grupos funcionales a través de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.
4. Conocer el potencial de producción del bioplástico micelial por medio de la determinación de la eficiencia biológica y pérdida de materia orgánica, así como las características físicas de densidad y absorción de agua.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Se han realizado trabajos de obtención de biomateriales, a partir de micelio de hongos y sustratos de residuo agrícola y forestal como materia prima, algunos de estos trabajos se citan a continuación:

Rodríguez (2018) creó un material biobasado compuesto por micelio de hongos descomponedores de madera *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*, utilizando como sustratos residuos agroindustriales como rastrojos de alfalfa y cáscaras de nuez, una vez que son sembrados, los hongos tardan de 5 a 8 días en colonizar, después se cambia de molde y se deja incubarse nuevamente en un lapso de 8 a 10 días obteniendo un material con buenas características mecánicas.

Colmenares et al., (2018) realizaron un material ecológico con fines de embalaje a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* y residuos orgánicos agroindustriales como: pasto seco, bagazo de caña, aserrín y cáscarilla de café utilizándolos solos y en mezcla. Se esterilizaron, e inocularon con micelio de hongo crecido en sorgo y se incubaron durante 18 días en moldes. Los biomateriales obtenidos se sometieron a pruebas físicas y mecánicas donde alcanzaron una deformación del 40% sin quebrarse, el esfuerzo aplicado varió entre 60 y 810 Kpa, sin embargo, absorbieron un gran porcentaje de humedad en comparación con los materiales sintéticos encontrando que el tamaño de molienda para la conformación del material es un factor influyente en la resistencia y absorción de agua.

Por otra parte, Houette et al., (2020) desarrollaron fachadas miceliadas utilizando el hongo *P. ostreatus* en sustratos de rastrojo de maíz, cáñamo, cáscara de soja granulada, aserrín de roble rojo, yeso y grano de centeno inoculado, utilizados a diferentes proporciones e incubados durante 2 a 5 semanas a 21 °C en un ambiente adaptado para su desarrollo. Los paneles finales fueron expuestos en un andamio exterior durante 7 meses, obteniendo que los paneles mostraban desintegración al estar en contacto con el aire después de 5 meses, formando grietas por las cuales se absorbía agua por capilaridad del medio ambiente aumentando su grosor y haciendo que los paneles no sean aptos para fachadas, debido a que las mismas deben ser duraderas y resistentes al estar en contacto con el exterior.

Gutiérrez et al., (2021) elaboraron un biomaterial obtenido a partir de micelio de hongo *Ganoderma lucidum* y los residuos agrícolas de cáscara de nuez y aserrín de roble como sustratos a diversas proporciones, fueron llevados a incubación a un tiempo de 30 días, temperatura de 26°C y humedad relativa del 70 al 80%. El biomaterial obtenido presento un aspecto aterciopelado similar a una espuma. La prueba de compresión revelo una alta resistencia a 0.392 MPa con un porcentaje de deformación máximo de 26% y presento una densidad media de $0.511 \pm 0.169 \text{ g/cm}^3$, obteniendo que el biomaterial se encuentra dentro de los parámetros de espumas a base de micelio.

Fue generada una bioespuma a base de micelio como una alternativa a la espuma a base de polímero de petróleo utilizando los materiales lignocelulósicos de cáscara de arroz, aserrín, y bagazo de caña de azúcar utilizando el hongo *Pleurotus ostreatus*. Obtuvieron densidades de 1.07 g/cm^3 y detectaron los grupos funcionales de las proteínas y lípidos a 1633 cm^{-1} y 3280 cm^{-1} por FTIR, determinando que la naturaleza química de los sustratos de alimentación presento cambios en los espectros de los materiales. Obtuvieron que la bioespuma a base *P. ostreatus* y cáscarilla de arroz es una buena alternativa prometedora a la espuma polimérica (Nashiruddin et al., 2021).

2.2 Generalidades

2.2.1 Bioplásticos

Los bioplásticos son polímeros naturales, producidos a partir de fuentes renovables. Son biodegradables, compostables y a diferencia del plástico tradicional, liberan menor cantidad de dióxido de carbono a la atmósfera (Meza, 2016).

Los bioplásticos se utilizan como alternativa a los plásticos convencionales derivados de combustibles fósiles (Wagner, 2014). Existen dos tipos diferentes de bioplásticos los biopolímeros y plásticos biodegradables (Fernández, 2016; Meza, 2016; Wagner, 2014). La biodegradabilidad está unida a la estructura de la cadena del polímero, no depende del origen de las materias primas. Los criterios para designar plásticos, envases y embalajes se especifican mediante las normas EN 13432 (Europea), ASTM D6400 (Americana) e ISO 17088 (Internacional). Por lo tanto, en el mercado hay materiales provenientes de recursos fósiles que son biodegradables según las normas y polímeros compuestos de biomasa resistentes a la biodegradación (Fernández, 2016).

Los polímeros biodegradables se pueden clasificar a partir de su origen de la siguiente manera (Meza, 2016):

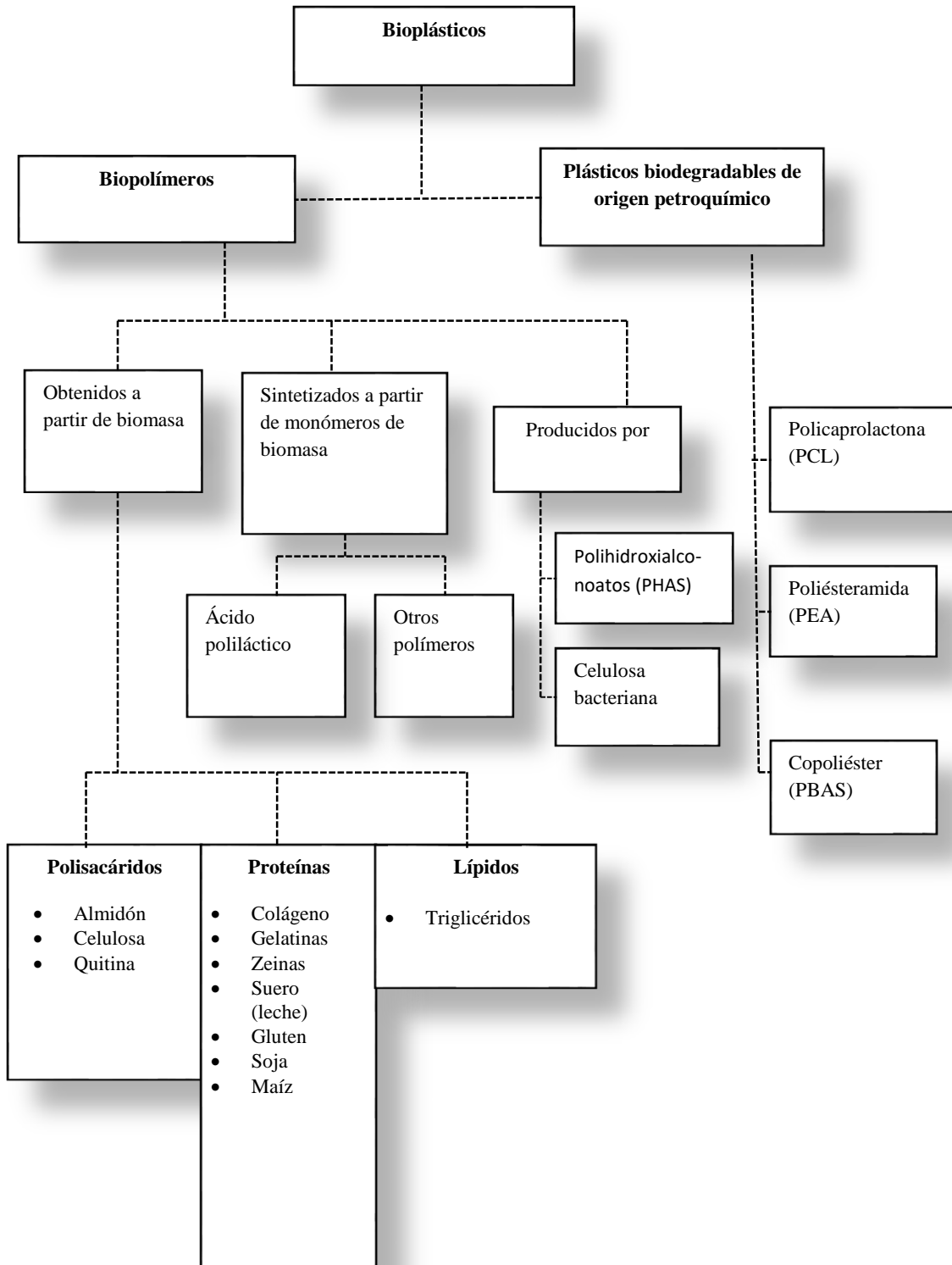


Figura 2.1. Clasificación de bioplásticos.

2.2.1.2 Bioplásticos a partir de micelio fúngico

Los bioplásticos a base de micelio fúngico, son el resultado del crecimiento de hongos en residuos naturales de materia orgánica lignocelulósica, que presentan propiedades similares a los plásticos tradicionales. Son materiales biodegradables, sustentables y sostenibles, con un proceso de biofabricación simple, además de presentar una baja huella de carbono debido a que no producen residuos contaminantes, tóxicos y emiten menos gases de efecto invernadero (Camere & Karana, 2018; Jones et al., 2017). El micelio une la materia orgánica a través de una red hifal de microfilamentos en un proceso biológico natural produciendo bioplásticos de bajo costo.

Existen diversos usos de los bioplásticos de micelio en la industria, algunos de ellos se muestran a continuación:



Figura 2.2. Usos de los bioplásticos de micelio en la industria (Jones et al., 2020).

2.2.2 Hongos

Los hongos son organismos eucariotas, libres de clorofila, productores de esporas y heterótrofos, es decir, requieren materia orgánica que utilizan como fuente de energía y carbono para la síntesis de estructuras celulares (López, 2014).

2.2.2.1 Micelio

Los hongos están constituidos por un micelio, uno de los organismos vivos más grandes de la Tierra, que crece por la expansión apical de la punta de una espora o un inóculo, tiene una estructura porosa ramificada y compuesta de células filamentosas tubulares conocidas como hifas (Figura 2.3). Estas células inician una ramificación aleatoria, formando colonias que se interconectan aleatoriamente mediante fusión hifal (anastomosis), con diámetros del orden de 1–30 micrómetros (Islam et al., 2017). Dependiendo de la especie y el entorno de crecimiento, alcanzan longitudes que varían desde micras hasta varios metros (Schmidt, 2006).

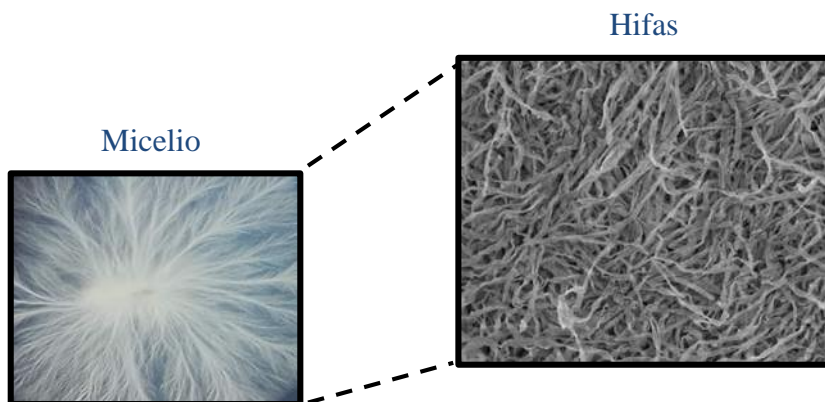


Figura 2.3. Constitución del hongo. Elaboración propia.

Las hifas son rodeadas por una pared celular rígida compuesta por una estructura con gran plasticidad que protege a la célula de estrés ambiental (Figura 2.4), compuesta en su mayor parte por quitina 25-30%, glucanos 29% y glicoproteínas 25-30% (Khalaf, 2004; Ponton, 2008; Schmidt, 2006). La función de la quitina es dar una delineada y gruesa conformación a la célula, así como conferir fuerza mecánica, se encuentra en la pared celular del micelio, esporas y tallo, la concentración de quitina depende de su fisiología y parámetros de crecimiento (Khalaf, 2004).

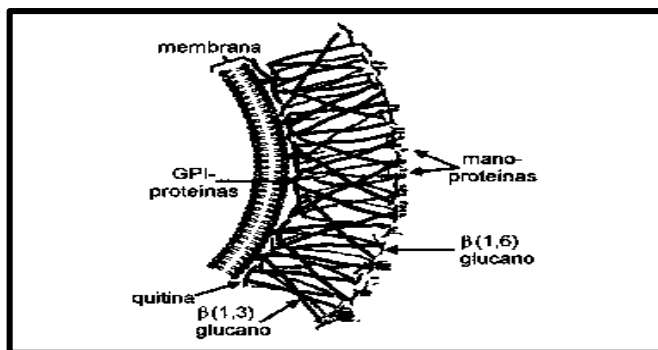


Figura 2.4. Esquema de la pared celular fúngica (Khalaf, 2004).

La quitina es un polisacárido, compuesto de unidades de N-acetilglucosamina (N-acetil-D-glucos-2-amina) unidas entre sí con enlaces β -1,4 (Figura 2.5) es altamente insoluble en agua y en solventes orgánicos debido a los enlaces hidrogeno que presenta la molécula. La quitina se vuelve soluble en ácidos minerales diluidos cuando pierde el acetilo del grupo acetilamino, convirtiéndose en quitosana (Zavala, 2010).

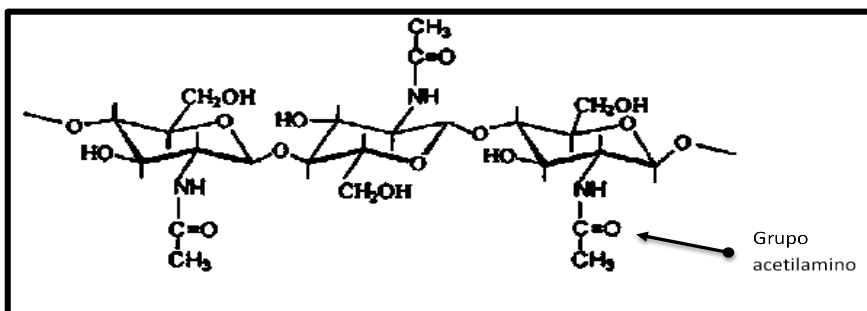


Figura 2.5. Estructura química de la quitina (Alzate & Arias, 2002).

2.2.2.2 *Pleurotus ostreatus*

El *P. ostreatus* es un hongo cuyo micelio forma cuerpos fructíferos en forma de sombrero bajo condiciones fisiológicas y ambientales específicas (Figura 2.6). Son muy populares debido a su habilidad de crecimiento en amplios rangos de temperatura y en una gran diversidad de sustratos orgánicos como residuos agrícolas, forestales, animales y vegetales. El *P. ostreatus* se caracteriza por alimentarse de materia orgánica en descomposición, la naturaleza moriría asfixiada si no existieran estos hongos ni las bacterias descomponedoras (Fuentes & C, 2020). Se desarrollan absorbiendo nutrientes que obtienen mediante la degradación de los biopolímeros lignocelulósicos de los sustratos, por acción de un complejo sistema de enzimas que liberan al sustrato donde se encuentran, entre las que destacan las hemicelulasas, celulasas como la β -

glucosidasas, exoglucanasas y endoglucanasas y enzimas degradadoras de lignina como Magnesio peroxidasa (Mnp), lacasas y Lignina peroxidasa (Lip) (Schmidt, 2006).



Figura 2.6. Hongo *Pleurotus ostreatus*. Elaboración propia.

2.2.3 Residuos agroforestales

En el sector agroforestal se generan toneladas de residuos anualmente como la astilla, aserrín, polvo, virutas, hojas, cortezas, olotes, rastrojos etc. Los cuales tienen bajo valor comercial y una mala disposición final, generalmente optan por quemar los residuos, arrojarlos a los basureros, quebradas y ríos, sin tener en cuenta la lenta degradación de estos materiales, lo que contribuye a la contaminación del entorno (Ntuli & Inocente, 2013; Luna et al., 2013). Los numerosos medios de eliminación, tienen impactos adversos en el medio ambiente, como los procesos térmicos que generan combustiones, produciendo emisiones gaseosas, así como la gestión de residuos de vertederos que producen malos olores ambientales, emisión de gases de efecto invernadero (CH_4 y CO_2) y contaminación de las aguas subterráneas y superficiales (Ntuli & Inocente, 2013).

2.2.3.1 Residuos agroforestales como sustratos de desarrollo de *P. ostreatus*

La materia prima sobre la cual se desarrollan los hongos se le llama sustrato, en el cual su naturaleza química está en relación con las necesidades de crecimiento del hongo. Además de la naturaleza química del sustrato están los factores físico-químicos, como el pH y factores ambientales, como la humedad, luz, temperatura y oxígeno (Díaz et al., 2019).

En los últimos años los principales países productores de madera y de rastrojos agrícolas han centrado su interés en la búsqueda de alternativas para la gestión y la utilización de los residuos derivados de las actividades agroforestales (Varner & Alvarez, 2010).

El cultivo de *P. ostreatus* se presenta como una opción para aprovechar los residuos lignocelulósicos agroforestales, agroindustriales y urbanos disponibles, por la abundancia de materia prima y alto contenido en fuentes de carbono como celulosa 40-61% y hemicelulosa 15-30% (García & Benitez, 2017). Así como por la relativa facilidad y versatilidad del manejo de las condiciones para su producción (García et al., 2011). En el mundo varios autores han evaluado el desarrollo y producción de *P. ostreatus* en diferentes sustratos, por lo que se han diversificado las técnicas de su cultivo, para esto se han utilizado una serie de residuos, como el bagazo de agave, rastrojo de maíz, trigo y aserrín en México, plantas y desperdicios de café en Colombia, bagazo de caña en Cuba, así como paja de arroz, avena, sorgo, algodón, virutas de madera, cortezas, residuos de la industria papelera, hojas de plátano, fibra de coco, entre otros por ser los más abundantes en su zona de cultivo, obteniendo eficiencias biológicas (EB) entre 45 y 138% (Díaz et al., 2019).

Resulta interesante explorar formas sostenibles y amigables con el medio ambiente para la eliminación de los residuos agroforestales, utilizándolos como sustratos promoviendo su uso innovador en el desarrollo de *P. ostreatus* para la producción de bioplásticos.

2.2.4 Métodos de caracterización

A continuación, se describen las técnicas usadas para la caracterización de los controles y de los bioplásticos.

2.2.4.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias inorgánicas y orgánicas, con lo que es posible realizar una identificación de los materiales. La espectroscopia IR es el método por el cual se estudia la absorción o emisión de energía radiante originada por la interacción entre la radiación electromagnética y el material en estudio. Basándose en que las moléculas tienen la posibilidad de rotar y vibrar a distintas frecuencias. Una molécula puede absorber la energía de fotones en el rango energético de IR, en el caso en que exista una diferencia en el momento bipolar de la molécula mientras ocurre un movimiento vibracional rotacional y cuando la frecuencia asociada con la radiación resuena con el movimiento vibracional. Los componentes de los enlaces químicos tienen movimientos

vibracionales con frecuencias naturales dentro del rango de frecuencias del infrarrojo como se muestran en la siguiente tabla (Pique & Vazquez, 2012).

Tabla 2.1. Longitud de onda de distintos rangos de IR.

Longitud de onda para distintos rangos en el infrarrojo	
Infrarrojo	cm^{-1}
IR Lejano	400 a 10
IR Medio	4000 a 400
IR Próximo	12.800 a 4000

En este tipo de espectrofotómetro se hace incidir todo el espectro de longitudes de onda sobre la muestra de forma que todas las frecuencias son detectadas simultáneamente.

2.2.4.2 Microscopia óptica (MO)

El microscopio óptico se ha utilizado como una herramienta fundamental para proporcionar imágenes aumentadas de objetos imperceptibles a simple vista. Una imagen óptica es una representación discreta de distribución de intensidades en una superficie hacia la cual se dirigen los rayos que derivan de un objeto iluminado tras interactuar con un sistema óptico. El resultado de la interacción de la luz con la muestra y su entorno es impreso en la imagen, ésta provee información sobre la estructura de la muestra como su morfología y distribución espacial (Guzmán, 2015).

Está construido con dos lentes que reflejan la imagen aumentándola para que se pueda ver todo mucho más de cerca el objetivo y el ocular. El objetivo recoge la luz que atraviesa la sección de tejido, mientras que el ocular es el que proyecta la imagen sobre la retina. El aumento total que permite un microscopio óptico se calcula multiplicando la magnificación que produce el objetivo por la que produce el ocular (Megias et al., 2019).

2.2.4.3 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscopy), es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado, lo hace utilizando un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen ampliada de la superficie de un objeto.

Para su funcionamiento utiliza un haz electrónico que atraviesa la columna y llega a la muestra, un generador de barrido el cual es el responsable de producir el movimiento del haz de manera que barra la muestra punto a punto de la interacción entre los electrones incidentes, con los átomos que componen la muestra se generan señales las cuales pueden ser captadas con detectores adecuados para cada una de ellas. La preparación de las muestras es relativamente sencilla las principales características son: muestra sólida, conductora. Caso contrario, la muestra es recubierta con una capa de carbón o una capa delgada de un metal como el oro o bronce para darle propiedades conductoras a la muestra, de lo contrario, las muestras no conductoras se trabajan en bajo vacío.

El SEM está equipado con diversos detectores, entre los que se pueden mencionar: el detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución SEI, un detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie BEI, y un detector de energía dispersiva EDS que permite coleccionar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis semicuantitativos y de distribución de elementos en superficies (Ipohorski & Bozzano, 2013).

2.2.4.4 Caracterización física

Las propiedades físicas de los materiales se determinan mediante pruebas en probetas o muestras estandarizadas. Para cada tipo de material existe un ensayo normatizado que regula su determinación, en este trabajo se describen los ensayos de densidad y absorción de agua para los bioplásticos utilizando las normas internacionales de materiales compuestos con matriz polimérica ASTM 792-08 y ASTM C272M-12.

- **Densidad**

Es una prueba importante para categorizar los materiales, nos proporciona información sobre la cantidad de masa dividida por unidad de volumen. La unidad de medición en el sistema internacional es en Kg/m^3 . Internacionalmente se mide bajo normas, pero de manera empírica se determina obteniendo el peso de la muestra y su volumen con la ecuación: densidad = masa/volumen como lo reporta (Luna et al., 2013).

- **Absorción de agua**

La absorción de agua es el porcentaje de peso que aumenta una probeta cuando se satura con agua y se define como el cociente entre el peso de agua que absorbe y su peso cuando está seco, expresado en porcentaje. El coeficiente de absorción de agua se puede determinar por inmersión total o capilaridad, en ambas el agua penetra los poros de pequeño tamaño y grietas. En algunos materiales el agua produce un aumento de volumen, además, en su recorrido por el interior del material, disuelve y arrastra las sales solubles obtenidas aumentando la porosidad original y creando depósitos de sales en lugares no deseados volviendo el agua corrosiva (Ariza, 2021).

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Tipo de sustrato seleccionado

Se estudiaron los residuos lignocelulósicos aserrín y astilla de encino (*Q. castanea neé*) obtenidos de un taller de cabo en Ocampo Michoacán (Figura 3.1) y un residuo de la industria agroalimentaria, olotes de maíz (*Zea Mays*) obtenido de un cultivo de la comunidad de Los Pilares Michoacán (Figura 3.2). Ambos residuos fueron utilizados como sustratos para el desarrollo del hongo *P. ostreatus* y para fungir como material de refuerzo en los bioplásticos desarrollados. Los residuos fueron tratados según la metodología descrita en los apartados 3.5 y 3.6.

Los materiales elegidos para ser utilizados como sustratos poseen propiedades como: ser material de residuo, económicos, disponibilidad en cantidad, localización fácil y cercana.

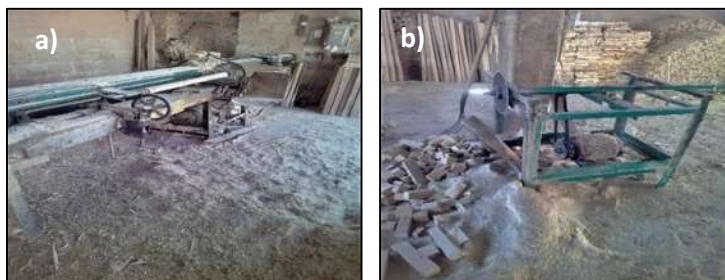


Figura 3.1. Residuos de un taller en Ocampo Michoacán: a) astilla de encino en copiadora de cabo, b) aserrín de encino en recortadora de raja, cuadro y cabo.

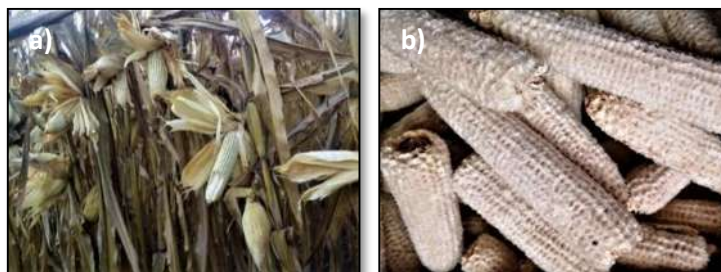


Figura 3.2. Cultivo de maíz de la comunidad de Los Pilares Michoacán: a) siembra, b) olotes.

3.2 Tipo de hongo seleccionado

Se seleccionó la especie *P. ostreatus* de la división Basidiomycota del Reino Fungí, conocido por ser un hongo de pudrición blanca que se alimenta de materia orgánica lignocelulósica en descomposición. Este hongo al ser constituido principalmente por quitina un biopolímero natural, fue utilizado para fungir como matriz en el desarrollo de un bioplástico poco denso, que se desarrolla rápidamente bajo sus mejores condiciones de desarrollo de T, Hr, C.H, O₂ y nutrientes. Fue utilizado micelio de *P. ostreatus* comercial proveniente de LABORATORIOS HONCOP de la ciudad de Perote, Veracruz.

3.3 Cuadro metodológico

El siguiente cuadro metodológico está dividido en 4 etapas las cuales a su vez se dividen en secciones de acuerdo a las actividades planeadas para la realización de los objetivos particulares de este proyecto.

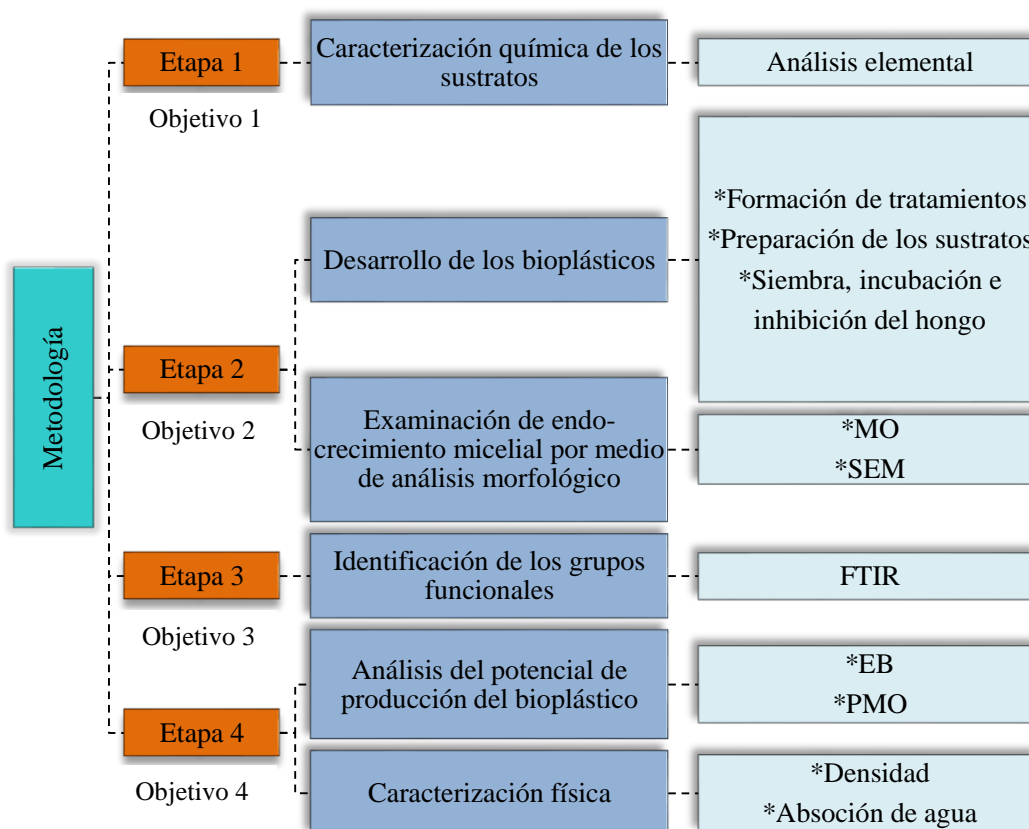


Figura 3.3. Cuadro metodológico.

3.4 Material

Materia prima	
	<ul style="list-style-type: none"> • Olotos
	<ul style="list-style-type: none"> • Aserrín de <i>Q. castanea</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • Astilla de <i>Q. castanea</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • micelio comercial de <i>P. ostreatus</i>
Material aséptico	
	<ul style="list-style-type: none"> • Guantes de látex
	<ul style="list-style-type: none"> • Cubrebocas
	<ul style="list-style-type: none"> • Alcohol 70%
	<ul style="list-style-type: none"> • Cloro
	<ul style="list-style-type: none"> • Aspersores manuales
Equipos y material para la elaboración de la biomasa y bioplásticos	
	<ul style="list-style-type: none"> • Estufa de secado
	<ul style="list-style-type: none"> • Tanque de calentamiento
	<ul style="list-style-type: none"> • Incubadora de hongos
	<ul style="list-style-type: none"> • Navaja
	<ul style="list-style-type: none"> • Cinta
	<ul style="list-style-type: none"> • Frascos transparentes de 2 litros
	<ul style="list-style-type: none"> • Moldes plásticos flexibles y transparentes
	<ul style="list-style-type: none"> • Aspersores manuales
	<ul style="list-style-type: none"> • Óxido de calcio
	<ul style="list-style-type: none"> • Plástico envolvente

ETAPA 1

3.5 Caracterización química de los sustratos

Los sustratos se caracterizaron al inicio de la experimentación, determinando la composición de la madera de encino y olotes de maíz como fuente de nutrientes para el desarrollo del micelio, realizado por medio de un análisis elemental para el cual se llevó a cabo la siguiente metodología:

Preparación de las muestras: Las muestras fueron molidas en un molino eléctrico para reducir el tamaño de partícula y tener una mayor área de contacto con los solventes facilitando los tratamientos posteriores, después fueron tamizadas con una malla no. 40 y finalmente fueron puestas en una estufa de secado a 30°C por 24 horas, las muestras secas se guardaron en frascos sellados. Todos los análisis fueron realizados por duplicado para cada especie.

3.5.1 Sustancias extraíbles

Para la determinación de las sustancias extraíbles se colocaron 12 gr de harina para cada especie en dedales de celulosa corrugados colocando tapones de papel filtro de porosidad media para evitar la pérdida de harina durante la extracción, después se aplicó una extracción sucesiva solido-liquido utilizando 150 ml de solvente en 4 equipos Soxhlet durante 6 horas realizando la extracción una vez para cada solvente con la siguiente secuencia: ciclohexano, metanol, acetona, y agua caliente (Figura 3.4). Los solventes fueron eliminados por evaporación utilizando baño maría hasta peso constante, los extractos obtenidos se recuperaron en viales color ámbar. El contenido de extraíbles para cada solvente se calculó dividiendo el peso del extracto anhidro entre el peso de la muestra de harina referido porcentualmente como se muestra a continuación:

$$\% \text{Extractivos} = \frac{\text{Peso de muestra anhidra}}{\text{Peso de muestra seca}} * 100 \quad (3.1)$$

Los extraíbles totales se calcularon con la suma de los porcentajes de los extraíbles de cada solvente. Al final el proceso la harina de encino y olote se designó como libre de extraíbles la cual se empleó para determinar el contenido de cenizas, lignina, celulosa y holocelulosa.

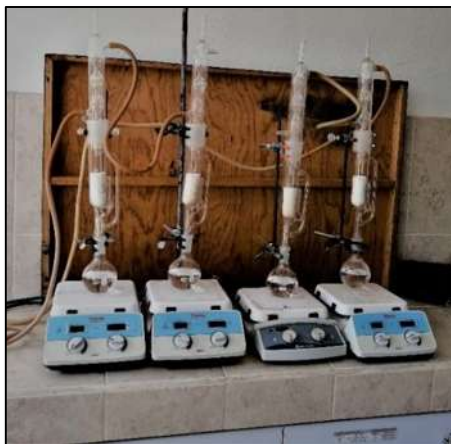


Figura 3.4. Extracciones solido-líquido en equipos Soxhlet.

3.5.2 Sustancias inorgánicas o cenizas

El contenido de estas sustancias se determinó de acuerdo a la norma T 2110m-93 colocando 1g de muestra en crisoles de níquel y colocándolos sobre una placa de calentamiento hasta el cese del humo (Figura 3.5), para posteriormente calcinarlos en una mufla (Thermo scientific) a 550°C hasta peso constante. El porcentaje de cenizas se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{Ceniza} = \frac{\text{Peso de ceniza}}{\text{Peso de muestra seca}} * 100 \quad (3.2)$$



Figura 3.5. Calcinación de las muestras en placa de calentamiento para la determinación de cenizas.

3.5.3 Holocelulosa

Se determinó el contenido de holocelulosa empleando el procedimiento descrito por Wise et al., (1946). En matraces de 250 ml se agregó 1 gr de muestra libre de extraíbles, se vertieron 32 ml de agua destilada, 0.3 g de clorito de sodio y 2 gotas de ácido acético glacial posteriormente se llevaron a baño maría a 75°C (Figura 3.6). Cada hora se adicionó 0.3g de clorito de sodio y 2

gotas de ácido acético glacial por un periodo de 4 horas agitando suavemente, al finalizar el proceso las muestras se dejaron enfriar y la solución fue filtrada y lavada con 100 ml de agua fría, seguida de 10 ml de acetona el residuo fue llevado a secado hasta peso constante a 105°C. El contenido de holocelulosa se calculó dividiendo el peso del residuo anhidro entre el peso de la harina libre de extraíbles anhidra referido porcentualmente como se muestra en la siguiente formula:

$$\% \text{Holocelulosa} = \frac{\text{Peso de muestra anhidra}}{\text{Peso de muestra seca}} * 100 \quad (3.3)$$



Figura 3.6. Baño maría de las muestras para la determinación de holocelulosa.

3.5.3 Lignina

La obtención de lignina se determinó por el método de Klason a partir de la siguiente norma ASTM D-1106-56 (1967). Se pesaron 2 g de harina para cada muestra posteriormente se adicionaron 15 ml de H₂SO₄ al 72% y se dejaron en reposo por 24 horas. Después se agregaron 560 ml de agua destilada para pasar de H₂SO₄ 72% al 3%. Los matraces fueron llevados a un sistema de destilación con reflujo manteniéndolos a ebullición durante 4 horas (Figura 3.7). Los sólidos fueron filtrados y lavados en embudos Buchner con agua destilada hirviendo hasta que el pH del agua de lavado fuera neutro, posteriormente las muestras se secaron en una estufa a 105°C hasta peso constante. El contenido en lignina se determinó con la siguiente expresión:

$$\% \text{Lignina} = \frac{\text{Peso de muestra anhidra}}{\text{Peso de muestra seca}} * 100 \quad (3.4)$$



Figura 3.7. Sistema de reflujo para la determinación de lignina.

3.5.4 Celulosa

Para determinar la celulosa, en matraces de 250 ml se pesó 1g de harina para cada muestra y se agregaron 10 ml de NaOH al 17.5%, adicionando 5 ml de NaOH cada 5 minutos, hasta completar 25 ml, mediante agitación con pequeños golpes. Se dejaron reposar durante 30 min, para enseguida adicionar 50 ml de agua destilada, las muestras fueron filtradas en embudos Buchner y lavadas en repetidas ocasiones hasta eliminar los residuos, después se agregaron 100 ml de NaOH al 8.3%, seguida de agua caliente y 15 ml de ácido acético al 10%. Finalmente, las muestras se llevaron a secado a 105°C hasta peso constante. El porcentaje de celulosa se determinó con la siguiente expresión:

$$\% \text{Celulosa} = \frac{\text{Peso de muestra anhidra}}{\text{Peso de muestra seca}} * 100 \quad (3.5)$$

ETAPA 2

3.6 Desarrollo de los bioplásticos

Para la realización de esta etapa se siguió y modifico el procedimiento descrito por Gaitan et al., (2006) y Rodríguez (2018), a continuación, se muestra la metodología empleada:

3.6.1 Formación de tratamientos

Se formaron cuatro tratamientos con diferentes composiciones de sustratos realizando 3 réplicas de cada uno (Tabla 3.1), posteriormente se inocularon con micelio de *P. ostreatus*. Fueron realizados a la par 4 tratamientos control uno para cada sustrato realizando la misma metodología, pero sin llevar a cabo la inoculación del hongo.

Tabla 3.1. Formación de tratamientos.

Tratamientos	Sustrato	Porcentaje
T1	Astillas	100%
T2	Astilla + Olote	50% + 50%
T3	Aserrín	100%
T4	Aserrín + Olote	50% + 50%

Los sustratos fueron utilizados con diversos tamaños en partícula como se muestra en la tabla 3.2.

Tabla 1.2. Tamaño de partícula de los sustratos.

Materia prima	Tamaño
Aserrín	1.36 mm en promedio
Astilla	3.5 cm * 0.2 cm en promedio
Olote	1 cm

3.6.2 Preparación de los sustratos

La correcta preparación de los sustratos es muy importante, si no se realiza correctamente los sustratos se contaminarán o en su defecto no se tendrán las condiciones necesarias para un eficaz desarrollo del hongo (colonización).

3.6.3 Hidratación por medio de álcalis

Los tratamientos a utilizar fueron llevados a inmersión en recipientes de agua con óxido de calcio previamente preparada (una cucharada de óxido de calcio / litro de agua) durante 24 horas con el fin de hidratarlos, añadir calcio a los sustratos y obtener un pH de 6.5 siendo el que favorece el desarrollo del *P. ostreatus* (Martínez, 2012).

3.6.4 Pasteurización de los sustratos por inmersión en agua caliente

Los sustratos se escurrieron hasta eliminar el exceso de agua y fueron sumergidos en un tanque de calentamiento presurizado con agua hirviendo entre 100-150°C durante 1 hora (Figura 3.8), ocasionando un choque térmico y eliminando cualquier microorganismo que pudiera competir con el desarrollo de los hongos, se escurrieron y enfriaron a temperatura ambiente esparcidos sobre una malla hasta que al tacto estuvieran fríos, finalmente estuvieron listos para ser inoculados con el micelio de hongo.



Figura 3.8. Pasteurización de sustratos en tanque de calentamiento presurizado.

3.6.5 Siembra, incubación e inhibición del hongo

Todos los pasos llevados en este proceso se llevaron a cabo a condiciones asépticas. Para la siembra del hongo se adaptó y utilizó un área limpia, cerrada y oscura la cual fue desinfectada con alcohol al 70%. La siembra se realizó en frascos transparentes intercalando capas alternas de sustrato e inóculo, tratando de que la mezcla fuera uniforme y evitando dejar áreas sin cubrir, aproximadamente de 40 a 50 g de inóculo se requirieron para sembrar 300 g en peso húmedo de sustratos. Los frascos fueron cubiertos con plástico envolvente realizando 4 agujeros de medio centímetro e incubados en una área limpia y oscura con temperatura ambiental entre 16 a 25°C en un lapso de 10 días (Figura 3.9).

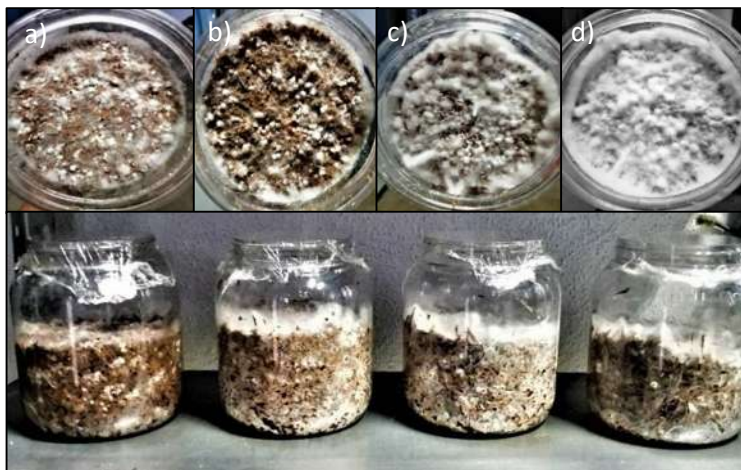


Figura 3.9. Tratamientos en incubación día 10 a) aserrín-micelio, b) aserrín-olote-micelio, c) astilla-micelio, d) astilla-olote-micelio.

Pasados los 10 días se removió y mezcló la biomasa de los frascos y se cambiaron a moldes de plástico flexibles y transparentes de 8cm*5cm*3cm compactando sobre las paredes del molde con el fin de desarrollar bioplásticos con la forma del molde, posteriormente fueron sellados con plástico envolvente realizando 6 perforaciones de medio centímetro para permitir el intercambio con el aire y favorecer la oxigenación del hongo (Figura 3.10).



Figura 3.10. Remoción de sustrato y cambio de molde.

Los moldes de las biomásas se llevaron nuevamente a incubación con condiciones asépticas durante 15 días a las siguientes condiciones: obscuridad, T. de 28°C, Hr. de 60-80% y un C.H. semicontrolado al 80%, Las biomásas fueron examinadas diariamente para detectar la recuperación del micelio, lo cual se observó como una masa blanquecina y algodonosa que se desarrollaba alrededor de los sustratos y para detectar cualquier posible contaminación por bacterias, otros hongos, mosquitas o insectos.

Una vez que transcurrieron los 15 días, para que el micelio colonizara completamente en la parte exterior y cubriera los sustratos en totalidad, se desmoldaron las biomásas colocándolas en bolsas

de plástico transparente manteniendo aire dentro y dejándolas nuevamente en incubación durante 5 días más (Figura 3.11a). Una vez que el micelio colonizo completamente y formo una capa gruesa de este microorganismo, se retiraron las biomásas de las bolsas y se colocaron en una estufa de secado 70 °C con una ventilación al 30% hasta peso constante, para eliminar el exceso de agua e inhibir el desarrollo del hongo deteniendo su crecimiento, obteniendo como resultado bioplásticos moldeados resistentes con poca densidad (Figura 3.11b).



Figura 3.11. a) desarrollo de biomasa de micelio en bolsas, b) inhibición del hongo y eliminación de exceso de humedad.

3.7 Examinación de endo-crecimiento micelial por medio de análisis morfológico

Se estudiaron los 4 diferentes tratamientos sin colonizar (controles) y colonizados con *P. ostreatus*, para evaluar el desarrollo del hongo y morfología a los 15 y 30 días desde la inoculación. Para su examinación se extrajeron muestras de 1 g de la parte central interna de cada uno de los tratamientos y se observaron en Microscopia óptica y microscopia electrónica de barrido.

3.7.1 Análisis morfológico por microscopia óptica (MO)

Se evaluó la morfología de los tratamientos con microscopia óptica de alta resolución mediante el uso de un estereoscopio (Rossbach Kyowa No. 805570) (Figura 3.12), las muestras fueron colocadas en porta objetos y observadas a 80x sin tratamiento alguno para no alterar su morfología.



Figura 3.12. Estereoscopio Rossbach Kyowa No. 805570.

3.7.2 Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para el análisis en SEM las muestras se deshidrataron durante 24 horas a 70°C, se colocaron en un soporte fijo en cinta carbón un día antes del análisis, se metalizaron recubriéndolas con cobre y se dejaron en un desecador hasta su observación empleando el equipo marca JEOL, modelo JSM 6400 (Figura 3.13).



Figura 3.13. Equipo de SEM JEOL JSM 6400.

ETAPA 3

3.8 Identificación de los grupos funcionales

El análisis estructural de los bioplásticos se caracterizó al final de la etapa experimental por medio de FTIR con la técnica ATR y se llevó a cabo en un espectrómetro Perking Elmer Spectrum 400 en el intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} a temperatura ambiente y presión atmosférica (Figura 3.14).



Figura 3.14. Equipo FTIR Perkin Elmer Spectrum 400.

ETAPA 4

3.9 Análisis del potencial de producción del bioplástico micelial por medio de la eficiencia biológica (EB) y pérdida de materia orgánica (PMO)

Una vez obtenidos los biomateriales, se evaluó el mejor tratamiento para el desarrollo del micelio con base a su EB utilizando la fórmula presentada por Tamayo (2018) mediante el tratamiento de biomasa por diferencia de pesos $EB = (\text{Peso de micelio obtenido} / \text{Peso de sustrato húmedo utilizado}) * 100$. Una vez determinada la EB se determinó la PMO para evaluar la descomposición del sustrato la cual se basa en la pérdida de materia orgánica descompuesta por el hongo. La PMO fue evaluada con la fórmula utilizada por Cármos & Andrade (2011) $PMO = 100 - (\text{MSSR} / \text{MSSI}) * 100$ donde MSSR = Masa seca del sustrato residual y MSSI = Masa seca del sustrato inicial.

3.10 Caracterización física

3.10.1 Densidad

Se elaboraron 3 réplicas de bioplásticos para cada uno de los tratamientos utilizando la norma ASTM D 792-08, la densidad se calculó del peso después del secado y volumen de cada espécimen como se muestra a continuación:

$$D = \frac{M}{V} \quad (3.6)$$

D = Densidad Kg/m³

M = Masa

V = Volumen

3.10.2 Absorción de agua

Para la realización de esta prueba se siguió el método descrito por la norma ASTM C272M-12 para lo cual se prepararon 3 réplicas cubicas con dimensiones de 3 in por tratamiento de los bioplásticos, las muestras se colocaron en estufa de secado durante 24 horas a 50°C, se dejaron enfriar en desecador, pesaron, tomaron sus dimensiones y se colocaron en recipientes llenos de agua destilada mantenida a 23 ± 1 ° C (Figura 3.15). Se retiraron las muestras y se extrajo manualmente el agua superficial con papel filtro y sumergiéndolas en alcohol isopropílico, se sacaron y se dejó evaporar el alcohol por 1 minuto, se pesaron y midieron sus dimensiones nuevamente. Por último, se determinó el porcentaje absorción de agua por unidad de volumen como se muestra a continuación:

$$\text{Absorción de agua por unidad de volumen g/cm}^3 = \frac{W-D}{V} \quad (3.7)$$

Donde:

W = Masa de la muestra después de la inmersión en agua y secado, g

D = Masa de pre-inmersión de la muestra, g

V = volumen de la muestra cm^3



Figura 3.15. Inmersión de los bioplásticos en recipientes con agua destilada.

3.11 Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental de bloques distribuidos completamente al azar evaluando 4 tratamientos con 3 repeticiones. Los tratamientos fueron: aserrín, aserrín-olote, astilla, astilla-olote (sustratos) con crecimiento micelial de *P. ostreatus* para un total de 48 unidades experimentales tomando como variable respuesta EB, PMO, densidad y absorción de agua. Realizando a su vez una comparación de medias con el método de Tukey utilizando el software Minitab 17.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Bioplásticos obtenidos

En la figura 4.1 se muestran los bioplásticos obtenidos de los diferentes tratamientos a condiciones de desarrollo de T y humedad relativa controladas (28°C, 60-80%) durante 30 días de colonización en obscuridad, los bioplásticos se aprecian con apariencia blanquecina y algunas tonalidades amarillas las cuales se deben a la aplicación de temperatura para la inhibición del hongo, así, como de las gotas de agua amarillentas que genera el micelio envejecido en la segregación de metabolitos que inhiben a los nematodos y otros organismos para mejorar su oportunidad de supervivencia (Piedra, 2008), también se aprecia una textura suave y aterciopelada correspondiente al micelio formado en la parte exterior conocido como piel fúngica, desarrollada de forma irregular, no se visualizan diferencias significativas ya que todos los tratamientos fueron totalmente cubiertos por el micelio. Por otra parte, se ilustran los diferentes tratamientos control de los sustratos sin inocular a modo comparativo (Figura 4.2).



Figura 4.1. Bioplásticos obtenidos de los diferentes tratamientos colonizados con *P. ostretaus*. T1: astillas-micelio, T2: astillas/olote-micelio, T3: aserrín-micelio, T4: aserrín/olote-micelio.

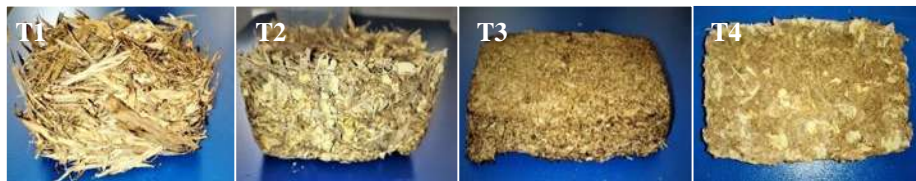


Figura 4.2. Tratamientos control sin colonización de los diferentes sustratos. T1: astilla, T2: astilla/olote, T3: aserrín, T4: aserrín/olote.

ETAPA 1

4.2 Caracterización química de la materia prima

En la etapa número uno, se determinó la composición química de la madera de *Quercus castanea neé* y olotes de maíz para conocer su aporte nutricional como sustratos en el desarrollo de micelio de *P. ostreatus*, fueron determinados cinco componentes en porcentaje en peso: cenizas, sustancias extraíbles, holocelulosa, celulosa y lignina.

En la tabla 4.1 se muestran los resultados obtenidos, para el olote se encontró un contenido de cenizas del 0.9%, sustancias extraíbles con un 5.1%, para la holocelulosa (celulosa + hemicelulosa) un 78.9% donde en la celulosa se obtuvo 45% y por diferencia se obtuvo la hemicelulosa con 33.9%, finalmente la lignina se encontró con un valor de 15.1%. Los datos obtenidos están acordes a los que reportan Córdoba et al., (2013), en los que obtuvieron 2% en cenizas, 4.6% en sustancias extraíbles, 78.6% en holocelulosa, 45% en celulosa y 15.8% en lignina. En la madera del *Quercus castanea*, se encontró un contenido de cenizas similar al olote con 1%, el contenido de extraíbles con 6.8%, se obtuvieron mayores porcentajes de lignina (22.7%) y de holocelulosa (69.3%) donde la celulosa tiene un valor del 49.7% y la hemicelulosa con 19.8%, no se encontraron reportes de composición química para esta especie de encino en la literatura, sin embargo, los resultados tienen similitud a lo reportado por Rutiaga et al., (2000) en la composición química del duramen de la madera de *Quercus candicans neé* los cuales reportan 10% para extraíbles, 1% para cenizas, 21% para lignina y para holocelulosa 67%.

Tabla 2.1. Composición química del olote y encino.

Composición química	Olote (% peso)	Encino (% peso)
Cenizas	0.9	1
Extraíbles	5.1	6.8
Lignina	15.1	22.7
Holocelulosa	78.9	69.5
• Celulosa	45	49.7
• Hemicelulosa	33.9	19.8

Ambas materias primas presentan una buena fuente de nutrientes al ser utilizados como sustratos en el desarrollo del micelio de *P. ostreatus* donde el carbono es su principal alimento, el olote presenta una mayor concentración de carbono en la holocelulosa respecto al encino, este elemento es necesario para los hongos en grandes cantidades porque es la fuente directa de energía para su metabolismo, así mismo, es necesario para la formación de la pared celular, el encino por otro lado presenta una mayor concentración de lignina respecto al olote, ambos presentan un contenido bajo en cenizas donde sus principales componentes son P, K, Ca, Mg y N (Solla et al., 2001), los cuales también son una buena fuente de nutrientes para el desarrollo del micelio en bajas concentraciones (Schmidt, 2006).

Por otra parte, la variación observada en el porcentaje de colonización de cada una de las cepas está en relación a la composición química y tasa C:N de los residuos agroindustriales utilizados. Yang et al., (2013) sugirió que la proporción C/N de 22-30,1, favorece la proporción de primordios, así como una alta proporción C/N favorece el crecimiento micelial y por el contrario una baja proporción C/N favorece el crecimiento del cuerpo fructífero. Martínez (2012) sugiere que la que la relación C:N para el desarrollo del micelio del *P. ostreatus* debería estar entre 50:1, 100:1 y 500:1, ya que este tiene la capacidad de desarrollarse y colonizar sustratos pobres en nitrógeno e incluso nulos, siendo una adaptación ecológica para desarrollarse y vivir en la naturaleza.

4.3 Análisis morfológico por MO

4.3.1 Tratamientos control

En la figura 4.3 se muestran los tratamientos control de los sustratos sin desarrollo micelial, en donde se aprecian partículas de diferentes tamaños y distribuidas completamente al azar, en los

diferentes tratamientos se puede observar un color cobrizo con tonalidades “rojaseas” típicas de la madera de encinos rojos como el *Q. castanea*, una madera de excelente resistencia mecánica con alta resistencia al impacto (Perez & Quintanar, 1994). En el T1, se observan fibras agrupadas, alargadas compactas que corresponden a las astillas, una vez que se mezclan con el olote (T2) la topografía se modifica, observándose partículas de menor tamaño dispersas sobre las fibras. Para los sustratos de aserrín (T3 y T4), se aprecian estructuras laminares, al adicionar olote, se observa una superficie de aspecto polvoso con una ligera modificación de tonalidad.



Figura 4.3. Imágenes topográficas realizadas en microscopia óptica a 80x de los tratamientos control. T1: astillas, T2: astillas-olote, T3: aserrín, T4: aserrín-olote.

4.3.2 Tratamientos inoculados con *P. ostreatus*

Para todos los tratamientos se realizó una observación en el MO a 80x a los 15 y 30 días de la colonización, a fin de tener indicios de las estructuras de los micelios de hongos filamentosos, lo cual se observa como una biomasa blanquesina en forma de telaraña creciendo alrededor de los sustratos (Figura 4.4). A los 15 días de colonización se observa variedad morfológica de las biomasas en los diferentes tratamientos, el desarrollo fue mayor donde se incorporó olotes de maíz (T2 Y T4). A los 30 días se observa una mayor colonización que aglomera los sustratos, mostrando que conforme avanzan los días y el micelio va envejeciendo, torna a una textura algodonosa, lo cual es evidente para todos los tratamientos y concuerda con lo reportado por (Sánchez, 2018). En todos los tratamientos se observó desarrollo de micelio, por lo que las condiciones de colonización otorgadas de T, Hr, C.H, oscuridad y tiempo fueron adecuadas.

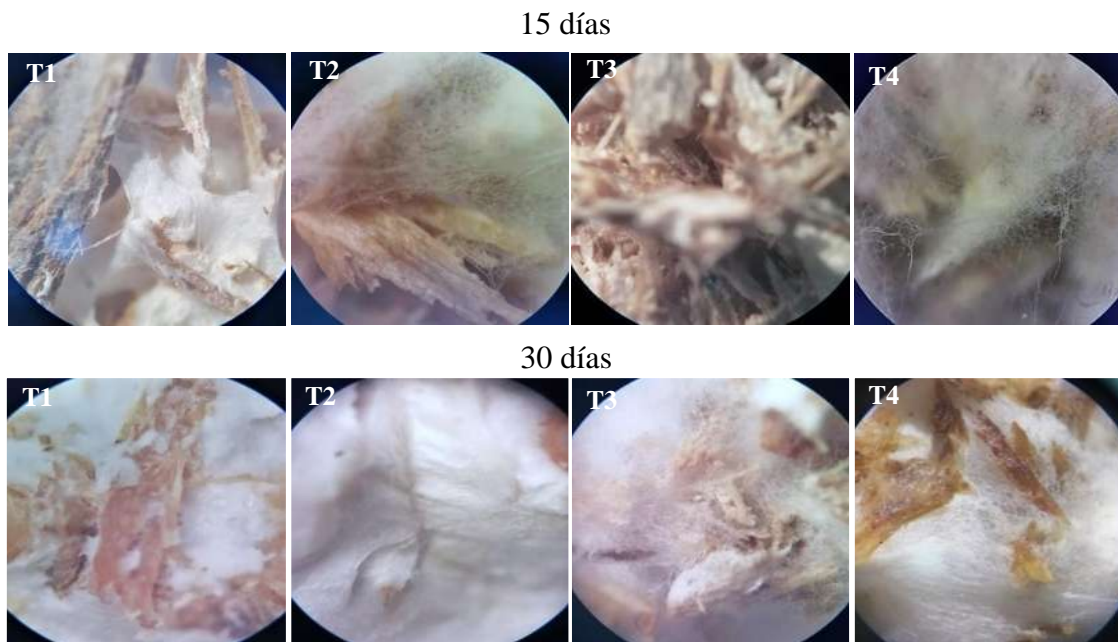


Figura 4.4. Imágenes topográficas realizadas en microscopía óptica a los 15 y 30 días de desarrollo de biomasa micelial de *P. ostreatus* en sustratos de T1: astillas, T2: astillas-olote, T3: aserrín, T4: aserrín-olote.

4.4 Análisis morfológico por SEM

4.4.1 Tratamientos control

En las figuras 4.5 y 4.6 se pueden apreciar las micrografías de los tratamientos control de los sustratos sin inocular a diferentes aumentos, en las figuras 4.5a y b (astillas, astillas-olote) se observan una cantidad considerable de cristales de oxalato de calcio en forma romboidal, estos cristales se encuentran en la madera de encino y se presentan frecuentemente en células radiales, fibras y esporádicamente en vasos (Pérez & Dávalos, 2008). Estos cristales sirven para regular los niveles de calcio, detoxificar a las plantas de metales pesados y protección herbívora (Jauregui & Moreno, 2008). Por otro lado en las micrografías de aserrín, aserrín-olote (Figuras 4.6a y b) al tener un tamaño de partícula más pequeño permite apreciar algunas características microscópicas referentes a la madera del *Q. castanea* como sus vasos y rayos las cuales están acordes a las reportadas por (Perez & Quintanar, 1994). En las figuras 4.6b se observa la presencia de partículas de olote incrustadas en los vasos y rayos del aserrín.

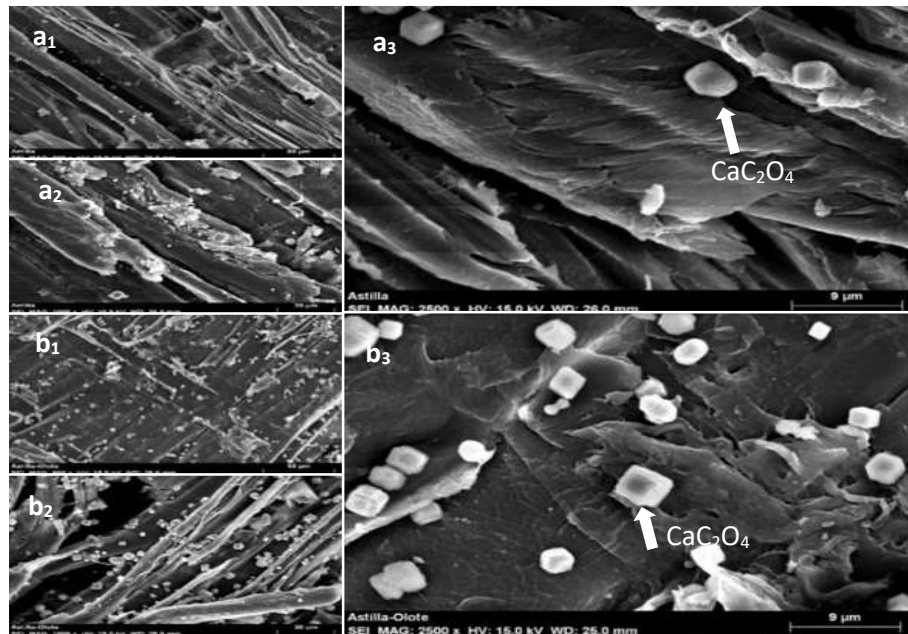


Figura 4.5. Micrografías de los tratamientos control T1 y T2 (astillas y astillas/olote). a₁: astillas 500X, a₂: astillas 1000X, a₃: astillas 2500X, b₁: astillas/olote 500X, b₂: astillas/olote 1000X, b₃: astillas/olote 2500X. Las flechas muestran partículas de oxalato de calcio.

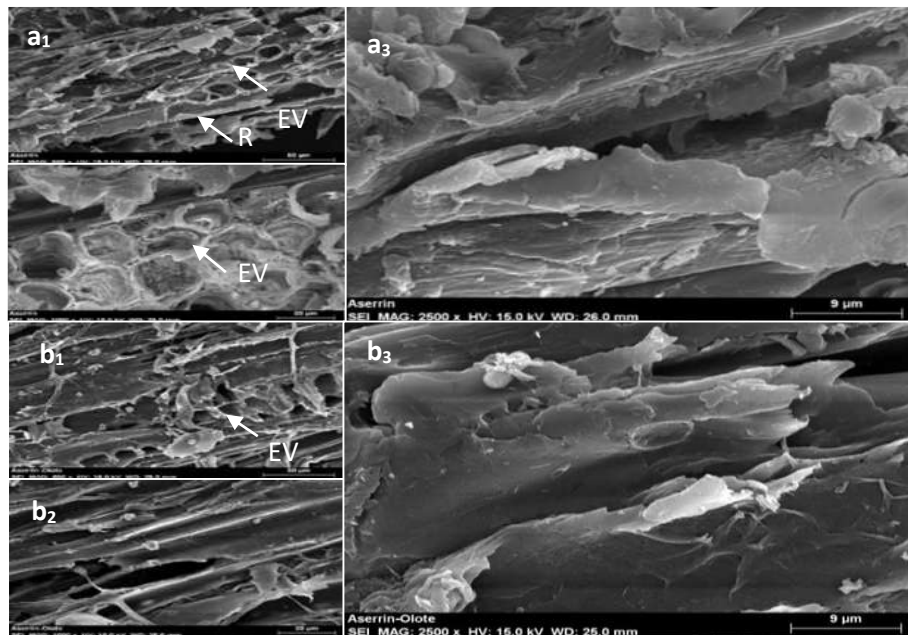


Figura 4.6. Micrografías de los tratamientos control T3 y T4 (aserrín, aserrín/olote). a₁: aserrín 500x, a₂: aserrín 1000x, a₃: aserrín 2500x, b₁: aserrín/olote 500x, b₂: aserrín/olote 1000x, b₃: aserrín/olote 2500x. Las flechas muestran R: radios y EV: elementos de vaso.

4.4.2 Tratamientos inoculados con micelio colonizados durante 15 días

Las micrografías de las figuras 4.7a y b de las muestras de biomasa de astillas-micelio y astillas/olote-micelio (T1 y T2) ilustran la morfología del micelio a los 15 días de colonización en SEM, exhibiendo una microestructura con filamentos entrelazados y orientados al azar correspondientes a las hifas. Por otra parte, en las figuras 4.8a y b de las muestras de aserrín-micelio y aserrín/olote-micelio (T3 y T4) se observa una menor colonización de hifas en el T3 comparada con los otros tratamientos. En general se observó que los sustratos de mayor colonización del hongo son aquellos que tienen mayor contenido de carbohidratos estructurales (T2 y T4), debido a que el olote es un material que tiene un alto contenido de carbono, fuente principal de moléculas estructurales. La morfología analizada en SEM es afín a lo visualizado en MO.

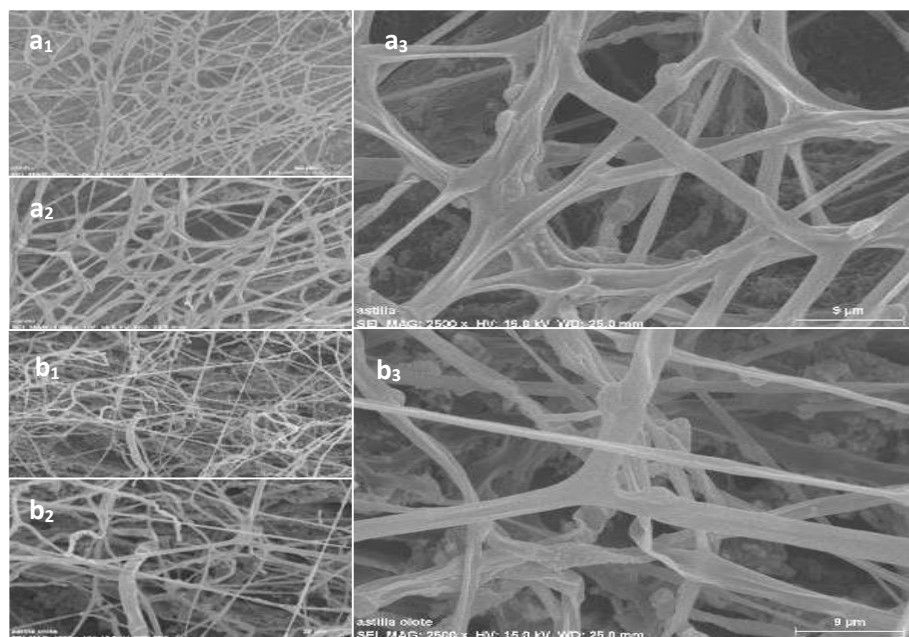


Figura 4.7. Micrografías SEM de hifas de *P. ostreatus* colonizadas durante 15 días en los sustratos de T1 Y T2 (astillas y astillas/olote). a₁: astillas 500x, a₂: astillas 1000x, a₃: astillas 2500x, b₁: astillas/olote 500x, b₂: astillas/olote 1000x, b₃: astillas/olote 2500.

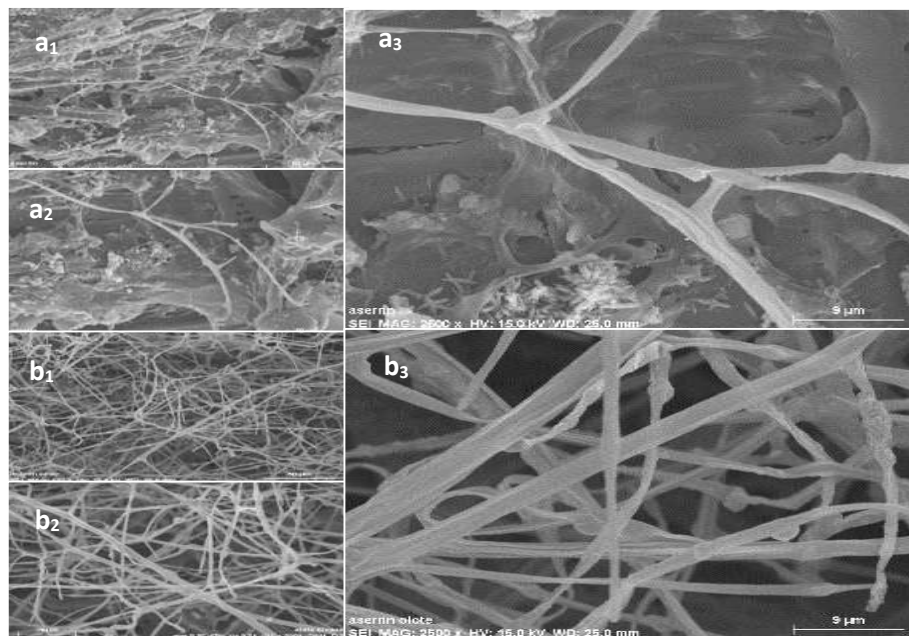


Figura 4.8. Micrografías SEM de hifas de *P. ostreatus* colonizadas durante 15 días en los sustratos de T3 y T4 (aserrín y aserrín/olote). a₁: aserrín 500x, a₂: aserrín 1000x, a₃: aserrín 2500x, b₁: aserrín/olote 500X, b₂: aserrín/olote 1000x, b₃: aserrín/olote 2500.

4.4.3 Tratamientos inoculados con micelio colonizados durante 30 días

Las figuras 4.9, 4.10 (a y b) de las muestras de biomasa ilustran la morfología de las microestructuras de los cuatro diferentes tratamientos a los 30 días de colonización, mostrando un aumento de hifas entrelazadas sin orden donde los sustratos se aprecian cubiertos por estas células, según Fuentes (2020) una hifa crece 1 mm por día bajo sus condiciones adecuadas, algunas hifas se observan con apariencia lisas y otras rugosas, la rugosidad se puede deber a la presión de turgencia provocada por cambios ambientales dentro de las células y la gran cantidad de sales encontradas en los sustratos como se observó en las micrografías de las figuras 4.6, mostrando a su vez diámetro de diversos tamaños, respecto a los diferentes sustratos utilizados, en T1 (Figuras 4.9a) el diámetro es de 1-1.8 μ m en los T2 (Figuras 4.9b) el diámetro es de 1-2 μ m, T3 (Figuras 4.10a) de 1.4-1.8 μ m y por último T4 (Figuras 4.10b) de 0.2-2 μ m. Los diámetros obtenidos son similares a los obtenidos por Islam et al., (2017) donde obtuvieron diámetros de 1.3 ± 0.6 .

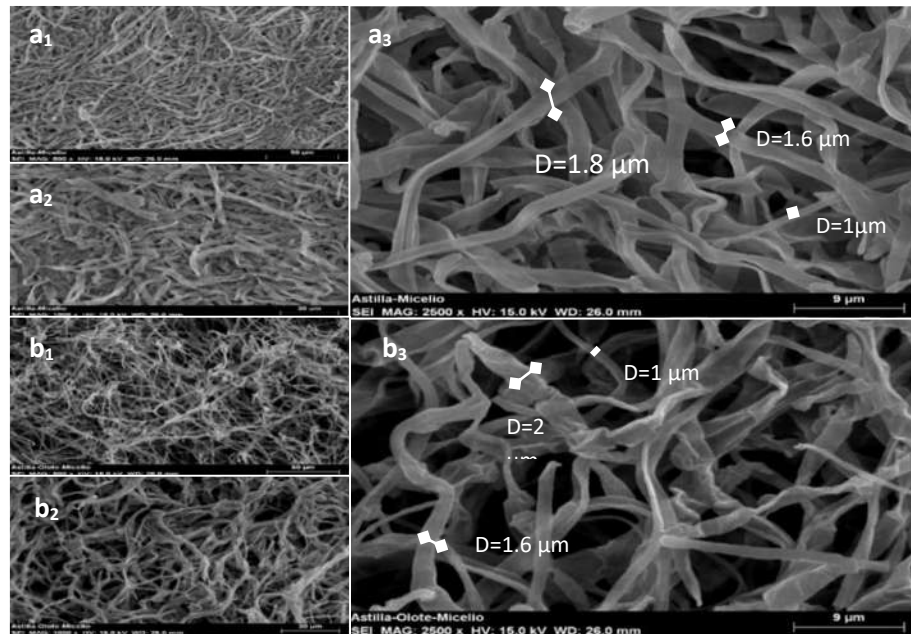


Figura 4.9. Micrografías SEM de hifas de *P. ostreatus* colonizadas durante 30 días en los sustratos de T1 y T2. a₁: astillas 500x, a₂: astillas 1000x, a₃: astillas 2500x, b₁: astillas/olote 500x, b₂: astillas/olote 1000x, b₃: astillas/olote 2500x. Las flechas muestran los diámetros de las hifas.

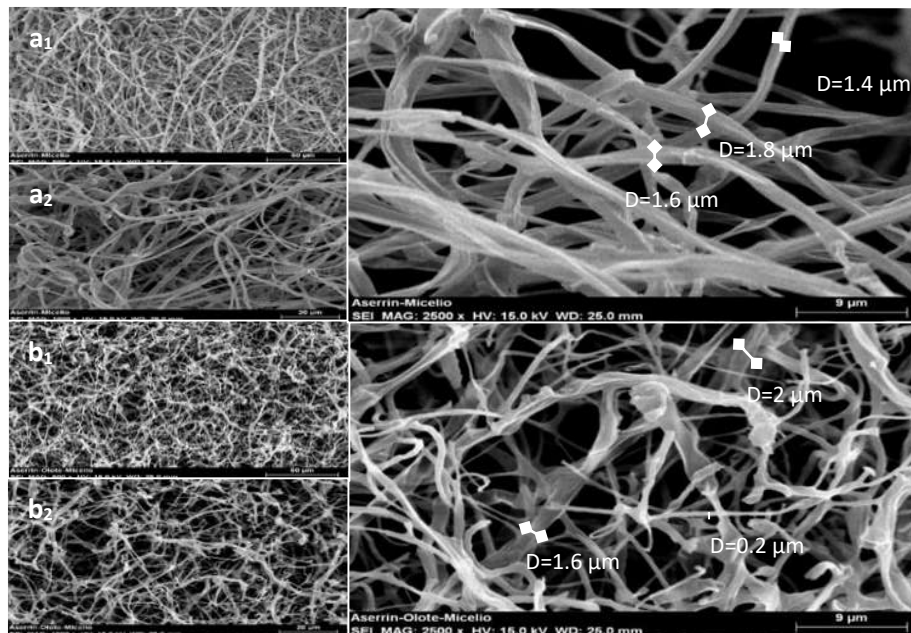


Figura 4.10. Micrografías SEM de hifas de *P. ostreatus* colonizadas durante 30 días en los sustratos de T3 y T4. a₁: aserrín 500x, a₂: aserrín 1000x, a₃: aserrín 2500x, b₁: aserrín/olote 500x, b₂: aserrín/olote 1000x, b₃: aserrín/olote 2500x. Las flechas muestran los diámetros de las hifas.

ETAPA 2

4.5 Composición química mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

En el siguiente apartado se muestran los espectros de absorción provenientes de los 4 tratamientos con y sin colonización de micelio formados con las combinaciones especificadas (Tabla 3.1) analizadas en un intervalo de número de onda de 650 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} . A fin de visualizar de manera más conveniente las vibraciones de cada uno de los tratamientos se ha colocado el FTIR de los tratamientos colonizados y sin colonizar en una sola figura a modo comparativo.

Las figuras 4.11a y b muestra los espectros FTIR de absorción del T1 correspondiente a astillas (control) y astillas-micelio. Los dos espectros muestran dos señales características de la celulosa, hemicelulosa, lignina y algunos extraíbles presentes en las astillas, una señal en el intervalo de 3500 cm^{-1} a 3200 cm^{-1} corresponde al grupo O-H y la señal que va de 3000 cm^{-1} a 2800 cm^{-1} de los grupos CH_2 simétricos y anti-simétricos de metilenos correspondientes a las unidades de guayacilo de la lignina en el espectro del tratamiento control y de la formación de lípidos en el tratamiento con micelio (Haneef et al., 2017), resultados similares a lo obtenido en el análisis elemental de la madera de encino (Tabla 4.1). En el espectro de la figura 4.11a se indica la presencia de O- CH_3 de lignina a 1427 cm^{-1} y del grupo funcional carbonilo (C=O) presente en la hemicelulosa a 1734 cm^{-1} encontrándose con una intensidad débil en el espectro con micelio a 1738 cm^{-1} indicando una degradación por parte del hongo. Adicionalmente en la figura 4.11b, se observa una señal de tensión a 1634 cm^{-1} característica de la amida I (C=O) (Fígoli et al., 2016), y una señal de menor intensidad a 1547 cm^{-1} de la amida II del grupo acetamido características de la quitina que componen la pared celular del micelio, resultado afín con los reportes hechos por Brugnerotto et al., 2001 y Peniche, (2006). Otra señal importante de este polímero es observada con mediana intensidad a 1372 cm^{-1} del CH_3 (Haneef et al., 2017). Un pico del enlace C-O en su modo vibracional de estiramiento del enlace glucosídico a 1029 cm^{-1} es característico de la celulosa en la figura 4.11a y con mayor intensidad en la figura 4.11b característico de la quitina.

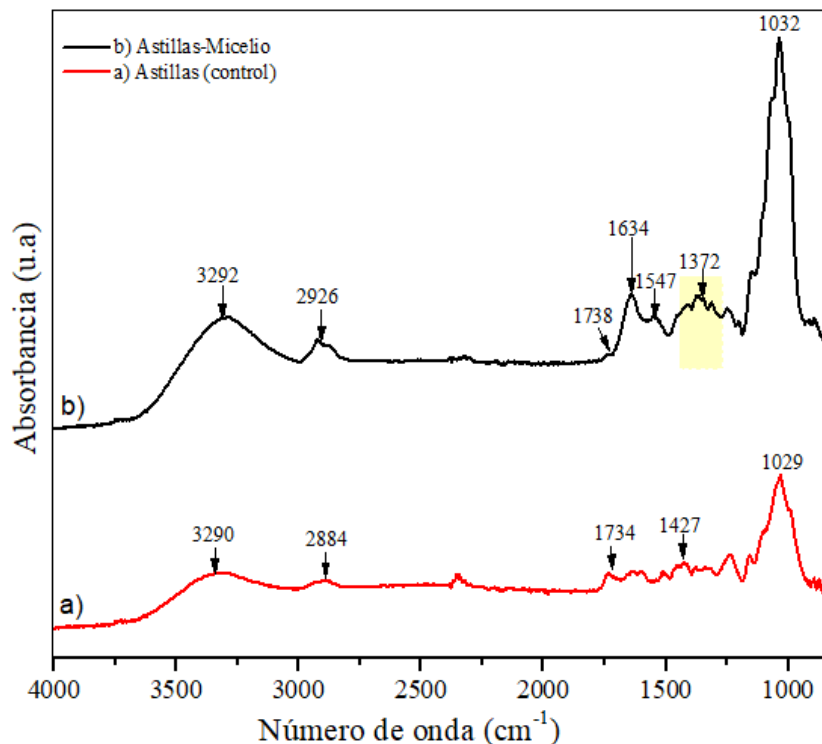


Figura 4.11. Espectros de FTIR de control y bioplástico del T1.

Tabla 4.2. Frecuencias FTIR de los grupos funcionales presentes en el T1.

Grupo funcional	Tensiones teóricas (cm ⁻¹)	Tipo de vibración	Tensiones experimentales T1 (cm ⁻¹)	
			Astilla-Micelio	Astilla
OH (Hidroxilo)	3500-3200	ν	3292	3290
CH ₂ (Metileno)	3000-2800	$\nu_{as,s}$	2926	2884
C=O (Carbonilo)	1800-1500	ν	1738	1734
C=O (Amida I)	1650-1620	ν	1634	-
NH (Amida II)	1560-1530	d	1547	-
O-CH ₃ (Metoxi)	1463-1420	d_{as}	-	1427
CH ₃ (Metilo)	1380-1295	d_s	1372	-
C-O (Enlace glucosídico)	1200-650	ν	1032	1029

ν = tensión, ν_{as} = tensión asimétrica, ν_s = tensión simétrica, d = deformación, d_s = deformación simétrica, d_{as} = deformación asimétrica.

En las figuras 4.12 se muestran los FTIR del T2 de astilla/olote y astilla/olote-micelio. La presencia de los grupos O-H y CH₂ se encuentran a 3500-3200 cm⁻¹ y 3000-2800 cm⁻¹ respectivamente. El pico a 1627 cm⁻¹ se atribuye al grupo C=O de la hemicelulosa en el espectro del tratamiento control. El espectro 4.12b muestra las señales de una banda de tensión a 1638 cm⁻¹ y el pico de deformación a 1543 cm⁻¹ característicos de la amida I y amida II, además, de un pico a 1379 cm⁻¹ correspondiente al grupo funcional metilo, estos tres grupos funcionales

pertenecientes a la formación de quitina se encuentran con mayor intensidad a diferencia del T1 (Figura 4.11), lo que coincide con el resultado del análisis morfológico en la etapa 1, donde se percibe que el olote mejora las condiciones desarrollo del micelio y con ello se obtiene un mayor desarrollo de quitina. En la figura 4.12a a 1423 cm^{-1} se encuentra el grupo O-CH₃ de la lignina. Ambos espectros muestran un pico intenso del C-O entre 1200 y 650 cm^{-1} , relacionado al enlace glucosídico.

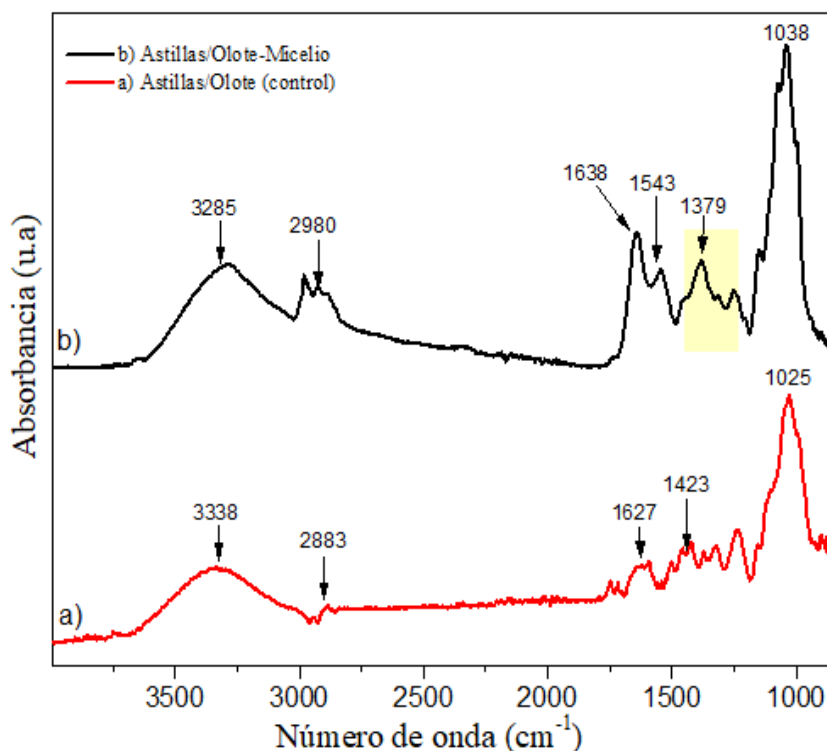


Figura 4.12. Espectros de FTIR de control y bioplástico del T2.

Tabla 4.3. Frecuencias FTIR de los grupos funcionales presentes en el T2.

Grupo funcional	Tensiones teóricas (cm^{-1})	Tipo de vibración	Tensiones experimentales T2 (cm^{-1})	
			Astilla/Olote-Micelio	Astilla/Olote
OH (Hidroxilo)	3500-3200	ν	3285	3338
CH ₂ (Metileno)	3000-2800	$\nu_{as,s}$	2980	2883
C=O (Carbonilo)	1800-1500	ν	-	1627
C=O (Amida I)	1650-1620	ν	1638	-
NH (Amida II)	1560-1530	d	1543	-
O-CH ₃ (Metoxi)	1463-1420	d_{as}	-	1423
CH ₃ (Metilo)	1380-1295	d_s	1379	-
C-O (Enlace glucosídico)	1200-650	ν	1038	1025

ν = tensión, ν_{as} = tensión asimétrica, ν_s = tensión simétrica, d = deformación, d_s = deformación simétrica, d_{as} = deformación asimétrica.

En los espectros de las figuras 4.13a y b, se muestra el T3 (aserrín-control y aserrín-micelio) ambos con señales de N-H y O-H, en 3319 cm^{-1} y 3287 cm^{-1} así como las señales del metileno a 2886 cm^{-1} y 2925 cm^{-1} . Entre $1800 - 1500\text{ cm}^{-1}$ se identifica el grupo C=O en ambos espectros. En el espectro control se aprecia la señal a 1502 cm^{-1} que se atribuye al grupo funcional C=C aromático guaiacil-siringil de la lignina y la señal de los grupos O-CH₃ en los intervalos de 1463 cm^{-1} a 1420 cm^{-1} , así como un pico de mediana intensidad del enlace C-O en su modo vibracional a 1025 cm^{-1} , al igual que en los espectros anteriores, las señales indican la presencia de compuestos lignocelulósicos que constituyen al aserrín y la formación del *P. ostreatus* en los tratamientos con micelio, como la notoria aparición de la vibración aguda de mediana intensidad en los enlaces C=O de la amida I (1636 cm^{-1}) y de la amida II (1542 cm^{-1}), así, como la señales a 1365 cm^{-1} del CH₃ y de los grupos C-O (1033 cm^{-1}) característicos de la quitina.

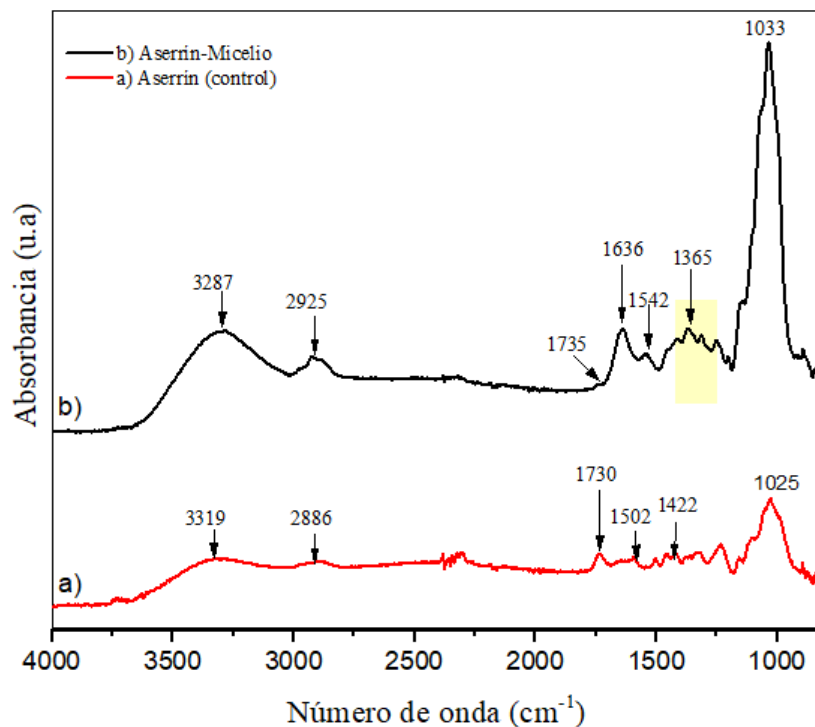


Figura 4.13. Espectros de FTIR de control y bioplástico del T3.

Tabla 4.4. Frecuencias FTIR de los grupos funcionales presentes en el T3.

Grupo funcional	Tensiones teóricas (cm ⁻¹)	Tipo de vibración	Tensiones experimentales T3 (cm ⁻¹)	
			Aserrín-Micelio	Aserrín
OH (Hidroxilo)	3500-3200	ν	3287	3319
CH ₂ (Metileno)	3000-2800	$\nu_{as,s}$	2925	2886
C=O (Carbonilo)	1800-1500	ν	1735	1730
C=O (Amida I)	1650-1620	ν	1636	-
NH (Amida II)	1560-1530	d	1542	-
C=C (Guaiacil-siringil)	1680-1500	ν	-	1502
O-CH ₃ (Metoxi)	1463-1420	d_{as}	-	1422
CH ₃ (Metilo)	1380-1295	d_s	1365	-
C-O (Enlace glucosídico)	1200-650	ν	1033	1025

ν = tensión, ν_{as} = tensión asimétrica, ν_s = tensión simétrica, d = deformación, d_s = deformación simétrica, d_{as} = deformación asimétrica.

En los espectros 4.14a y b, del T4 (aserrín/olote, aserrín/olote-micelio) se pueden identificar las señales características de los componentes de la madera de encino y olote. En ambos espectros, se observa el grupo funcional O-H en las señales a 3283 cm⁻¹ y 3339 cm⁻¹, en 2887 cm⁻¹ y 2925 cm⁻¹ se identifican las bandas de mediana intensidad de CH₂, la señal a 1734 cm⁻¹ y 1730 cm⁻¹ corresponde al grupo C=O observándose con menor intensidad para el tratamiento con micelio debido a su degradación ocasionada por el hongo como se obtuvo en los tratamientos anteriores. En el FTIR de la figura 4.14a el grupo O-CH₃ se percibe con una vibración en los intervalos de 1463-1420 cm⁻¹, la banda a 1591 cm⁻¹ se atribuye al grupo funcional C=C. Un pico intenso del enlace glucosídico (C-O) de estiramiento se aprecia en los intervalos 1200-650 cm⁻¹. En el análisis de la figura 4.14b al igual que en los espectros con micelio de los anteriores tratamientos, es notoria la aparición de la vibración de los enlaces de la quitina de la amida I (C=O) a 1641 cm⁻¹, la amida II a 1538 cm⁻¹ y el grupo funcional CH₃ a 1372 cm⁻¹.

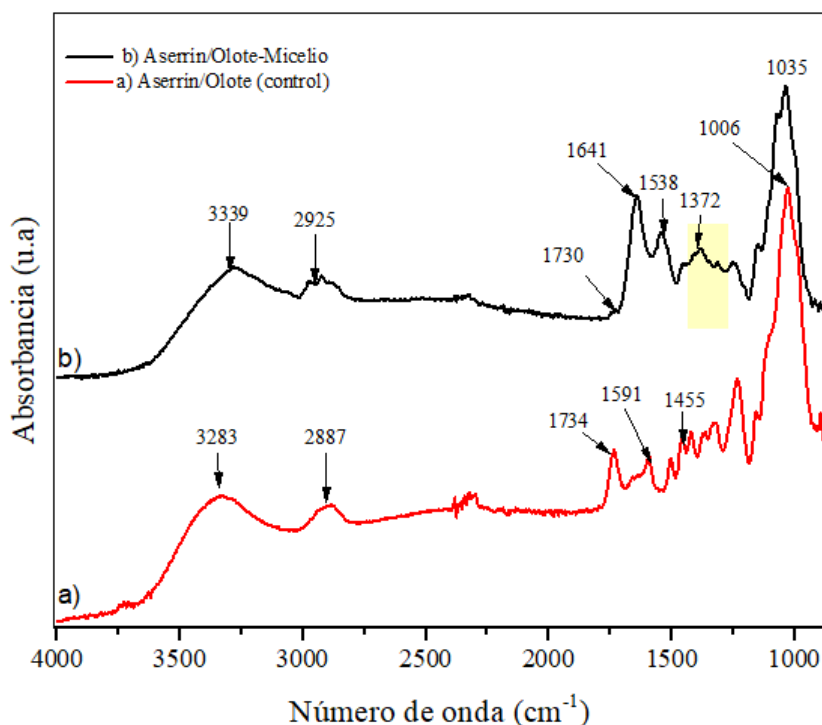


Figura 4.14. Espectros de FTIR de control y bioplástico del T4.

Tabla 4.5. Frecuencias FTIR de los grupos funcionales presentes en el T4.

Grupo funcional	Tensiones teóricas (cm ⁻¹)	Tipo de vibración	Tensiones experimentales T4 (cm ⁻¹)	
			Aserrín/Olote-Micelio	Aserrín/Olote
OH (Hidroxilo)	3500-3200	ν	3339	3283
CH ₂ (Metileno)	3000-2800	$\nu_{as,s}$	2925	2887
C=O (Carbonilo)	1800-1500	ν	1730	1734
C=O (Amida I)	1650-1620	ν	1641	-
NH (Amida II)	1560-1530	d	1538	-
C=C (Guaiacil-siringil)	1680-1500	ν	-	1591
O-CH ₃ (Metoxi)	1463-1420	d_{as}	-	1455
CH ₃ (Metilo)	1380-1295	d_s	1372	-
C-O (Enlace glucosídico)	1200-650	ν	1035	1006

ν = tensión, ν_{as} = tensión asimétrica, ν_s = tensión simétrica, d = deformación, d_s = deformación simétrica, d_{as} = deformación asimétrica.

Los espectros de los tratamientos con micelio mostraron bandas representativas del principal componente del micelio en la formación de la quitina, componente de la pared celular del *P. ostreatus*. La naturaleza química de los sustratos de alimentación y el tamaño en sus partículas son responsables de los cambios en los espectros infrarrojos.

ETAPA 3

4.6 Potencial de producción del bioplástico micelial

4.6.1 Análisis de EB

Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis estadístico de Fisher (valor F) y los valores P obtenidos permitieron evaluar la influencia de los factores críticos y la eficiencia del modelo.

Los resultados del ANOVA (Tabla 4.6) indican que hay diferencias significativas entre los grupos de tratamiento ($p < 0,05$). Por lo que los diferentes sustratos (T1=astilla; T2=astilla/olote; T3=aserrín; T4= aserrín/olote), presentan un efecto significativo en la EB del desarrollo de micelio del *P. ostreatus*.

Tabla 4.6. Análisis de varianza para la EB con una $\alpha=0.05$.

F.V.	GI	SC	CM	F	p-valor
Bloques	3	790.54	263.515	159.73	0.000000178
Error	8	13.20	1.650		
Total	11	803.74			

Comparación de medias

La tabla 4.7 muestra el análisis de comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0.05, permitiendo contrastar la existencia de diferencias estadísticas significativas para los valores medios de los tratamientos T1 y T3. El *P. ostreatus* tuvo un mayor desarrollo de micelio en los T2 y T4 alcanzando una EB de 91% y 92%, por lo cual propiciaron las mejores condiciones para el desarrollo de la biomasa vegetal, corroborando que la incorporación de olotes de maíz contribuye satisfactoriamente en el desarrollo del micelio debido a su rica composición en carbohidratos (78.9%) y al tamaño de partícula empleado (1 cm). Por otra parte, hubo un menor desarrollo en T1 y T3 (astilla-micelio, aserrín-micelio) obteniendo una EB de 71% y 84%. Realizando un análisis comparativo de la EB con los de la literatura, los resultados obtenidos en este estudio son superiores a la EB reportada por Martínez et al., (2012) quienes obtuvieron una EB de 49% y 61%, lograda con una cepa de *Pleurotus spp* cultivado en

rastrojo de maíz y cebada y a lo reportado por Tamayo, (2018) quien evaluó *P. ostreatus* en aserrín y grano de cebada obteniendo una EB de 73% y 71%.

El tamaño de partícula empleado y los espacios generados en los sustratos fueron de gran importancia, ya que permiten un intercambio de oxígeno para la colonización del micelio, para el T3 con tamaño de partícula de 1.33 mm en promedio en el sustrato a base de aserrín este fenómeno se ve limitado, ya que la compactación entre las partículas provoca retención de agua inhibiendo los espacios para la inserción de O₂ que hace un desarrollo de micelio más lento. En el T1 el tamaño de partícula de las astillas es más grande (3.5 * 0.2 cm) lo cual forma una estructura amorfa que permite la inserción de más oxígeno y no retiene suficiente agua por lo que el desarrollo de micelio se detiene. En los tratamientos donde hubo incorporación de olote con un tamaño de partícula de 1 cm mejora las condiciones de retención de agua, para el T2 el olote se intersecta en los espacios huecos entre las astillas y en el T4 permite que el sustrato sea menos compacto incrustándose entre el aserrín favoreciendo la oxigenación y facilitando el desarrollo del micelio.

Tabla 4.7. Comparación de medias prueba de Tukey con 0.05 de significancia.

Propiedad	Tratamientos	Media de tratamientos \pm SD
EB (%)	T1: Astillas-Micelio	84 \pm 0.917 b
	T2: Astillas/Olote-Micelio	92 \pm 1.446 a
	T3: Aserrín-Micelio	71 \pm 1.155 c
	T4: Aserrín/Olote-Micelio	91 \pm 1.528 a

Los resultados son expresados en promedio (n=3) \pm SD (desviación estándar).
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

En base a los resultados obtenidos, se demuestra que una buena fuente de nutrientes lignocelulósicos en los sustratos, el tamaño de partícula para la inserción de O₂, así como las condiciones dadas en la incubación (temperatura, tiempo, humedad y obscuridad) son factores que influyen de manera significativa para un buen desarrollo del micelio y por tanto de los bioplásticos.

4.6.2 Análisis de PMO

Análisis de varianza

En el análisis de varianza resultante de los datos mostrados en la tabla 4.8 se obtiene un valor de $F = 79.04$ y un valor de $p < 0.05$, indicando que hay diferencias significativas para la variable respuesta PMO.

Tabla 4.8. Análisis de varianza para la PMO con una $\alpha = 0.05$.

F.V.	G1	SC	CM	F	p-Valor
Bloques	3	333.85	111.28	79.04	0.00000027558
Error	8	11.26	1.4		
Total	11	345.11			

Comparación de medias

En la tabla 4.9 se aprecia por el análisis de comparación de medias, que no se indica diferencia entre los tratamientos T2 y T4, esto es coincidente con la EB. En T2 a base de astilla/olote y T4 de aserrín/olote el hongo ocasiona una mayor degradación de materia orgánica en los sustratos evaluados (67 y 69 %), el olote mejora las condiciones en los sustratos para un eficaz desarrollo del hongo (EB) y con ello una mayor PMO. Las medias obtenidas mediante la prueba de Tukey de la determinación de la PMO, a su vez muestran que el *P. ostreatus* ocasionó una menor descomposición en los tratamientos a base de madera 55% para T1 y 63% para T3. Al hacer una comparación con reportes bibliográficos, la PMO obtenida, es menor a la reportada por López et al., (2018) donde obtuvieron 72% de pérdida de masa para el *P. ostreatus*, 73% para *P. eryngii* y 71 % para *Pycnoporus sanguineus*, las cepas fueron colonizadas en polvo de coco con salvado de trigo. Los resultados en esta investigación, fueron superiores a lo reportado por Sales y Andrade (2011) para *Lentinus strigosus* en aserrín de marupa, palo de balsa y cajú suplementado con arroz y salvado de trigo donde obtuvieron una PMO de 42%, 59% y 48%.

Tabla 4.9. Comparación de medias prueba de Tukey con 0.05 de significancia.

Propiedad	Tratamientos	Media de tratamientos \pm SD
PMO (%)	T1: Astillas-Micelio	55 \pm 1.770 c
	T2: Astillas/Olote-Micelio	67 \pm 0.525 a
	T3: Aserrín-Micelio	63 \pm 1.407 b
	T4: Aserrín/Olote-Micelio	69 \pm 0.479 a

Los resultados son expresados en promedio ($n=3$) \pm SD (desviación estándar).

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ETAPA 4

4.7 Caracterización física

4.7.1 Densidad

Análisis de varianza

Los resultados de análisis de varianza para la densidad de bioplásticos mostrados en la tabla 4.10, presenta que hay diferencia estadística significativa entre los grupos de tratamientos evaluados.

Tabla 4.10. Análisis de Varianza de densidad con una $\alpha=0.05$.

F.V.	GI	SC	CM	F	p-Valor
Bloques	3	16026.9	5342.31	109.59	0.00000007763
Error	8	390	48.75		
Total	11	16416.9			

Comparación de medias

En la tabla 4.11 no se aprecian diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos T1 y T4. Sin embargo, en los demás tratamientos si se encontraron diferencias, lo cual indica que el tipo de sustrato utilizado influye en la densidad de los materiales obtenidos. Los valores promedio (medias) de densidad en los bioplásticos variaron entre 96 y 198 Kg/m³ obteniendo una reducción en su peso debida a la degradación de la materia orgánica provocada por el *P. ostreatus* como se vio en el análisis de PMO. Los valores obtenidos de los bioplásticos se asemejan a las densidades que varían entre 123 y 237 kg/m³ obtenidos por Colmenares et al., (2018) en materiales ecológicos donde utilizaron *P. ostreatus* con residuos de bagazo de caña, cascara de café, aserrín de madera y pasto seco, donde dichos autores aseguran que esos materiales pueden aprovecharse como material de embalaje (EPS) en la protección de diversos productos. Por otra parte, López, (2014) obtuvo una densidad que varió entre 159 hasta 209 Kg/m³ en un biomaterial obtenido a partir de *Pleurotus sp.* y residuos de *Triticum sp.* cubiertos con ceras vegetales donde sugieren su uso como materiales de embalaje de electrodomésticos o empaque de alimentos.

Tabla 4.11. Comparación de medias prueba de Tukey con 0.05 de significancia.

Propiedad	Tratamientos	Media de tratamientos \pm SD
Densidad (Kg/m ³)	T1: Astillas-Micelio	147.67 \pm 5.69 b
	T2: Astillas/Olote-Micelio	96 \pm 6.24 c
	T3: Aserrín-Micelio	197.67 \pm 4.73 a
	T4: Aserrín/Olote-Micelio	162.33 \pm 10.07 b

Los resultados son expresados en promedio (n=3) \pm SD (desviación estándar).

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

4.7.2 Absorción de agua

Análisis de varianza

Una vez analizada la información de la tabla 4.12 del ANOVA en los diferentes tratamientos, se encontró que no existe evidencia estadística suficiente que influya en el porcentaje de absorción de agua.

Tabla 4.12. Análisis de Varianza para la absorción de agua con una $\alpha=0.05$.

F.V.	Gl	SC	CM	F	p-Valor
Bloques	3	934.1	311.38	3.88716	4.066181
Error	8	640.8	80.10		
Total	11	1574.9			

En la tabla 4.13 de comparación de medias con el método de Tukey se corrobora lo analizado en la tabla 4.12 no presentando diferencias significativas entre los tratamientos. En los T3 y T4 se utilizó un menor tamaño de partícula en los sustratos (1.36 mm aserrín, 1 cm olote) sin considerar su reducción en tamaño por la PMO ocasionada por el hongo en los bioplásticos finales, obteniendo una mayor área superficial para la absorción de agua (56.8, 49.4 %) contrario a T1 y T3 (40.2, 33.6 %). Los porcentajes de absorción de agua fueron bajos, debido a la hidrofobicidad (repelencia de agua) atribuida a la naturaleza hidrofóbica de la quitina y proteínas (hidrofobinas) que conforman la pared celular del hongo, desarrollada aglomerando los sustratos y en la piel fúngica que se desarrolló en el exterior de los materiales y que sirvió como barrera para la entrada de agua (Haneef et al., 2017; Feijóo et al., 2021). En comparación con la literatura, López, (2014) obtuvo un porcentaje de absorción de agua mayor de 114 a 274 % en el desarrollo de biomateriales alternativos al poliestireno expandido a partir de hongos y cubiertas comestibles,

por otra parte, Rodríguez, (2018) obtuvo un 15% de absorción de agua en un material biobasado compuesto de micelio de *P. ostreatus* y *T. versicolor* con cáscara de nuez y rastrojo de alfalfa.

Tabla 4.13. Comparación de medias prueba de Tukey con 0.05 de significancia.

Propiedad	Tratamientos	Media de tratamientos \pm SD
Absorción de agua (%)	T1: Astillas-Micelio	40.2 \pm 4.28 a
	T2: Astillas/Olote-Micelio	33.6 \pm 15.02 a
	T3: Aserrín-Micelio	56.8 \pm 7.30 a
	T4: Aserrín/Olote-Micelio	49.4 \pm 4.82 a

Los resultados son expresados en promedio (n=3) \pm SD (desviación estándar).

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

En base a los resultados de la caracterización física de densidad y absorción de agua realizados hasta el momento, los bioplásticos de micelio fúngico podrían utilizarse como material de embalaje para la protección de diversos productos como electrodomésticos, en el desarrollo de muebles, en la construcción no estructural y no expuesta al aire libre por su capacidad de absorción de humedad (Fuentes, 2020), siendo los bioplásticos de astillas-micelio (T1) y astillas/olote-micelio (T2) los más aptos para dichos fines por su menor densidad y menor porcentaje de absorción de agua.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

5.2 Conclusión general

Es posible el desarrollo de un bioplástico a través del crecimiento en biomasa micelial como residuos lignocelulósicos: astilla, aserrín de encino y olote de maíz, que sirven como sustratos. Estos sustratos de bajo costo habilitan la producción de biomasa micelial con clara ventaja sobre los materiales de origen fósil, siendo una alternativa sostenible y ambientalmente viable.

5.1 Conclusiones particulares

En este capítulo se resumen las conclusiones más importantes de acuerdo a los objetivos particulares planteados:

- I. Se determinó por análisis elemental la composición química del encino y olote. Donde el olote presentó la mayor concentración de carbono y por lo tanto es la mejor fuente de nutrientes. Al presentar ambos (60-80%) una concentración mayor al 50% de carbono son ideales para el desarrollo micelial.
- II. En los análisis morfológicos en MO y SEM mostraron mayor crecimiento de micelio en los sustratos de astilla/olote y aserrín/olote. Observándose un mayor crecimiento sobre estos dos sustratos en los primeros 15 días de colonización. Posterior a estos días, los sustratos restantes astilla y aserrín favorecieron también el desarrollo micelial.
- III. El análisis de FTIR de los micelios desarrollados sobre los cuatro sustratos (T1-T4), resultó en la determinación de los grupos funcionales amida I (CO-NH₂-), amida II (CO-NHR), glucosídicos (CO) y éter (COC pyr). Con ellos se determinó la formación de la quitina que es uno de los principales componentes del micelio y que confiere a un material propiedades de plasticidad.
- IV. Se obtuvieron los resultados de la eficiencia biológica (EB) y pérdida de materia orgánica (PMO), los cuales fueron mayores para los sustratos que contienen olote (T2 y T4) en comparación con los sustratos donde no hubo su incorporación (T1 y T3).
- 4.1. Al reducir el tamaño de la partícula de olote se incrementó su eficiencia para el crecimiento del micelio. Este resultado se obtuvo como consecuencia de la reducción en el intercambio de oxígeno e incremento de la retención de humedad.

- 4.2. El desarrollo del micelio disminuyó la densidad y absorción de agua para los todos los sustratos. Esto fue motivado por un incremento del área superficial del micelio en comparación con los sustratos y por su carácter hidrofóbico. La menor densidad y absorción de agua se observó para los sustratos que contienen olote (T2 y T4).

5.3 Perspectiva

De acuerdo a las dos caracterizaciones físicas realizadas (densidad y absorción de agua), los bioplásticos miceliales obtenidos en esta investigación, pueden presentar alternativas para el uso de embalaje como sustituto del EPS como protección de diversos productos como electrodomésticos, así como material de construcción no estructural y no expuesta al aire libre por su capacidad de absorción de agua, siendo los bioplásticos de astillas-micelio (T1) y astillas-olote-micelio (T2) los más aptos para dichos fines, por su menor densidad y absorción de agua. Podrían utilizarse a su vez en numerosas aplicaciones en arquitectura, decoración y fabricación de muebles debido a su fácil moldeo, sin embargo, es deseable considerar más análisis físico-mecánicos para poder asignar un uso eficaz.

PROPUESTAS

- Realizar análisis de biodegradabilidad en tierra y agua, haciendo énfasis en agua debido a que no existen reportes de este estudio y es el entorno más contaminado por este tipo de materiales.
- Evaluar la compostabilidad para establecer su aporte benéfico en el desarrollo de nuevas plantas.
- Completar los estudios físico-mecánicos para poder tener una aplicación certera de los bioplásticos.
- Efectuar nuevos estudios utilizando diferentes tamaños de partícula en los sustratos, así como realizar tratamientos utilizando únicamente olote.
- Elaborar un análisis económico de producción a escala industrial y compáralo con los costos de los plásticos tradicionales.

BIBLIOGRAFÍA

- Ariza, M. (2021). Absorción de agua a presión atmosférica y capilaridad de materiales cerámicos de construcción. *Materiales Industriales, Ingeniería Técnica Industrial – Mecánica*, 1-2. Obtenido de <https://w3.ual.es/~mjariza/pract7.pdf>
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F., Arguelles, W., Desbrieres, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42(8): 3569-3580. doi:[https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00713-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00713-8)
- Camere, Y., Young-Ah, G., Yong-Tae, J., & Chi-Hyun, S. (2007). Anti-complementary Activities of Exo- and Endo-biopolymer Produced by Submerged Mycelial Culture of Eight Different Mushrooms. *Mycobiology*, 35(3): 145-149.
- Camere, S., & Karana, E. (2018). Fabricating materials from living organisms: an emerging design practice. *Journal of Cleaner Production*, 186(1): 570-584. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.03.081>
- Cámpo, C., & Andrade, M. (2011). Aproveitamento de resíduos madeiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. *Acta Amazonica*, 41(1): 1-8.
- Colmenares, E., Bautista, L., & Oliveros, C. (2018). Material ecológico con fines de embalaje a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* y residuos agroindustriales. *Científica Unet*, 30(1): 324-332.
- Córdoba, J., Salcedo, E., Rodríguez, R., Zamora, F., Manríquez, R., Contreras, H., Delgado, E. (2013). Caracterización y valoración química del olote: degradación hidrotérmica bajo condiciones subcríticas. *Revista latinoamericana de química*, 41(3):171-184.
- Díaz, K., Casanova, M., León, C., & Gil, L. (2019). Production of *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) ICFC 153/99 grown on different waste lignocellulosic. *Arnaldoa*, 26(3):1177-1184.
- Fernández, L. (2016). Desarrollo de materiales bioplásticos proteicos con elevada capacidad de absorción de agua. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- Fígoli, C., Rojo, R., Gasoni, L., Kikot, G., Leguizamón, M., Gamba, R., Alconada, M. (2016). Characterization of *Fusarium graminearum* isolates recovered from wheat samples from Argentina by Fourier transform infrared spectroscopy: Phenotypic diversity and detection of specific markers of aggressiveness. *International Journal of Food Microbiology*, 244 (2017): 36-42.

- Fuentes, I., & C, M. (2020). Biofabricación. Micelio como material de construcción: Biocomposite en sustratos lignocelulósicos. Universidad Politécnica de Madrid, Tesis de grado.
- Gaitán, R., Salmenes, D., Pérez, R., & Mata, G. (2006). Practical manual of the mushroom culture: Isolation, sowing and production. Xalapa, Veracruz, México.
- García, N., & Bermúdez, R. C. (2011). Formulations of substrates in the production of edible mushroom *Pleurotus*. 272-282.
- García, V., & Benítez, G. (2017). Wood preservatives and microbial exudates with antagonistic activity against biological agent. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1): 56-78.
- Gutiérrez, S., Domínguez, E., Fernández, A., Cervantes, J., Medellín, L., & Mendoza, B. (2021). Biomaterial obtained from fungus micellium (*Ganoderma lucidum*) and agricultural wastes. *South Florida Journal of Development*, 2(3): 4663-4681.
- Guzmán, M. (2015). Remoción de la aberración cromática lateral en imágenes de microscopía óptica de campo claro. Tesis doctoral, Instituto Potosino de investigación científica y tecnológica, A.C.
- Haneef, M., Ceseracciu, L., Canale, C., Bayer, I., Heredia, J., & Athanassiou, A. (2017). Advanced materials from fungal mycelium: fabrication and tuning of physical properties. *Scientific Reports*, 7:41292.
- Ha-Thi, H., Chun-Li, W., & Chong-H, W. (2015). The Effects of Different Substrates on the Growth, Yield, and Nutritional Composition of Two Oyster Mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology*, 43(4); 423-434.
- Houette, T., Foresi, B., Maurer, C., & Gruber, P. (2020). Manufacturing and exposing experimental panels in a facade setting. *Center for biomedical reserch and innavation*, 3-23.
- Huynh, T. J. (2017). Mycelium Composites: A Review of Engineering. *Journal of*, 11: 241-257.
- Ipohorski, M., & Bozzano, P. (2013). Microscopia electrónica de barrido en la caracterización de los materiales. *Ciencia e investigación*, 63(3): 43-53.
- Islam, M., Tudryn, G., Bucinell, R., Schadler, L., & Picu, R. (2017). Morphology and mechanics of fungal micellium. *Scientific Reports*, 8 (1): 4206.
- Jackson, B. (9 de octubre de 2018). Challenges and Considerations of Using Wood Substrates: Chemical Properties.

- Jones, M., Huynh, T., Dekiwadia, C., Daver, F., & John, S. (2017). Mycelium compounds: a review of engineering characteristics and growth kinetics. *Bionanoscience*, 11(4): 241-257.
- Jones, M., Mautner, A., Luenco, S., Bismarck, A., & John, S. (2020). Engineered mycelium composite construction materials from fungal biorefineries: A critical review. *Materials and Design*, 187(2020): 0264-1275.
- Khalaf, A. (2004). Production and Characterization of Fungal Chitosan Under Solid-State Fermentation Conditions. *International journal of agriculture and biology*, 6(6): 1033-1036.
- López, J. (2014). Desarrollo de biomateriales alternativos al poliestireno expandido a partir de hongos y cubiertas comestibles. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila.
- Luna, J., Cordoba, L., Gil, K., & Romero, I. (2013). Effect of Agroforestry Residues Partially Biodegraded by *Pleurotus*. *Acta Biológica Colombiana*, 18(2): 365-374.
- Martínez, J. (2012). Cultivo de *Pleurotus ostreatus* en el Valle del Fuerte, Sinaloa: una alternativa de aprovechamiento de esquilmos agrícolas. Universidad Autónoma Indígena de México, Tesis doctoral 18-31.
- Martínez, M., Cruz, P., & Sánchez, C. (2012). Eficiencia biológica y contenido de cenizas en *Pleurotus spp* en diferentes sustratos agrícolas alternativos en Temoaya Estado de México.
- Megias, M., Molist, P., & Pombal, M. (2019). Atlas de histología vegetal y animal.
- Meza, P. (2016). Elaboración de bioplásticos a partir de almidón residual obtenido de peladoras de papa y determinación de su biodegradabilidad a nivel laboratorio. Tesis de grado, Universidad de Lima Perú.
- Nashiruddin, M., Kai, C., Fadziyana, A., Roshanida, R., Jau, L., Nur, W., & Hesham, E. (2021). Effect of grown factors on the production of micelium-based biofoam. *Clean Technologies and Enviromental Policy*.
- Ntuli, V., & Inocente, H. (2013). Sustainable waste management by production of activated carbon from agroforestry residues. *South African Journal of Science*, 109 (2): 1-6.
- Peniche, C. (2006). Estudios sobre quitina y quitosana. Ph.D, 11(2): 24-32.
- Peña, E., & Acuña, E. (2015). Residuos de la cosecha forestal, aprovechamiento. En *Rastrojo de cultivos y residuos agroforestales* (págs. 159-173). Chillan: Ministerio de agricultura.

- Pérez, C., & Dávalos, R. (2008). Some anatomical and technological characteristics of 24 *Quercus* wood species (oaks) of Mexico. *Madera y Bosques*, 14(3): 43-80.
- Piedra, R. (2008). Manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias. *Tecnología en Marcha*, 21(1): 123-132.
- Pique, T., & Vázquez, A. (2012). Uso de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) en el estudio de la hidratación del cemento. *Concreto y cemento. Investigación y desarrollo*, (3)(2): 2007-3011.
- Pontón, J. (2008). The fungal cell wall and the mechanism of action of lanidula fungin. *Revista iberoamericana de micología*, 25 (2): 78-82.
- Reyes, D. (2017). Generación de un biomaterial compuesto por fibra vegetal y micelio de hongo y su aplicabilidad. Universidad Autónoma de Nuevo León, Tesis de grado.
- Rodríguez, S. (2018). Material biobasado compuesto por el micelio del hongo *Trametes Versicolor* y cáscaras e nuez Juglans Regia. *RChD: Creación y Pensamiento*, 3(5): 1-15.
- Rutiaga, J., Weiderpass, E., & Strobel, C. (2000). Composición química del duramen de la madera de *Quercus candicans* Neé. *Madera y Bosques*, 6(2):73-80.
- Sales, C., & Andrade, M. (2011). Aproveitamento de resíduos madeireiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. *Acta Amazônica*, 41(1): 1-8.
- Sánchez, E. (2018). Efecto del eritritol sobre el desarrollo y fructificación de *Pleurotus ostreatus*. Tesis maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, 14-17.
- Schmidt, O. (2006). *Wood and Tree Fungi*. Germany: Springer.
- Solla, F., Rodríguez, R., & Merino, A. (2001). Evaluación del aporte de cenizas de madera como fertilizante de un suelo ácido mediante un ensayo en laboratorio. *Invest. Agr: Prod. Prot.Veg*, 16(3): 379-393.
- Tamayo, E. (2018). Aplicación de materiales amigables con el medio ambiente, sustitutos al poliestireno expandido para su uso en hidroponía. Tesis doctoral, Universidad Mayor de San Marcos.
- Varner, M., & Álvarez, M. (2010). Use of lignocellulosic forest residues for oyster mushroom production (*Pleurotus ostreatus*). 21(2):13-20.
- Wagner, C. (2014). Food packaging forum. Obtenido de <https://www.foodpackagingforum.org/es/envasado-de-alimentos-y-salud/bioplasticos>

- Yang, W., Guo, F., & Wan, Z. (2013). Yield and size of oyster mushroom grow on rice/wheat straw basal substrate supplemented with cotton seed hull. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20(13): 333-338.
- Zavala, K. (2010). Obtención, semipurificación y caracterización de la enzima quitina desacetilasa del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* para la conversión de quitina a quitosan por medio de desacetilación enzimática. Tesis de grado, Universidad nacional Autónoma de México.