



Máster de Ingeniería Industrial

Trabajo de Fin de Máster

Diseño, síntesis y caracterización de un material compuesto  
extruible a base de micelio para bioimpresión

Autor

Nicolás Olabarría García

Supervisado por

Eva Paz Jiménez

Madrid

Agosto 2022

Declaro, bajo mi responsabilidad, que el Proyecto presentado con el título  
**Diseño, síntesis y caracterización de un material compuesto  
extruible a base de micelio para bioimpresión**  
en la ETS de Ingeniería - ICAI de la Universidad Pontificia Comillas en el  
curso académico 2021/2022 es de mi autoría, original e inédito y  
no ha sido presentado con anterioridad a otros efectos. El Proyecto no es  
plagio de otro, ni total ni parcialmente y la información que ha sido tomada  
de otros documentos está debidamente referenciada.

Fdo.: Nicolás Olabarría García      30/ Agosto/ 2022  
Fecha: ...../ ...../ .....



Autorizada la entrega del proyecto

EL DIRECTOR DEL PROYECTO



Fdo.: Eva Paz Jiménez      30 / Agosto / 2022  
Fecha: ...../ ...../ .....



Máster de Ingeniería Industrial

Trabajo de Fin de Máster

Diseño, síntesis y caracterización de un material compuesto  
extruible a base de micelio para bioimpresión

Autor

Nicolás Olabarría García

Supervisado por

Eva Paz Jiménez

Madrid

Agosto 2022





# DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN MATERIAL COMPUESTO EXTRUIBLE A BASE DE MICELIO PARA BIOIMPRESIÓN

**Autor:** Olabarría García, Nicolás.

**Director:** Paz Jiménez, Eva.

**Entidad Colaboradora:** ICAI – Universidad Pontificia Comillas.

## **Resumen:**

Hoy en día, la mayor parte de productos utilizados en el día a día tienen una vida útil tras la cual son descartados y desechados. Pasan a alimentar vertederos y centros de tratamiento de residuos durante largos periodos de tiempo, esperando a ser descompuestos. Esta ocupación y contaminación del medio dificulta la provisión de recursos. Para evitar esto, es necesario focalizarse en la creación de productos que se puedan reutilizar o no tarden largos periodos de tiempo en descomponerse.

A raíz de esto, se propone un material que utilice el micelio como base. El micelio es el entramado que forma la mayor parte de un hongo. Esta red forma las setas con las que todo el mundo está familiarizado. Estas, al llegar a la madurez esparcirán esporas, las cuales originan una nueva red de micelio.

El objetivo de este proyecto es conseguir diseñar un material que utilice hongos que colonicen una pieza y, de esta manera, otorgarle una mayor integridad estructural. Este método ha visto un reciente auge en la industria, con compañías utilizándolo para aplicaciones tan diversas como pudieran ser la alimentación, la construcción o la moda. En este proyecto se intentará ir un paso más allá y crear

una pasta que se pueda extruir haciendo uso de una impresora 3D adaptada.

Para ello, se seguirá el proceso representado en la figura 1. Este proceso es secuencial, dado que si alguna de las etapas no tiene un resultado positivo, no es posible seguir a la siguiente.



Figura 1: Diagrama del proceso a seguir

Para conseguir el material, se tienen tres elementos esenciales:

- **Sustrato:** Para que el hongo pueda crecer, es necesario aportarle nutrientes. Este es el trabajo del sustrato, que proveerá el medio para que el hongo pueda desarrollarse y formar la estructura que se desea.
- **Agente coagulante:** Este elemento será el responsable de conferir las propiedades reológicas adecuadas al sustrato. Esto quiere decir que será el que convierta el serrín en una pasta extruible.
- **Hongo:** La pieza central del material. Este organismo será el responsable de colonizar el producto impreso. En este proceso creará la matriz que una las partículas del serrín.

Para conseguir el hongo necesario para el proyecto se crearon cultivos que proveyesen el micelio necesario. Estos se mantuvieron en condiciones óptimas de crecimiento para las especies seleccionadas. La temperatura media rondaba los 30°C, y la humedad estaba en torno al 80%.

El resultado obtenido en este proyecto, no fue el esperado. El hongo, al contrario de la hipótesis planteada de que iba a crecer por todo el volumen, se desarrolló nada más por la superficie de las piezas impresas. Por ello, no se consiguió realizar ensayos mecánicos o físicos sobre piezas que tuvieran el estándar deseado. Sin embargo, se llevaron a cabo estudios sobre piezas conseguidas que mostraban una integridad estructural aceptable. Adicionalmente, no se consiguió incubar las probetas creadas bajo condiciones óptimas.

En futuros proyectos sobre la materia sería recomendable la incubación de las probetas en condiciones óptimas. Para ello, es recomendable la monitorización de las partículas de dióxido de carbono, factor que no se tuvo en cuenta en el desarrollo de este proyecto. Finalmente, sería importante estudiar el efecto que tiene el grado de deacetilación sobre la viscosidad del agente coagulante.

Este proyecto se hizo en colaboración con Gonzalo Borja Reyes Uzquiano, quien desarrolló el equipo necesario para la extrusión y la incubación del material.



# DESIGN, SYNTHESIS Y CHARACTERIZATION OF AN EXTRUDABLE MYCELIUM-BASED COMPOSITE MATERIAL

**Author:** Olabarría García, Nicolás.

**Director:** Paz Jiménez, Eva.

**Collaborating entity:** ICAI – Universidad Pontificia Comillas.

## Summary:

Today, most products used in everyday life have a useful life, after which they are discarded and thrown away. They are fed into landfills and waste treatment centres for long periods, waiting for decomposition. This occupation and pollution of the environment hamper the provision of resources. It is necessary to focus on creating products that can be reused or do not take a long time to decompose to avoid this scenario.

As a result, a material using mycelium as a base seems like a reasonable alternative. Mycelium is the web that forms the bulk of a mushroom. This network creates mushrooms. When these fruiting bodies reach maturity, they will spread spores. These seeds will start a new mycelium network, beginning the cycle anew.

This project aims to design a material that uses fungi to colonise a part and thus give it greater structural integrity. This method has seen a recent boom in the industry, with companies using it for applications as diverse as food, construction and fashion. This thesis will attempt to go one step further and create an extrudable paste for 3D-printing applications.

The diagram in figure 2 represents the path followed to accomplish the extrusion of the material. Success in a task determines the possibility of being able to go on to the next step. Therefore, the process has a sequential nature.



Figura 2: Process diagram.

Three essential components form the material:

- **Substrate:** Fungus growth demands a constant supply of nutrients. The substrate will provide the medium for the fungus to develop and form the desired structure.
- **Coagulating agent:** This element will be responsible for giving the substrate the appropriate rheological properties. The coagulating agent will be the one that converts the sawdust into an extrudable paste.
- **Fungus:** The centrepiece of the material. This organism will be responsible for colonising the printed product. In this process, the fungus will create the matrix that binds the sawdust particles together.

Cultures provided the necessary mycelium needed in the project. These were maintained under optimal growth conditions for the selected species. The average temperature was around 30°C, and the humidity was around 80%.

The results obtained in this project were not as expected. Contrary to the initial hypothesis of how the fungi would spread throughout the whole volume, it only grew on the surface of the printed piece.

As a result, mechanical or physical tests on parts of the desired standard could not be carried out. However, extruded pieces that showed acceptable structural integrity were analysed. In addition, it was not possible to incubate the specimens created under optimal conditions.

In future projects on the subject, it would be advisable to incubate the specimens under optimal conditions. To this end, it is advisable to monitor the carbon dioxide particles. Even though this parameter has a considerable influence on the product, it was not taken into account. Finally, it would be primordial to study the effect of the degree of deacetylation on the viscosity of the coagulating agent.

This project was a collaboration with Gonzalo Borja Reyes Uzuquiano, who designed the necessary equipment for the extrusion and incubation of the material.



# Índice general

<b>1</b>	<b>Estado del arte</b>	<b>1</b>
1.1	Introducción . . . . .	1
1.2	Micelio y biomateriales . . . . .	4
1.2.1	Definición de conceptos importantes . . . . .	4
1.2.2	El micelio en la industria . . . . .	7
1.3	Revisión bibliográfica . . . . .	14
1.3.1	Método de extrusión utilizado . . . . .	14
1.3.2	Tipo de hongo utilizado . . . . .	17
1.3.3	Sustrato y agente coagulante . . . . .	18
1.3.4	Resultados obtenidos . . . . .	20
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>23</b>
2.1	Cultivo de las especies de hongos . . . . .	23
2.2	Creación de material extruible . . . . .	24
2.3	Extrusión del material . . . . .	25
2.4	Caracterización del material . . . . .	26
<b>3</b>	<b>Metodología experimental</b>	<b>29</b>
3.1	Hipótesis . . . . .	30
3.1.1	Hongo . . . . .	30
3.1.2	Agente coagulante . . . . .	31
3.1.3	Sustrato . . . . .	32
3.2	Materiales . . . . .	32
3.2.1	Hongo . . . . .	32
3.2.2	Agente Coagulante . . . . .	35
3.2.3	Sustrato . . . . .	38
3.3	Método . . . . .	40
3.3.1	Hongo . . . . .	43
3.3.2	Agente coagulante . . . . .	46
3.3.3	Sustrato . . . . .	48
3.4	Diseño experimental . . . . .	48

3.4.1	Hongo . . . . .	50
3.4.2	Agente coagulante . . . . .	52
3.4.3	Sustrato . . . . .	53
<b>4</b>	<b>Resultados</b>	<b>55</b>
4.1	Creación del material . . . . .	56
4.1.1	Cultivos . . . . .	57
4.1.2	Agente Coagulante . . . . .	65
4.2	Ensayos mecánicos . . . . .	71
4.2.1	Ensayo de viscosidad dinámica . . . . .	72
4.2.2	Ensayo de Flexión a tres puntos . . . . .	75
4.2.3	Ensayo de Compresión . . . . .	76
4.2.4	Ensayo de Dureza . . . . .	78
4.3	Conclusiones . . . . .	80
4.4	Futuras líneas de investigación . . . . .	82
<b>A</b>	<b>Objetivos de Desarrollo Sostenible</b>	<b>85</b>
A.1	Ciudades y comunidades sostenibles . . . . .	85
A.2	Consumo y producción sostenibles . . . . .	86
	<b>Bibliografía</b>	<b>87</b>

# Índice de figuras

1	Diagrama del proceso a seguir . . . . .	v
2	Process diagram. . . . .	viii
1.1	Generación de residuo, reciclaje y recuperación. <b>Fuente:</b> <i>Eurostat</i> . . . . .	1
1.2	Degradación del plástico. <b>Fuente:</b> <i>Chamas et al.</i> . . . . .	2
1.3	Plásticos biodegradables, compostables y de origen biológico. <b>Fuente:</b> <i>ETC/WMGE and EEA</i> . . . . .	3
1.4	Partes del hongo y ciclo de vida. . . . .	5
1.5	Estructura de la quitina. <b>Fuente:</b> <i>Majeti N.V. Ravi Kumar</i> . . . . .	6
1.6	Fundadores de Ecovative y patente del proceso utilizado. . . . .	7
1.7	Bolso <i>Victoria</i> de Hermès creado con micelio. <b>Fuente:</b> <i>Coppi Barbieri</i> . . . . .	8
1.8	Cuero hecho a base de micelio y las granjas utilizadas para su creación . . . . .	9
1.9	Porcentaje de las emisiones y consumo de energía atribuible a los diferentes sectores. <b>Fuente:</b> <i>IEA</i> . . . . .	10
1.10	Tendencia del coste de los materiales. <b>Fuente:</b> <i>National Association of Home Builders</i> . . . . .	10
1.11	Estructura de micelio creada para la exposición de arquitectura y urbanismo bienal de Seúl. <b>Fuente:</b> <i>Heisel et al.</i> . . . . .	11
1.12	Sustitutos de la carne a base de micelio. . . . .	13
1.13	Contaminantes que es posible mitigar a través de la micorremediación. <b>Fuente:</b> <i>Akhtar et al.</i> . . . . .	13
1.14	Impresora y cabezal utilizado en el estudio de <i>Bhardwaj et al.</i> . . . . .	15
1.15	Sistema utilizado en el paper de Chen et al. <b>Fuente:</b> <i>Chen et al.</i> . . . . .	16
1.16	<i>Fomes fomentarius</i> . <b>Fuente:</b> <i>Ultimate Mushroom</i> . . . . .	17
1.17	<i>Ganoderma Lucidum</i> . <b>Fuente:</b> <i>OutGrow</i> . . . . .	18
1.18	Curvas de tensión-deformación del material conseguido por <i>Soh et al.</i> <b>Fuente:</b> <i>Soh et al.</i> . . . . .	20
1.19	Módulos elásticos conseguidos. . . . .	20
1.20	Viscosidad del material . . . . .	21
2.1	Cultivo utilizado en el desarrollo del proyecto. . . . .	24
2.2	Creación del material. . . . .	25

2.3	Extrusión del material . . . . .	26
2.4	Caracterización del material. . . . .	27
3.1	Organización del capítulo . . . . .	29
3.2	Cultivo colonizado. . . . .	31
3.3	Impresora creada para la extrusión del material. Su diseño se puede encontrar en el trabajo de Gonzalo Borja Reyes Uzquiano [15]. . . . .	32
3.4	Hongos seleccionados para el desarrollo del proyecto. . . . .	35
3.5	Pasta resultante de la mezcla con el chitosan. . . . .	36
3.6	Quitina y chitosan . . . . .	37
3.7	Sustrato en el proceso de ser molido y mezclado. . . . .	39
3.8	Fibra de serrín. . . . .	40
3.9	Diagrama del proceso seguido. . . . .	42
3.10	Cultivos en tarros. . . . .	44
3.11	Cultivos en la calefactora. . . . .	45
3.12	Cultivos en Agar . . . . .	46
3.13	Mezclado del chitosan con la solución de ácido acético. . . . .	47
3.14	Proceso seguido para conseguir el sustrato. . . . .	48
3.15	Probeta utilizada para los ensayos de Flexión. . . . .	49
3.16	Ensayo de dureza para una pieza creada con el material. . . . .	50
3.17	Placa de petri con una muestra de crecimiento del micelio. . . . .	51
3.18	Contaminación de un cultivo de tarro. . . . .	52
3.19	Viscosímetro rotacional. <b>Fuente:</b> <i>GAOTek</i> . . . . .	52
4.1	Primera extrusión del material siendo colonizada superficialmente. . . . .	56
4.2	Tarro de cultivo de <i>G. Lucidum</i> . . . . .	57
4.3	Hifas de <i>P. Ostreatus</i> . . . . .	58
4.4	Probeta utilizada para controlar el desarrollo del micelio por el sustrato. . . . .	59
4.5	Contaminación sufrida en los cultivos de tarro. . . . .	60
4.6	Esporas encontradas en el algodón del tarro. . . . .	61
4.7	Comparación entre esporas de <i>G. Lucidum</i> y un contaminante. . . . .	62
4.8	Extracción de muestras de micelio de <i>G. Lucidum</i> . . . . .	63
4.9	Extracto del micelio. . . . .	64
4.10	Solución creada con la gelatina de piel bovina. . . . .	66
4.11	Gel de chitosan en su estado ácido. . . . .	67
4.12	Gel de chitosan. . . . .	68
4.13	Placas de Agar y su preparación. . . . .	69
4.14	Solución de chitosan. . . . .	70
4.15	Probetas esterilizadas. . . . .	71
4.16	Viscosidad dinámica del chitosan. . . . .	73



4.17	Viscosidad dinámica del material. . . . .	74
4.18	Ensayo de Flexión a tres puntos. . . . .	75
4.19	Curva de esfuerzo-deformación a compresión. . . . .	76
4.20	Comparación de las resistencias máximas de compresión de las muestras. . . . .	77
4.21	Ensayos de dureza Shore A. . . . .	78
4.22	Unidad de Tratamiento de Aire diseñada en el proyecto de Gonzalo Borja Reyes Uzquiano. . . . .	82
A.1	Ciudades y comunidades sostenibles. <b>Fuente:</b> <i>Naciones Unidas</i> . . .	85
A.2	Producción y consumo responsables. <b>Fuente:</b> <i>Naciones Unidas</i> . . .	86



# Índice de cuadros

1.1	Consumo de microplásticos por los humanos. <b>Fuente:</b> <i>D.Cox, et al.</i>	3
1.2	Clasificación de los polímeros naturales según origen. <b>Fuente:</b> <i>Derval dos Santos Rosa and Denise Maria Lenz</i>	6
1.3	Resistencia característica a la compresión de fábricas usuales $f_k \left[ \frac{N}{mm^2} \right]$ . <b>Fuente:</b> <i>Ministerio de Fomento</i>	11
1.4	Características de las impresoras utilizadas	16
1.5	Muestras recogidas por <i>Chen et al.</i> <b>Fuente:</b> <i>Chen et al.</i>	19
3.1	Comparación de los distintos hongos.	34
3.2	Cultivos creados en función de sustrato y hongo utilizado.	43
4.1	Viscosidad de la solución del quitosán dependiendo en el porcentaje de quitosán.	72
4.2	Viscosidad dinámica de la mezcla de quitosán con sustrato inoculado con <i>G. Lucidum</i> .	73
4.3	Resistencia a compresión de las diferentes muestras.	77
4.4	Ensayos de dureza Shore A.	79



# Capítulo 1

## Estado del arte

### 1.1 Introducción

El plástico se introdujo en nuestras vidas en 1862 con el nombre de *Parkesina* [1]. Si bien el objetivo inicial era el de suplantar al marfil, fue tomando cada vez más importancia en la sociedad. Hoy en día resulta casi imposible imaginar una vida sin el plástico, es parte imprescindible de prácticamente todos los elementos que forman parte de nuestro día a día.

Sin embargo, el gran papel que desempeña este material en nuestra sociedad, también conlleva una gran generación de residuos. En 2019 de media el ciudadano de la Unión Europea había generado 178kg de residuos de empaquetado, de los cuales un 19,4% era plástico [2]. Si bien la cantidad de residuo ha aumentado desde un 62.9% en 2009 hasta un 64.4% en 2019, también ha aumentado la cantidad de residuo generado, como se puede observar en la imagen.

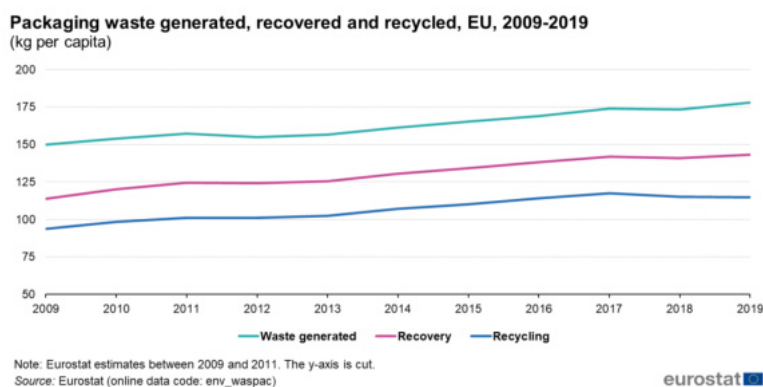


Figura 1.1: Generación de residuo, reciclaje y recuperación. **Fuente:** Eurostat

Una gran parte de este residuo generado va a parar a los mares. Se estima que la cantidad de plásticos que entraron en el océano en 2010 es de entre 4.8 y 12.7 millones de toneladas [3] y en 2016 una cantidad de entre 19 a 23 millones de toneladas [4]. La estimación es que para el 2030 habrán entrado en ecosistemas acuáticos una cantidad de alrededor de 53 millones de toneladas [4]. No solo eso, sino que se estima que 54 millones de toneladas de plástico acaban en vertederos [5]. Una vez ahí, el residuo tarda desde 10-20 años [6] hasta 500-1000 años [7]. En la figura 1.2 se pueden observar los diferentes tiempos de degradación dependiendo del tipo de plástico.

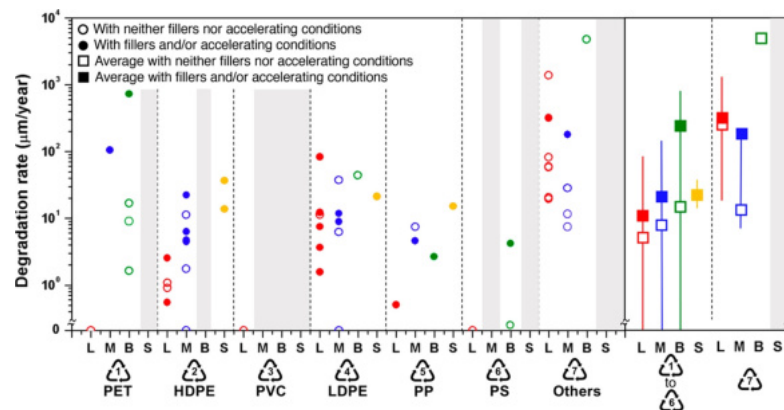


Figura 1.2: Degradación del plástico. Fuente: Chamas et al.

Teniendo en cuenta estos datos, se han propuesto alternativas. Es importante aclarar en este punto las diferencias entre bioplásticos, plásticos biodegradables y plásticos compostables. Según la United States Environmental Protection Agency (EPA) [8] y la Comisión Europea [9] se pueden clasificar de la siguiente manera:

- **Bioplásticos o plásticos de origen biológico:** Son aquellos plásticos que no tienen como base materiales fósiles. Están compuestos completa o parcialmente por material biológico. Sin embargo, ello no quiere decir que sean biodegradables o compostables.
- **Plástico biodegradable:** La característica que define a estos materiales es su habilidad para degradarse en el medio ambiente. Sin embargo, ello no quiere decir que sean compostables. No tienen porqué tener como base material biológico. Estos, a su vez, pueden ser clasificados en [10]:
  - *Oxo-biodegradable:* La degradación empieza con la oxidación.
  - *Hidro-biodegradable:* La degradación empieza con la hidrólisis.

- **Plástico compostable:** su característica principal, y de ahí la confusión general, es que estos tienen como base material biológico y son biodegradables.

En la figura 1.3 se puede ver de manera gráfica esta clasificación de los plásticos.

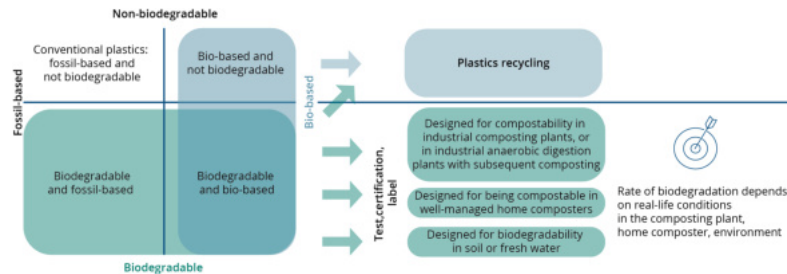


Figura 1.3: Plásticos biodegradables, compostables y de origen biológico. **Fuente:** ETC/WMGE and EEA

La tendencia actual es a la eliminación de los plásticos que no entran en la categoría de convencionales. Sin embargo, esto no es tan fácil. Como ya se ha mencionado antes, los plásticos tienen una gran influencia sobre la vida cotidiana. Según un estudio publicado en la revista *Science*, en Reino Unido se consumen 275g de plástico al día por persona [3].

Este rechazo al plástico no solo se debe a nuestro impacto sobre el planeta, sino por el la influencia de este material sobre nuestra salud. En un estudio publicado en *Environmental Science and Technology* se estimó que los humanos ingerimos anualmente entre 39000 y 52000 partículas de microplásticos [11], siendo para mujeres adultas  $46000 \pm 8000$  y para hombres  $52000 \pm 8000$  [12]. Estos datos se pueden ver en la Tabla 1.1.

	daily		annual		total	
	consumed	inhaled	consumed	inhaled	daily	annually
male children	113	110	41 000 ± 7000	40 000 ± 45 000	223	81 000
male adults	142	170	52 000 ± 8000	62 000 ± 69 000	312	114 000
female children	106	97	39 000 ± 7000	35 000 ± 39 000	203	74 000
female adults	126	132	46 000 ± 8000	48 000 ± 54 000	258	94 000

Cuadro 1.1: Consumo de microplásticos por los humanos. **Fuente:** D.Cox, et al.

Además de ser perjudicial para el medio ambiente y para la salud, los residuos de plástico también son nocivos en una dimensión económica. Se estima que el coste de cada tonelada de plástico es de unos 3300\$ a unos 33000\$ [13]. Teniendo en cuenta la cantidad de residuos desechados anualmente, se puede llegar a hablar de billones de dólares. Estas pérdidas económicas tienen en cuenta el valor de inherente de la biodiversidad, cada día más pequeña. Solamente el valor de esta última alcanzaba desde los 125 trillones de dólares al año hasta los 145 trillones de dólares al año en 2011 [14].

Conociendo estos datos, queda clara la importancia de encontrar un sustituto al polímero convencional. El material en cuestión debe tener poco o ningún impacto en el medio ambiente. Ha de ser eficiente en el ámbito energético. Esto es aplicable tanto a la hora de fabricarlo como de reciclarlo o reutilizarlo. Además, debe poseer características mecánicas, físicas y químicas parecidas a las del plástico. El punto de foco de esta tesis será el campo del empaquetado. Como se ha explicado antes, es responsable de una gran cantidad de los residuos presentes en vertederos, ríos y océanos. También se discutirá porqué el *composite* escogido debe ser extruible, de las ventajas que aporta su extrusión y del proceso para llegar a un resultado aceptable. Este proyecto es complementado por otra parte donde se discute del diseño de una máquina que propicie esta manera de fabricación. A cargo de esa parte está Gonzalo Borja Reyes Uzquiano[15].

## 1.2 Micelio y biomateriales

### 1.2.1 Definición de conceptos importantes

Se ha mencionado en el apartado anterior la intención de utilizar micelio como base del nuevo *composite*. Sin embargo, para ello es necesario entender qué es el micelio y dónde se encuentra. Al hablar de hongos, el primer pensamiento que se tiene es de la seta. Sin embargo, esta es una pequeña parte del organismo del hongo.

El reino de los hongos se compone de más de 144000 especies conocidas, yendo desde unicelulares hasta pluricelulares [16]. Los hongos son seres heterótrofos, es decir, no son capaces de producir su propio alimento [17]. Es por ello que se suelen encontrar en restos orgánicos, descomponiéndolos. Esta es una función esencial, dado que son los responsables de devolver los nutrientes al suelo [18].

Los sujetos de esta tesis se encuentran dentro del grupo de hongos que producen



*esporóforos*, o también conocidos como setas [19]. El ciclo de vida de estos seres comienza con las esporas. Estas se posan sobre sustrato rico en nutrientes, como pudiera ser un cuerpo orgánico en descomposición. De estas esporas nacen las hifas, elementos filamentosos que forman la mayor parte del hongo [20]. Cuando dos hifas se juntan, dan lugar al micelio. Este se expande de manera exponencial, absorbiendo nutrientes a su paso. Llegado un momento, forma nudos *hifales*. De este punto crecerá una seta, cerrando el ciclo y comenzándolo de nuevo. Este proceso se puede ver gráficamente en la Figura 1.4b.

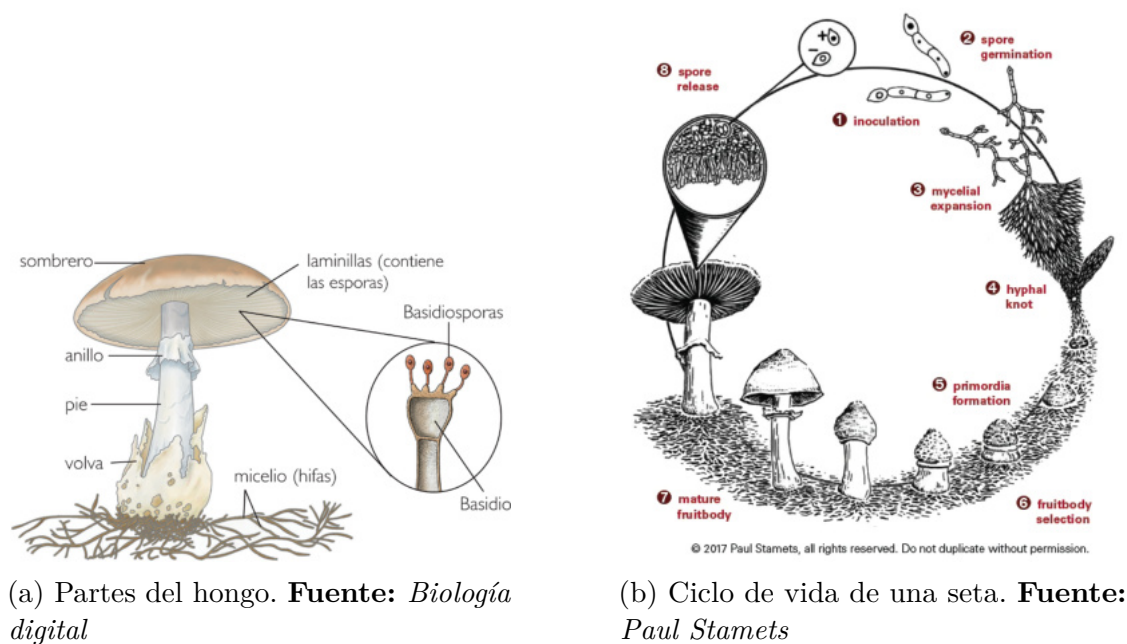


Figura 1.4: Partes del hongo y ciclo de vida.

Las hifas están recubiertas de una sustancia denominada quitina. Este es un polisacárido de aspecto blanquecino que suele recubrir los exoesqueletos de animales invertebrados (como pudieran ser crustáceos o insectos) o en las membranas celulares de los hongos [21][22]. A pesar de ser el segundo biopolímero más común en la naturaleza, después de la celulosa, se utiliza poco en la industria. Es insoluble en agua y la mayor parte de disolventes orgánicos [23]. Se puede observar en la figura 1.5 la estructura de este polímero.

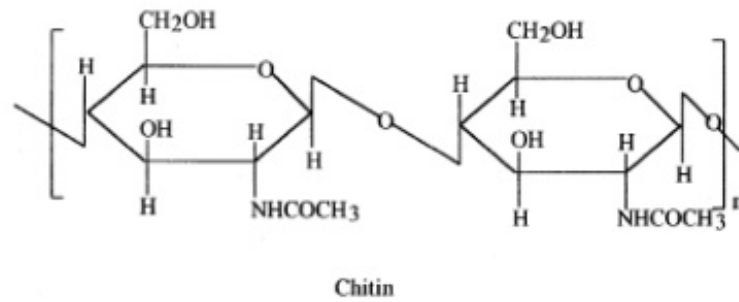


Figura 1.5: Estructura de la quitina. **Fuente:** *Majeti N. V. Ravi Kumar*

La quitina, junto con su forma deacetilada, el chitosan, se encuentran entre los polímeros naturales más utilizados para la creación de matrices naturales de *biocomposites*. Esto se debe a que es biodegradable, biocompatible y no es tóxico [24]. Adicionalmente, como ya se ha mencionado es uno de los polímeros naturales más comunes en el medio ambiente. Esto hace que sea abundante y fácil de conseguir.

			Cellulose
	Carbohydrates	Polysaccharides	Starch
			Pectin
Plant Source			Soy derivatives
		Proteins	Polypeptides
		Lignins	Polyphenols
		Proteins	Silk
			Wool
Animal Source			Polypeptides
			Chitin
		Polysaccharides	Chitosan
			Glycogen

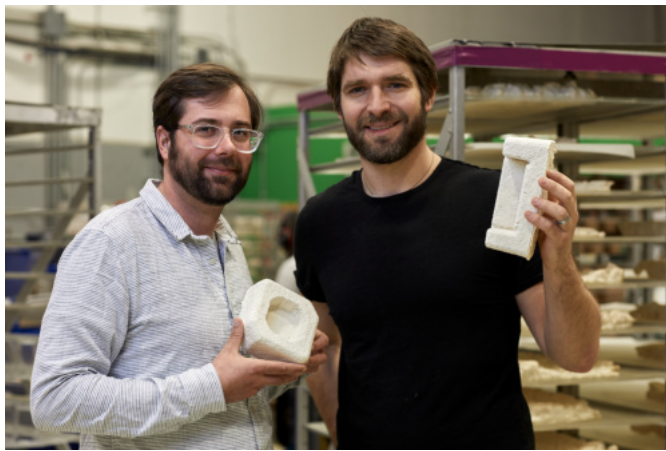
Cuadro 1.2: Clasificación de los polímeros naturales según origen. **Fuente:** *Derval dos Santos Rosa and Denise Maria Lenz*

El micelio es la parte del hongo que interesa para el desarrollo de este proyecto. Esta red de hifas posee características parecidas a las del poliestireno expandido, en el sentido mecánico y físico. Sin embargo, como se menciona en el siguiente apartado, sus aplicaciones van más allá que las del polímero mencionado.

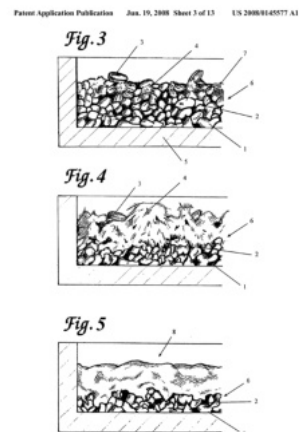
## 1.2.2 El micelio en la industria

Como ya se ha mencionado, el micelio posee características parecidas a aquellas del EPS en cuanto a física y mecánica. No es de extrañar por tanto que se haya utilizado para aplicaciones similares. Este es el caso, por ejemplo de la empresa americana *Ecovative* [25].

Fundada en 2007 por Eben Bayer y Gavin McIntyre, en la figura 1.6a, la compañía empezó dedicándose a los materiales de construcción y aislamiento. La primera patente sobre el proceso fue concedida en el 2008 [26]. En la figura 1.6b se puede ver el proceso que registraron inicialmente. No tardaron en dedicarse también al material de empaquetado [27]. En la actualidad, se dedican a campos tan diversos como el de la comida, belleza, ropa, espumas y empaquetado. Ofrecen además kits de *Grow-it-yourself*, para educar a la comunidad sobre estos materiales.



(a) Eben Bayer y Gavin McIntyre. **Fuente:** *PR Web*



(b) Primera patente del método para crecer *composites* basados en micelio. **Fuente:** *Bayer et al.*

Figura 1.6: Fundadores de Ecovative y patente del proceso utilizado.

No son solo las pequeñas empresas quienes han adoptado esta técnica en aras de encontrar soluciones más sostenibles al poliestireno expandido. Empresas como Ikea [28] o Dell [29] han empezado a ofrecer paquetes creados a partir de este material. Más allá del empaquetado, la conocida marca de ropa Hermès, en colaboración

con la empresa MycoWorks, creó un bolso [30], figura 1.7, utilizando la técnica conocida como *Fine Mycelium*. Para ello fue necesaria la creación de un nuevo material, *Sylviania*.



Figura 1.7: Bolso *Victoria* de Hermès creado con micelio. **Fuente:** *Coppi Barbieri*

Está claro por tanto que el micelio se está empezando a adoptar con éxito en múltiples y variadas industrias. Es por ello que merece la pena entrar más en detalle en los principales campos de aplicación de este material. Es posible distinguir los siguientes.

### **Textil**

El micelio se ha presentado en este campo como un posible sustituto al cuero. Las principales empresas trabajando en este campo son MycoWorks, previamente mencionados por su colaboración con Hermès, y Bolt Threads, colaboradores con Ecovative y desarrolladores de Mylo™. Ambas empresas se dedican al desarrollo de sustitutos al cuero convencional, habiendo registrado sendos procesos para su creación [31][32].



(a) Cuero creado por Mylo.  
Fuente: *Mylo™*

(b) Granja de cultivo de Bolt Threads. Fuente: *Bolt Threads*

Figura 1.8: Cuero hecho a base de micelio y las granjas utilizadas para su creación

La ventaja de utilizar este material, es la rapidez con la que se consigue el producto final. El hongo es capaz de colonizar la superficie requerida en cuestión de días [33]. Adicionalmente, se ha de tener en cuenta el impacto medioambiental y el ahorro económico. A diferencia del ganado, los hongos utilizados en este proceso no requieren un excesivo consumo de agua o nutrientes. La media de agua utilizada en la producción de cuero es de entre 12L/kg y 37kg/L [34], y anualmente la industria utiliza anualmente 30 billones de litros de agua [35]. En contraste con esto, el cuero creado con micelio tiene un consumo de agua prácticamente mínimo. Se estima que requiere de un 99% menos de agua [36]. Sin embargo, a pesar del bajo coste del proceso, aún sigue siendo más caro que el del cuero convencional, aunque esto debería solucionarse al escalar la producción [37].

## Construcción

El campo de la construcción fue donde antes se aplicaron las características de este material. Como ya se mencionó previamente, es percibido comúnmente como un sustituto del poliestireno expandido (EPS). Esto es debido a sus excelentes propiedades como aislante térmico y acústico, empresas como Mogu [38] crean paneles con este mismo propósito.

La creciente población hace necesaria la construcción de nuevos hogares. Sin embargo, no se pueden ignorar los grandes problemas que tiene esta industria. En primer lugar, al sector de la industria se le atribuye un 6% de las emisiones y un 11% del consumo energético [39]. Este dato se puede ver de manera gráfica en la figura 1.9. En segundo lugar, las materias primas cada vez son más caras. Desde el comienzo de la pandemia, la materia prima para la construcción ha subido un 33% y 2022 comenzó con una subida de precios de un 8% [40][41]. En la figura se puede ver la tendencia que sigue el coste de los precios de las materias.

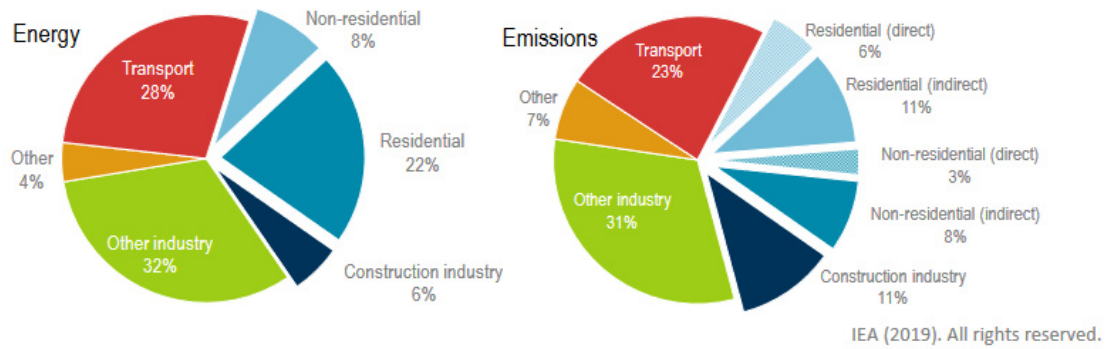


Figura 1.9: Porcentaje de las emisiones y consumo de energía atribuible a los diferentes sectores. **Fuente:** IEA

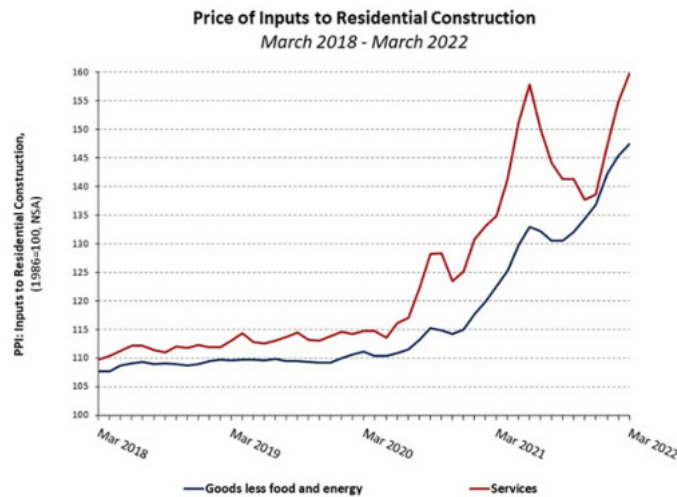


Figura 1.10: Tendencia del coste de los materiales. **Fuente:** National Association of Home Builders

Teniendo en cuenta estos problemas, no es de extrañar que se estén buscando alternativas sostenibles para los materiales de construcción. El micelio promete una alternativa sostenible y de poco costo. Sin embargo, la fabricación con esta técnica presenta tres principales problemas, bajas propiedades mecánicas, alta retención de agua y la falta de estandarización para su producción y testeo [42][43]. Aunque algunos artículos han encontrado que el micelio puede aguantar fuerzas de hasta 25MPa [43] y la seta de hasta 200 MPa [44].

Hay dos técnicas principales a la hora de construir utilizando materiales ladrillos de bajo peso, y tablas producidas por la prensa fría o caliente de materiales unidos con micelio [42]. En un estudio de 2020 sobre la creación de tales ladrillos se consiguieron resistencias máximas de compresión de unos 3.5MPa [45], la cual es suficiente para la mayor parte de aplicaciones según el Código Técnico de la Edificación [46], como se puede ver en la Tabla 1.3.

**Tabla 4.4 Resistencia característica a la compresión de fábricas usuales  $f_k$  (N/mm<sup>2</sup>)**

Resistencia normalizada de las piezas, $f_b$ (N/mm <sup>2</sup> )	5		10		15		20		25
Resistencia del mortero, $f_m$ (N/mm <sup>2</sup> )	2,5	3,5	5	7,5	7,5	10	10	15	15
Ladrillo macizo con junta delgada	-	-	3	3	3	3	3	3	3
Ladrillo macizo	2	2	4	4	6	6	8	8	10
Ladrillo perforado	2	2	4	4	5	6	7	8	9
Bloques aligerados	2	2	3	4	5	5	6	7	8
Bloques huecos	1	1	2	3	4	4	5	6	6

Cuadro 1.3: Resistencia característica a la compresión de fábricas usuales  $f_k$  [ $\frac{N}{mm^2}$ ].  
**Fuente:** *Ministerio de Fomento*

Casos destacable es el de la estructura de micelio creada para la exposición de arquitectura y urbanismo Bial de Seúl. De esta manera se prueba que este material puede soportar ligeras cargas [47]. El material mostró tener una fuerza de compresión de 0.61MPa al 5% del esfuerzo. La estructura creada puede verse en la figura 1.11.



Figura 1.11: Estructura de micelio creada para la exposición de arquitectura y urbanismo bienal de Seúl. **Fuente:** *Heisel et al.*

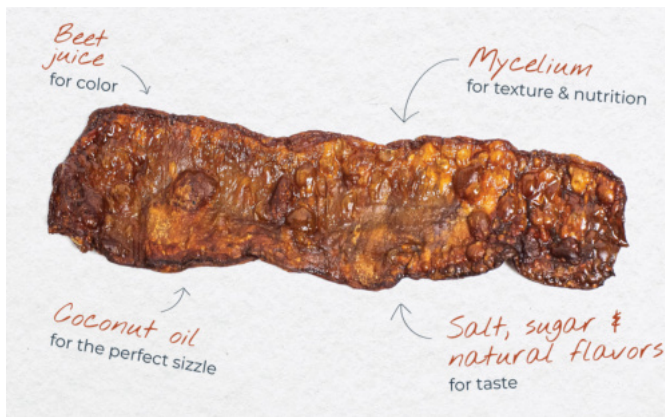
## Alimentación

Según el informe de BIS Research, se estima que el valor del mercado del micelio en 2020 fue de 2.48 billones de dólares y se prevee que para el 2026 crezca hasta los 3.84 billones de dólares[48]. Un 55% de este mercado está captado por la industria alimenticia.

La mayor parte de las aplicaciones del micelio en la industria alimenticia se basan en la sustitución de la carne. Este material es utilizado para dar textura a estos productos [49]. Compañías prominentes en este sector son las siguientes:

- **MyForest Foods:** Compañía de Ecovative, compañía mencionada anteriormente. Se especializan en la creación de sustitutos para la carne [50][51]. El producto principal es MyBacon, un sustituto para el bacon hecho a partir de micelio, zumo de remolacha, aceite de coco y especias variadas, representado en la figura 1.12a.
- **Chinova Bioworks:** Tienen productos que van desde los conservantes naturales hasta sustitutos cárnicos, pasando por productos lácteos y de repostería [52]. Sin embargo, el producto estrella es el conservante natural, Chiber<sup>TM</sup>, a partir de extracto de champiñones blancos, el cual consigue extender la validez de las bebidas considerablemente[53].
- **ENOUGH:** El producto principal de esta compañía es denominado ABUNDA. Sirve como sustituto para ternera, pescado y pollo. La empresa afirma que este producto utiliza un 97% menos de forraje, un 93% menos de agua y emiten un 97% menos de  $CO_2$ , en caso de los sustitutos de la ternera[54].
- **Meati Inc.:** Al igual que los anteriores, esta empresa utiliza el micelio para emular la textura de productos cárnicos. Se especializan en sustitutos para ternera, representado en la figura 1.12b, y pollo. Sus productos están formados por un 95% de micelio[55].





(a) MyBacon. **Fuente:** *MyForest Foods*



(b) Sustituto de la ternera de Meati Inc.. **Fuente:** *Meati Inc.*

Figura 1.12: Sustitutos de la carne a base de micelio.

Además de estos campos principales, el micelio es utilizado para muchas otras aplicaciones. Es destacable, por ejemplo, el proceso de la *micorremediación*. Este es un método que utiliza hongos para descontaminar el medio ambiente. Es utilizado para la descomposición de metales pesados, residuos agrícolas o farmacéuticos [56][57]. Las enzimas producidas por los hongos son capaces de descomponer una gran variedad de contaminantes [58]. Este método fue aplicado en Nueva Zelanda para el tratamiento de tierra y agua contaminada con resultados exitosos [59]. También han sido utilizados para la limpieza de derrames de petróleo [60] y la limpieza de residuos tóxicos de los incendios forestales de California de 2017 [61].

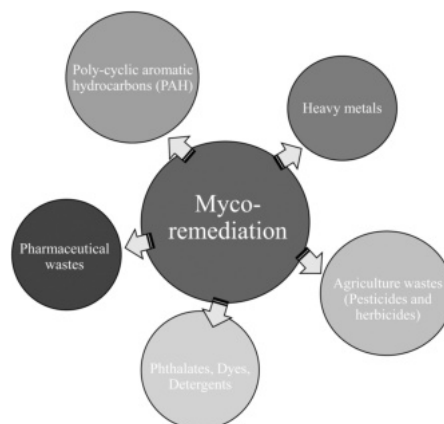


Figura 1.13: Contaminantes que es posible mitigar a través de la micorremediación. **Fuente:** *Akhtar et al.*

## 1.3 Revisión bibliográfica

La impresión 3D con micelio es una técnica que aún se encuentra en fase de estudio. No hay ninguna estandarización del proceso, técnica de extrusión, hongo o sustrato utilizado. Por ello, en este apartado se estudiarán las características de los principales artículos versando sobre el tema. El foco de este apartado se hará sobre 3 artículos:

- *Soh et al.* [62]: El trabajo se centra en la creación de un material compuesto de bambú y micelio. Estudia las características físicas y mecánicas del material resultante.
- *Bhardwaj et al.* [63][64]: Este paper construye un sistema de extrusión del material y crea una variante distinta del mismo concepto.
- *Chen et al.* [65]: En este caso, se crea un sistema parecido al anterior con algunas diferencias. El sustrato, hongo y agente coagulante son también distintos.

Los apartados que se analizarán serán el método de extrusión utilizado, el tipo de hongo, el sustrato y su coagulante y finalmente los resultados obtenidos. No merece la pena comparar los procesos seguidos, ya que en todos es el mismo proceso. Es el mismo que se ha seguido en este proyecto, por lo cual será descrito en apartados posteriores de la memoria.

### 1.3.1 Método de extrusión utilizado

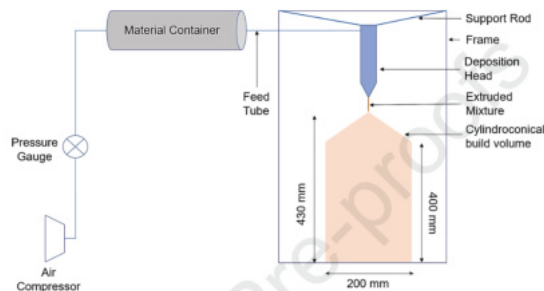
En primer lugar, se compararán los sistemas utilizados por las distintas investigaciones. Es de notar que solo se tomarán el sistema de *Bhardwaj et al.*[63] y el de *Chen et al.*[65] en consideración. Esto es debido a que el tercer artículo, *Soh et al.*[62], no desarrolló un sistema de extrusión, sino que las probetas se crearon manualmente con una jeringuilla de alimentación. Cabe mencionar que este sistema inspiró el diseño utilizado en el proyecto de Gonzalo Borja Reyes Uzquiano.

Cabe destacar que todos los sistemas utilizados son de extrusión. En los dos trabajos en los que se diseña un sistema de depositado del material, la base es una impresora de *Filament Deposition Modeling* (FDM). La gran disponibilidad de estos equipos le da ventaja sobre otros posibles sistemas. Además, esta técnica no daña a las esporas y requiere de poca modificación del hardware o firmware de la máquina.

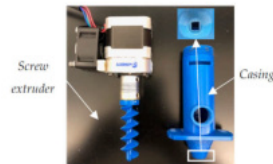
### Propuesta de *Bhardwaj et al.*

El primer artículo introduce una impresora tipo delta como opción. En esta disposición, el cabezal es movido por 3 motores distintos dispuestos en un triángulo equilátero. Los brazos tiran y empujan al cabezal, moviéndolo en las tres dimensiones del espacio. De esta manera, la cama queda fija. El sistema queda representado en la figura 1.14a. Utiliza una cámara con un pistón para contener el material inoculado con micelio. Se utiliza para empujar el pistón una bomba de aire conectada a una válvula. El conducto de alimentación termina en el extrusor. Este sistema tiene un problema también experimentado en el diseño creado para este proyecto. Al empujar el material, el agua se filtra a través de las partículas. Esto deja una pasta dura y seca que obstruye el conducto.

El sistema mecánico del extrusor es un tornillo de Arquímedes conectado al motor *stepper* del cabezal. Esta modificación apenas hace cambios permanentes en el sistema, siendo el único de ellos el cambio del *hot-end* de la impresora por el tornillo de Arquímedes. Esto evita la eliminación del micelio debido a las altas temperaturas. Permite además ejercer presión puntual en el caso de que se quiera depositar material.



(a) Sistema utilizado en el paper de Bhardwaj et al. **Fuente:** *Bhardwaj et al.*



(b) Extrusor utilizado por el sistema. **Fuente:** *Bhardwaj et al.*

Figura 1.14: Impresora y cabezal utilizado en el estudio de *Bhardwaj et al.*

La velocidad del cabezal en todos los experimentos fue de 30mm/s[64]. El cabezal posee una apertura cuadrada de 6mm por cada lado.

### Propuesta de *Chen et al.*

En este artículo se abandona la disposición delta por una más clásica, la cartesiana. El cabezal se mueve en dos ejes, siendo la cama la que se mueve en el eje Z, y

de esta manera consiguiendo la tercera dimensión. Esta distribución es más simple que la anterior. Un diagrama de la impresora en cuestión queda representada en la figura 1.15.

Otro cambio que cabe destacar es el uso del aire a presión. Mientras que en el sistema anterior simplemente servía para alimentar el extrusor, en este caso se mueve un pistón directamente montado en el cabezal. En este caso se cambia el sistema mecánico del anterior estudio por uno neumático. Es de notar que esto aumenta el peso del cabezal. Esto representa un problema que hace elegir entre precisión y velocidad. En caso de mantener una alta velocidad de impresión, la inercia del sistema hace que se pierda exactitud. Adicionalmente, un depósito montado de esta manera reduce la cantidad de material disponible.

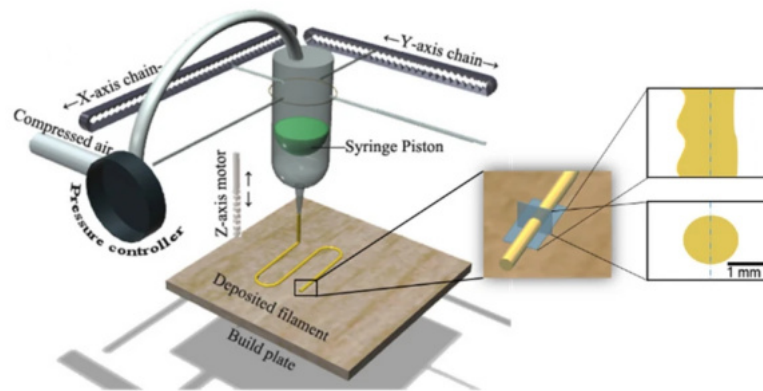


Figura 1.15: Sistema utilizado en el paper de Chen et al. **Fuente:** *Chen et al.*

La velocidad de impresión conseguida en este caso es de 10mm/s. El diámetro del extrusor, en este caso circular, va desde los 0.58mm hasta los 1.6mm. Esto se traduce en una mayor precisión de las piezas.

De esta manera, se pueden resumir las características de las dos impresoras en la tabla 1.4.

Característica	Bhardwaj et al.	Chen et al.
Velocidad de impresión [mm/s]	30	10
Tamaño del cabezal	6x6mm	0.58-1.2mm
Impresora base	Delta WASP 2040	Ultimaker 2 Go
Volumen de impresión antes de la modificación [cm]	20x40h	12x12x11.5

Cuadro 1.4: Características de las impresoras utilizadas

### 1.3.2 Tipo de hongo utilizado

El tipo de hongo utilizado es un parámetro crucial. Dependiendo de la especie y la familia, las condiciones de cultivo varían. Ha de tenerse en cuenta también la disponibilidad y el precio. Estos son todos factores que se discutirán en futuros apartados, cuando se haga la selección del hongo para este proyecto.

Comenzando con *Chen et al.*, el hongo utilizado es el *Fomes fomentarius*[65], representado en la figura 1.16. Es un hongo que crece en los troncos de los árboles en decadencia o en madera en descomposición. Puede crecer hasta los 50cm de diámetro, no es comestible y se caracteriza por una superficie muy seca[66].



Figura 1.16: *Fomes fomentarius*. Fuente: *Ultimate Mushroom*

En el artículo de *Soh et al.*, se hace referencia a dos tipos de hongos utilizados en estudios anteriores, son el *Ganoderma lucidum*, figura 1.17, y el *Pleurotus Ostreatus*[62]. En este caso se deciden por el primero de ellos, el *Ganoderma lucidum*. Este hongo también es conocido como *Reishi* o *Lingzhi*, no se suele comer, aunque si se utiliza para la preparación de té y otro tipo de infusiones. También crece sobre troncos de árboles muertos y madera en descomposición[67].



Figura 1.17: *Ganoderma Lucidum*. Fuente: OutGrow

En el último estudio, *Bhardwaj et al.* no se detalla la especie del hongo utilizado. Sin embargo, sí se menciona la división a la que pertenece, *Basidiomycota*[64]. Este hongo es proporcionado en los kits de *Grow-it-Yourself* de Ecovative [68]. Sin embargo, se puede deducir que es un hongo parecido al de *Chen et al.*, dado que el *Fomes Fomentaris* pertenece a la división *Basidiomycata*.

Viendo los tres tipos de hongos utilizados, no es difícil ver la conexión entre ellos, el crecimiento en madera en estado de descomposición. Todos estos hongos son elegidos por los respectivos estudios por ser fáciles de cultivar y resistentes a una gran variedad de condiciones. No son hongos que necesiten de cuidados especiales y el sustrato utilizado, aunque influye en el producto final, es fácilmente intercambiable.

### 1.3.3 Sustrato y agente coagulante

El sustrato es un aspecto esencial, dado que contribuye a las propiedades físicas y mecánicas del *biocomposite* final. Además, es necesario que aporte los nutrientes esenciales para el correcto crecimiento del hongo. Finalmente, hay que tener en cuenta que el objetivo de estos estudios es la extrusión del material. Esto quiere decir que es primordial que al juntar el sustrato con un agente coagulante y un

medio líquido, como pudiera ser el agua, formen un fluido con ciertas características. El fluido ha de ser lo suficientemente espeso y tener la viscosidad apropiada para mantener cierta integridad estructural a la hora de ser impreso. Al mismo tiempo, ha de ser posible su extrusión, por lo que no debe presentar demasiada resistencia.

En el estudio de *Soh et al.*, se utilizan fibras de bambú como sustrato y una solución de Chitosan como agente coagulante [62]. Las fibras de bambú proporcionan integridad estructural, así como un medio de cultivo. En el estudio se observa que el tamaño de las fibras influye en las propiedades mecánicas.

En el estudio de *Bhardwaj et al.*, se utiliza en un comienzo cáñamo como sustrato y agua como medio para mejorar las propiedades de extrusión. Además, se utiliza harina de trigo para proveer al medio con nutrientes[63]. Sin embargo, en estudios posteriores, se añade polvo de cáscara de *psyllium*[64]. Con esto, se mejoran las propiedades de extrusión y la calidad de impresión.

En el tercer estudio, *Chen et al.*, se utilizan alginatos con diversos grados de viscosidad. Esto permite a los investigadores evaluar sus propiedades en función de la capacidad de extrusión, homogeneidad del fluido, propiedades reológicas y facilidad de apilamiento[65]. Se observa que a medida que aumenta la cantidad de alginatos en el fluido, la viscosidad incrementa con ello. Utilizan además agua para mejorar las propiedades del fluido. Según el criterio utilizado, se consiguen las proporciones ideales de estos tres elementos. Esta información se recoge en la tabla 1.5.

Samples	Compositions			Characterization				
	Mass ( <i>F. fomentarius</i> ) mg	Mass (Alginate) mg	Volume(H <sub>2</sub> O) mL	Rheology	Homogeneity	Collapse	Stackability	Microstructures
F91A09	50	5	10	x	x			
F83A17	50	10	10	x	x	x		
F77A23	50	15	10	x	x			
F71A29	50	20	10	x	x	x	x	x
F62A38	50	30	10	x	x	x		
F56A44	50	40	10	x	x	x		
F00A09	0	5	10	x				
F00A17	0	10	10	x		x		
F00A23	0	15	10	x				
F00A29	0	20	10	x		x		
F00A38	0	30	10	x		x		
F00A44	0	40	10	x		x		

Cuadro 1.5: Muestras recogidas por *Chen et al.* Fuente: *Chen et al.*

### 1.3.4 Resultados obtenidos

Se compararán los tres estudios en función de las propiedades mecánicas obtenidas. Viendo los parámetros de entrada que tienen, lo más interesante de ver son las propiedades que muestran en el campo mecánico y físico.

En el caso de *Soh et al.*, son los únicos en sacar las curvas de tensión-deformación, habiendo realizado sendos ensayos de tracción, figura 1.18. Se puede apreciar la notable mejoría de propiedades que conlleva dejar que el hongo colonice la mayor parte del material.

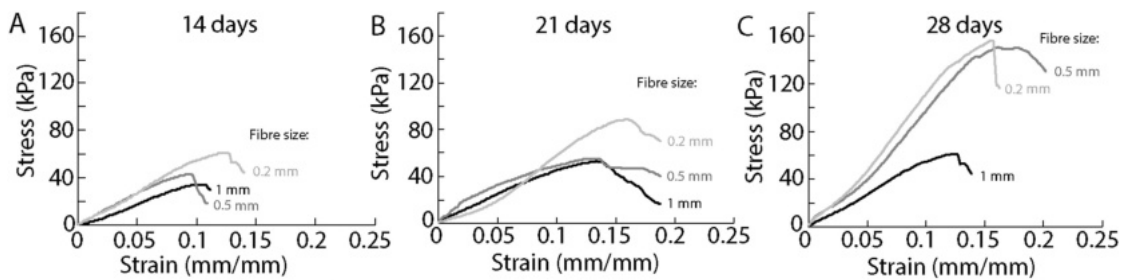
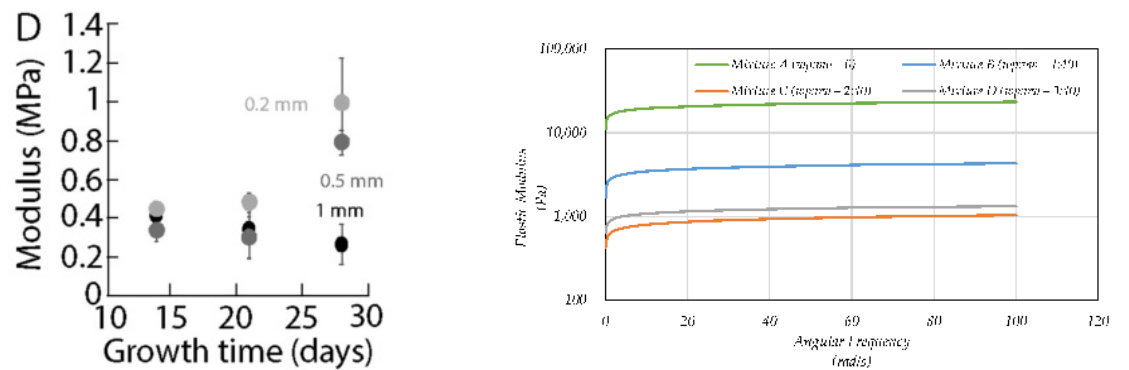


Figura 1.18: Curvas de tensión-deformación del material conseguido por *Soh et al.* **Fuente:** *Soh et al.*

Se puede hacer sin embargo, una comparación entre módulos elásticos de los materiales de *Soh et al.* y de *Bhardwaj et al.*, figura 1.19. Se puede apreciar que *Soh et al.* consigue resultados mayores que *Bhardwaj et al.* según el tiempo de cultivo aumenta. Sin embargo, ambos valores se hayan en el mismo orden de magnitud.



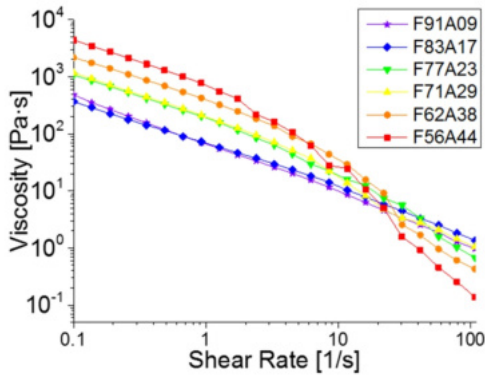
(a) Módulo elástico de *Soh et al.* **Fuente:** *Soh et al.*

(b) Módulo elástico de *Bhardwaj et al.* **Fuente:** *Bhardwaj et al.*

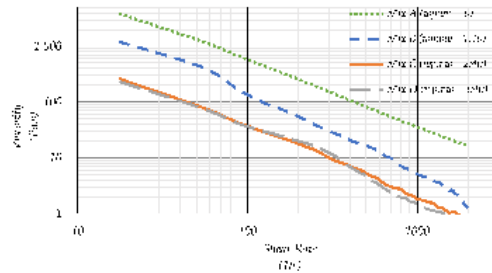
Figura 1.19: Módulos elásticos conseguidos.



En la figura 1.20, se pueden ver los resultados obtenidos en los dos estudios. Se puede ver en el caso de *Chen et al.* el rango completo de viscosidades dependiendo de la cantidad de alginato en el compuesto. Pasa lo mismo en el caso de *Bhardwaj et al.* con la cantidad de cáscara de psyllium incorporada en el material. Sin embargo, comparando entre los dos materiales, se puede ver claramente ambos se mueven en el mismo rango de viscosidades.



(a) Resultados de viscosidad en *Chen et al.* **Fuente:** *Chen et al.*



(b) Resultados de viscosidad en *Bhardwaj et al.* **Fuente:** *Bhardwaj et al.*

Figura 1.20: Viscosidad del material



# Capítulo 2

## Objetivos

El objetivo de este proyecto es el diseño, elaboración y caracterización de un material extruible con base de micelio. En este capítulo se discutirán los objetivos que permitirán alcanzar esta meta. Es posible dividirlos en las etapas esenciales del proceso a seguir. En primer lugar, es importante tener una fuente estable de micelio. En segundo lugar, se diseñará el medio en el que se extruirá el micelio. En tercer lugar, se extruirá el material, modificándose en la medida de lo necesario. Finalmente, se procederá a caracterizar el material.

### 2.1 Cultivo de las especies de hongos

Es importante afianzar una fuente fiable de micelio. Esto permitirá observar las condiciones de crecimiento del hongo, para más tarde ajustarlas y aplicarlas al material extruido. La temperatura, humedad y CO<sub>2</sub> presente en el aire son factores que aplican en el desarrollo de la seta escogida. Adicionalmente, es importante observar el papel que juega el tipo de sustrato, no solo en las propiedades físicas y mecánicas del material final, sino también en la velocidad de colonización, la densidad del micelio y la facilidad de manejo.

Por otra parte, para hacer las pruebas es necesario que haya la menor cantidad de variables posibles para poder hacer un estudio estadístico. Por ello, tener una fuente de material, en teoría idéntica, es crucial. Tener cultivos de las dos especies de hongos utilizadas en el proyecto da la posibilidad de tener tejido que colonice el material que se quiere extruir y ensayar. De este tejido se pueden sacar a su vez, clones para aumentar la cantidad de cultivo o para tener copias de seguridad de los especímenes.



Figura 2.1: Cultivo utilizado en el desarrollo del proyecto.

## 2.2 Creación de material extruible

Una vez se haya cumplido con el objetivo anterior, se puede proseguir con este objetivo. Para crear el material es necesario definir los parámetros que jueguen un papel importante en el cumplimiento de los requisitos impuestos. Estos requisitos o restricciones son, entre otros, la extrusibilidad del material, la capacidad de guardar integridad estructural o proveer al organismo con los nutrientes necesarios para su correcto desarrollo.

En la creación del material será imprescindible encontrar componentes que reúnan las características mencionadas anteriormente. En este apartado jugarán un papel esencial el sustrato utilizado en los cultivos, el tamaño de las partículas utilizadas, la proporción de los componentes y el tiempo de cultivo del hongo.



Figura 2.2: Creación del material.

## 2.3 Extrusión del material

El objetivo final de este apartado es la extrusión del material. Para ello, es necesario cumplir con una serie de requisitos y estudiar los parámetros óptimos para conseguir un resultado satisfactorio. La restricción más importante es la de mantener al hongo con vida. Esto supone la creación de métodos que no dañen al organismo al extruirlo. Parámetros como la temperatura, presión o humedad del medio de extrusión son cruciales a la hora de mantener con vida a las hifas en el material.

Si bien esta es una restricción esencial, también lo es el evitar la contaminación. Cualquier tipo de agente biológico externo, ya sean bacterias, hongos u otros organismos del mismo tamaño, puede influenciar el crecimiento del micelio escogido. Esto puede resultar perjudicial para futuras pruebas, ya que si crece un hongo que no fuese uno de los cultivados, podría alterar la caracterización del material final.

También será en este apartado donde se hará una primera parametrización del material. Esto se debe al uso del equipo de extrusión desarrollado para este proyecto[15]. Aunque no sea una caracterización en el sentido más ortodoxo, se deben ajustar los parámetros de la máquina para poder imprimir con cierta precisión las probetas o piezas utilizadas en los ensayos.



Figura 2.3: Extrusión del material

## 2.4 Caracterización del material

Finalmente, el último objetivo es la caracterización del material. Esto conlleva la realización de pruebas físicas y mecánicas para registrar las propiedades del producto final en estos campos. Para ello, es necesario la definición de las características que se quieren estudiar. Hay que hacer un estudio de los parámetros que son importantes para la potencial aplicación de esta tecnología. Sabiendo esto, se puede diseñar un programa de pruebas para observar el comportamiento del material bajo diferentes circunstancias. Una vez hecho esto, se hará un análisis de los resultados obtenidos para poder definir, con cierto grado de incertidumbre, las características del elemento.

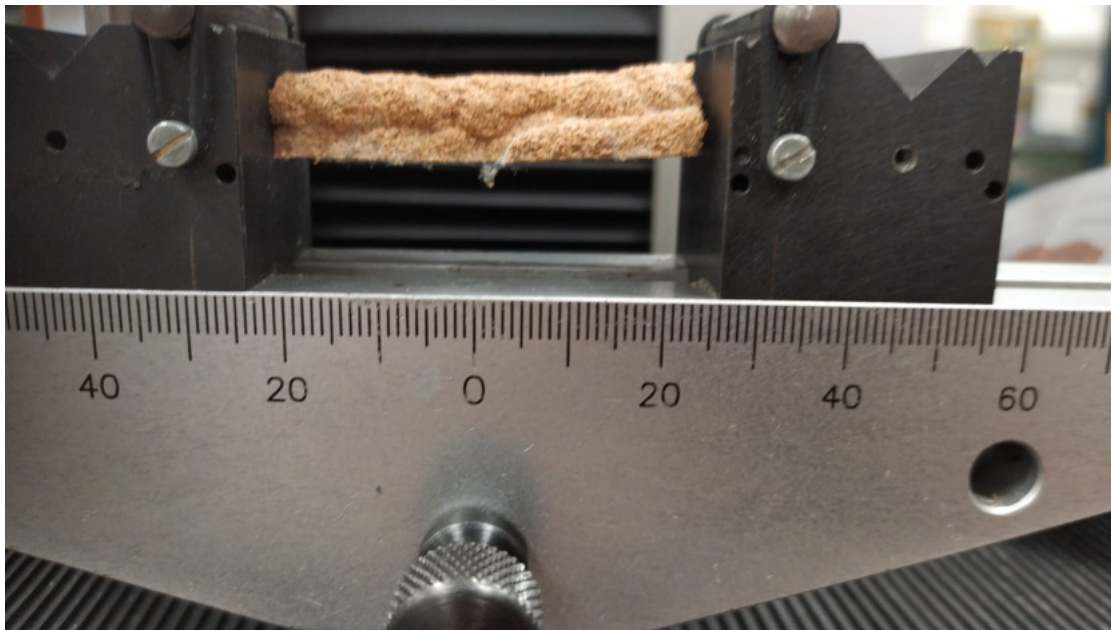


Figura 2.4: Caracterización del material.





# Capítulo 3

## Metodología experimental

El material a desarrollar se compone de tres elementos principales, el hongo, el agente coagulante y el sustrato. Cada uno de estos elementos precisa de un desarrollo particular antes de poder formar parte del producto final. Es por ello por lo que cada apartado de este capítulo tendrá una sección en cada paso dedicada a cada una de las partes. Esta organización puede verse de manera gráfica en el diagrama de la figura 3.1.

En primer lugar, en la sección de *Hipótesis*, se plantearán los objetivos finales deseados para cada componente del material. En el apartado de *Materiales*, se discutirá el equipo y los componentes utilizados para la creación de cada elemento. Se hablará también del proceso seguido para la selección de los componentes. En el apartado de *Metodología*, se hablará de los procesos seguidos en cada caso, los métodos de fabricación y cómo se llegó a la selección de estos mismos. Finalmente, en *Diseño experimental*, el objeto principal de discusión será las pruebas creadas para probar las hipótesis planteadas.

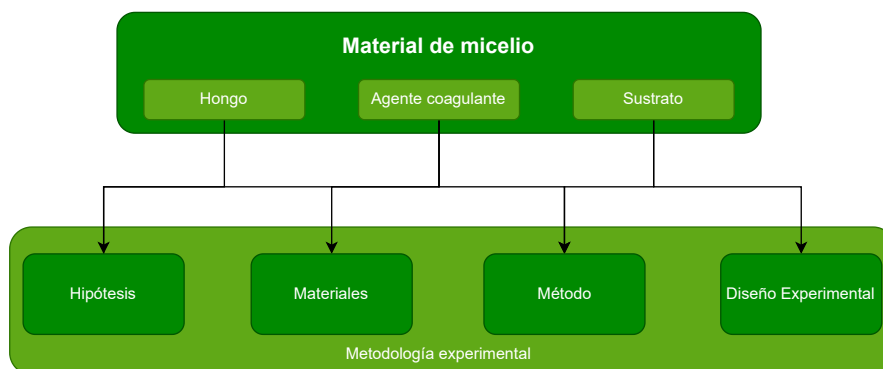


Figura 3.1: Organización del capítulo

## 3.1 Hipótesis

En este apartado, se discutirán los objetivos y resultados que esperan obtenerse de cada componente. Sin embargo, es esencial plantear en un primer momento el producto final que se pretende conseguir. Una visión general del producto final ayuda a entender lo que se pretende conseguir en cada uno de los apartados planteados, y por tanto explica los procedimientos seguidos, los experimentos diseñados y los materiales utilizados. Los experimentos utilizados para controlar las hipótesis formuladas se desarrollarán en el apartado de *Diseño experimental*.

El material creado ha de reunir los siguientes requisitos como mínimo. En primer lugar, el componente base ha de ser un medio colonizado por un hongo. Es decir, la matriz ha de ser el micelio y el sustrato que sirve como nutriente. Por ello, es necesario plantear hipótesis relacionadas con el organismo con el que se trabaja, su crecimiento y sus propiedades. En segundo lugar, ha de ser lo suficientemente viscoso como para poder ser extruido y mantener su forma. Y por último, el material ha de reunir unas características mecánicas aceptables y comparables con las del poliestireno expandido.

### 3.1.1 Hongo

Como ya se ha mencionado, la mayor parte de hipótesis que tienen que ver con la parte del hongo se pueden resumir en su correcto crecimiento, colonización y proliferación. Para entrar más en detalle, se pueden distinguir las siguientes:

- **Crecimiento:** El hongo será capaz de colonizar el sustrato en pocos días, o por lo menos será capaz de tener influencia suficiente en el sustrato como para que después de extruirlo pueda colonizar la pieza.
- **Creación de una fuente de micelio constante:** Mediante la creación de cultivos en tarro y en agar, se conseguirá una fuente fiable de especímenes a utilizar en el desarrollo del material.
- **Colonización del material:** El micelio se expandirá por todo el material, creando una red de hifas. Estas aportarán a la pieza integridad estructural y crearán un material compuesto basado en el sustrato seleccionado.

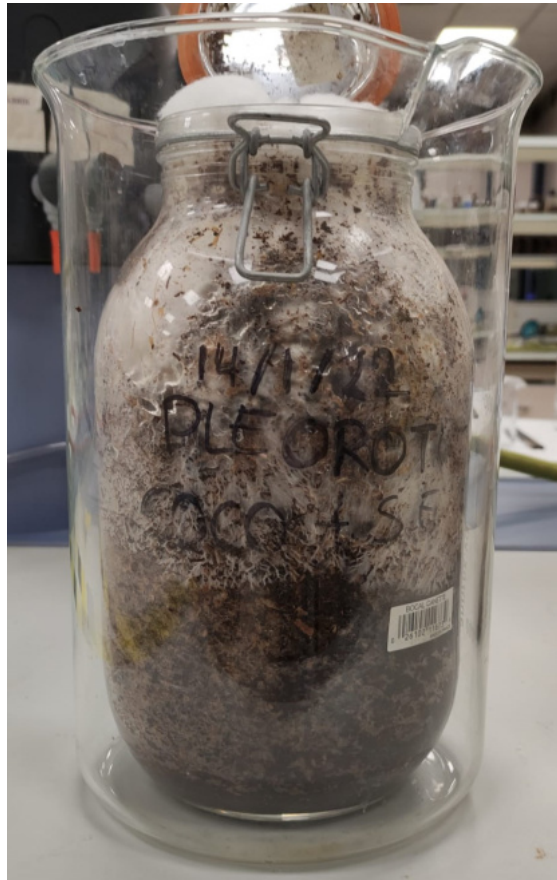


Figura 3.2: Cultivo colonizado.

### 3.1.2 Agente coagulante

El agente coagulante actúa como el pegamento que une todos los componentes entre sí. A su vez, es el encargado de aportar al material las propiedades reológicas necesarias como para poder ser extruido. Para ello, debe tener una **viscosidad dinámica suficiente** como para arrastrar con él las partículas de sustrato inoculado y poder extruirlo a través de una jeringuilla. Esto es debido al diseño utilizado en la máquina, como se puede ver en la figura 3.3. Sin embargo, el material ha de ser tener las propiedades de un fluido en el estado de equilibrio.

El diámetro de la boquilla se reduce a 6mm. Si bien en comparación con un extrusor estándar de una impresora 3D FDM, para el material adecuado es normal hacer uso de extrusores de este tamaño. En los artículos discutidos en la *Revisión bibliográfica* se puede ver como se hace uso de diámetros de entre 0.58mm y 6mm.

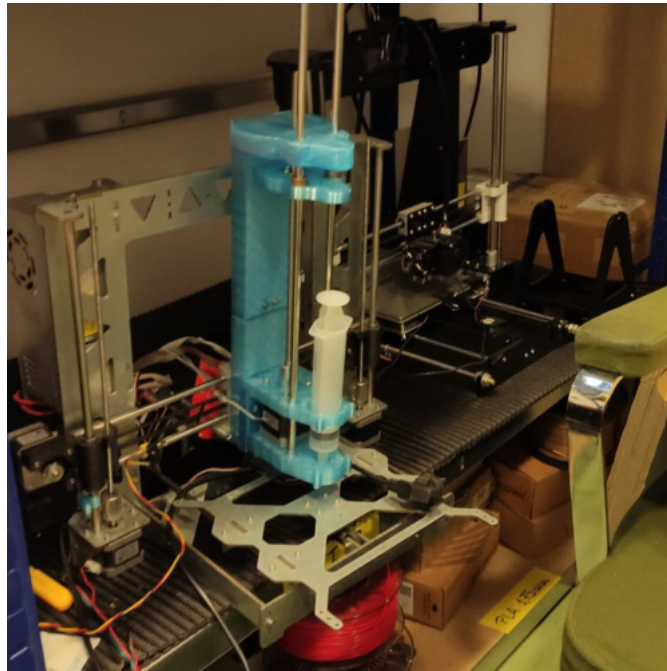


Figura 3.3: Impresora creada para la extrusión del material. Su diseño se puede encontrar en el trabajo de Gonzalo Borja Reyes Uzquiano [15].

### 3.1.3 Sustrato

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, uno de los desafíos más importantes del proyecto, es la extrusión del material. Para ello, ha de tener el tamaño adecuado para no obturar la salida del extrusor y ser arrastrado por el agente coagulante. A la vez, el sustrato aportará los nutrientes necesarios para el correcto crecimiento del organismo seleccionado.

## 3.2 Materiales

### 3.2.1 Hongo

Como se ha podido ver, en los estudios anteriores sobre esta materia[64] [65] [62], se puede reducir la selección de los hongos utilizados a los siguientes:

- *P. Ostreatus*
- *G. Lucidum*

- *F. Fomentaris*

En este apartado se discutirá cuáles son los ideales para el desarrollo de este proyecto. Para ello, hay primero que definir los requisitos que ha de cumplir el hongo seleccionado. Los siguientes parámetros han de ser considerados para una correcta selección del organismo que provea el micelio:

- **Disponibilidad:** Es imprescindible que el material sea fácil de conseguir. De otra manera la reproducción de este proyecto en otras circunstancias o en otro ambiente podría dificultarse. Además, es importante tener varias fuentes de materia prima en caso de que los cultivos o los clones guardados fuesen destruidos o contaminados.
- **Coste económico:** Este aspecto no es del todo esencial, ya que al tener comenzado un cultivo, teóricamente se dispone de una fuente prácticamente infinita de micelio. Por ello, los costes de entrada no son tan importantes como los costes que se puedan observar a lo largo de la vida útil del producto. Sin embargo, la reducción de costes es una ventaja a la hora de comparar hongos entre si.
- **Velocidad de crecimiento:** Este factor contribuye a los costes mencionados anteriormente. Un hongo que colonice el medio de manera más rápida requerirá de menos días en condiciones de cultivo. Esto, se traduce en menores costes, ya que ha de tenerse menos tiempo la calefactora encendida y se precisa menor control de las condiciones de humedad. Adicionalmente, esto se traduce en mayor disponibilidad de producto, dada el reducido tiempo de preparación del material.
- **Resiliencia:** Dado el proceso seguido, es importante que el organismo sea capaz de absorber bien los cambios de condiciones. Es esencial que sea resistente frente a los posibles agentes contaminantes. Además de esto, es necesario que sea capaz de absorber cambios en la humedad y temperatura, ya que en ciertas partes del proceso se encontrará en medios donde estas variables no estarán controladas. La extrusión en específico genera variaciones en la temperatura, presión y humedad.
- **Facilidad de cultivo:** Ninguno de los componentes de este proyecto es un experto en la materia del cuidado de estos organismos, por ello es necesario que su mantenimiento no sea demasiado complicado. Un hongo que sea fácil de cultivar conlleva que no precise de un sustrato específico para su desarrollo o de mantenimiento especial más allá de mantener las condiciones del medio.

De esta manera, se puede construir una matriz, cuadro 3.1, para comparar cómo cumplen los distintos hongos los requisitos mencionados.

Requisitos	Hongo		
	<i>G. Lucidum</i>	<i>P. Ostreatus</i>	<i>F. Fomentaris</i>
Disponibilidad	Alta	Alta	Media
Coste económico	Bajo	Medio	Alto
Velocidad de crecimiento	Alta	Alta	Alta
Resiliencia	Alta	Alta	Medio
Facilidad de cultivo	Alta	Alta	Media

Cuadro 3.1: Comparación de los distintos hongos.

En el cuadro 3.1 se puede ver que la clara elección de hongo es la *G. Lucidum*. Como ya se comentó en apartados anteriores, este hongo es de uso muy común, siendo populares las infusiones preparadas con su seta en zonas de Asia. Es por ello, que encontrar esporas o bolsas con semillas parcialmente colonizadas son fáciles de encontrar, habiendo múltiples proveedores españoles que lo distribuyen. El hecho de que sean comunes reduce su precio, lo cual le da ventaja en el apartado del coste económico. La velocidad con la que coloniza su entorno es alta, pudiendo verse indicios de propagación en un medio fértil en pocas horas después de entrar en contacto con cualquier elemento de la seta. Asimismo, es de una resiliencia elevada, ya que acepta un gran rango de temperaturas y humedades. Esto hace que su cultivo sea bastante simple.

El *P. Ostreatus* no tiene un coste igual de bajo que el del *G. Lucidum*, siendo esta la única área en la que se muestra en desventaja. Sin embargo, es notable que, aunque el coste sea algo mayor, no es un factor demasiado relevante. La diferencia de precios encontrada nunca fue tanta como la que presenta el tercer candidato, del que se hablará más tarde. En el resto de campos, el *P. Ostreatus* presenta una disponibilidad igual o mayor que la del *G. Lucidum*. Es un hongo muy popular entre la comunidad micológica, ya que este hongo es comestible. Este factor, junto con la facilidad de cultivo y su natural resiliencia hacen que este hongo sea un fuerte candidato a considerar.

El *F. Fomentaris* no es tan disponible como los otros dos. No es comestible como el *P. Ostreatus* ni tiene usos medicinales ni en las infusiones como el *G. Lucidum*. Por ello, la oferta es bastante menor. No es difícil encontrar proveedores, e incluso se podría conseguir de forma independiente sacando clones de un espécimen salvaje. Sin embargo, ambas alternativas presentan un coste económico o una inversión

del tiempo que no merece la pena. Siendo menor la comunidad micológica que cultiva estas setas, está menos claro cómo hacerlo. No se están incluyendo como posibilidad los kits de autocultivo de *Grow.bio*[68] como *F. Fomentaris*, ya que no se tiene claro que el hongo utilizado sea de esta especie. De igual manera, pedir estos equipos supone importarlos desde Estados Unidos, lo cual añade tiempo y coste al proyecto.

Habiendo analizado cada candidato en profundidad, se decide por optar por los hongos *G. Lucidum* y *P. Ostreatus*. Si bien no presentan grandes diferencias en los requisitos, es importante ver las diferencias que pudiera haber en sus propiedades físicas y mecánicas o en la facilidad de procesar ambos tipos de hongos. Los hongos fueron adquiridos del proveedor de hongos *Mycelia*[69][70].



(a) Cultivo de *P. Ostreatus*.



(b) Cultivo de *G. Lucidum*.

Figura 3.4: Hongos seleccionados para el desarrollo del proyecto.

### 3.2.2 Agente Coagulante

El agente coagulante seleccionado para este proyecto es una solución de chitosan en ácido acético. El chitosan utilizado en este estudio fue proporcionado por *ThermoFisher Scientific*[71]. A este, se le añade cierta proporción de agua para

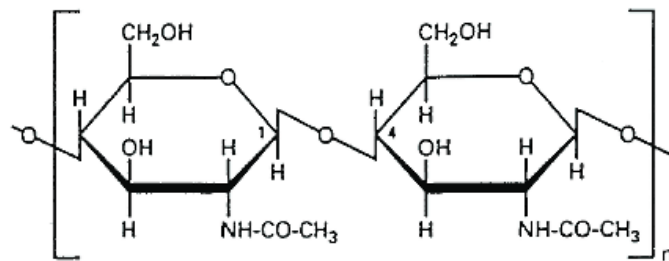
hidratar al serrín ya que, como se explicará en un apartado posterior, este estará completamente deshidratado. En este punto, formará una pasta viscosa con la capacidad de mantener la forma.



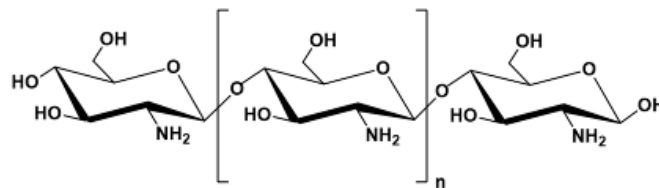
Figura 3.5: Pasta resultante de la mezcla con el quitosan.

El quitosan es la forma deacetilada de la quitina [72]. Como ya se mencionó antes, la quitina es un biopolímero presente en las cáscaras de crustáceos y en las hifas de los hongos. Es por ello por lo que es un material compatible con el organismo en cuestión. El quitosan, es conocido por sus características de biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad [72]. De hecho, este material ya es utilizado en medicina para la producción de cartílago, andamiaje o *scaffolding* y curación de heridas [73].





(a) Estructura molecular de la quitina. **Fuente:** *Lertsutthiwong et al.*



(b) Estructura molecular del quitosán. **Fuente:** *Ayan et al.*

Figura 3.6: Quitina y quitosán

La deacetilación implica la eliminación del grupo acetyl de la molécula. La acetilación ocurre normalmente sobre átomos de Oxígeno o Nitrógeno, lo cual se define como N- y O-acetilación respectivamente [74][75]. Las estructuras químicas de ambas moléculas, quitina y quitosán, pueden ser observadas en las figuras 3.6a y 3.6b respectivamente.

El compuesto que se utilizará, es una forma parcialmente acetilada del quitosán, siguiendo el proceso de *Soh et al.*[62]. En este estudio, se disuelve el quitosán en una solución del 1% de ácido acético. Este compuesto resultó ser el más práctico de todas las opciones estudiadas. Estas opciones serán desarrolladas en futuros apartados. Sin embargo, una lista de las opciones es la siguiente:

- **Mezcla de quitosán en una solución de ácido acético:** En este caso se probaron diferentes opciones en función del peso de quitosán incorporado a la mezcla. Como ya se verá en futuros apartados, la viscosidad del medio se incrementa con la proporción de quitosán.
  - 1% de peso en quitosán
  - 2% de peso en quitosán
  - 3% de peso en quitosán

- **Gel de chitosan:** Este compuesto presentaba propiedades mecánicas muy pobres, además de que no resultaba en una sustancia fluida y viscosa, sino más bien sólida. Por ello, fue descartado como opción para crear la pasta extruible. Además de ello, el proceso para conseguir el material es complicado y requiere de sustancias nocivas para la salud. Haciendo un uso precavido de estos elementos no hay riesgo. Sin embargo, se aleja del objetivo de este proyecto de hacer el proceso lo más asequible posible.
- **Compuesto de agar con levadura y malta:** Este medio fue utilizado en un principio para guardar y cultivar los clones de los especímenes con los que se trabajaba. Es un medio rico en nutrientes que provee de un entorno óptimo para el desarrollo del micelio. Sin embargo, su estado sólido no hace factible la incorporación del serrín para crear la pasta que se busca. Además de esto, su densidad no posibilita el desarrollo del micelio más allá de la superficie.
- **Gelatina de piel bovina:** La imposibilidad de aumentar su viscosidad o de llegar a su estado de gel fueron los culpables de que se descartase el uso de este material para actuar como agente coagulante.
- **Residuo de la industria maderera:** Por su composición desconocida y la imposibilidad de esterilizarlo, fue inmediatamente descartado.

### 3.2.3 Sustrato

Para este proyecto, se probaron tres tipos de sustratos con el objetivo de ver el impacto que tuviera sobre el crecimiento del hongo y sobre las propiedades mecánicas y físicas del material. En primer lugar, está el serrín. Este material es barato y altamente disponible. En segundo lugar, fibra de coco. Esta alternativa es algo más cara pero sigue siendo altamente disponible. Por último, una mezcla a la mitad de los dos sustratos.

Para la elección de los sustratos, al igual que con la elección del hongo, se han de tener en cuenta ciertos requisitos. Algunos de ellos coinciden con los de los hongos, ya que han de ser de bajo costo y altamente disponibles. Sin embargo, a diferencia del caso del hongo, la elección de este afecta a la elección del sustrato. Esto se debe a que los hongos elegidos no crecen en cualquier medio, sino que han de cumplir ciertos criterios. Las características que ha de recoger el sustrato deben ser:

- **Disponibilidad:** El material a utilizar ha de ser ampliamente disponible. La disponibilidad de un producto acorta los tiempos de espera para que llegue el producto y evita que solo haya un proveedor. De esta manera, si el suministro

se corta, se puede confiar en que haya otra fuente de la materia de una calidad relativamente parecida. Adicionalmente, esto ayuda a la reproducción del proyecto en caso de que se quisiera seguir desarrollando.

- **Coste económico:** Como se mencionó antes con los hongos, es importante disminuir los costes de entrada todo lo posible. A diferencia de los hongos, la materia a utilizar no se multiplica. La cantidad de hongo que se pueda conseguir será directamente proporcional a la cantidad de sustrato que se tenga, y por ello el coste del proyecto está muy relacionado con este parámetro.
- **Base vegetal:** Los hongos seleccionados son conocidos como saprófitos. Esto quiere decir que se alimentan de materia orgánica vegetal en descomposición [76]. Por ello han de ser descartados elementos que pudieran tener origen animal. Más allá de la dieta del hongo, la materia en descomposición de origen animal suele portar con ella mayor número de parásitos y agentes externos, lo cual dificultaría el crecimiento del hongo.
- **Ausencia de agentes químicos en exceso:** Si bien los hongos son usados para la descomposición de agentes químicos, como ya se mostró con la micorremediación, no es aconsejable para el crecimiento de los mismos. Dado que se quieren estudiar los parámetros que influyen en las propiedades de los hongos, es preferible reducir el mayor número de variables desconocidas. Por ello, es preferible trabajar con un sustrato libre del mayor número posible de agentes químicos.



Figura 3.7: Sustrato en el proceso de ser molido y mezclado.

El serrín y la fibra de coco cumplen con todos estos requisitos perfectamente. En primer lugar, son altamente disponibles y de coste reducido. En el caso del serrín, es producido como residuo en la industria maderera, por lo que no hay problema con el suministro, además de que es de coste bastante reducido. En el caso de la fibra de coco, es ampliamente utilizada en el mundo de la jardinería, por lo que cualquier establecimiento dedicado a estos enseres puede proveer este producto.

En cuanto a la base vegetal, en ambos se cumple este requisito. En el caso del serrín utilizado, la mayor parte proviene de madera de pino. Este tipo de madera no es comúnmente usada para el crecimiento de hongos y setas, pero sí es más común de encontrar. En cuanto a la fibra de coco, los bloques que se venden como sustrato están prácticamente compuestos enteros de la fibra de la cáscara de este fruto.



Figura 3.8: Fibra de serrín.

### 3.3 Método

El proceso seguido en la creación del material se divide en seis etapas, representadas de manera gráfica en la figura 3.9. En cada una de ellas, juega un papel esencial cada uno de los componentes clasificados al principio del capítulo. En este apartado se irán definiendo el papel que juegan los componentes en cada parte del proceso. El proceso seguido es necesariamente secuencial, ya que depende, en mayor parte del crecimiento del hongo. Se han definido las etapas del proceso de la

siguiente manera:

- **Inoculación del sustrato:** Esta etapa es una de las más importantes, por estar al comienzo del proceso. El mayor riesgo en esta etapa es la contaminación. Si bien este es un problema persistente en todas las etapas, es crucial en esta primera. En caso de que se diera contaminación en la inoculación del sustrato, todo el cultivo o el clon se vería comprometido, afectando de sobremanera al resultado final del proceso.

Esta etapa se basa en la mezcla del hongo con el sustrato a utilizar. Se puede partir de dos fuentes distintas. En primer lugar, se puede partir directamente de hongo provisto por un criador de hongos. En general, esta fuente de hongo viene preparada para que el micelio empiece a desarrollar setas. Esto quiere decir que son bolsas compactadas al vacío con una gran densidad de micelio. Tiene mínima ventilación y está pensado para que se realicen unos agujero de pequeño tamaño en la bolsa para que puedan salir por ahí las setas. El segundo caso es el uso de clones creados en el laboratorio. Este medio se basa en la incorporación de trozos de *Agar* colonizados con micelio. Se entrará más en detalle en la creación de dichos clones en esta sección

- **Primera colonización:** Una vez ha sido mezclado el hongo con el sustrato, se procede a esperar que el organismo colonice el medio. Para ello, es importante mantener unas condiciones constantes de temperatura y humedad. Si bien la concentración de partículas de Dióxido de Carbono influye sobre el crecimiento de los hongos [77][78], en este caso no se tendrá en cuenta, dado que en el medio utilizado para la primera colonización no hay manera de controlarlo. Sin embargo, las condiciones dentro del laboratorio presentan poca variabilidad en este respecto. Es en este paso del proceso donde se pueden ver claras diferencias entre los sustratos en términos de calidad y preferencia del hongo. Este periodo de colonización tendrá una duración de un par de días.
- **Mezcla con el agente coagulante:** Después de que el hongo haya tenido la ocasión de colonizar el sustrato a utilizar, es necesario mezclar con el agente coagulante. Resultado de este paso es la pasta viscosa y con capacidad de mantener cierta integridad estructural que se buscaba. Para ello, es necesario primero la creación de la solución de chitosan, la esterilización del sustrato y la selección del tamaño. Este último aspecto provó ser crucial para la correcta extrusión del material. En cuanto menor era el tamaño de grano del sustrato, mejores eran las propiedades de extrusión. Las proporciones exactas de material utilizado son:

– 30% en peso de Chitosan.

- 30% en peso de Agua.
  - 30% en peso de Sustrato inoculado.
- **Extrusión:** Una vez se ha mezclado con el coagulante y se ha formado la pasta, se procede a la extrusión. Esta debe realizarse en condiciones en las que haya mínima contaminación. Como ya se ha mencionado previamente, es esencial que el organismo que colonice la pieza sea el elegido y no otro. Es práctica común en la comunidad micológica el uso de cámaras de flujo laminar. Estos equipos previenen la contaminación de la campana estando el interior de esta a mayor presión que el exterior. El aire que se introduce en ellas, atraviesa previamente un filtro para evitar que elementos nocivos entren dentro del medio estéril.
  - **Incubación:** Tras tener la probeta deseada, es esencial mantener las condiciones de humedad y temperaturas en un rango óptimo. Para ello, se diseñó una cámara que consiguiera este propósito [15]. En este estado estarán desde los 15 hasta los 30 días. Teóricamente, tras este tiempo debería observarse cómo el hongo ha colonizado todo el volumen. Como se verá en el capítulo de resultados, este solamente colonizará la superficie de la probeta. Este es un campo que ha de ser estudiado en futuras líneas de investigación.
  - **Parada del crecimiento biológico:** La fase final del proceso es también la más simple. Si no se hace nada, el micelio seguirá creciendo. Esto podría tener sus utilidades, dando lugar a materiales con capacidad de autorrepararse. Sin embargo, ese no es el objetivo del trabajo. Además, una colonización fuera de control del micelio podría acabar dañando a componentes que se pusieran en contacto con el material en caso de tener un origen vegetal. Por ello, el crecimiento ha de ser detenido. Esto se realiza de la misma manera con la que se esteriliza el equipo que tendrá contacto con el hongo o los sustratos. Es necesario aumentar su temperatura hasta unos 120°C. De esta manera, cualquier ser vivo quedará eliminado.



Figura 3.9: Diagrama del proceso seguido.

### 3.3.1 Hongo

En esta sección se hablará de los diferentes procesos seguidos para mantener una fuente constante y fiable de hongos. Se dividirá la sección en dos subsecciones, cultivos en tarro y cultivos de clonación. Estos primeros son los que más duración tuvieron, aportando la mayor parte del organismo necesario para el desarrollo del proyecto. Los otros cultivos, se sacaron a partir de los primeros, sirviendo como una copia de seguridad de los especímenes.

#### Cultivos en tarro

En primer lugar, se crearon los cultivos en tarro. Este método no requiere gran sofisticación. Simplemente, se llena un tarro con cierta proporción de sustrato mezclado con cierta proporción de sustrato inoculado. Al ser los primeros cultivos en realizarse, el sustrato inoculado fueron semillas recubiertas de micelio. Estas se mezclaron con fibra de coco, serrín o una mezcla de ambas.

En el cuadro 3.2 se pueden observar los cultivos empezados. Se puede observar ahí la proporción entre sustrato y hongo, parámetro que será importante para monitorizar la velocidad de crecimiento del hongo. De estos cultivos, desafortunadamente, no sobrevivieron todos. Esto será discutido en la sección de resultados en mayor profundidad.

Nombre	Fecha de inicio	Sustrato	Peso del sustrato	Hongo	Peso del hongo	Ratio Hongo/sustrato
Serrin_Coco_P_140122	14/01/2022	Serrin Coco	443,00 g	Pleorotus Ostreatus	244,70 g	0,55
Serrin_P_140122	14/01/2022	Serrin	330,40 g	Pleorotus Ostreatus	220,35 g	0,67
Coco_P_140122	14/01/2022	Coco	412,00 g	Pleorotus Ostreatus	214,60 g	0,52
Coco1_G_140122	14/01/2022	Coco	2020,69 g	Ganoderma Lucidum	126,66 g	0,06
Coco2_G_140122	14/01/2022	Coco	662,94 g	Ganoderma Lucidum	173,25 g	0,26
Serrin_Coco_G_140122	14/01/2022	Serrin Coco	268,46 g	Ganoderma Lucidum	220,44 g	0,82
Serrin_G_140122	14/01/2022	Serrin	335,41 g	Ganoderma Lucidum	318,90 g	0,95

Cuadro 3.2: Cultivos creados en función de sustrato y hongo utilizado.

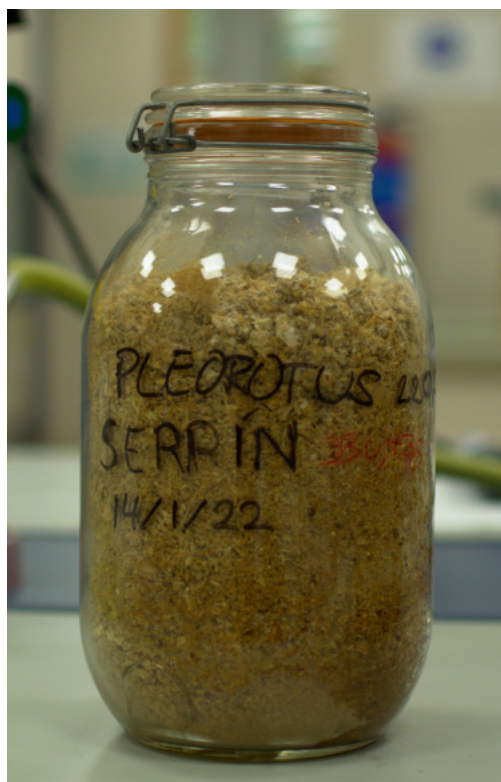
En las figuras 3.10a, 3.10b y 3.10c se pueden observar los cultivos creados antes de ser colonizados. En estos cultivos se utilizó como sustrato, de izquierda a derecha, fibra de coco, mezcla de serrín y coco y, por último, serrín.



(a) Cultivo de **fibra de coco** con *P. Ostreatus*.



(b) Cultivo de **serrín y fibra de coco** con *P. Ostreatus*.



(c) Cultivo de **serrín** con *P. Ostreatus*.

Figura 3.10: Cultivos en tarros.



Estos tarros fueron esterilizados en primer lugar con etanol al 95% y luego puestos en una calefactora a 120°C durante una hora. Esto permite minimizar la contaminación posible que pudiera interferir con el crecimiento del hongo. Después de esto, se introduce el sustrato seleccionado. Para mantener las condiciones de temperatura y humedad, se utilizó una calefactora con un plato con agua. De esta manera, se consiguieron unas condiciones constantes de 30°C y un 80% de Humedad Relativa. La única pega de este método es la necesidad de tener que cambiar el agua casi constantemente por riesgo de contaminación del medio. Dado que los hongos necesitan oxígeno para poder desarrollarse correctamente, las tapas de los botes tuvieron que permanecer abiertas. Fueron cubiertas simplemente con un algodón que impedía el acceso de agentes contaminantes. Se puede ver la situación de los cultivos en la figura 3.11.



Figura 3.11: Cultivos en la calefactora.

#### Cultivos de clonación

Los cultivos de clonación se realizaron en un medio de Agar. La receta utilizada para la elaboración de este medio, se sacó de criadores de hongos. En concreto, la cantidad exacta de cada componente proviene del canal de YouTube *Freshcap Mushrooms*[79]. Para la creación de este agar, los componentes son los siguientes por cada litro de agua:

- **Extracto de malta:** 20g.
- **Polvo de Agar:** 20g.
- **Levadura nutricional:** 2g.

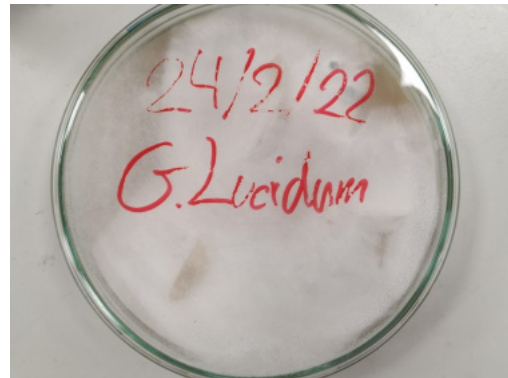
La elaboración de estos medios de cultivo es muy sencilla. En primer lugar, se mezclan los tres componentes mencionados en las proporciones definidas. Seguidamente, se introducen en un recipiente resistente al calor. Dicho recipiente será

introducido en un autoclave, calefactora u horno para ser calentado. El Agar posee una curva de histéresis, la cual hace que al aumentar su temperatura y volver a enfriarlo, el estado de reposo cambie [80]. De esta manera, queda un gel sólido óptimo para el crecimiento del micelio.

En la figura 3.12a se puede observar una placa sin colonizar todavía. Se pueden ver trozos de una placa previa de cultivo. Esto se debe a que la placa es tan nutritiva que la contaminación es inminente. El único remedio para la mitigación de este efecto es coger los trozos que no han sido contaminados para pasarlos a una nueva placa. Se puede ver claramente qué partes de la placa han sido contaminados por el color del micelio. En caso de ser blanco, es el micelio deseado. En caso contrario, es crucial quitarlo de la placa, puesto que podría acabar con el cultivo entero. En la figura 3.12b se puede ver un cultivo colonizado por completo sin ningún tipo de contaminación.



(a) Placa de Agar antes de ser colonizada.



(b) Placa de Agar colonizada

Figura 3.12: Cultivos en Agar

### 3.3.2 Agente coagulante

Para la creación del agente coagulante, se utilizó una mezcla de chitosan con una solución de ácido acético. De esta manera, los componentes esenciales fueron los siguientes:

- **Chitosan:** con un grado de deacetilación mayor o igual al 90%[71].

- **Ácido acético glacial**
- **Agua**

El proceso para la creación del agente coagulante es bastante sencillo. Sin embargo, lleva consigo una importante inversión de tiempo. En primer lugar, se crea la solución de ácido acético. Para ello, se introduce 1mL de ácido acético glacial por cada 100mL de agua. Esta solución contribuirá a la acetilación del quitosán. Tras haber creado la solución, se introduce un agitador magnético, que se activará a velocidad media alta, evitando salpicar o derramar solución. Por último, se irá introduciendo el quitosán. La proporción que mejor resultado dió fue la de 3% de quitosán. Este se irá incorporando poco a poco y intentará incrementar la velocidad del proceso removiendo con una varilla de vidrio. Esto se debe a que el compuesto suele flotar a la superficie y es difícil de disolver. Tras un par de horas se debería obtener un líquido viscoso de color amarillento. En la figura 3.13 se puede ver el proceso de creación del agente coagulante.

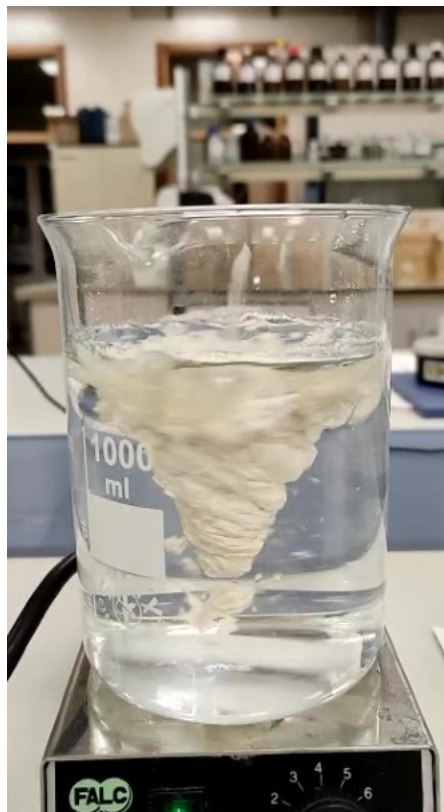


Figura 3.13: Mezclado del quitosán con la solución de ácido acético.

### 3.3.3 Sustrato

Como se mencionó anteriormente, para conseguir una extrusión óptima el tamaño de grano del sustrato es un parámetro crucial. Por ello, ha de conseguirse un tamaño consistente. El proceso seguido incluirá los siguientes elementos:

- **Sustrato:** al probarse otros procesos de extrusión, quedó claro que el único candidato apto era el serrín.
- **Amoladora:** Con ella se muele el serrín para reducir su tamaño.
- **Tamiz:** Con él se controla que el serrín tenga un tamaño consistente, **0.5mm**.

El primer paso en este proceso es conseguir un tamaño de grano apropiado. Para ello, se pasa por la amoladora. El equipo utilizado en este caso es un molinillo de café o de especias. Gracias a esto se consigue reducir el tamaño del serrín. Sin embargo, no es un tamaño consistente, ya que el grano de menor tamaño tiende a agruparse en la parte inferior del aparato. Además, en ausencia de elementos abrasivos, se llega a un estado de equilibrio en el que el serrín ya no reduce su tamaño. Tras esto, es importante la selección del serrín. Para esta empresa se hace uso de un tamiz de laboratorio. Con este elemento se hace un filtro del material a utilizar. El resultado será esterilizado y juntado con el agente coagulante. En la imagen 3.14 se puede ver este proceso de manera gráfica.

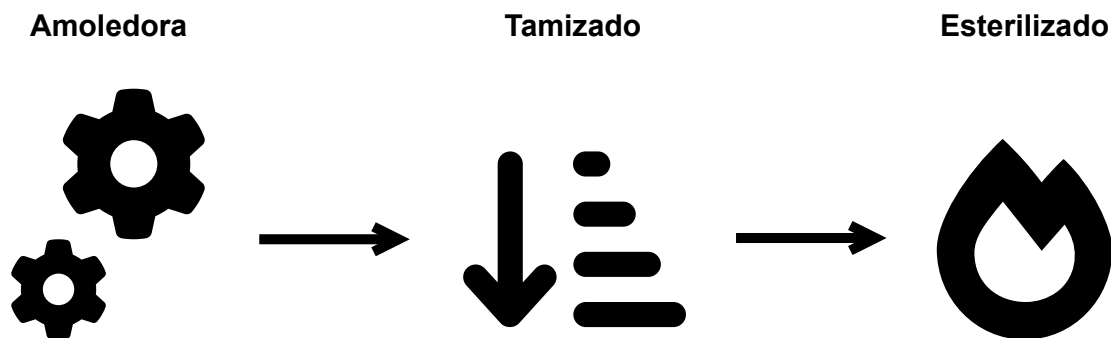


Figura 3.14: Proceso seguido para conseguir el sustrato.

## 3.4 Diseño experimental

Teniendo claras las hipótesis, se pueden diseñar las pruebas que las confirmarán o refutarán. Se crearán pruebas para cada componente del material en particular,

además de para el material en su conjunto.

En primer lugar, se definirán las pruebas a realizar sobre el material en su conjunto. Estas pueden resumirse en pruebas de carácter mecánico. Esto se debe, a que el resto de hipótesis serán confirmadas o refutadas para cada uno de los componentes que conforman el material. De esta manera, las pruebas realizadas para el material final serán las siguientes:

- **Ensayo de compresión:** La primera prueba realizada será un ensayo de compresión. Esto se realiza para comprobar cuál es la resistencia del materia frente a esfuerzos de esta naturaleza. Este valor será comparado con el análogo del poliestireno expandido (EPS). El objetivo de esta prueba es analizar si en este campo, el material creado presenta unas propiedades competitivas. Estos valores también serán comparados con aquellos conseguidos en estudios previos sobre la materia. Las probetas utilizadas en este ensayo tendrán 15.82mm de diámetro y con un espesor de alrededor de 2mm.
- **Ensayo de flexión en tres puntos:** En segundo lugar, se realizará una prueba de flexión. Aquí, se pondrá a prueba la capacidad del material para resistir cargas en este sentido. Al igual que la anterior, se compararán tanto con estudios anteriores como con las propiedades del EPS. En este caso, las probetas miden 55mm de largo, como se puede observar en la figura 3.15.

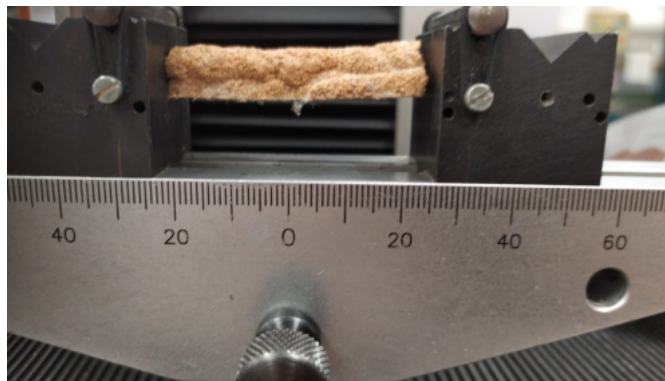


Figura 3.15: Probeta utilizada para los ensayos de Flexión.

- **Ensayo de dureza:** Para medir la dureza que tiene la capa superficial de la probeta, es necesario realizar un ensayo de dureza. Se realizará un ensayo de dureza Shore A. En esta prueba, un durómetro empuja una punta de metal contra el material. De esta manera, se consigue una medida entre 0 y 100 en la escala Shore A [81].



Figura 3.16: Ensayo de dureza para una pieza creada con el material.

### 3.4.1 Hongo

En primer lugar, ha de demostrarse que el hongo es capaz de crecer y de colonizar el sustrato en pocos días. Este control puede realizarse de manera visual. El color blanco característico del micelio hace que su detección sea muy simple. Sin embargo, esto solo puede demostrarse para la superficie. Para la confirmación de la presencia de hongo en muestras, más allá del desarrollo superficial, la única solución es el aislamiento de una sección del sustrato para ver si se da crecimiento de micelio.

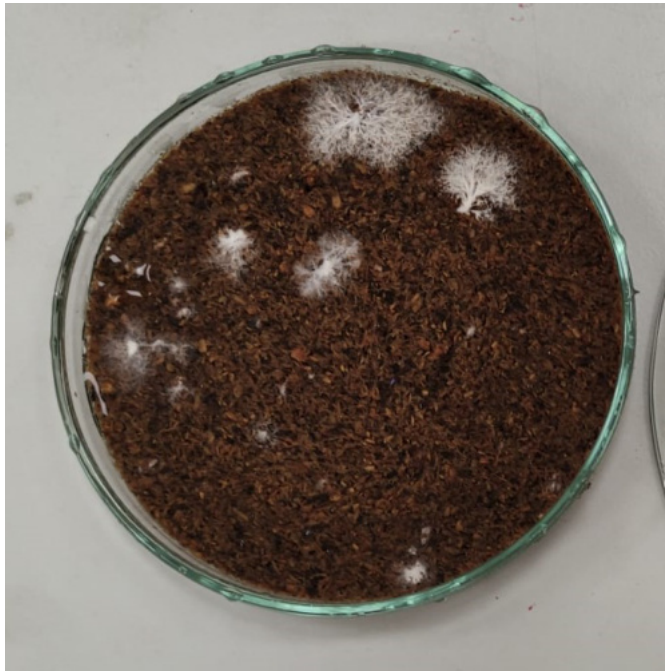


Figura 3.17: Placa de petri con una muestra de crecimiento del micelio.

En segundo lugar, se ha de demostrar que se tiene un cultivo que sirve como fuente constante de micelio. Para ello, se ha de controlar el estado del hongo regular y periódicamente. En caso de presentar contaminaciones o influencias de agentes externos, ese cultivo se da como perdido y hay que intentar preservar lo máximo posible.

En el caso de los cultivos en medios de agar, esto es fácil de hacer. Simplemente, como se ha comentado anteriormente, se seleccionan zonas del medio que no presenten contaminación y se trasladan a medios limpios y estériles. Para ello se han de esterilizar todos los instrumentos a utilizar. Además, se ha de trabajar en un medio estéril, como pudiera ser una cámara de flujo laminar.

Sin embargo, en caso del tarro es más difícil. Es posible crear clones del cultivo si hay presencia de setas. En este caso, se tomarán trozos de la carne interior del fruto y se pondrán en medios de agar. Después de ello, el micelio tendrá que ser transplantado el número de veces necesario como para que deje de presentar signos de contaminación. Un ejemplo de esto se puede ver en la figura 3.18.



Figura 3.18: Contaminación de un cultivo de tarro.

Por último, para demostrar la colonización del material por el hongo, simplemente es necesario buscar las hifas blancas por el volumen. Para ello, se crearán cortes longitudinales y transversales en un probeta que haya sido colonizada. Esto demostrará si el hongo ha sido capaz de penetrar más allá de la superficie.

### 3.4.2 Agente coagulante

Para el agente coagulante, es necesario hacer un estudio de viscosidad dinámica. Para ello, se utilizará un viscosímetro rotacional, figura 3.19. Con este aparato, se introduce un cabezal en el fluido. A medida que rota, se medirá la resistencia que opone el fluido al movimiento. De esta manera, se consigue la medida de la viscosidad. Es necesario hacer esta medida a diferentes velocidades y con un diámetro de cabezal apropiado para poder conseguir medidas con precisión.



Figura 3.19: Viscosímetro rotacional. **Fuente:** GAOTek



### **3.4.3 Sustrato**

Para demostrar que el sustrato porta los nutrientes adecuados, simplemente basta con ver si el micelio crece en el sustrato o no. Este proceso se podrá notar por la presencia de hifas y por la colonización del tarro en el que se encuentra o en la probeta utilizada. Adicionalmente, el tamaño de grano conseguido se comprobará mediante el uso de tamices, que limitan la dimensión máxima de la partícula.



# Capítulo 4

## Resultados

El objetivo de este capítulo es refutar o confirmar las hipótesis planteadas en el capítulo de la *Metodología experimental*. Además de ello, es necesario analizar el proceso seguido para llegar a la creación de cada uno de los componentes del material. Esto se hará analizando los dos componentes principales del material, los cultivos y el agente coagulante. El sustrato no se discutirá en este capítulo, puesto que su influencia queda localizada en la posibilidad de reducir el tamaño de la partícula o no. Teniendo en cuenta el proceso seguido para disminuir las dimensiones del grano de sustrato, la fibra de coco quedó descartada como medio viable para ser extruido. Por ello, los resultados discutidos toman el serrín como base del material.

En primer lugar, se estudiará la creación del material. Se analizarán aquí los problemas encontrados dentro del cultivo del hongo. Entre ellos se puede contar la contaminación del medio como uno de los problemas más influyentes en todo el proceso. Se verá qué agentes causaron las contaminaciones observadas y los métodos utilizados para lidiar con ello. Adicionalmente, se observará la manera en la que el micelio coloniza los cultivos y la velocidad en la que lo hace.

Pasando al agente coagulante, se verán las alternativas que se probaron para poder llegar hasta la solución seleccionada. Se analizarán los métodos utilizados y las características que hacen que estos medios no sean apropiados. Para resumir, se probaron cinco variantes distintas. Entre ellas se cuentan un residuo sacado de la industria maderera, gelatina de piel bovina, gel de chitosan, agar y, por último, la solución de chitosan.

Finalmente, se estudiarán los ensayos mecánicos mencionados en el capítulo de *Metodología experimental*. Entre ellos, se cuentan el ensayo de compresión, el de flexión, dureza y viscosidad mecánica. Este último se realizará sobre la solución de

chitosan antes de mezclarla con el material y en el material a extruir.

## 4.1 Creación del material

Para llegar a conseguir extractos del micelio cultivado, hubo que enfrentarse a dos grandes desafíos. En primer lugar, las condiciones del desarrollo del micelio y la velocidad de crecimiento. Dado que la temperatura afecta a la velocidad de crecimiento del micelio, es difícil predecir cuál será el punto óptimo para la extracción de este mismo. Si se espera demasiado, se habrá formado una dura costra que dificultará las operaciones que se quiera hacer. Si por el contrario se espera demasiado poco, es probable que se acabe seleccionando parte del sustrato que no haya sido colonizado.

Más allá de este problema, yace el de la creación del agente coagulante. Para ello, se probarán diferentes medios, llegando a la conclusión de que la solución de chitosan es la más adecuada.

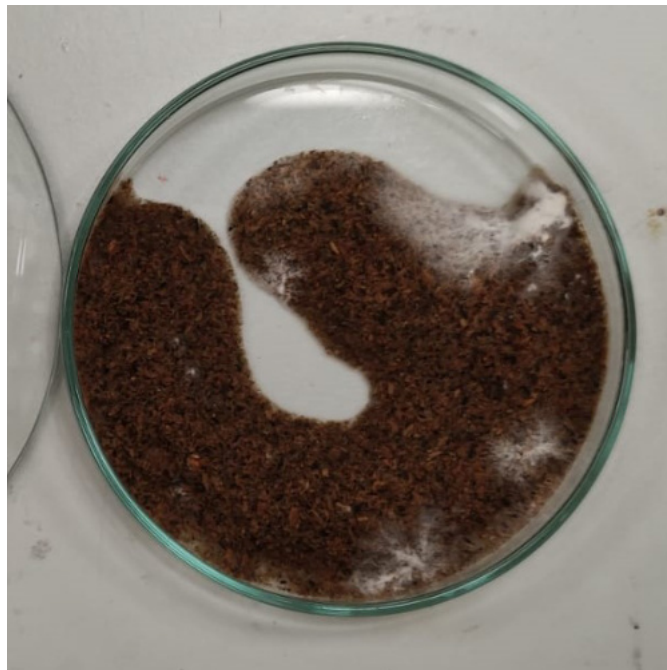


Figura 4.1: Primera extrusión del material siendo colonizada superficialmente.

### 4.1.1 Cultivos

Los cultivos en tarro utilizados fueron puestos inicialmente en condiciones anaerobias a 30°C y 80% de Humedad relativa. Como ya se ha mencionado, esto se conseguía mediante el uso de una calefactora con un plato con agua esterilizada que era renovada cada poco tiempo.

Esta disposición no mostraba indicios de ningún tipo de crecimiento a excepción de uno de los tarros, ilustrado en la figura 4.2. Todos ellos habían sido tapados herméticamente por riesgo de contaminación. Sin embargo, esto restringía el acceso de oxígeno, elemento necesario para el crecimiento del organismo. Es por ello que se optó por la utilización de tapas de algodón. De esta manera, se restringe el tamaño de las partículas que entran al recipiente, evitando así la entrada de agentes contaminantes.

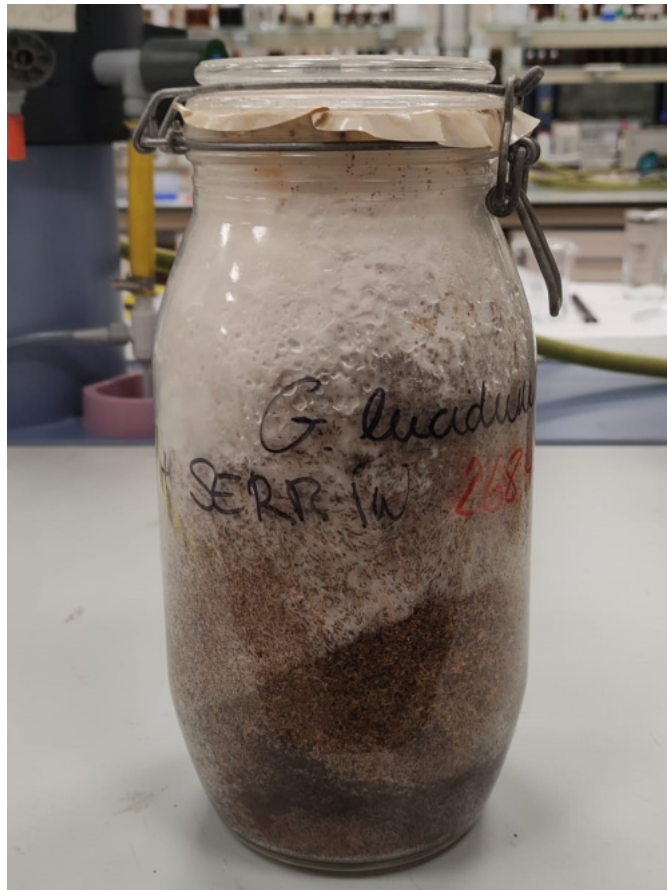


Figura 4.2: Tarro de cultivo de *G. Lucidum*.

### Desarrollo del micelio

Una vez se dejó respirar al micelio, el hongo empezó a colonizar rápidamente el medio. En los tarros el crecimiento fue exponencial, acabando la mayor parte del sustrato cubierto por el hongo.

Para hacer un control de las hifas, se hizo uso de un microscopio para poder ver cómo este material se distribuye. En la figura 4.3 se puede observar el crecimiento del hongo. Se puede diferenciar de otros tipos de hongo por el tamaño de la hifa. Otros especímenes de diferente especie presentan menor grosor y color distinto. Debido a la falta de tinte, se puede ver el color natural de la red de micelio, que es de un tono blanquecino casi transparente.

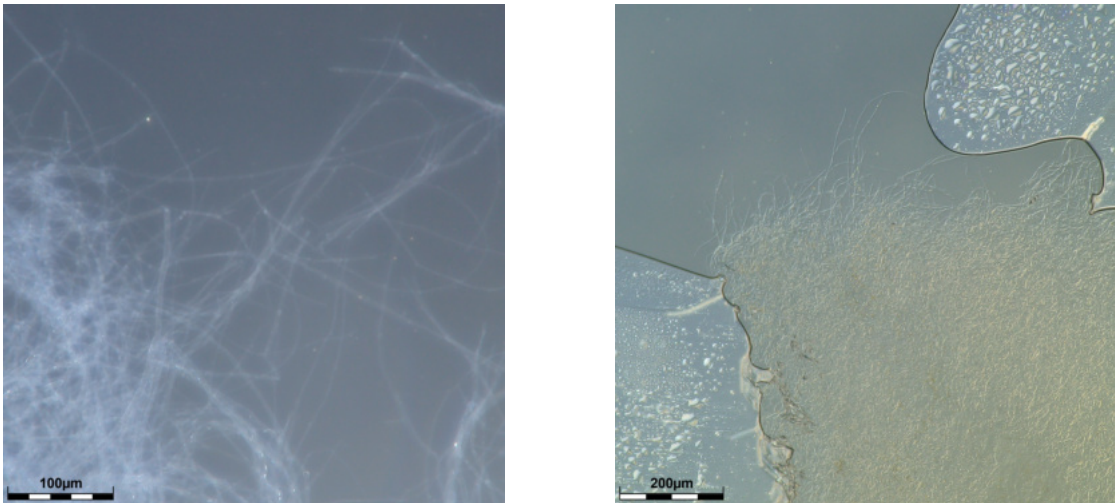


Figura 4.3: Hifas de *P. Ostreatus*

Las muestras observadas en las figuras fueron tomadas de la seta una vez extraída. Esto se debe a que abrir un cultivo para tomar una muestra implicaría exponer a ese cultivo a una contaminación innecesaria. Por ello, se esperó a que se pudieran tomar muestras que no afectaran el crecimiento del hongo.

Para observar el crecimiento del hongo por el volumen del medio, se creó una probeta que pudiera ser seccionada. El proceso seguido fue el mismo que para cualquier otra pieza. Se mezclaron a partes iguales sustrato inoculado, agente coagulante y agua. Se esperaron 20 días de incubación en un medio controlado para el correcto desarrollo del hongo. Una vez pasado este tiempo, se seccionó la pieza de manera longitudinal. De esta manera se podría ver mejor si el micelio

había penetrado en la pieza.



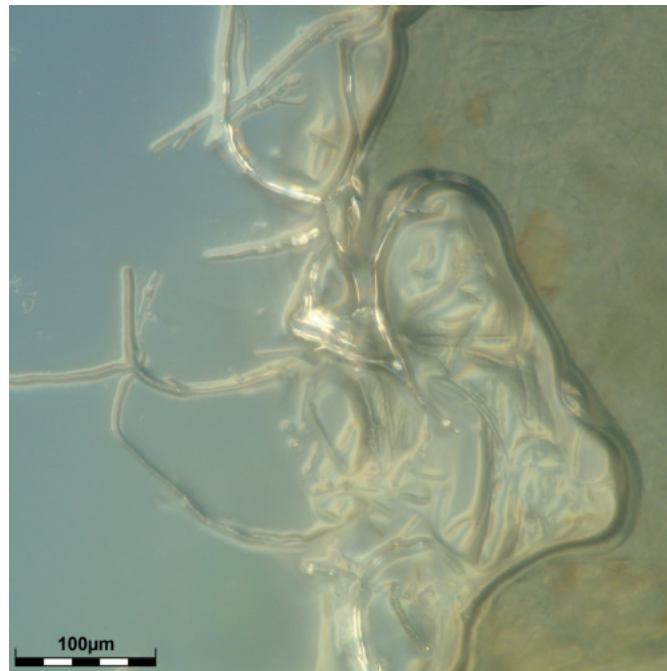
Figura 4.4: Probeta utilizada para controlar el desarrollo del micelio por el sustrato.

Como se puede ver en la figura 4.4, el hongo no penetró más allá de la superficie. En un primer momento se planteó la hipótesis de que podría deberse al tamaño de grano del serrín, que, al ser tan pequeño y estar compactado mediante el quitosán, impedía al hongo colonizar el volumen entero. Sin embargo, esta teoría se desmintió al limpiar los tarros de cultivo. En ellos, se podía observar el mismo fenómeno. El hongo crecía por la superficie, pegado al vidrio, pero no tocaba el serrín o la fibra de coco más profunda. Esto es posible que se deba a que la tendencia del micelio del *G. Lucidum* es hacia fuera, siendo esta el comportamiento que buscan los fabricantes de micelio [82].

### Contaminación

Durante el crecimiento del hongo, se dieron dos casos de contaminación. El primero fue a manos de un hongo perteneciente al género de *Penicilium*. El segundo caso no llegó a afectar al sustrato. Sin embargo, se encontraron indicios de presencias de esporas en el algodón que cubría las bocas de los tarros.

Como se puede ver en la figura 4.5b, la base del bote se llenó de una población de hongo del género *Penicillium*. El color verdoso azulado delata su género [83], como se puede observar en la figura 4.5b. Si bien este hongo no es tóxico ni dañino para la salud, supone una contaminación del cultivo, que comprometía el crecimiento del hongo. Por ello, el tarro tuvo que ser vaciado, limpiado y esterilizado, quedando por tanto el cultivo inutilizado. Otra manera de diferenciar este hongo del *G. Lucidum* o del *P. Ostreatus*, es tomando muestras con el microscopio. En la figura 4.5a se puede observar que las hifas del hongo son de bastante mayor tamaño que las observadas en la figura 4.3.



(a) *Penicillium* bajo el microscopio.



(b) Contaminación de *Penicillium* en el agua filtrada.

Figura 4.5: Contaminación sufrida en los cultivos de tarro.



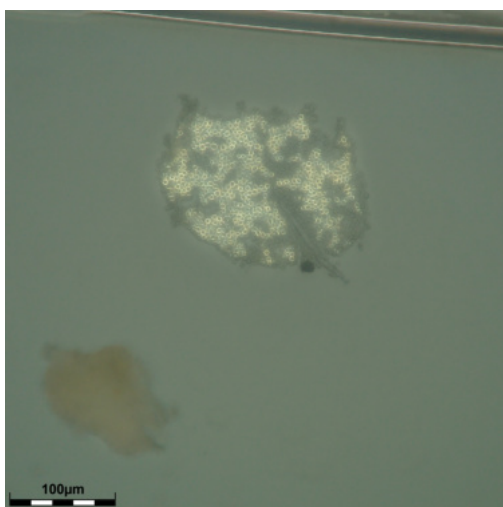
El origen de esta contaminación fue debido a una raja en el tarro. Esta grieta se creó por un incorrecto enfriamiento tras la esterilización del bote. En un primer momento el único impedimento que suponía la raja es que el agua introducida en el sustrato para mantener al hongo húmedo, se filtraba al exterior. Esto se solucionó poniendo un plato debajo del tarro. Esta situación se dio también en otro tarro, por lo que no se consideró importante reemplazar el contenedor. Sin embargo, el agua filtrada acabó contaminándose y las zonas próximas a la grieta también.

Posteriormente a este suceso, se encontraron esporas en los algodones de los tarros de los cultivos. Estos elementos se pueden ver a simple vista, como se ve en la figura 4.6. La presencia de estas motas negras podría significar que alguno de los cultivos hubiera sacado setas y estuviera esparciendo sus semillas. Sin embargo, esta teoría puede ser refutada por el hecho de que ninguno de los cultivos había dado fruto visible.

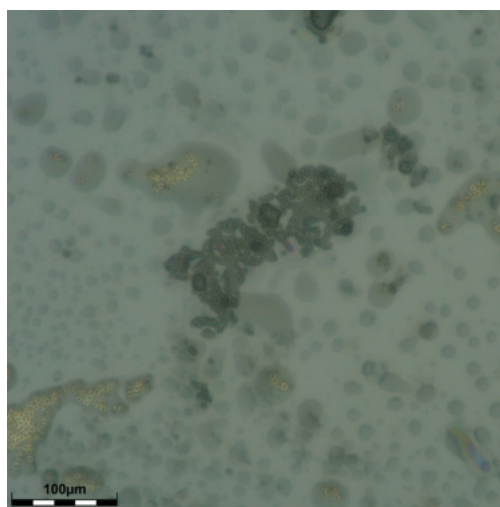


Figura 4.6: Esporas encontradas en el algodón del tarro.

En las figuras 4.7a y 4.7b se confirma que las esporas son de distinto origen. Se puede ver claramente diferencias en el color de ambos especímenes. Hay una gran cantidad de esporas en el ambiente. El número y la especie dependen de la zona y la estación del año. Por ello, la teoría más plausible es que ya se hallaran presentes en el aire.



(a) Esporas de *G. Lucidum*.



(b) Esporas de un contaminante.

Figura 4.7: Comparación entre esporas de *G. Lucidum* y un contaminante.

### Extracción del micelio y setas

Una vez se vio que el micelio había recubierto todo o la mayor parte del sustrato, se procedió a la extracción de muestras para ser mezcladas con el sustrato. Para ello, se introdujeron los cultivos seleccionados, en este caso de *G. Lucidum*, dentro del medio estéril, la campana de flujo laminar. Una vez ahí, se frotó la superficie de los tarros y de los recipientes a utilizar con alcohol. De esta manera, se minimiza la contaminación. El utensilio seleccionado fue un bisturí, que fue esterilizado mediante el uso de un mechero.



Figura 4.8: Extracción de muestras de micelio de *G. Lucidum*

El material extraído era duro y difícil de cortar. La textura recordaba al cuero o a la goma. Una vez cortado un trozo de material, la extrusión era prácticamente imposible, dada la textura del micelio y la imposibilidad de molerlo para conseguir un tamaño menor. Por ello, se consideró para futuras extrusiones reducir el tiempo de cultivo a los 15 días y hacerlo sobre el sustrato final. Esto quiere decir, utilizar

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS

---

el serrín molido y tamizado en lugar de hacer crecer el micelio sobre serrín para después molerlo.

Del cultivo seleccionado, se extrajo la muestra que queda ilustrada en la figura 4.9b. Si bien en el momento de extracción eran fragmentos sueltos, al dejarlo reposar unos días en un vaso de precipitados, el micelio creció uniendo los diferentes trozos para formar una pieza cohesionada. Tras esto, se esterilizó para detener el crecimiento biológico. Esto hizo que la textura cambiase de gomosa a dura y con tacto parecido al del corcho.



(a) Extracto del micelio siendo esterilizado.



(b) Extracto del micelio una vez esterilizado.

Figura 4.9: Extracto del micelio.

### 4.1.2 Agente Coagulante

Para la creación de un fluido lo suficientemente viscoso, se consideraron diversos candidatos. La viscosidad del fluido es el requisito necesario. Sin embargo, el que pueda aportar los nutrientes necesarios para el desarrollo del organismo es también esencial.

#### Residuo de la industria maderera

En primer lugar, se consideró utilizar residuo de industria maderera. La composición de este compuesto era desconocida. El único químico que era conocido era la lignina. Este es un polímero orgánico presente en la madera. Es uno de los polímeros orgánicos más abundantes en la naturaleza. Las enzimas producidas por los hongos son capaces de degradarla y descomponerla. Los hongos seleccionados en específico pertenecen a la clase de hongos que se alimentan de madera.

Este factor hace que en teoría el compuesto pareciese ideal para el proyecto. Sin embargo, al intentar esterilizar el residuo, este pasó a un estado sólido. Esto se podría haber evitado de tener acceso a un autoclave. Esto unido al hecho que se desconocía la mayor parte de los componentes del material, hicieron que fuese fácil descartarlo como candidato para actuar de agente coagulante.

#### Gelatina de piel bovina

En segundo lugar, se tomó en consideración la gelatina de piel bovina. Para conseguir este material, se preparó una solución del compuesto en agua, como se puede ver en la figura 4.10. Una vez disuelto, se elevó la temperatura hasta la ebullición y se volvió a bajar. Este proceso no consiguió aumentar la viscosidad ni hacer que el compuesto adquiriese propiedades de gelatina. Por estos dos inconvenientes fue descartado para el uso como agente coagulante.

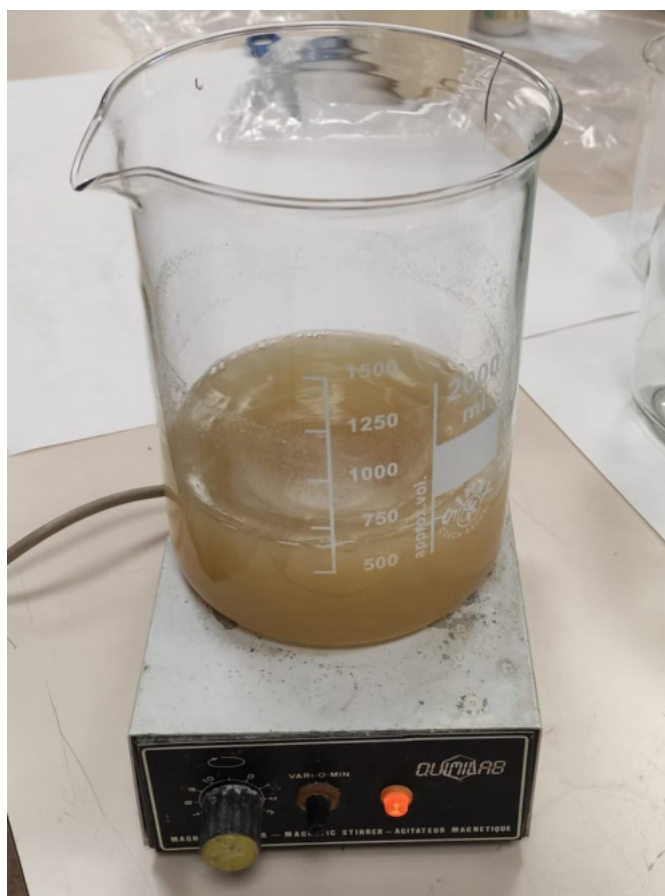


Figura 4.10: Solución creada con la gelatina de piel bovina.

### Gel de chitosan

Para la elaboración de este compuesto, se tomaron como referencia los artículos de *Hirano et al.*[84] y *Moore et al.*[85]. Estos fueron los primeros en desarrollar un gel de chitosan que no conllevara la reticulación del mismo[86]. Este proceso, se llevaba a partir de chitosan prácticamente deacetilado o, lo que es lo mismo, con un grado de deacetilación (DD) muy alto.

La preparación de este gel requiere de los siguientes elementos:

- Chitosan:  $DD \geq 90\%$  (500mg)
- Solución: 25mL 10% ácido acético
- Anhídrido acético: 12.5mL (Exceso)

Juntando estos componentes con un agitador magnético, se consigue el resultado representado en la figura 4.11. A primera vista, parecía que no había cambiado demasiado. Sin embargo, el componente adquirió un estado de gel. Era blando al tacto, aunque mantenía su integridad estructural. Tanto era así que mantuvo un hueco con la forma que dejó el agitador magnético al retirarlo.

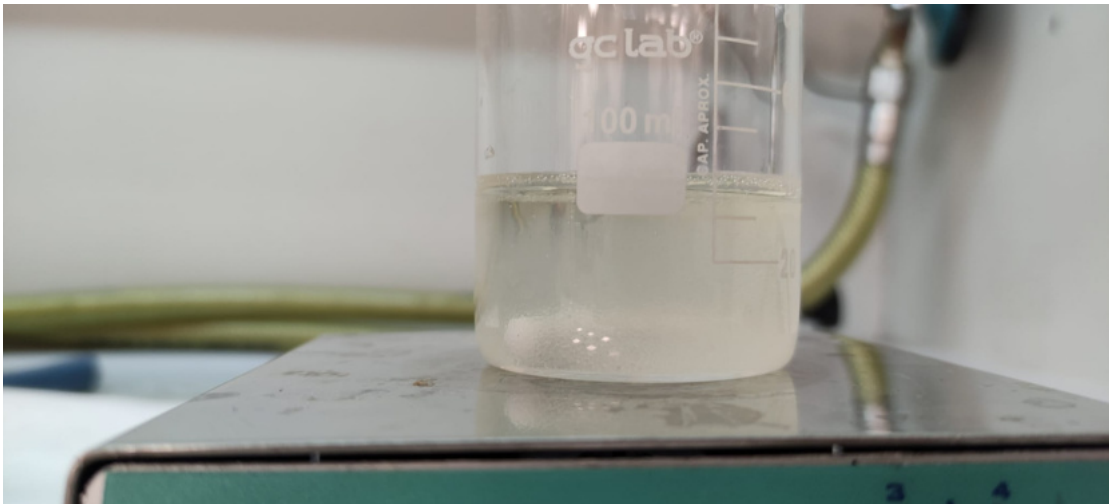
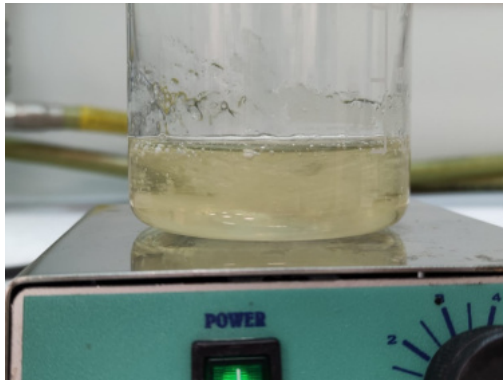


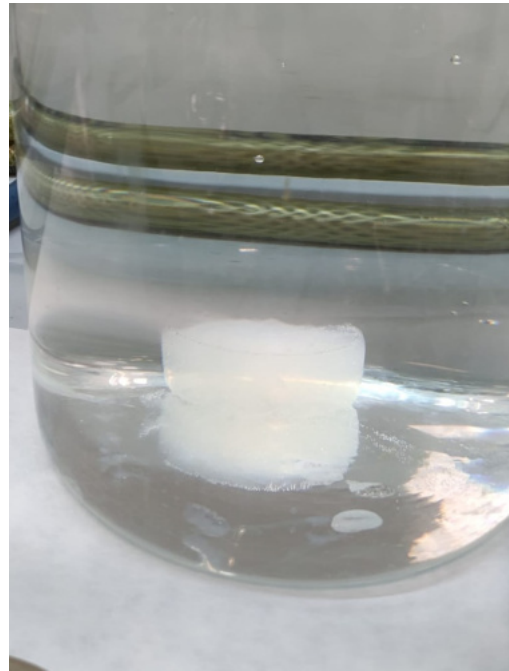
Figura 4.11: Gel de quitosan en su estado ácido.

El gel conseguido tenía una acidez muy elevada, por lo que fue necesario sumergirlo en agua durante una semana, cambiando esta varias veces al día, para reducir su acidez. Esto queda representado en la figura 4.12b. Tras ello fue posible manipularlo sin ningún tipo de protección.

Si bien el compuesto adquirió unas características de gel, no tiene las propiedades de extrusión deseadas. La falta de viscosidad hacía imposible que actuase de agente coagulante para el serrín.



(a) Preparación del gel de quitosán.



(b) Gel de quitosán tras una semana de lavados.

Figura 4.12: Gel de quitosán.

### Agar

El Agar se consideró por sus propiedades gelificantes y su capacidad de aportar nutrientes. Es un medio muy popular de cultivo de micelio entre la comunidad micológica. Es utilizado para la creación de clones de setas y hongos, ya que es fácil identificar la aparición de contaminaciones y de agentes externos.

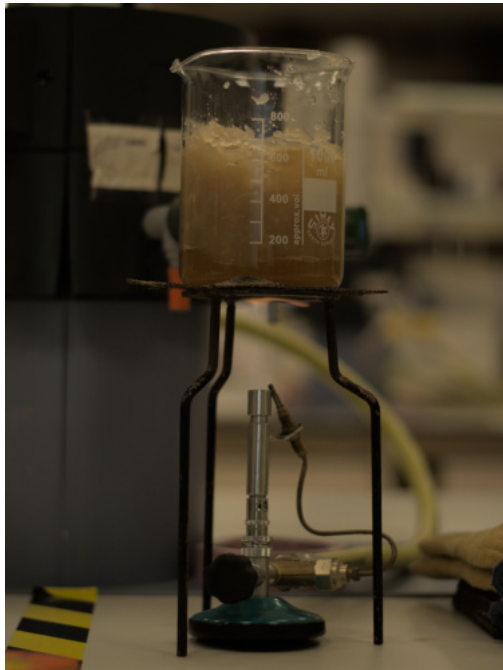
Para su creación, solo se precisa de los componentes mencionado en apartados anteriores. Una mezcla de estos tras calentarla y enfriarla, adquiere una consistencia sólida a temperatura ambiente. Esto es irreversible, volviendo al estado líquido únicamente cuando se vuelve a calentar, como se puede ver en la figura 4.13a.

La gran ventaja de este método, es la sencillez de inoculación. Mientras que en el sustrato el hongo crea una dura capa de micelio superficial, el agar es fácil de cortar. Esto se debe a que el micelio cubre una capa mínima de la superficie, creando una red de hifas muy delicada.

Al mezclarlo con el sustrato y el agua, la mezcla resulto fácil de imprimir. Sin



embargo, a pesar de la gran cantidad de nutrientes, el hongo no creció en la probeta. Además de ello, el Agar no conseguía mantener la integridad estructural deseada. Por ello, esta alternativa fue descartada como candidato para actuar como agente coagulante.



(a) Preparación del agar.



(b) Placas de Agar.

Figura 4.13: Placas de Agar y su preparación.

### Solución de chitosan

Finalmente, se llega a la alternativa utilizada. La solución utilizada está compuesta de un 3% de chitosan en peso en una solución de un 1% de ácido acético. Se seguía el proceso citado en *Soh et al.*[62]. En este procedimiento se crea una solución como la mencionada anteriormente. La única diferencia entre ambos procesos radica en que el chitosan usado fue el mismo que se utilizó para la creación del gel de *Hirano et al.*[84]. El grado de deacetilación (DD) entre ambos procesos difiere, teniendo el utilizado en el primer artículo un DD de entre 75% y 85%. El utilizado para la solución tiene un DD mayor de 90%. Esto hace que las características de la solución obtenida sean distintas.

Para obtener la solución utilizada en el producto final, es necesario crear en primer lugar la solución de ácido acético al 1%. Tras ello, se añade el chitosan

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS

---

poco a poco mientras se remueve la mezcla con un agitador magnético. Se ayuda al chitosan a mezclarse con el uso de una vara de vidrio. El resultado final es una solución de aspecto amarillento y de una elevada viscosidad. La elaboración de este producto se puede observar en la figura 4.14.

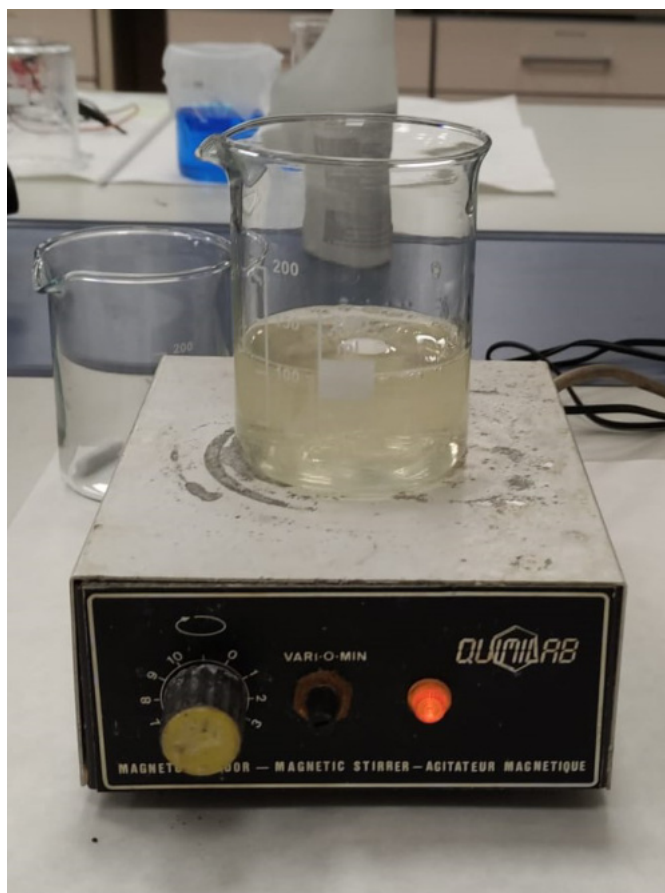
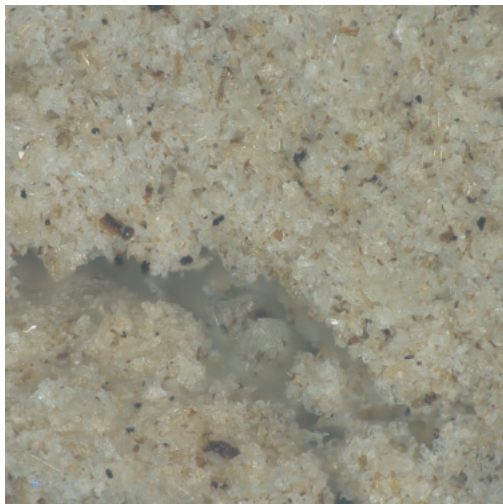


Figura 4.14: Solución de chitosan.

## 4.2 Ensayos mecánicos

Las probetas que se sacaron de la extrusión del material no presentaron crecimiento del hongo. En la superficie la colonización era mínima y, como ya se ha explicado anteriormente, no había crecimiento por dentro del volumen. Al inspeccionar las muestras extruidas, se notó que la mayor parte de ellas estaban deshidratadas. La carencia de humedad puede servir para explicar la falta de crecimiento del hongo en las probetas.

Sin embargo, se vio que la mayor parte de ellas poseía la integridad estructural necesaria como para que se pudieran analizar sus propiedades mecánicas. Siguiendo con el proceso final, definido en la figura 3.9, se introdujeron dentro de una calefactora una selección de las probetas para detener el crecimiento biológico. Tras esto, las piezas adquirieron un color blanquecino y frágil. Por ello fue imposible extraer de ellas probetas con unas medidas dadas para someterlas a los ensayos deseados. De estas piezas se extrajeron muestras para observar al microscopio la estructura resultante de pasarlas por el horno. Esto se puede observar en la figura 4.15a. Para obtener las características mecánicas, no se pasaron por el horno las probetas a ensayar.



(a) Estructura de la probeta tras ser esterilizada.



(b) Estructura de la probeta tras ser esterilizada.

Figura 4.15: Probetas esterilizadas.

### 4.2.1 Ensayo de viscosidad dinámica

Antes de la extrusión, se realizaron dos tipos de estudio de viscosidad dinámica. El primero se llevó a cabo para determinar la viscosidad dinámica de la solución creada. Además, sirvió para seleccionar la cantidad de chitosan que se añadiría a la solución de ácido acético.

En el cuadro 4.1 quedan representados los resultados del ensayo. Este fue realizado con un viscosímetro rotacional. En este caso, se utilizó un husillo R4. De esta manera, quedó amplio espacio de separación con las paredes para evitar interferencias, además de estar dentro del rango de medida de este husillo.

Viscosidad	Velocidades			
Porcentaje chitosan	10 rpm	20 rpm	50 rpm	100 rpm
1%	99,20 mPa · s	67,10 mPa · s	51,60 mPa · s	53,80 mPa · s
2%	205,30 mPa · s	168,20 mPa · s	153,70 mPa · s	149,80 mPa · s
3%	872,20 mPa · s	837,90 mPa · s	800,30 mPa · s	697 mPa · s

Características de la solución	
Ácido acético	1mL
Agua Milipur	100mL
Husillo	R4
T <sup>a</sup> ambiente	21,2°C
HR	32%

Cuadro 4.1: Viscosidad de la solución del chitosan dependiendo en el porcentaje de chitosan.

El primer factor a resaltar, es que a medida de que aumenta la velocidad del husillo, la viscosidad disminuye. Esto es debido a que esta decrece con la temperatura, la cual crece con la velocidad del husillo. Si bien no es un cambio notable de temperatura, es suficiente como para hacer que el valor de la viscosidad dinámica caiga.

En la gráfica presentada en la figura 4.16 se puede ver la tendencia que sigue la viscosidad dinámica según se aumenta la velocidad de rotación del husillo. También es notable la diferencia entre las concentraciones de chitosan en la solución. Según sube la cantidad de chitosan en peso, sube la viscosidad dinámica. De estas tres concentraciones, se seleccionará el 3% para añadir al agente coagulante.

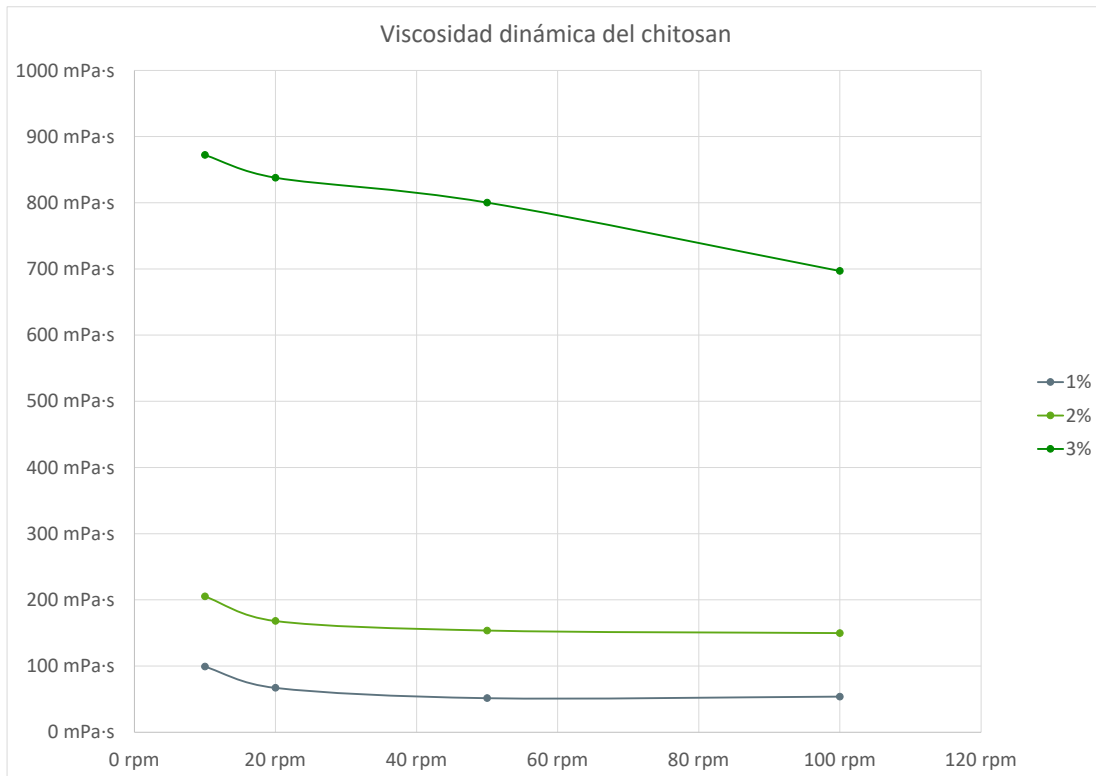


Figura 4.16: Viscosidad dinámica del quitosán.

Al añadir el serrín inoculado y el agua, es necesario el cambio de husillo. Esto se debe a que con la adición de estos componentes, la resistencia a que el husillo rote se dispara. En este caso, el instrumento tiene un diámetro menor en la pala, por lo que la superficie que opone resistencia es menor.

Viscosidad	Velocidades				
	10 rpm	20 rpm	30 rpm	50 rpm	60 rpm
Porcentaje quitosán					
3%	34627 mPa · s	25880 mPa · s	19846 mPa · s	15470 mPa · s	12650 mPa · s

Características de la solución	
Ácido acético	1mL
Agua Milipur	100mL
Husillo	R6
T <sup>a</sup> ambiente	21,8°C
HR	43%

Cuadro 4.2: Viscosidad dinámica de la mezcla de quitosán con sustrato inoculado con *G. Lucidum*.

Al igual que en el caso anterior, la viscosidad disminuye al aumentar la velocidad

de rotación. Dado que una tercera parte de la composición del material es chitosan, no es de extrañar que se presenten efectos similares a los observados en el ensayo donde se analiza el comportamiento del chitosan aislado.

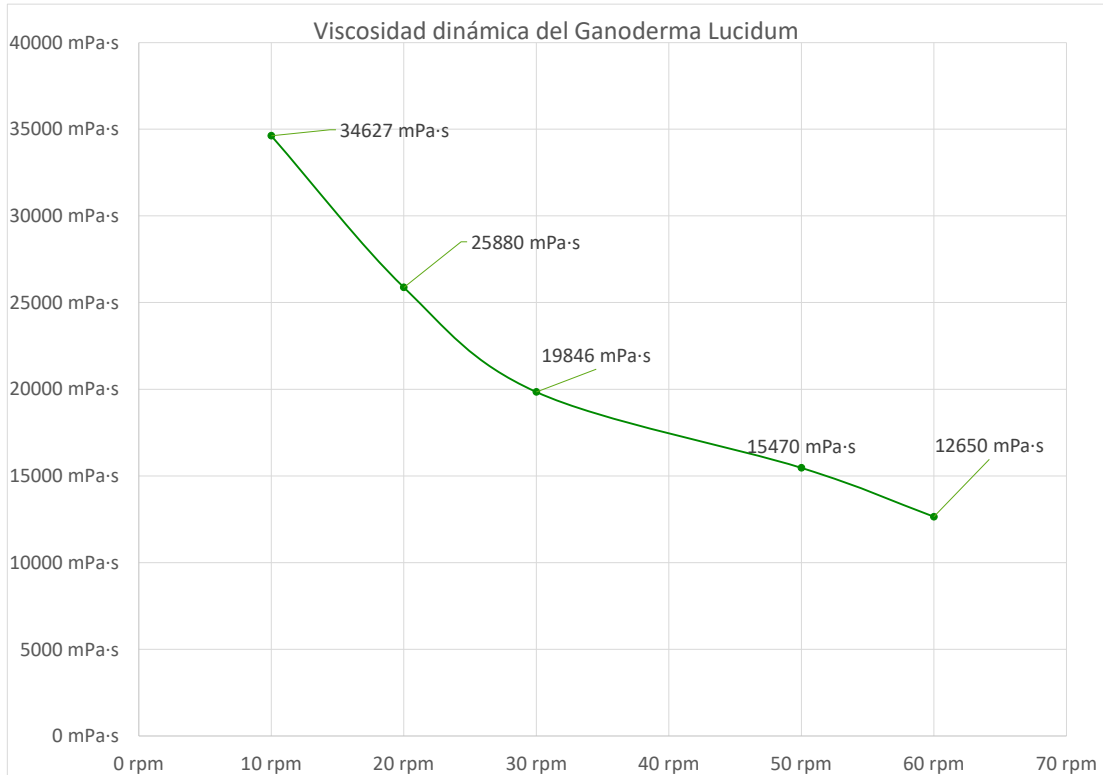


Figura 4.17: Viscosidad dinámica del material.

Los resultados obtenidos, muestran viscosidades de entre 12650 mPa · s y 34627 mPa · s. En comparación con *Chen et al.*, esta cifra parece pequeña, dado que en este artículo se consiguen viscosidades dinámicas de un orden de  $10^6 - 10^7 mPa \cdot s$  [65]. En comparación con *Bhardwaj et al.*, también es menor la viscosidad aunque más parecida, ya que las ordenes de magnitud están entre  $10^4 - 10^5 mPa \cdot s$ .

A pesar de la viscosidad del material, se presentaron problemas a la hora de la extrusión. Al igual que a *Bhardwaj et al.*, el material al ser presionado filtraba el agua presente en la mezcla. Este problema es causado por la heterogeneidad del material.

### 4.2.2 Ensayo de Flexión a tres puntos

Para el Ensayo de Flexión a tres puntos, se utilizó una probeta de 55mm de largo. Para obtener la probeta, se recortó el material que se había extruido. La probeta será sometida a esfuerzos de flexión para poder ver cuál es su resistencia a este tipo de cargas.

En la gráfica de la figura 4.18 se puede ver la curva que relaciona la carrera recorrida por el cabezal flexionando a la probeta con la fuerza que esta ejerce resistiéndose al movimiento. Al llegar a los **26,21N**, la probeta parte. Esto se puede afirmar debido a que tras llegar a su punto máximo, la resistencia presentada empieza a caer en picado. La presencia de un súbito crecimiento en la fuerza momentos más tarde puede ser debido a irregularidades en el material o que la probeta no tuviese una ruptura limpia.

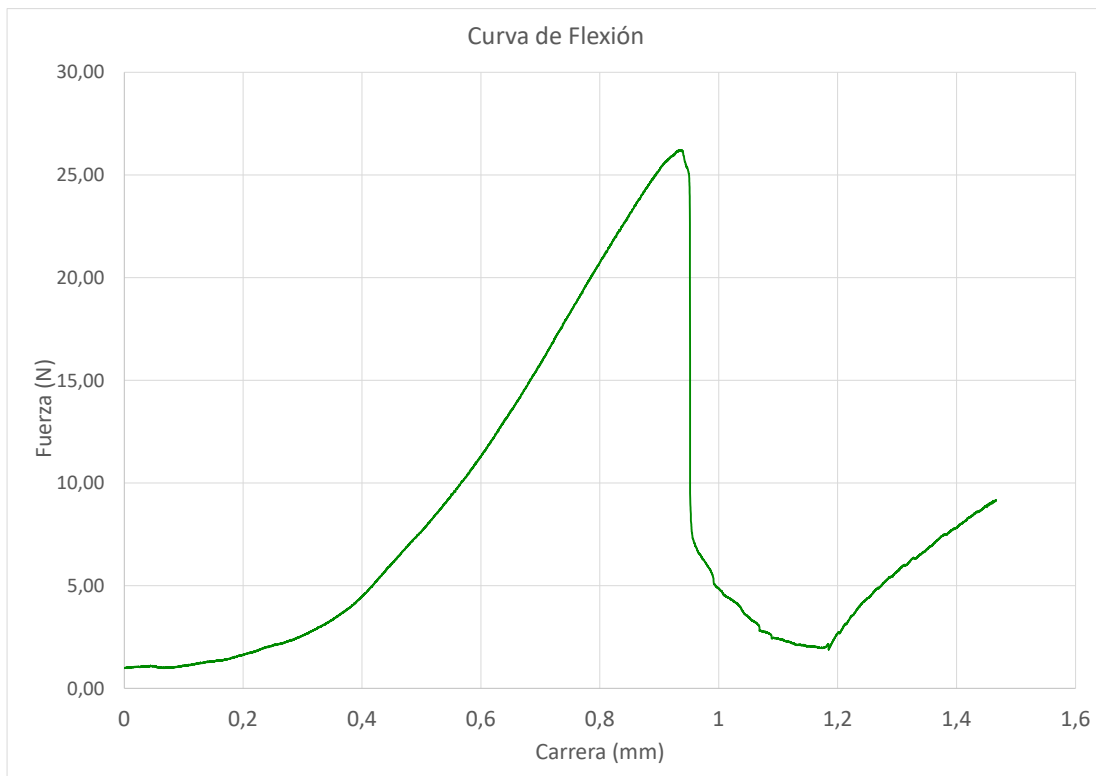


Figura 4.18: Ensayo de Flexión a tres puntos.

Sabiendo el dato de la máxima resistencia presentada, es posible comparar las capacidades de esta probeta con el Poliestireno expandido (EPS). La sección de la

probeta es de aproximadamente  $57\text{mm}^2$ , por lo que la tensión máxima de flexión soportada es de  $459,81\text{MPa}$ . La resistencia máxima de este material a la flexión, dependiendo de su densidad, va desde  $200\text{MPa}$  hasta los  $862\text{MPa}$  [87].

Otro aspecto notable es la forma de la curva. No hay una parte lineal, sino que inicialmente hay una curva que más tarde se linealiza. Esto se debe a la heterogeneidad del material.

### 4.2.3 Ensayo de Compresión

Para el ensayo de compresión, la probeta utilizada tenía un diámetro de  $15.82\text{mm}$ . Este estudio se realizará para tres probetas distintas. De esta manera, se pueden comparar las características entre las distintas muestras.

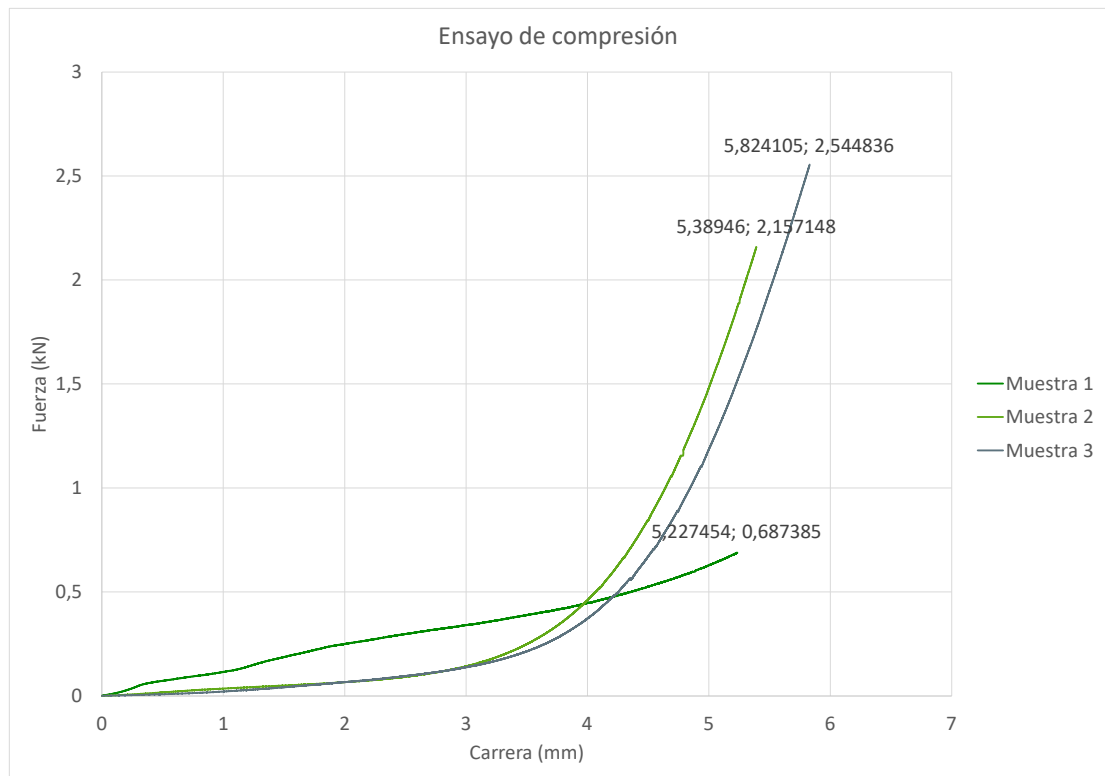


Figura 4.19: Curva de esfuerzo-deformación a compresión.

En la figura 4.19 se puede ver claramente la diferencia entre las curvas de esfuerzo-deformación. Entre ellas, destaca la curva de la muestra 3. En ella, se



puede apreciar la forma rectilínea que debería presentar en un caso ideal el material. Sin embargo, las otras dos presentan una linealidad inicial seguida de un cambio de pendiente repentino. Este cambio se puede deber a la heterogeneidad del material. Al estar conformado por partículas de serrín en su mayor parte, estas se comprimen inicialmente rápido sin oponer demasiada resistencia. Sin embargo, llega un punto crítico en el que no tienen sitio donde ir, por tanto comienzan a presentar mayor resistencia.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Carrera máxima	5,23 mm	5,39 mm	5,83 mm
Fuerza máxima	0,69 kN	2,16 kN	2,55 kN
Resistencia máxima	3,48 MPa	10,9 MPa	12,9 MPa

<b>Sección probeta</b>	15,88 mm
------------------------	----------

Cuadro 4.3: Resistencia a compresión de las diferentes muestras.

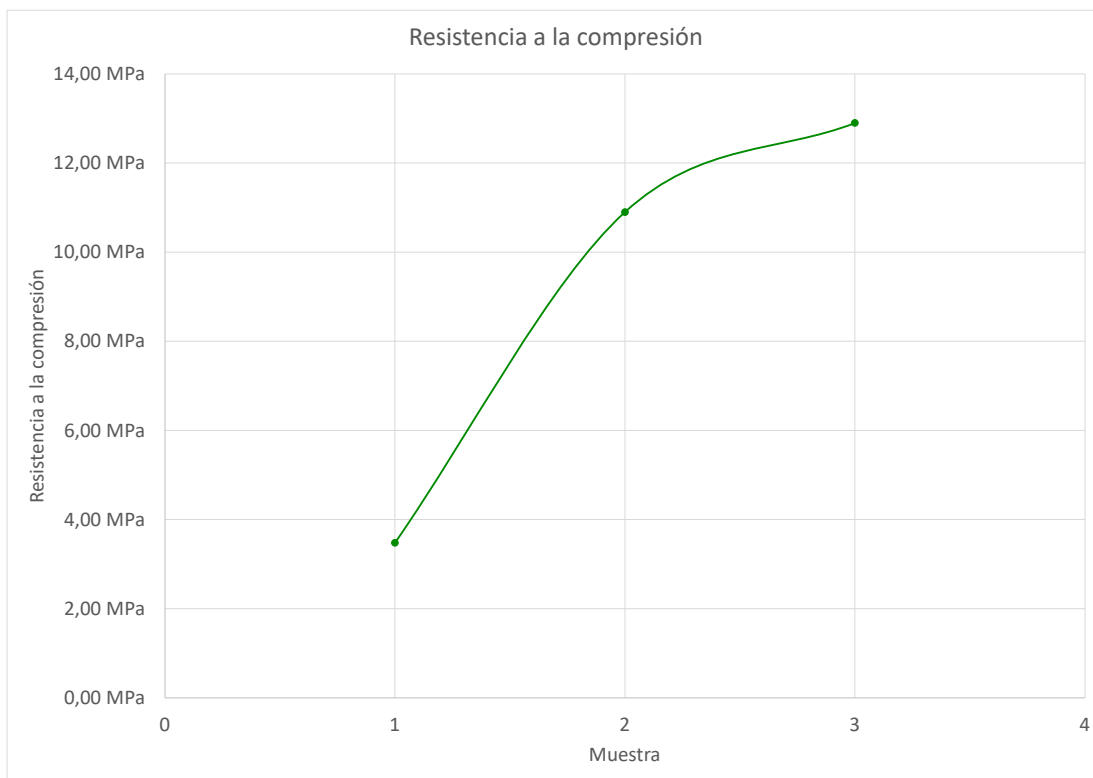


Figura 4.20: Comparación de las resistencias máximas de compresión de las muestras.

En el cuadro 4.3 quedan representados los máximos resultados de cada una de las muestras. Se puede ver que la muestra 3 tiene claramente la mayor resistencia a la compresión. Esta tendencia de crecimiento entre muestras es posible verla en la gráfica de la figura 4.20. Aquí se puede ver que donde mayor incremento hay entre muestras es entre la primera y la segunda.

El poliestireno expandido presenta una resistencia a la compresión de entre  $0.090MPa$  y  $0.552MPa$ [87]. En comparación, las muestras realizadas presentan una resistencia máxima a la compresión de una media de  $9.1MPa$ . Sin embargo, esta medida ha sido tomada de una población de tres muestras, por lo que el valor tomado no puede ser considerado como fiable. Adicionalmente, el crecimiento del hongo puede introducir incertidumbre extra, ya que la concentración de este afecta a las características del *composite*.

#### 4.2.4 Ensayo de Dureza

Para el ensayo de dureza, se utilizará la medida de Shore A, esta es utilizada normalmente para elastómeros y gomas [81]. Se realizará sobre tres probetas distintas para comprobar la constancia de la dureza. En cada una de estas probetas se medirá la dureza dos veces. De esta manera, el resultado final es la media aritmética de ambas. En la figura 4.21 se pueden ver dos de las 3 probetas a utilizar.



Figura 4.21: Ensayos de dureza Shore A.

En el cuadro 4.4, se pueden ver los resultados de los distintos ensayos. Las

probetas van disminuyendo en grosor. Esto lleva a concluir que la dureza va aumentando de manera inversamente proporcional a esta medida. También se observa mayor cantidad de micelio según se disminuye el grosor de la pieza. La disparidad en resultados observada se debe a la heterogeneidad del material. Si bien no hay manera simple de homogeneizar el crecimiento del hongo, dada su naturaleza aleatoria, sí es crucial controlar los parámetros del entorno. De esta manera, se puede predecir en cierta medida su desarrollo.

	Probeta 1	Probeta 2	Probeta 3
Shore A	30	70	88
	35	72	88
Media	32,5	71	88

Cuadro 4.4: Ensayos de dureza Shore A.

Al igual que con los resultados de flexión y compresión, no se puede sacar un resultado fiable de una población tan pequeña. Sin embargo, muestra que el material presenta cierta integridad, pudiendo soportar tensiones de flexión y de compresión comparables a los del EPS.

### 4.3 Conclusiones

Si bien en este proyecto no se consiguió obtener un material exitoso, sí se pueden sacar conclusiones interesantes a tener en cuenta. En primer lugar, sobre los hongos se puede concluir que el parámetro que mayor influencia tiene en la velocidad de crecimiento es la temperatura. A pesar de que la humedad juega un papel crucial en mantener al hongo con vida, es la temperatura ambiente la que dicta la velocidad con la que el organismo colonizará el medio. Sobre este último, se observó que el serrín tiene mayor éxito para proveer a las setas con nutrientes. Este factor, añadido a la posibilidad que tiene este material de ser molido, hizo que se considerase como óptimo.

La heterogeneidad del material fue un factor clave en los ensayos mecánicos. Al igual que muchos materiales compuestos, es posible considerar a este como anisotrópico. La disposición de las fibras de serrín o las hifas del micelio hacen que las propiedades de las piezas ensayadas difieran con la posición y el sentido en el que se ejercen los esfuerzos. Por ello, es difícil caracterizar este material, aunque no imposible. Para reducir la incertidumbre causada por la heterogeneidad de la colonización, es importante conseguir uniformidad en el desarrollo del micelio. Para ello, es esencial la constancia de las condiciones de temperatura y humedad del entorno.

Es importante resaltar la dureza que tiene el material en su estado puro. A pesar de que no se desarrollase correctamente en las piezas impresas, el micelio encontrado en los cultivos poseía unas propiedades mecánicas muy elevadas. Con una alta resistencia al corte o a la flexión, este material recordaba a una goma o a un elastómero. El crecimiento de este micelio es achacado por la literatura de la comunidad micológica a la cantidad de dióxido de carbono en el aire. Sin embargo, esto no se comprobó en este proyecto, por lo que sería interesante investigarlo más a fondo en futuros estudios.

Las propiedades observadas en este material se vieron mermadas por el proceso de esterilización. Esto lleva a pensar que el horno utilizado no es el método óptimo para realizar este proceso. Habiendo utilizado este medio, las piezas son propensas a perder agua, quedando carbonizadas, adquiriendo una gran fragilidad. Es esencial desarrollar un método alternativo que no ponga en peligro la integridad de las piezas o que afecte a sus propiedades mecánicas. Esta importancia se ve elevada cuando se observa en el contexto de evitar la contaminación.

Como ya se ha comentado, la contaminación es el mayor de los riesgos que afec-

tan al proceso diseñado. Por ello, la esterilización de los componentes e ingredientes del material es una parte central del proyecto. La modificación de este paso es, por tanto, necesaria.

## 4.4 Futuras líneas de investigación

En este proyecto el mayor obstáculo encontrado fue conseguir extruir el material. A pesar de conseguir un resultado aceptable en estos términos, la replicación de las proporciones que daban un material aceptable no implicaba un material con las mismas características. Por ello, es recomendable que en futuros proyectos se investigase más en este aspecto. Sabiendo que el grado de deacetilación juega un papel esencial en la viscosidad dinámica del fluido, sería recomendable probar distintos grados para relacionarlos con esta variable.

Una vez se haya conseguido esto, el segundo punto a mejorar del proyecto es la creación de una muestra de mayor tamaño. Esto permite la creación de un estudio estadístico que permita reducir la incertidumbre y analizar la variabilidad de los parámetros estudiados.

Otro punto de mejora es el estudio de las condiciones de preservación. La Unidad de Tratamiento de Aire, figura 4.22, creada en el proyecto de Gonzalo Borja Reyes Uzquiano, no llegó a utilizarse. Por ello, las muestras extruidas no fueron guardadas en condiciones estériles en las que se pudiera controlar la temperatura o la humedad de una manera exacta. Por ello, las probetas obtenidas quedaron deshidratadas.

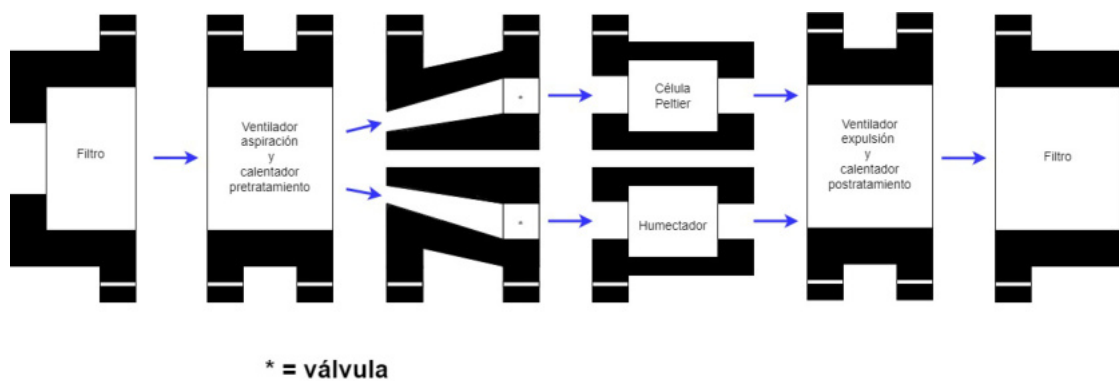


Figura 4.22: Unidad de Tratamiento de Aire diseñada en el proyecto de Gonzalo Borja Reyes Uzquiano.

La cantidad de dióxido de carbono en el aire es un parámetro que influye de gran manera en el crecimiento y desarrollo del micelio. Por ello, es importante que futuras líneas de investigación tomen este parámetro en cuenta a la hora de crear los cultivos o incubar las probetas. Esto puede llevar a la creación de especímenes

más resistentes y con mayor flexibilidad.

Finalmente, el método de esterilización utilizado en este proyecto no es óptimo. Si bien la calefactora detiene el crecimiento biológico de manera efectiva, evapora toda la humedad presente en el artículo a esterilizar. Esto es la causa por la que las probetas introducidas en la calefactora quedaron secas y se volvieron frágiles. Utilizando un autoclave, es posible preservar la humedad presente en la pieza. Esto significaría que esta sería capaz de mantener la flexibilidad que tiene al ser extraída del cultivo.





# Apéndice A

## Objetivos de Desarrollo Sostenible

### A.1 Ciudades y comunidades sostenibles

En la actualidad, alrededor de la mita de la población vive en ciudades [88]. No es de extrañar pues, que una gran cantidad de emisiones de carbono provengan de estas concentraciones de la población, más de un 70% de ellas. Este objetivo de las Naciones Unidas busca asegurar el acceso a una vivienda adecuada a todas las personas, así como reducir el impacto medioambiental de las ciudades.

Una gran cantidad de los emisiones generadas en las ciudades es debida la poca eficiencia energética en el campo de la climatización. El mal aislamiento provoca mayor exposición a la inclemencia de los elementos. Esto hace que se necesite más energía para calentar los hogares en invierno o enfriarlos en verano.



Figura A.1: Ciudades y comunidades sostenibles. **Fuente:** *Naciones Unidas*

El micelio ofrece una alternativa sostenible y potencialmente más barata a los

aislantes comunes. Al fin de su uso es fácil descomponerlo e incluso utilizarlo para la generación de nuevo material.

## A.2 Consumo y producción sostenibles

Las estimaciones predicen que si la población mundial alcanza los 9500 millones de habitantes para 2050, sería necesario el equivalente de tres planetas para poder abastecer las necesidades de todos ellos [89]. Por ello, es esencial ser lo más eficiente posible a la hora de generar productos. Esto requiere una gestión responsable de los recursos y las materias primas. Además de esto es crucial la posibilidad de reciclar o reutilizar los productos en desuso.

Los productos hechos con base de micelio son perfectos para la consecución de las metas definidas en este objetivo. El organismo estudiado es capaz de crecer en medios hechos a partir de residuos. De esta manera, se da una segunda vida a productos que de otra manera hubiesen caído en el desuso. De hecho, los mismos productos con base de micelio pueden servir de base para otros nuevos en cuanto llegan al final de su vida útil, sirviendo como medio de aportación de nutrientes.



Figura A.2: Producción y consumo responsables. **Fuente:** Naciones Unidas

# Bibliografía

- [1] Plastics Industry Association. *History of Plastics*. URL: <https://www.plasticsindustry.org/history-plastics>.
- [2] eurostat. *Packaging waste statistics - Statistics Explained*. Mar. de 2022. URL: [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Packaging\\_waste\\_statistics#Waste\\_generation\\_by\\_packaging\\_material](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Packaging_waste_statistics#Waste_generation_by_packaging_material).
- [3] Jenna R. Jambeck y col. «Plastic waste inputs from land into the ocean». En: *Science* 347.6223 (feb. de 2015), págs. 768-771. ISSN: 10959203. DOI: 10.1126/SCIENCE.1260352/SUPPL{\\_}FILE/JAMBECK.SM.PDF. URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1260352>.
- [4] Stephanie B. Borrelle y col. «Predicted growth in plastic waste exceeds efforts to mitigate plastic pollution». En: *Science* 369.6509 (sep. de 2020), págs. 1515-1518. ISSN: 10959203. DOI: 10.1126/SCIENCE.ABA3656/SUPPL{\\_}FILE/ABA3656-BORRELLE-SM-DATA-S4.CSV. URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aba3656>.
- [5] Ian Tiseo. *Plastic waste flow worldwide 2016-2040, by treatment*. Oct. de 2021. URL: <https://www.statista.com/statistics/1270092/plastic-waste-treatment-and-disposal-projections-worldwide/>.
- [6] The Ocean Conservancy. «POCKET GUIDE TO MARINE DEBRIS». En: *The Ocean Conservancy* (2003). URL: <https://www.mass.gov/files/documents/2016/08/pq/pocket-guide-2003.pdf>.
- [7] Paul Delaney. *HOW LONG IT TAKES FOR SOME EVERYDAY ITEMS TO DECOMPOSE. - Down2Earth Materials*. Feb. de 2013. URL: <https://www.down2earthmaterials.ie/2013/02/14/decompose/>.
- [8] United States Environmental Protection Agency. *Frequently Asked Questions about Plastic Recycling and Composting | US EPA*. URL: <https://www.epa.gov/trash-free-waters/frequently-asked-questions-about-plastic-recycling-and-composting>.

- [9] European Commission. *Bio-based, biodegradable and compostable plastics*. URL: [https://environment.ec.europa.eu/topics/plastics/bio-based-biodegradable-and-compostable-plastics\\_en](https://environment.ec.europa.eu/topics/plastics/bio-based-biodegradable-and-compostable-plastics_en).
- [10] Omnexus The material selection platform. *Biodegradable Plastic: Types, Properties & Material Table*. URL: <https://omnexus.specialchem.com/polymer-properties/properties/biodegradable>.
- [11] Kieran D. Cox y col. «Human Consumption of Microplastics». En: *Environmental Science and Technology* 53.12 (jun. de 2019), págs. 7068-7074. ISSN: 15205851. DOI: 10.1021/ACS.EST.9B01517/SUPPL{\\_}FILE/ES9B01517{\\_}SI{\\_}001.PDF. URL: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.est.9b01517>.
- [12] Kieran D. Cox y col. «Correction to Human Consumption of Microplastics». En: *Environmental Science & Technology* 54.17 (sep. de 2020), pág. 10974. ISSN: 15205851. DOI: 10.1021/ACS.EST.0C04032. URL: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.est.0c04032>.
- [13] Nicola J. Beaumont y col. «Global ecological, social and economic impacts of marine plastic». En: *Marine Pollution Bulletin* 142 (mayo de 2019), págs. 189-195. ISSN: 0025-326X. DOI: 10.1016/J.MARPOLBUL.2019.03.022.
- [14] Robert Costanza y col. «Changes in the global value of ecosystem services». En: *Global Environmental Change* 26.1 (2014), págs. 152-158. ISSN: 09593780. DOI: 10.1016/J.GLOENVCHA.2014.04.002.
- [15] Gonzalo Borja Reyes Uzquiano. *Diseño y parametrización de una bioimpresora para material orgánico compuesto a base de micelio*. Inf. téc. Madrid: Universidad Pontificia de Comillas, ago. de 2022.
- [16] Constantine John Alexopoulos, David Moore y Vernon Ahmadjian. *fungus*. URL: <https://www.britannica.com/science/fungus>.
- [17] BD Editors. *Fungi - Definition, Types and Examples | Biology Dictionary*. Oct. de 2019. URL: <https://biologydictionary.net/fungi/>.
- [18] Intermountain Herbarium. *Decomposition | Herbarium | USU*. URL: <https://www.usu.edu/herbarium/education/fun-facts-about-fungi/decomposition>.
- [19] The Editors of Encyclopaedia Britannica. *mushroom | Definition, Characteristics, Species, & Facts | Britannica*. URL: <https://www.britannica.com/science/mushroom>.
- [20] J. Silva y col. «FUNGI | The Fungal Hypha». En: *Encyclopedia of Food Microbiology* (ene. de 1999), págs. 850-853. DOI: 10.1006/RWFM.1999.0705.

- 
- [21] The Editors of Encyclopaedia Britannica. *chitin | chemical compound | Britannica*. URL: <https://www.britannica.com/science/chitin>.
- [22] Real Academia Española. *quitina | Definición | Diccionario de la lengua española | RAE - ASALE*. URL: <https://dle.rae.es/quitina>.
- [23] Majeti N.V. Ravi Kumar. «A review of chitin and chitosan applications». En: *Reactive and Functional Polymers* 46.1 (2000), págs. 1-27. ISSN: 13815148. DOI: 10.1016/S1381-5148(00)00038-9.
- [24] Derval Dos, Santos Rosa y Denise Maria Lenz. «Biocomposites: Influence of Matrix Nature and Additives on the Properties and Biodegradation Behaviour». En: *Biodegradation - Engineering and Technology* (jun. de 2013). DOI: 10.5772/56290. URL: <https://www.intechopen.com/chapters/44036>.
- [25] Ecovative. *Our Story – Ecovative*. URL: <https://www.ecovative.com/pages/our-story>.
- [26] Eben Bayer, Gavin McIntyre y Burt L. Swersey. *METHOD FOR PRODUCING GROWN MATERIALS AND PRODUCTS MADE THEREBY*. 2008. URL: <https://patents.google.com/patent/US20080145577A1/en>.
- [27] Ecovative. *Ecovative and Mycelium — 15 Years Growing*. URL: <https://www.ecovative.com/blogs/blog/ecovative-and-mycelium-materials-15-years-growing>.
- [28] We Don't Have Time. *IKEA Starts Using Biodegradable Mushroom-Based Packaging for Its Products | by We Don't Have Time | We Don't Have Time | Medium*. 2018. URL: <https://medium.com/wedonthavetime/ikea-starts-using-biodegradable-mushroom-based-packaging-for-its-products-42d079f98bb1>.
- [29] EPE USA. *Dell and its sustainable packaging – EPE Global*. 2019. URL: <https://epe.global/2019/11/29/dell-and-its-sustainable-packaging/>.
- [30] MycoWorks. *An Exclusive Collaboration by Hermès and MycoWorks - MycoWorks*. 2021. URL: <https://www.mycoworks.com/introducing-sylvania-by-hermes>.
- [31] Philip Ross y col. *US11032982B2 - Mycelium growth bed*. 2019. URL: <https://patents.google.com/patent/US11032982B2/en?q=leather&assignee=mycoworks&oq=mycoworks+leather>.
- [32] Jessica Wang y col. *US20220007777A1 - Methods of generating mycelium materials with improved properties*. 2022. URL: <https://patents.google.com/patent/US20220007777A1/en?q=bolt+threads;+leather&oq=bolt+threads;+leather>.

- [33] Mylo Unleather. *What Is Mycelium: Benefits & Uses - Mylo Stories*. URL: <https://www.mylo-unleather.com/stories/what-is-mycelium/>.
- [34] Jakov Buljan e Ivan Král. *The framework for sustainable leather manufacture*. Inf. téc. United Nations Industrial Development Organization, 2019. URL: <https://leatherpanel.org/content/framework-sustainable-leather-manufacture-second-edition>.
- [35] Victor Sundar y col. «Water management in leather industry». En: *Journal of Scientific and Industrial Research* 60 (ago. de 2001), págs. 443-450. URL: [https://www.researchgate.net/publication/279547003\\_Water\\_management\\_in\\_leather\\_industry](https://www.researchgate.net/publication/279547003_Water_management_in_leather_industry).
- [36] Waston & Wolfe. *Mushroom Leather - What is it and How is it Made? | Watson & Wolfe*. 2022. URL: <https://www.watsonwolfe.com/2020/02/08/what-is-mushroom-leather/>.
- [37] Brooke Roberts-Islam. «Mushroom-Based ‘Leather’ Is Now A Scalable Alternative To Animal Leathers, Poised For Market Disruption». En: *Forbes* (2021). URL: <https://www.forbes.com/sites/brookerobertsislam/2021/04/01/mushroom-leather-is-now-a-scalable-alternative-to-animal-leathers-poised-for-market-disruption/>.
- [38] Mogu. *Mogu*. URL: <https://mogu.bio/>.
- [39] International Energy Agency y United Nations Environment Programme. *2019 Global Status Report for Buildings and Construction Towards a zero-emissions, efficient and resilient buildings and construction sector*. Inf. téc. Global Alliance for Buildings y Construction, 2019. URL: [www.iea.org](http://www.iea.org).
- [40] National Association of Home Builders. *Building Materials Prices Start 2022 with 8% Increase - NAHB*. 2022. URL: <https://www.nahb.org/blog/2022/04/building-materials-prices-start-2022-with-8-percent-increase>.
- [41] United States of Labour Statistics. *Producer Price Index News Release summary*. Inf. téc. United States Bureau of Labour Statistics, 2019. URL: <https://www.bls.gov/news.release/ppi.nr0.htm>.
- [42] Alireza ; Javadian y col. «Application of Mycelium-Bound Composite Materials in Construction Industry: A Short Review Rights». En: *ETH Zurich* (2020). ISSN: 2372-0964. DOI: 10.3929/ethz-b-000543782. URL: <https://doi.org/10.3929/ethz-b-000543782>.
- [43] Mitchell Jones y col. «Engineered mycelium composite construction materials from fungal biorefineries: A critical review». En: *Materials and Design* 187 (feb. de 2020). ISSN: 18734197. DOI: 10.1016/J.MATDES.2019.108397.

- 
- [44] Wan Mohd Fazli y col. «Surface properties of chitin-glucan nanopapers from *Agaricus bisporus*». En: (2020).
- [45] Jason Maximino C. Ongpeng y col. «Using waste in producing bio-composite mycelium bricks». En: *Applied Sciences (Switzerland)* 10.15 (ago. de 2020). ISSN: 20763417. DOI: 10.3390/APP10155303. URL: <https://doi.org/10.3390/app10155303>.
- [46] Ministerio de Fomento. *Documento Básico SE-F Seguridad Estructural: Fábrica*. Inf. téc. Ministerio de Fomento, 2019. URL: <https://www.codigotecnico.org/pdf/Documentos/SE/DBSE-F.pdf>.
- [47] Felix Heisel y col. «Design of a load-bearing mycelium structure through informed structural engineering: The MycoTree at the 2017 Seoul Biennale of Architecture and Urbanism». En: (2017). URL: [https://www.researchgate.net/publication/320443920\\_Design\\_of\\_a\\_load-bearing\\_mycelium\\_structure\\_through\\_informed\\_structural\\_engineering\\_The\\_MycoTree\\_at\\_the\\_2017\\_Seoul\\_Biennale\\_of\\_Architecture\\_and\\_Urbanism](https://www.researchgate.net/publication/320443920_Design_of_a_load-bearing_mycelium_structure_through_informed_structural_engineering_The_MycoTree_at_the_2017_Seoul_Biennale_of_Architecture_and_Urbanism).
- [48] BIS Research. *Mycelium Market Analysis and Forecast, 2020-2026*. Inf. téc. BIS Research, 2022. URL: <https://bisresearch.com/industry-report/mycelium-market.html>.
- [49] Eben Bayer. «The Mycelium Revolution Is upon Us». En: *Scientific American* (2019). URL: <https://blogs.scientificamerican.com/observations/the-mycelium-revolution-is-upon-us/>.
- [50] MyForest Foods. *MyFOREST FOODS*. URL: <https://myforestfoods.com/>.
- [51] Ecovative. *Introducing Atlast Food Co.* 2019. URL: <https://www.ecovative.com/blogs/blog/introducing-atlast-food-co>.
- [52] Chinova Bioworks. *Chinova Bioworks - Mushroom Fiber Ingredient*. URL: <https://www.chinovabioworks.com/>.
- [53] Chinova Bioworks. *Chiber Nature's Preservative*. Fredericton. URL: <https://www.chinovabioworks.com/chiber-for-beverages>.
- [54] ENOUGH. *Sustainability — ENOUGH - delicious, nutritious, sustainable*. URL: <https://www.enough-food.com/sustainable>.
- [55] Meati Inc. *It's Meati™ | Meati Foods*. URL: <https://meati.com/>.
- [56] Nahid Akhtar y M. Amin ul Mannan. «Mycoremediation: Expunging environmental pollutants». En: *Biotechnology Reports* 26 (jun. de 2020). ISSN: 2215017X. DOI: 10.1016/J.BTRE.2020.E00452. URL: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00452>.

- [57] Christopher J. Rhodes. «Mycoremediation (bioremediation with fungi) - growing mushrooms to clean the earth». En: *Chemical Speciation and Bioavailability* 26.3 (2014), págs. 196-198. ISSN: 09542299. DOI: 10.3184/095422914X14047407349335.
- [58] Shweta Kulshreshtha, Nupur Mathur y Pradeep Bhatnagar. «Mushroom as a product and their role in mycoremediation». En: *AMB Express* (2014). DOI: 10.1186/s13568-014-0029-8. URL: <http://www.amb-express.com/content/4/1/29>.
- [59] J. M. Thwaites y col. «Fungal-based remediation: Treatment of PCP contaminated soil in New Zealand». En: *Environmental Bioremediation Technologies* (2007), págs. 465-479. DOI: 10.1007/978-3-540-34793-4\_{\\_}20.
- [60] Maddie Stone. *The Plan to Mop Up the World's Largest Oil Spill With Fungus*. Mar. de 2015. URL: <https://www.vice.com/en/article/jp5k9x/the-plan-to-mop-up-the-worlds-largest-oil-spill-with-fungus>.
- [61] Renée Alexander. *How oyster mushrooms helped clean up after California's wildfires*. Ago. de 2019. URL: <https://thecounter.org/mycoremediation-radical-mycology-mushroom-natural-disaster-pollution-clean-up/>.
- [62] Eugene Soh y col. «Development of an extrudable paste to build mycelium-bound composites». En: *Materials and Design* 195 (2020), pág. 109058. ISSN: 18734197. DOI: 10.1016/j.matdes.2020.109058. URL: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.109058>.
- [63] Abhinav Bhardwaj y col. «3D Printing of Biomass-Fungi Composite Material: A Preliminary Study». En: *Manufacturing Letters* 24 (abr. de 2020), págs. 96-99. ISSN: 22138463. DOI: 10.1016/J.MFGLET.2020.04.005. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mfglet.2020.04.005>.
- [64] Abhinav Bhardwaj y col. «3D printing of biomass–fungi composite material: Effects of mixture composition on print quality». En: *Journal of Manufacturing and Materials Processing* 5.4 (dic. de 2021). ISSN: 25044494. DOI: 10.3390/jmmp5040112. URL: <https://doi.org/10.3390/jmmp5040112> <https://www.mdpi.com/2504-4494/5/4/112>.
- [65] Huaiyou Chen y col. «Extrusion-based additive manufacturing of fungal-based composite materials using the tinder fungus *Fomes fomentarius*». En: *Fungal Biology and Biotechnology* 8.1 (2021), págs. 1-11. ISSN: 20543085. DOI: 10.1186/s40694-021-00129-0. URL: <https://doi.org/10.1186/s40694-021-00129-0>.
- [66] Asociación Micológica Fungipedia. *Fomes fomentarius*. URL: <https://www.fungipedia.org/hongos/fomes-fomentarius.html>.



- [67] Andrew L. Loyd y col. «Identifying the “Mushroom of Immortality”: Assessing the Ganoderma Species Composition in Commercial Reishi Products». En: *Frontiers in Microbiology* 9.JUL (jul. de 2018). ISSN: 1664302X. DOI: 10.3389/FMICB.2018.01557. URL: /pmc/articles/PMC6055023/%20/pmc/articles/PMC6055023/?report=abstract%20https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6055023/.
- [68] Grow.bio. *Grow It Yourself™ material – Grow.bio*. URL: <https://grow.bio/collections/shop/products/grow-it-yourself-material>.
- [69] Mycelia. *M2125 Pleurotus ostreatus var. florida | Mycelia*. URL: <https://mycelia.be/shop/m2125-pleurotus-ostreatus-var-florida/>.
- [70] Mycelia. *M9720 Ganoderma lucidum | Mycelia*. URL: <https://mycelia.be/shop/m9720-ganoderma-lucidum/>.
- [71] ThermoFisher Scientific. *Chitosan, molecular weight: 600,000-800,000*. 2022. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/428850500?SID=srch-hj-428850500>.
- [72] Rayane Santa Cruz Martins de Queiroz Antonino y col. «Preparation and Characterization of Chitosan Obtained from Shells of Shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone)». En: *MDPI* (mayo de 2017). DOI: 10.3390/md15050141. URL: [www.mdpi.com/journal/marinedrugs](http://www.mdpi.com/journal/marinedrugs).
- [73] Sümeýra Ayan y col. «Materials for 3D Printing in Medicine». En: (nov. de 2020). DOI: 10.13140/RG.2.2.36538.11207. URL: <https://www.researchgate.net/publication/346494744>.
- [74] Marco Bürger y Joanne Chory. «Structural and chemical biology of deacetylases for carbohydrates, proteins, small molecules and histones». En: *Communications Biology* 1.1 (dic. de 2018). ISSN: 23993642. DOI: 10.1038/S42003-018-0214-4.
- [75] Marco Bürger y Joanne Chory. «Publisher Correction: Structural and chemical biology of deacetylases for carbohydrates, proteins, small molecules and histones (*Communications Biology*, (2018), 1, 1, (217), 10.1038/s42003-018-0214-4)». En: *Communications Biology* 2.1 (dic. de 2019). ISSN: 23993642. DOI: 10.1038/S42003-018-0258-5.
- [76] Laura Fernández Roldán. *Saprófitos: qué son y ejemplos - Resumen*. Jun. de 2021. URL: <https://www.ecologiaverde.com/saprofitos-que-son-y-ejemplos-3461.html>.
- [77] Poorna Khanna. *Role of CO2 Monitoring in Mushroom Farming-Prana Air*. Dic. de 2020. URL: <https://www.pranair.com/blog/co2-monitoring-in-mushroom-farming/>.

- [78] Martin Pavlík y col. «Evaluation of the Carbon Dioxide Production by Fungi Under Different Growing Conditions». En: *Current Microbiology* 77.9 (sep. de 2020), págs. 2374-2384. ISSN: 14320991. DOI: 10.1007/S00284-020-02033-Z. URL: [https://www.researchgate.net/publication/341739805\\_Evaluation\\_of\\_the\\_Carbon\\_Dioxide\\_Production\\_by\\_Fungi\\_Under\\_Different\\_Growing\\_Conditions](https://www.researchgate.net/publication/341739805_Evaluation_of_the_Carbon_Dioxide_Production_by_Fungi_Under_Different_Growing_Conditions).
- [79] FreshCap Mushrooms. *How to Make Agar Plates for Growing Mushrooms*. Mayo de 2017. URL: <https://www.youtube.com/watch?v=kX2vw0Y21-w&t=83s>.
- [80] PubChem. *Agar / C14H24O9 - PubChem*. 2022. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Agar>.
- [81] Barnwell. *Shore A Hardness / What is a Shore A Hardness and why is it important? : Barnwell*. 2022. URL: <https://www.barnwell.co.uk/shore-a-hardness/>.
- [82] Simon Vandelook y col. «Current state and future prospects of pure mycelium materials». En: *Fungal Biology and Biotechnology* 8.1 (dic. de 2021), págs. 1-10. ISSN: 20543085. DOI: 10.1186/S40694-021-00128-1/FIGURES/8. URL: <https://fungalbiolbiotech.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40694-021-00128-1>.
- [83] Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. *Penicillium spp. - Agentes Biológicos - Hongo*. Mayo de 2022. URL: <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/penicillium-spp>.
- [84] Shigehiro Hirano, Sumiyo Kondo y Yasuo Ohe. «Chitosan gel: a novel polysaccharide gel». En: *Polymer* 16.8 (ago. de 1975), pág. 622. ISSN: 00323861. DOI: 10.1016/0032-3861(75)90159-7. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0032386175901597?via%3Dihub>.
- [85] Graham K Moore y George A F Roberts. «Chitosan gels: 1. Study of reaction variables». En: *International Journal of Biological Macromolecules* 2. March 1979 (abr. de 1980), págs. 73-77. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0141813080900318>.
- [86] Pasquale Sacco y col. «Concepts for Developing Physical Gels of Chitosan and of Chitosan Derivatives». En: *MDPI* (jun. de 2017). DOI: 10.3390/gels4030067. URL: [www.mdpi.com/journal/gels](http://www.mdpi.com/journal/gels).
- [87] Omnexus The material selection platform. *Expanded Polystyrene (EPS Foam): Uses, Structure & Properties*. URL: <https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/expanded-polystyrene-eps-foam-insulation>.
- [88] Naciones Unidas. *Ciudades y comunidades sostenibles*. URL: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/cities/>.

- [89] Naciones Unidas. *Producción y consumo responsables*. URL: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/sustainable-consumption-production/>.

## *BIBLIOGRAFÍA*

---