



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**OBTENCIÓN DE BIOPOLÍMEROS A TRAVÉS DE PLEUROTUS
OSTREATUS EN THEOBROMA CACAO**

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar el grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: LEO ANDERSON NARANJO CALVOPÍÑA

DIRECTOR: Dr. EDGAR IVÁN RAMOS SEVILLA, PhD.

Riobamba – Ecuador

2023

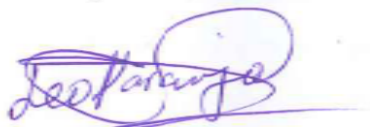
© 2023, Leo Anderson Naranjo Calvopiña

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho del Autor.

Yo, Leo Anderson Naranjo Calvopiña, declaro que el presente Trabajo de Titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 23 de marzo del 2023.






Leo Anderson Naranjo Calvopiña

CI: 092117549-3

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; tipo: Proyecto de Investigación, “**OBTENCIÓN DE BIOPOLÍMEROS A TRAVÉS DE *PLEUROTUS OSTREATUS EN THEOBROMA CACAO***”, realizado por el señor: **LEO ANDERSON NARANJO CALVOPÍÑA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Cristina Gabriela Calderón Tapia, MSc.		2023-03-23
PRESIDENTA DEL TRIBUNAL		
Dr. Edgar Iván Ramos Sevilla, PhD.		2023-03-23
DIRECTOR DE TRABAJO DE		
TITULACIÓN		
Dra. Lourdes Janneth Jara Samaniego, PhD.		2023-03-23
ASESOR DEL TRABAJO DE		
TITULACIÓN		

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Limitaciones y delimitaciones.....	3
1.3. Problema general de investigación.....	3
1.4. Problemas específicos de investigación.....	4
1.5. Objetivos.....	4
1.5.1. <i>Objetivo general</i>	4
1.5.2. <i>Objetivos específicos</i>	4
1.6. Justificación.....	4
1.7. Hipótesis.....	5

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Antecedentes de investigación.....	6
2.2. Referencias teóricas.....	7
2.2.1. <i>Pleurotus ostreatus</i>	7
2.2.1.1. <i>Características</i>	7
2.2.1.2. <i>Forma del micelio</i>	7
2.2.1.3. <i>Condiciones para la formación del micelio</i>	7
2.2.1.4. <i>Aplicaciones</i>	8
2.2.2. <i>Residuos de la producción de cacao</i>	10
2.2.3. <i>Theobroma cacao</i>	11

2.2.4.	<i>Fermentación en estado sólido de residuos lignocelulósicos con <i>Pleurotus ostreatus</i>.</i>	
	
	12
2.2.4.1.	<i>Factores</i>	12
2.2.5.	<i>Compuestos del micelio</i>	13
2.2.6.	<i>Biodegradabilidad de los compuestos de micelio</i>	13
2.2.7.	<i>Polímeros</i>	13
2.2.7.1.	<i>Biopolímeros</i>	14
2.2.7.2.	<i>Características</i>	14
2.2.7.3.	<i>Aplicaciones</i>	14

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	16
3.1.	Enfoque de la investigación	16
3.2.	Nivel de investigación	16
3.3.	Diseño de investigación	16
3.3.1.	<i>Según la manipulación o no de la variable independiente</i>	16
3.3.2.	<i>Según las intervenciones en el trabajo de campo</i>	16
3.4.	Tipo de estudio	17
3.5.	Población y planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra	17
3.5.1.	<i>Población de estudio</i>	17
3.5.2.	<i>Tamaño de la muestra</i>	17
3.6.	Métodos, técnicas e instrumentos de investigación	17
3.6.1.	<i>Método de muestreo</i>	17
3.6.2.	<i>Técnicas de recolección de datos</i>	17
3.6.3.	<i>Instrumentos</i>	18
3.6.3.1.	<i>Materiales</i>	18
3.6.3.2.	<i>Equipos</i>	18
3.6.3.3.	<i>Reactivos</i>	18
3.7.	Diseño del experimento	19
3.7.1.	<i>Primera etapa</i>	19
3.7.1.1.	<i>Preparación de los medios de cultivo</i>	19
3.7.1.2.	<i>Extracción e inoculación del micelio</i>	19
3.7.1.3.	<i>Multiplicación del micelio</i>	19
3.7.1.4.	<i>Preparación del medio donde se hará fructificar el micelio primario</i>	19

3.7.1.5.	<i>Inoculación del micelio primario en el sustrato</i>	19
3.8.	Segunda etapa	20
3.8.1.	Obtención y caracterización del quitosano	20
3.8.1.1.	<i>Obtención del quitosano a partir del Micelio Pleurotus Ostreatus</i>	20
3.8.1.2.	<i>Preparación de la materia prima</i>	20
3.8.1.3.	<i>Desproteínización</i>	20
3.8.1.4.	<i>Desmineralización</i>	20
3.8.1.5.	<i>Purificación</i>	20
3.8.1.6.	<i>Desacetilación</i>	21
3.8.1.7.	<i>Dilución y moldado</i>	21

CAPÍTULO IV

4.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	22
4.1.	Evaluar las etapas de cultivo del Pleurotus ostreatus en Theobroma cacao	22
4.1.1.	<i>Fase de incubación</i>	22
4.1.2.	<i>Fase de fructificación</i>	22
4.1.3.	<i>Datos físicos químicos obtenidos del micelio del hongo</i>	23
4.1.4.	<i>Datos recolectados del proceso de extracción del micelio por vía húmeda</i>	23
4.1.5.	<i>Cantidad de humedad y materia seca del micelio del hongo Pleurotus ostreatus</i>	25
4.1.6.	<i>Contenido de ceniza</i>	25
4.1.7.	<i>Solubilidad</i>	25
4.1.8.	<i>Viscosidad</i>	26
4.1.9.	<i>pH</i>	26
4.1.10.	<i>Temperatura de gelatinización</i>	26
4.1.11.	<i>Granulometría del micelio</i>	27
4.1.12.	<i>Porcentaje de amilosa y amilopectina del micelio</i>	27
4.1.13.	<i>Análisis microbiológicos del micelio</i>	27
4.1.14.	<i>Parámetros físico-químicos y microbiológicos para el micelio</i>	28
4.2.	Resultados obtenidos de la elaboración del bioplástico	29
4.2.1.	<i>Análisis sensorial del bioplástico</i>	31
4.2.2.	<i>Análisis de los resultados de la caracterización del bioplástico</i>	31
4.2.3.	<i>Cálculos de la caracterización físicoquímico del bioplástico del micelio</i>	31
4.2.3.1.	<i>Humedad</i>	31
4.2.3.2.	<i>Cálculo de la solubilidad en agua</i>	32
4.2.3.3.	<i>Cálculo de la permeabilidad al vapor de agua</i>	32

4.2.3.4.	<i>Cálculo de la biodegradabilidad</i>	34
4.2.4.	Resultados de la caracterización del bioplástico	34
4.2.4.1.	<i>Espesor</i>	34
4.2.4.2.	<i>Contenido de humedad</i>	36
4.2.4.3.	<i>Solubilidad del bioplástico</i>	37
4.2.4.4.	<i>Permeabilidad del bioplástico</i>	39
4.2.4.5.	<i>Ensayo de tracción</i>	40
CONCLUSIONES		42
RECOMENDACIONES		43
BIBLIOGRAFÍA		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-4:	Características organolépticas del micelio del hongo	23
Tabla 2-4:	Características Organolépticas de la extracción del micelio	23
Tabla 3-4:	Resultados del rendimiento en la extracción del micelio del hongo	24
Tabla 4-4:	Resultados de humedad y materia seca.....	25
Tabla 5-4:	Resultados de ceniza	25
Tabla 6-4:	Resultados de solubilidad.....	25
Tabla 7-4:	Resultados de viscosidad.....	26
Tabla 8-4:	Resultados de pH	26
Tabla 9-4:	Resultados de Temperatura de Gelatinización.....	26
Tabla 10-4:	Resultado de la granulometría.....	27
Tabla 11-4:	Datos del porcentaje de amilosa y amilopectina del almidón	27
Tabla 12-4:	Resultados Análisis Microbiológicos.....	28
Tabla 13-4:	Datos de los análisis físicos, químicos y microbiológicos del micelio del hongo	28
Tabla 14-4:	Ensayos preliminares para la producción del Bioplástico.....	29
Tabla 15-4:	Resultados de la elaboración del Bioplástico mediante el método diseño factorial 2k.	30
Tabla 16-4:	Resultados del análisis sensorial del Bioplástico.....	31
Tabla 17-4:	Resultados de la tasa de transmisión de vapor del Bioplastico.....	33
Tabla 18-4:	Resultados del ensayo de espesor del Bioplástico	34
Tabla 19-4:	Resultados del ensayo de humedad del Bioplástico	36
Tabla 20-4:	Resultados de análisis de Solubilidad en el Bioplástico	37
Tabla 21-4:	Datos para calcular la permeabilidad del Bioplastico.....	39
Tabla 22-4:	Resultados del ensayo de permeabilidad al vapor del agua para el Bioplástico...	40
Tabla 23-4:	Resultados del análisis de tracción.....	40

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-4: Análisis de la humedad del Bioplástico	32
Ilustración 2-4: Espesor del Bioplástico.....	35
Ilustración 3-4: Análisis de la humedad de los Bioplástico	36
Ilustración 4-4: Análisis de solubilidad del Bioplástico	37
Ilustración 5-4: Análisis de elongación del Bioplástico.....	41

RESUMEN

Los plásticos son uno de los materiales más utilizados en esta aplicación ya que presentan características deseables como por ejemplo transparencia, propiedades mecánicas eficientes y estabilidad térmica. El objetivo del estudio fue obtener biopolímeros utilizando *Pleurotus ostreatus* en *Theobroma cacao* como sustrato. Se utilizó una metodología mixta que combinó investigación cuantitativa y cualitativa para minimizar debilidades potenciales. Se recolectó información cuantitativa y cualitativa, la cual se analizó y se convirtió en conocimiento, ya que se aplicó el método de diseño factorial 2k para extraer biopolímeros del micelio del hongo *Pleurotus ostreatus* utilizando diferentes variables de proceso, como velocidad de RPM y tiempo de trituración. Se obtuvo el mejor rendimiento en el tratamiento T3 con alta velocidad de RPM y 60 segundos de tiempo de trituración, con un rendimiento del 12,74%. Se caracterizó el bioplástico y se obtuvieron mejores resultados en el T2 en términos de humedad, solubilidad, espesor y esfuerzo máximo de tracción. Finalmente se evaluó la biodegradabilidad del bioplástico en agua, aire y tierra durante 28 días, obteniendo porcentajes de degradación favorables, con respecto a los de un material comercial. Se recomienda utilizar diferentes tipos de residuos agroindustriales de la región interandina en futuras investigaciones para aumentar la producción y rendimiento del micelio de *Pleurotus ostreatus*.

Palabras clave: <BIOPOLÍMERO>, <ZETAS DE OSTRA (*Pleurotus ostreatus*)>, <MICELIO>, <RESIDUOS>, <CACAO (*Theobroma cacao* L)>.



0788-DBRA-UPT-2023

ABSTRACT

Plastics are one of the most widely used materials in this application as they have desirable characteristics such as transparency, efficient mechanical properties, and thermal stability. This study aimed to obtain biopolymers using *Pleurotus ostreatus* on *Theobroma cacao* as a substrate. A mixed methodology was used that combined quantitative and qualitative research to minimize potential weaknesses. Quantitative and qualitative information was collected, which was analyzed and converted into knowledge since the 2k factorial design method was applied to extract biopolymers from the *Pleurotus ostreatus* fungus's mycelium using different processes variables, such as RPM speed and grinding time. The best performance was obtained in the T3 treatment with high RPM speed and 60 seconds of crushing time, with a yield of 12.74%. The bioplastic was characterized, and better results were obtained in T2 regarding humidity, solubility, thickness, and maximum tensile stress. Finally, the biodegradability of the bioplastic in water, air and soil was evaluated for 28 days, obtaining favourable degradation percentages concerning those of commercial material. It is recommended to use different types of agro-industrial waste from the inter-Andean region in future research to increase the production and yield of *Pleurotus ostreatus* mycelium.

Keywords: <BIOINDICATORS OF ANIONIC SURFACTANTS>, <SODIUM LAURYL SULFATE (SLS)>, <DODECYLBENZENE SULFONIC ACID (ADS)> <SODIUM LAURYL ETHER SULFATE (SLES)>, <Spirogyra spp.> <Chlorella sp>, <BIOACCUMULATION >.



Ing. Angel Paul Obregón Mayorga, Mgs.

C.I. 060192712-2

INTRODUCCIÓN

La mayor parte de los materiales que se utilizan para el empaque de alimentos no son biodegradables y debido al auge de tantos mercados y competencia en diversas áreas y productos como es el caso de las industrias de alimentos, se ha vuelto necesario que las compañías investiguen nuevas maneras de mejorar su productividad en términos de seguridad, uso de materiales de empaque de manera sostenible, implementación de tecnología flexible y estandarizada. Los materiales de empaque van cambiando constantemente debido al desarrollo de nuevos productos, tecnología y procesos; así encontramos materiales como el vidrio, papel, cartón, hojalata, aluminio y plásticos (Instituto and Investigación, 2019, p.2).

Los plásticos son uno de los materiales más utilizados en esta aplicación ya que presentan características deseables como por ejemplo transparencia, propiedades mecánicas eficientes y estabilidad térmica. Sin embargo, al no ser totalmente reciclables ni biodegradables, impactan negativamente al medio ambiente, además del aumento en el consumo de combustibles fósiles lo que a su vez incrementa los costos en sus procesos de manufactura (Instituto and Investigación, 2019, p.7).

El uso de materiales más amigables con el ambiente, se ha visto como una de las muchas estrategias para minimizar el impacto ambiental. El hongo *Pleurotus ostreatus* presenta características atractivas, debido a su facilidad de ser modelados de manera programada para diversas aplicaciones. El uso del hongo es sostenible, ya que se desarrollan a partir de fuentes económicas de residuo creciendo rápidamente sin altos consumos de energía, con altos rendimientos en un proceso de elaboración simple (Instituto and Investigación, 2019, p.3). Por lo tanto, se considera pertinente realizar un análisis de viabilidad con el fin de ofrecer una alternativa sustentable de biopolímeros disminuyendo el impacto ambiental.

En el mercado actualmente se está generando una gran demanda de productos con características, naturales que sean menos contaminantes además que mejoren la calidad de vida de los consumidores, por tal razón, en Ecuador se están promoviendo campañas para la producción de los hongos *Pleurotus ostreatus* bajo condiciones controladas y adecuadas, además se resalta que es un cultivo 100% orgánico en el cual se pueden aprovechar los residuos agroindustriales como sustrato para su germinación ya que este hongo es un descomponedor primario.

En ese orden de ideas, el sector productivo del Cantón Bucay posee un gran potencial para el acceso a mercados nacionales, donde se cultivan una variedad de productos agrícolas que les permite pensar en ser un eje potencial en la producción y comercialización en este caso específico de hongos.

De acuerdo con el mapa de zonificación agroecológica elaborado por el Instituto GeoIlustración Nacional, en 1985 la tierra potencialmente agrícola de Ecuador corresponde al 12,7% del territorio Nacional o sea 14.497.517 millones de hectáreas (Lindao, 2016, p.22).

Sin embargo, se está usando el 4.66% que equivale a 5.317.826 millones de hectáreas. De aquí, se concluye que la actividad agrícola es relativamente baja comparada con la disponibilidad existente (Lindao, 2016, p.3). Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el GAD del Guayas, cantón Bucay no es ajeno a esa realidad, en la actualidad el establecimiento de cultivos de hongo de alto rendimiento es escaso y contrasta con la realidad de las altas extensiones de tierra con cultivos transitorios y ganadería extensiva, lo que hace que estas tierras sean poco competitivas en los mercados regionales y nacionales desde el punto de vista agrícola (Micheller, 2019, p.3).

Con base en lo anterior, se identifica la necesidad y oportunidad de promover entre los productores agrícolas del municipio de Suratá el establecimiento de cultivos que les permita acceder a mercados regionales, nacionales e internacionales para posicionar la región como referente de desarrollo y crecimiento en el sector agrícola. La formulación del presente proyecto tiene como objetivo revisar la factibilidad del establecimiento del cultivo de hongos para el consumo y su comercialización por parte de productores agrícolas del cantón.

El desarrollo del proyecto se realizará durante el período abril 2022 – julio 2022 en el Cantón Riobamba y surge como una solución a la búsqueda de otros métodos efectivos y no perjudiciales para producir biopolímeros, con el objetivo de erradicar los polímeros de origen petrolífero por ser productos altamente perjudiciales para el ambiente y la biodiversidad, para los suelos, aguas superficiales, subterráneas y atmósfera y para nuestra salud, así como también satisfacer la necesidad de la población de consumir productos orgánicos y más saludables, además que económicamente es factible por los costos mínimos que requiere el desarrollo del hongo.

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema

Los plásticos son uno de los materiales más utilizados en esta aplicación ya que presentan características deseables como por ejemplo transparencia, propiedades mecánicas eficientes y estabilidad térmica. Sin embargo, al no ser totalmente reciclables ni biodegradables, impactan negativamente al medio ambiente, además del aumento en el consumo de combustibles fósiles lo que a su vez incrementa los costos en sus procesos de manufactura (Instituto Investigación, 2019, p.7). El uso de materiales más amigables con el ambiente, se ha visto como una de las muchas estrategias para minimizar el impacto ambiental. El hongo *Pleurotus ostreatus* presenta características atractivas, debido a su facilidad de ser modelados de manera programada para diversas aplicaciones. El uso del hongo es sostenible, ya que se desarrollan a partir de fuentes económicas de residuo creciendo rápidamente sin altos consumos de energía, con altos rendimientos en un proceso de elaboración simple (Instituto Investigación, 2019, p.3). Por lo tanto, se considera pertinente realizar un análisis de viabilidad con el fin de ofrecer una alternativa sustentable de biopolímeros disminuyendo el impacto ambiental.

1.2. Limitaciones y delimitaciones

Una de las limitaciones es que en el mercado actualmente se está generando una gran demanda de productos con características naturales que sean menos contaminantes además que mejoren la calidad de vida de los consumidores, por tal razón, se están promoviendo campañas para la producción los hongos *Pleurotus ostreatus* bajo condiciones controladas y adecuadas, además se resalta ser un cultivo 100% orgánico en el cual se pueden aprovechar los residuos agroindustriales como sustrato para su germinación ya que este hongo es un descomponedor primario, es por esta razón que al tener un mercado reducido no se ha podido desarrollar mejores pruebas con respecto a la tracción (resistencia del bioplástico que se genera a partir del *Pleurotus ostreatus*) u otros factores pues de esta manera se complica competir con los productos ya posicionados.

1.3. Problema general de investigación

La mayor parte de los materiales que se utilizan para el empaque de alimentos no son biodegradables.

1.4. Problemas específicos de investigación

- Falta de seguimiento dentro de las etapas de producción de *Pleurotus ostreatus*.
- Los sistemas enzimáticos no ayudan a comprobar la capacidad de *Pleurotus ostreatus*.
- No se controlan los parámetros económicos que determine la rentabilidad en el mercado.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

- Obtener biopolímeros a través de *Pleurotus ostreatus* en *Theobroma cacao*.

1.5.2. Objetivos específicos

- Evaluar las etapas de cultivo del *Pleurotus ostreatus* en *Theobroma cacao*.
- Realizar análisis físico químicos y microbiológicos del micelio extraído del hongo.
- Caracterizar el bioplástico mediante pruebas de ensayo en el laboratorio.

1.6. Justificación

De acuerdo con el mapa de zonificación agroecológica elaborado por el Instituto GeoIlustración Nacional, en 1985 la tierra potencialmente agrícola de Ecuador corresponde al 12,7% del territorio Nacional o sea 14.497.517 millones de hectáreas (Lindao, 2016, p.8).

Sin embargo, se está usando el 4,66% que equivale a 5.317.826 millones de hectáreas. De aquí, se concluye que la actividad agrícola es relativamente baja comparada con la disponibilidad existente (Lindao, 2016, p.2). Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el GAD del Guayas, cantón Bucay no es ajeno a esa realidad, en la actualidad el establecimiento de cultivos como el hongo de alto rendimiento es escaso y contrasta con la realidad de las altas extensiones de tierra con cultivos transitorios y ganadería extensiva, lo que hace que estas tierras sean poco competitivas en los mercados regionales y nacionales desde el punto de vista agrícola (Mishel, 2019, p.7).

Con base en lo anterior, se identifica la necesidad y oportunidad de promover entre los productores agrícolas del municipio de Suratá el establecimiento de cultivos que les permita acceder a mercados regionales, nacionales e internacionales para posicionar la región como referente de desarrollo y crecimiento en el sector agrícola. La formulación del presente proyecto tiene como

objetivo revisar la factibilidad del establecimiento del cultivo de hongo para el consumo y su comercialización por parte de productores agrícolas del municipio.

El desarrollo del proyecto se realizará durante el período abril 2022 – julio 2022 en el Cantón Riobamba. El mismo surge como solución a la búsqueda de otros métodos efectivos y no perjudiciales para producir biopolímeros, con el objetivo de erradicar los polímeros de origen petrolífero por ser productos altamente perjudiciales para el ambiente y la biodiversidad, para los suelos, aguas superficiales, subterráneas y atmósfera y para nuestra salud, así como también satisfacer la necesidad de la población de consumir productos orgánicos y más saludables, además que económicamente es factible por los costos mínimos que requiere el desarrollo del hongo.

1.7. Hipótesis

Ha: La especie de hongo *Pleurotus ostreatus* tiene la capacidad de sintetizar biopolímeros a partir de un crecimiento en residuos de *Theobroma cacao*.

Ho: La especie de hongo *Pleurotus ostreatus* no tiene la capacidad de sintetizar biopolímeros a partir de un crecimiento en residuos de *Theobroma cacao*.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de investigación

En la economía del Ecuador siempre se presentaron altibajos a lo largo de su historia, es así que la larga recesión provocada por la crisis del cacao que se inició a principios de la década de los veinte, se suma la gran depresión de los años treinta; esta fue superada con un nuevo periodo de auge exportador, el bananero, que abrió la puerta a una serie de cambios largamente esperados en la sociedad ecuatoriana. Posteriormente la crisis del banano, registrada en los años sesenta; fue superada por el boom petrolero, a partir de 1972 hasta los primeros años de los ochenta; donde el mundo sufrió una pérdida en la economía del petróleo, sin embargo, los estudios para la recuperación de las zonas que se veían afectadas por la extracción del petróleo.

Okyere (2011, p.7), recolectó y aisló cepas silvestres de *Auricularia*, en tres fincas cafetaleras del municipio de San Rafael Pie de la Cuesta San Marcos. Los especímenes recolectados se encontraron creciendo sobre troncos de cushín (*Inga paterna*) (cepas A-1 y A-3) y sobre troncos de arbustos de café (A-2). Se evaluó el crecimiento micelial de estas cepas en tres medios: Agar extracto de malta (AEM), agar papa dextrosa (PDA) y agar Sabouraud (SAB), incubando tanto a temperatura ambiente (24°C) como a 30°C. La mayor velocidad de crecimiento a 24°C se reportó en los medios AEM y PDA con un promedio de 4,3mm día respectivamente, mientras que en SAB el micelio creció a razón de 2,1mm/día. El mejor sustrato orgánico para el crecimiento de las cepas aisladas fue la mezcla de aserrín con salvado de arroz con el que se obtuvo un crecimiento de 4,8cm³/día a 24°C y 6,2cm³/día a 30°C. Para este sustrato se reportó una eficiencia biológica del 75%. El sustrato que presentó la velocidad de crecimiento más baja fue la pulpa de café con 3cm³/día a 24°C y 4cm³/día a 30°C. Solo una cepa (A-3), no presentó crecimiento en este sustrato. De las tres cepas estudiadas la que presentó mayor tolerancia a cambios nutricionales y de temperatura fue la cepa A-1, asimismo las mejores velocidades de crecimiento tanto en medio de cultivo como en los sustratos orgánicos utilizados, además fue la única cepa que fructificó.

(Quiroz, 2020, p.7) evaluó la adaptabilidad de 3 cepas del hongo *Pleurotus*, en 3 sustratos para su fructificación, en condiciones ambientales controladas en las que se usó la paja de trigo, hojas de maíz y aserrín de pino, teniendo como resultado que el hongo que fructificó mejor ha sido el que tuvo como sustrato la paja de trigo. En contraste (Ramón, 2012, p.34) también evaluó el crecimiento de cepas del hongo en diferentes sustratos, siendo estos la paja de trigo, hojas de maíz y cascarilla de cacao, dando como resultado que el hongo fructificó en menor tiempo con el sustrato en base a la cascarilla de cacao.

2.2. Referencias teóricas

2.2.1. *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus es uno de los hongos con mayor porcentaje de cultivo alrededor del mundo y valorado principalmente por sus propiedades medicinales y ecológicas. El tiempo de crecimiento de este hongo es mucho menor que otros hongos comestibles, además requiere sustratos de bajo costo, lo cual los convierte en una alternativa rentable (Sánchez, 2010, p.8). Su baja tasa de control ambiental asociado con su alta resistencia ante enfermedades y plagas lo posesionan como una gran oportunidad de producción a gran escala (Magae Magae, 1993, p.7).

2.2.1.1. Características

Pleurotus ostreatus se caracteriza por tener una superficie lisa con leves escamas hacia la base, generalmente poseen un ancho de 5 cm y puede llegar a los 15 cm dependiendo de factores ambientales. Tienen un color gris o marrón y láminas entrelazadas de color blanco o amarillo de bordes lisos que no se unen entre sí en la base. Los bordes del sombrero son irregulares y se modifican con el paso del tiempo; en etapas juveniles el borde presenta enrollamiento. y en etapas adultas aparece desenrollado y abierto. El color y sabor de este tipo de hongos es muy agradable y altamente perceptible. Ordinariamente crecen sobre troncos descompuestos o arboles de zonas tropicales o subtropicales. Poseen un alto valor gastronómico y suelen ser muy apetecidas estas setas en varias partes del mundo (Pérez, 2006, p.3).

2.2.1.2. Forma del micelio

Los micelios que forman parte de *Pleurotus ostreatus* son de color blanco, con una longitud de tipo radial y una textura tipo algodón cuando el micelio recién comienza a formarse. A medida que el micelio de estas setas comienza a envejecer comienza a tornarse color amarillo o marrón (Pérez, 2006, p.98).

2.2.1.3. Condiciones para la formación del micelio

El cultivo de hongos en el mundo ha tenido un significativo impacto en la producción de alimentos y ha ayudado a resolver el problema de la disposición de desechos orgánicos no comestibles (Holgado et al., 2019, p.4). Para que el micelio logre desarrollarse con mayor facilidad es importante

contar con condiciones ambientales óptimas, la incubación tarda de 22 a 30 días (Hernandez., 2004, p.211).

- **Temperatura:** *Pleurotus ostreatus* necesita un lapso de temperatura entre 23 y 24°C (Hernández, 2004, p.34).
- **Humedad del sustrato:** La humedad del sustrato debe permanecer entre el 50 y 80% (Taniguchi et al., 2005, p.4).
- **Humedad ambiental:** El área donde se mantiene el micelio debe permanecer cerrado y mantener una humedad relativa entre 70 y 80 % (Hernández, 2004, p.11).
- **Luz:** El micelio de *Pleurotus ostreatus* debe reposar en un lugar oscuro y fresco para que tenga un crecimiento idóneo (Hernandez, 2004, p.1).
- **Aireación:** Para que exista un crecimiento ideal los hongos deben estar en presencia del 20% de oxígeno y una concentración de CO₂ no mayor a los 800 ppm presentes en el ambiente (Taniguchi et al., 2005, p.8).

2.2.1.4. Aplicaciones

- Industria del papel

La preparación industrial del papel requiere la separación y degradación de lignina en pulpa (Rodríguez Toca, 2007). Convencionalmente, este proceso se realiza usando oxidantes químicos a base de contaminantes clorados y oxígeno (Kunamneni et al., 2006, p.7). Los procesos de deslignificación con oxígeno se han introducido industrialmente en los últimos años para sustituir los métodos convencionales con cloro, pero pretratamientos de la pulpa con enzimas ligninolíticas, podrían proporcionar estrategias más limpias de deslignificación (Rodríguez, 2007, p.2). Una razón importante para sustituir el blanqueo químico con cloro, por el bioblanqueo, es la eliminación de compuestos organoclorados del medio ambiente, dado que son altamente carcinogénicos (Rodríguez, 2007, p.1).

Las lacasas son utilizadas en la industria papelera para llevar a cabo el biopulpeo, que es un proceso fundamental para separar y eliminar la lignina de la celulosa (Deleé et al., 1988, p.21).

- Industria biotecnológica

Dado que las lacasas son capaces de catalizar reacciones de transferencia de electrones sin la adición de cofactores, su uso también ha sido estudiado en biosensores, para detectar varios compuestos fenólicos u oxígeno. Por ello, biosensores para la detección de morfina y codeína, flavonoides vegetales y electro inmuno ensayos, han sido desarrollados. La contribución de la nanotecnología es el desarrollo de más pequeños y más eficientes biosensores controlados por

deposición y adsorción específica de biomoléculas en diferentes tipos de superficies, que van desde el orden de micras hasta nanómetros (Rodríguez, 2007, p.9).

- Biorremediación

Uno de los mayores problemas ambientales que enfrenta el mundo hoy en día, es la contaminación del suelo, agua y aire, por compuestos químicos tóxicos (Desai Nityanand, 2011). Con la rápida industrialización y el uso extensivo de pesticidas para mejorar la productividad agrícola, la contaminación ambiental se ha convertido en un serio problema. Ciertos compuestos peligrosos, como bifenilos policlorados, benceno, tolueno, etilbenceno, xileno, hidrocarburos aromáticos policíclicos, pentaclorofenol, 1,1,1-tricloro-2,2-bis (4-clorofenil) etano y trinitrotolueno, son sustancias conocidas por su efecto carcinogénico y mutagénico y por su persistencia en el medio ambiente (Shraddha et al., 2017, p.2).

En la biorremediación de suelos, las lacasas oxidan contaminantes orgánicos tóxicos que, en conjunto con otros xenobióticos, son la principal fuente de contaminación del suelo. Normalmente se aplican en forma de micelio crecido sobre viruta de madera, paja de trigo o de maíz, o de algún otro material lignocelulósico similar (Quintero et al., 2006, p.90).

En aguas de irrigación, la presencia de compuestos aromáticos, representa un riesgo significativo para la salud, por lo que el uso de lacasas inmovilizadas sobre soportes orgánicos, permite la remoción natural de los xenobióticos aromáticos de suspensiones acuosas (Minussi et al., 2002, p.2).

- Industria cosmética

El ámbito de los cosméticos no ha sido indiferente a la aplicación de las lacasas ya que actualmente se conocen tintes capilares a base de estas enzimas que los hacen menos irritantes, pues las lacasas sustituyen el peróxido de hidrógeno como un agente oxidante en la formulación de los tintes. Recientemente, también se han desarrollado preparaciones cosméticas y dermatológicas que contienen proteínas para el aclarado de la piel (Rodríguez, 2007, p.23).

- Industria alimentaria

En la industria alimentaria, las lacasas se utilizan para la eliminación de compuestos fenólicos indeseables en la elaboración de jugos, en la estabilización del vino y la biorremediación de aguas residuales. Las lacasas no sólo mejoran la funcionalidad, sino también las propiedades sensoriales del producto en el que se aplican (Shraddha et al, 2011, p .7).

En la industria de la cerveza, las lacasas no sólo proporcionan estabilidad, sino también alargan la vida útil de la misma. En esta bebida, la formación de turbidez es estimulada por las proantocianidinas presentes de forma natural, fenómeno que se conoce como “niebla fría”. A temperatura ambiente o superior, el calentamiento de la cerveza puede disolver el complejo, pero después de cierto tiempo, los anillos fenólicos son sustituidos por el grupo sulfhidrilo, y la turbidez entonces, se vuelve permanente, sin que se pueda redisolverse (Shraddha et al., 2011, p.5).

En la elaboración de jugos frutales estables, la enzima lacasa es utilizada comúnmente, ya que los compuestos fenólicos y sus productos de oxidación confieren color y sabor no característico al jugo. El cambio en el color y aroma del jugo se atribuye a la polimerización y oxidación de compuestos fenólicos y polifenoles, debido a que existe una alta concentración de estos compuestos; esta reacción se denomina oscurecimiento enzimático (Rodríguez, 2007, p.6).

2.2.2. Residuos de la producción de cacao

Según datos oficiales de FAO/STAT, en el año 2019 se ha reportado a nivel mundial una superficie de 12'234.311 hectáreas destinadas al cultivo de cacao, con una producción anual de 5'596.397 toneladas; mientras que en Ecuador se encuentran registradas alrededor de 525.435 hectáreas destinadas a este cultivo con una producción de 283.680 toneladas/año; de la superficie Ecuatoriana cultivada de cacao, el 83% corresponde a cacao nacional o criollo y el restante, 17 % a otros tipos de cacao trinitario, entre ellos CCN-51. Peritos en la producción cacaotera establecieron que en este tipo de cultivo solo es aprovechado el 10% del peso del fruto fresco, un 90% concierne a productos de desecho, como la cáscara de cacao y su placenta que representa el 75% del peso total de las mazorcas cosechadas.

El análisis proximal de los residuos de cacao determina una alternativa nutricional fundamentalmente en cuanto a su contenido de extracto etéreo, extracto libre de nitrógeno y fibra bruta. La técnica de degradación in situ ha sido ampliamente adoptada para evaluar la tasa y la extensión de la degradación de los alimentos en el rumen. Técnicas que simulan el ambiente ruminal son ampliamente utilizadas para caracterizar la cinética de degradación de recursos forrajeros. Entre ellas, la técnica in situ o de las bolsas suspendidas en rumen, es de las más ampliamente utilizadas. Por estas consideraciones, el presente estudio consistió en evaluar la composición química, energética, fibra, cinética y degradabilidad ruminal in situ de la materia seca de los residuos de cosecha de cacao (*Theobroma cacao L.*) (cáscara, cascarilla y placenta de cacao) en las variedades como alternativa alimenticia para rumiantes.

2.2.3. *Theobroma cacao*

- **Forma:** Árbol de pequeña talla, perennifolio, de 4 a 7 m de altura (cultivado). El cacao silvestre puede crecer hasta 20m o más.
- **Copa / Hojas:** Copa baja, densa y extendida. Hojas grandes, alternas, colgantes, elípticas u oblongas, de (15) 20 a 35 (50) cm de largo por 4 a 15 cm de ancho, de punta larga, ligeramente gruesas, margen liso, verde oscuro en el haz y más pálidas en el envés, cuelgan de un pecíolo.
- **Tronco / Ramas:** El tronco tiene un hábito de crecimiento dimórfico, con brotes ortotrópicos o chupones. Ramas plagiotrópicas o en abanico. Las ramas primarias se forman en verticilos terminales con 3 a 6 ramillas; al conjunto se le llama "molinillo". Es una especie cauliflora, es decir, las flores aparecen insertadas sobre el tronco o las viejas ramificaciones.
- **Corteza:** Externa de color castaño oscuro, agrietada, áspera y delgada. Interna de color castaño claro, sin sabor.
- **Flores:** Se presentan muchas flores en racimos a lo largo del tronco y de las ramas, sostenidas por un pedicelo de 1 a 3 cm. La flor es de color rosa, púrpura y blanca, de pequeña talla, de 0;5 a 1 cm de diámetro y 2 a 2,5 cm de largo, en forma de estrella. Pétalos 5, de 6 mm de largo, blancos o teñidos de rosa, alternos con los sépalos y de forma muy singular: comienzan estrechos en la base, se ensanchan y se hacen cóncavos para formar un pequeño capuchón y terminan en una lígula; sépalos 5, rosas, angostos, puntiagudos, ampliamente extendidos. Las inflorescencias después de producir flores durante varios años se convierten en tubérculos engrosados que reciben el nombre de "cojinetes florales".
- **Fruto(s).** El fruto. una baya grande comúnmente denominada "mazorca", carnosa, oblonga a ovada, amarilla o purpúrea, de 15 a 30 cm de largo por 7 a 10 cm de grueso, puntiaguda y con camellones longitudinales; cada mazorca contiene en general entre 30 y 40 semillas dispuestas en placentación axial e incrustadas en una masa de pulpa desarrollada de las capas externas de la testa.
- **Semillas:** Semillas grandes del tamaño de una almendra, color chocolate o purpúreo, de 2 a 3 cm de largo y de sabor amargo. No tiene albumen y están recubiertas por una pulpa mucilaginosa de color blanco y de sabor dulce y acidulado. Todo el volumen de la semilla en el interior está prácticamente ocupado por los 2 cotiledones del embrión. Se les llama vulgarmente "habas" o "granos" de cacao. Ricas en almidón, en proteínas, en materia grasa, lo cual les confiere un valor nutritivo real.
- **Raíz:** El sistema radical se compone de una raíz pivotante que en condiciones favorables puede penetrar más de 2 m de profundidad, favoreciendo el reciclaje de nutrientes y de un extenso sistema superficial de raíces laterales distribuidas alrededor de 15 cm debajo de la superficie del suelo.

- **Sexualidad:** Hermafrodita.
- **Número cromosómico:** $2n = 20$.

2.2.4. *Fermentación en estado sólido de residuos lignocelulósicos con *Pleurotus ostreatus**

La fermentación se define principalmente como el crecimiento de microorganismos en sustratos de tipo sólido sin la presencia de agua libre. Esta técnica se ha desarrollado para la transformación de los compuestos presentes en alimentos o residuos, ya que los microorganismos son los que realizan este proceso pues aprovechan los nutrientes, la cantidad de agua, temperatura y el pH entre los más importantes que pueden facilitar o limitar el crecimiento de la biomasa que se desarrolla por el crecimiento de los microorganismos (MO's). El consumo de residuos lignocelulósicos como materias primas principalmente surgen como alternativas por su coste económico y de fácil acceso en el país; entre los más destacados se encuentra la alfalfa, la paja de cebada, pastos, tamo de trigo, residuos de maíz, bagazo de caña, residuos de flores.

Estos residuos contienen celulosa, lignina y hemicelulosa, estos son esenciales para la producción de la biomasa del *Pleurotus ostreatus* en el proceso de fermentación sólida del micelio se produce una cantidad importante de enzimas que permiten reducir los contenidos lignocelulósicos para usarlos como nutrientes para el crecimiento y la fructificación del hongo. Sin embargo, si la composición de los residuos es de baja calidad afecta directamente en el desarrollo del micelio, ya que este es el principal responsable del proceso de biotransformación (Rosa et al. 2014, p.7).

2.2.4.1. *Factores*

- **Temperatura:** Este factor depende de la especie de hongo y donde se desarrolle, es decir la zona climática pues la temperatura mínima que pueden soportar es 10°C hasta una temperatura de 20°C, esto en condiciones ambientales naturales, es importante mencionar que si se trabaja en el laboratorio, dependerá del objetivo para trabajar con temperaturas controladas (Feijóo, et al., 2021, p.5).
- **Humedad y actividad del agua:** La humedad se mantiene por debajo del 50% siendo la óptima una humedad relativa del sustrato debe ser no mayor al 14,6% y del aire deben ser del 40% (Feijóo et al., 2021, p.3).
- **pH:** el sustrato inicial para el crecimiento del hongo inicia con un pH alcalino, pero en el proceso de degradación terminará siendo de alcalino a ácido (Feijóo, et al. 2021, p.4).
- **Aireación:** La aireación se debe mantener puesto que no es anaerobio, el proceso por lo que el sustrato debe estar distribuido homogéneamente para que exista un flujo de aire y facilite la fermentación en especial al inicio de la inoculación (Feijóo, et al., 2021, p.6).

2.2.5. *Compuestos del micelio*

Los compuestos a partir del micelio son productos innovadores que se reparten en 2 categorías por su diseño micelial vegetativo sobre sustratos lignocelulósicos siendo los primeros de tipo espuma y de tipo sándwich.

Los de tipo espuma son materiales de baja densidad, con alta porosidad lo que le da unas propiedades mecánicas asimétricas en todas las direcciones; estos no necesitan de un prensado ya que se realizan en un microambiente húmedo con una temperatura de entre 24-28°C y en ausencia de luz, dando como resultado final materiales con propiedades similares a la de las espumas de poliestireno expandido que se usan para un aislamiento térmico o acústico, si se prensa alcanzan mayor resistencia de tracción por lo que son más efectivos ante aislantes como las espumas de estireno o madera (Feijóo, et al. 2021, p.6).

Los compuestos de tipo sándwich están compuestas de un núcleo micelar que está recubierto por dos o más capas de fibras hechas de materia lignocelulósica prensada, para tener la forma deseada, esto se realiza con el propósito de detener el crecimiento del micelio, además que al realizarse el micelio se pega de manera que se vuelve un solo bloque, por lo que son estructuras mucho más fuertes que los de tipo espuma, en contraste principalmente se las usa en la fabricación de biotextiles y en la construcción por sus propiedades elásticas y de resistencia física-térmica (Feijóo, et al., 2021, p.7).

2.2.6. *Biodegradabilidad de los compuestos de micelio*

Los compuestos basados en el micelio tienen un nulo impacto ambiental ya que en los procesos de fabricación no se requiere de implementos de carácter químico, lo que facilita la descomposición del empaque puesto que el micelio al encontrarse en condiciones ambientales sin el sustrato pierde sus características de resistencia de alto impacto y altas temperaturas por lo que se descomponen sus proteínas, en pocos días se reducen alcanzando un impacto cero al ambiente (Ramón, 2012, p .7).

2.2.7. *Polímeros*

Los polímeros son macromoléculas que se encuentran formadas por moléculas más pequeñas (monómeros), que se unen entre sí mediante enlaces covalentes. En química orgánica, se denomina polimerización al proceso que atraviesan los monómeros para formar una cadena y constituir un polímero.

Los polímeros se pueden clasificar según diferentes criterios: su composición química, sus propiedades, su comportamiento térmico o su origen. Según este último criterio, los polímeros pueden ser naturales, semisintéticos o artificiales.

2.2.7.1. Biopolímeros

Los biopolímeros son macromoléculas de diferente origen, derivados del petróleo, de origen vegetal y muchos son de origen sintético. En este último caso, la mayoría son derivados de la silicona, pudiendo incluir otros materiales como metacrilato o colágeno, entre otros.

2.2.7.2. Características

Los biopolímeros son polímeros producidos por organismos vivos, tales como plantas, animales o microorganismos, y son sintetizados por enzimas procesadoras que vinculan componentes básicos como azúcares, aminoácidos o ácidos grasos hidroxilados para formar moléculas de alto peso molecular. Estos polímeros son derivados directamente por fermentación o por polimerización química. Sin embargo, también se ha conseguido crear biopolímeros sintéticos.

Los biopolímeros se consideran materiales sustentables ya que son biodegradables. También son biocompatibles ya que se degradan dentro del cuerpo en presencia de enzimas y procesos naturales siendo reabsorbidos sin tener efectos secundarios en sistemas biológicos. Estas propiedades de los biopolímeros están siendo explotadas por el campo médico para el suministro de fármacos y en ingeniería de tejidos (Moradali y Jain, 2020, p.8).

2.2.7.3. Aplicaciones

- Biopolímeros en la medicina

En años recientes, el desarrollo de la investigación médica y biológica se ha apoyado cada vez más en el desarrollo de nuevas tecnologías. Micropartículas y nanopartículas basadas en polímeros han sido objeto de investigación en el sector farmacéutico en las últimas décadas (Pawłowska, 2018, p.6).

Los biopolímeros tienen un gran potencial de aplicaciones en el área biomédica como prótesis temporales, andamios para ingeniería de tejidos, como vehículos de liberación controlada de fármacos y como agentes de sutura, fijación y adhesión (Rebelo, 2017, p.7).

Entre los biopolímeros más utilizados se puede mencionar al ácido poliláctico, el quitosano, el ácido poliglicólico y la policaprolactona.

En el área médica, los investigadores están muy interesados en los materiales reabsorbibles, ya que se eliminan sin necesidad de cirugía. Generalmente estos materiales se eliminan sin ser tóxicos para el cuerpo y se degradan a la mitad de su masa inicial en unos pocos meses (Davidson, 2019, p.3).

- Polímeros inteligentes

Existe un tipo especial de polímeros, conocidos como polímeros inteligentes, esto porque responden a estímulos, ya que contienen grupos funcionales en su estructura los cuales actúan como un interruptor. Estos son biocompatibles, no trombogénicos, fuertes, flexibles, resistentes y fáciles de moldear. Estas características los hace candidatos ideales para diversas aplicaciones en el campo biomédico, tales como ingeniería de tejidos, ingeniería de tejidos óseos, endotelización 3D, venas sanguíneas artificiales, patrón de células 3D, liberación de fármacos, ortodoncia, cicatrización y cierre de heridas, microcirugías, materiales anticonceptivos, dispositivos de reparación vascular y stents para tratamiento de aneurisma, entre otras (Pattanashetti., 2017; citado en Kirillova, 2019, p.6).

- Implantes poliméricos

El objetivo principal de los implantes es el asemejar una parte del cuerpo, y se usan generalmente para reemplazar un órgano o estructura y mantener el funcionamiento normal del cuerpo. El ácido poliláctico es uno de los biopolímeros más prometedores, el cual se extrae del almidón de maíz, arroz, papas u otros recursos naturales. Entre sus ventajas se encuentran que es muy abundante y tiene un bajo costo, también es bioabsorbible, lo que lo hace un candidato perfecto para implantes. Por mencionar un ejemplo, un stent, después de servir como dilatador intravascular se degradaría por los fluidos del cuerpo humano sin dejar rastro de este, sin tener que hacer una segunda cirugía para extraerlo (Rebelo, 2017, p.8).

- Ingeniería de tejidos

Para que un biopolímero pueda utilizarse específicamente en el área de ingeniería de tejidos, se requiere que tenga propiedades tales como biodegradabilidad, biocompatibilidad, bioadhesividad, hemo compatibilidad, que no sea tóxico, y que sea elástico, además deberá ser compatible con las propiedades mecánicas de la parte en la que se va a implantar (Davidson, 2019, p.7).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Enfoque de la investigación

El presente trabajo considera una investigación de tipo mixta dado que la meta de la investigación mixta no es reemplazar a la investigación cuantitativa ni a la investigación cualitativa, sino utilizar las fortalezas de ambos tipos de indagación para minimizar debilidades potenciales. Por el método de investigación cuantitativa, ya que las variables en estudio son medibles. Se indagará y se recolectará información cuantitativa y cualitativa, se analizará y se convertirá en conocimiento para luego, realizar el análisis del crecimiento y después de la síntesis de los biopolímeros.

3.2. Nivel de investigación

El nivel de investigación según el alcance del objetivo general y objetivos específicos es de tipo correlacional debido a que se van a relacionar dos variables. Por un lado, los biopolímeros como variable independiente y el crecimiento del hongo como variable dependiente. Se evaluará el crecimiento del micelio en relación a la cantidad de biopolímeros que se logrará producir.

3.3. Diseño de investigación

3.3.1. *Según la manipulación o no de la variable independiente*

Se realizarán series cronológicas con repetición del estímulo. Dentro de la experimentación se prevé realizar pruebas en distintos lapsos de tiempo para determinar la calidad del biopolímero obtenido a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* que será cultivado en *Theobroma cacao*. Por lo tanto, existe manipulación de la variable independiente para observar el efecto sobre la variable dependiente de estudio.

3.3.2. *Según las intervenciones en el trabajo de campo*

El estudio se realizará en las instalaciones de los laboratorios de la Facultad de Ciencias, para mantener condiciones ambientales controladas, dichos laboratorios se encuentran ubicados de acuerdo con el sistema WGS 84 a 1°39'06" Latitud Sur y 78°37'10" de longitud Occidental.

3.4. Tipo de estudio

El tipo de estudio de la investigación es experimental, ya que se eligieron libremente las variables a correlacionar, los resultados dependen de la manipulación de las variables, en el ambiente controlado del laboratorio y como se va a tratar el micelio del hongo para la formación de biopolímeros.

3.5. Población y planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra

3.5.1. Población de estudio

La población de estudio está representada por las muestras existentes en el laboratorio obtenidas de la síntesis de biopolímeros a partir de un crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en residuos de *Theobroma cacao*. Será representada por muestras con la aplicación de fórmulas estadísticas que garanticen su idoneidad para la síntesis y obtención de biopolímeros.

3.5.2. Tamaño de la muestra

Será representada por muestras con la aplicación de fórmulas estadísticas que garanticen la idoneidad de estas para la síntesis y obtención de biopolímeros.

3.6. Métodos, técnicas e instrumentos de investigación

3.6.1. Método de muestreo

Específicamente se determinó que es de tipo no probabilístico debido a que no existe una cantidad específica de biopolímero que se obtendrá, se realizarán varias pruebas con las cuales se aprovechará al máximo el micelio de *Pleurotus ostreatus*.

3.6.2. Técnicas de recolección de datos

Específicamente se determinó que es de tipo no probabilístico debido a que no existe una cantidad específica de biopolímero que se obtendrá, se realizarán varias pruebas con las cuales se aprovechará al máximo el micelio de *Pleurotus ostreatus*.

En la presente investigación las técnicas de recolección de datos están conformadas por datos obtenidos en las pruebas experimentales preliminares de este proyecto de investigación, que serán

llevadas a cabo en los Laboratorios de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

3.6.3. Instrumentos

3.6.3.1. Materiales

- Vasos de precipitación
- Pipetas graduadas
- Varillas de agitación
- Pera de succión
- Erlenmeyer
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Papel aluminio
- Papel filtro Whatman
- Frascos de plástico
- Envases de plástico
- Hojas de menta
- Agua destilada
- Alcohol
- Mecheros
- Aza de siembra
- Cajas Petri
- Guantes
- Crisoles
- Termómetro
- Cinta adhesiva
- Rotuladores

3.6.3.2. Equipos

- Balanza analítica
- pH-metro
- Microscopio binocular
- Hornilla Eléctrica

3.6.3.3. Reactivos

- Síntesis del quitosano:
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Ácido clorhídrico al 37 % (HCl)
- Etanol
- Solución Buffer pH 4

3.7. Diseño del experimento

3.7.1. Primera etapa

3.7.1.1. Preparación de los medios de cultivo

- Dilución del medio en agua destilada.
- Esterilización del medio y de las cajas Petri.
- Llenado de cajas Petri al calor del mechero.

3.7.1.2. Extracción e inoculación del micelio

- Extracción de trozos del micelio con bisturí y pinzas.
- Colocación de los trozos en las cajas de Petri con el medio solidificado.
- Se llevan las cajas inoculadas a estufa de cultivo a 28°C.

3.7.1.3. Multiplicación del micelio

Una vez que el micelio primario prolifera en las cajas de los pasos anteriores, se multiplica para obtener más cantidad.

- Se preparan más cajas con medio de cultivo.
- Se recortan nuevos trozos de medio sólido con micelio primario y se inoculan en las nuevas cajas.
- Las nuevas cajas se llevan a estufa de cultivo a 28°C.

3.7.1.4. Preparación del medio donde se hará fructificar el micelio primario

- Se arman paquetes de sustrato y se esterilizan en la autoclave.
- Humidificación del sustrato con agua destilada para favorecer las condiciones.

3.7.1.5. Inoculación del micelio primario en el sustrato

- En una funda o bolsa de nylon, se colocan capas alternadas de sustrato y micelio primario.
- La bolsa se mantiene cerrada y en condiciones de humedad/luz moderada.

3.8. Segunda etapa

3.8.1. Obtención y caracterización del quitosano

3.8.1.1. Obtención del quitosano a partir del Micelio Pleurotus Ostreatus

El quitosano fue sintetizado a partir del *Pleurotus ostreatus* siguiendo la metodología propuesta por Escobar et al (2013, p.261) mediante el siguiente procedimiento:

3.8.1.2. Preparación de la materia prima

El pleurotus *Ostreatus* fue lavado con abundante agua con el fin de retirar la materia orgánica residual, luego fue secado a 40 °C en una estufa por 2 horas. Una vez seca la muestra fue triturada y tamizada para reducir el tamaño de partículas a una distribución de entre 0,8 mm y 1,5 mm.

3.8.1.3. Desproteización

Las proteínas presentes fueron removidas usando hidróxido de sodio (NaOH) al 3,5% en una relación 1:10 a 80 °C de temperatura, bajo agitación constante durante 2 horas. Luego la muestra fue filtrada y lavada con agua destilada hasta pH neutro.

3.8.1.4. Desmineralización

En esta etapa se realizó la remoción de los carbonatos de calcio de los hongos, usando HCl 2N por 90 minutos en una relación 1:5, bajo agitación constante y a temperatura ambiente. Posteriormente la muestra fue filtrada y lavada hasta pH neutro.

3.8.1.5. Purificación

Se realizó una inmersión de la muestra en solución de NaOH a concentración de 3,5% y una relación de 1:5 a temperatura de 100 °C por 1 hora, bajo agitación constante. Luego se filtró y secó la muestra a 80 °C por 30 minutos. Al finalizar la etapa de purificación se obtuvo la quitina.

3.8.1.6. Desacetilación

Para la desacetilación de la quitina se utilizó una solución de NaOH al 50% de concentración en una relación 1:10 a 100 °C bajo agitación constante por 1 hora. Finalmente, la muestra obtenida corresponde al quitosano, la misma que fue filtrada, lavada hasta pH neutro y secada en una estufa a 80 °C por 30 minutos.

3.8.1.7. Dilución y moldado

Después de que obtenemos quitosano, diluimos el quitosano en una solución al 5% de ácido acético en una relación de 1:5 y este gel que se forma lo pasamos a los moldes para finalmente obtener el bioplástico.

CAPÍTULO III

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Evaluar las etapas de cultivo del *Pleurotus ostreatus* en *Theobroma cacao*

4.1.1. Fase de incubación

Posterior a la preparación de los sustratos, esterilización e inoculación, las bolsas fueron colgadas en filas de 3 unidades, en un área previamente desinfectadas que se le llamó zona de incubación del invernadero necesaria para este estudio, en donde se observaron temperaturas de 7 a 34° C y humedad relativa entre 31 y 100% registradas mediante la ayuda de un termo higrómetro. Las bolsas permanecieron allí ocho días sin ser movidas o abiertas, después de ocho días las bolsas fueron monitoreadas semanalmente, a los tres días se les permitió la aireación a los sustratos. Esta fase se dio por terminada cuando en el monitoreo se observó que el micelio había colonizado toda la superficie del sustrato, mediante una capa blanquecina y algodonosa, en esta fase se midió el efecto de los tratamientos sobre el número de días en la fase de incubación.

4.1.2. Fase de fructificación

Se observó que el micelio había colonizado toda la superficie del sustrato y así las unidades son sometidas a la zona de fructificación del invernadero, bajo las siguientes condiciones-, exposición de luz solar indirecta, temperatura ambiente mínima de 7°C y máxima de 31, 5°C, humedad relativa entre 33 a 100%, donde las bolsas permanecieron colgadas. Los sustratos fueron regados diariamente con agua potable y con ayuda de un atomizador para permitir una mejor distribución. del agua sobre el área del sustrato. Las cosechas se hicieron manualmente desprendiendo los cuerpos fructíferos del sustrato cuando estos dejaban de crecer en diámetro.

En esta fase se midió el efecto de los tratamientos sobre:

- Número de primordios de los cuerpos fructíferos que aparecieron para tres cosechas.
- Número de carpóforos y peso cada cuerpo fructífero.
- Eficiencia biológica y rendimiento de los sustratos.

Datos obtenidos en la fase de fructificación: se tuvo en cuenta para la recolección de datos tres cosechas con la producción constante por 14 días teniendo en cuenta que la temperatura fue temperatura ambiente comprendidas entre 7°C hasta 31,5°C, humedad relativa entre 45% y 100% y 12 horas de luz indirecta, para los tratamientos con más rápida aparición de primordios el

número de días para la primera cosecha fue 7 días y para la segunda cosecha fue 7 días después de la primera.

4.1.3. Datos físicos químicos obtenidos del micelio del hongo

Tabla 1-4: Características organolépticas del micelio del hongo

N°	Micelio del hongo	
	Características	
1	Color	Amarillo
2	Sabor	Desabrido
3	Olor	Característico
4	Textura Interna	Seco
5	Textura interna	Medio lisa

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

Tabla 2-4: Características Organolépticas de la extracción del micelio

N°	Extracción del micelio del hongo	
	Características	
1	Color	Amarillo
2	Sabor	Insípido
3	Olor	Inoloro
4	Textura	Granular

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

4.1.4. Datos recolectados del proceso de extracción del micelio por vía húmeda

Se encuentra los resultados que se obtuvieron en el proceso mecánico de extracción del micelio del hongo *Pleurotus ostreatus* por el método de vía húmeda, aplicando el método diseño factorial 2^k se establecieron 6 tratamientos con 4 repeticiones con un total de 24 experimentaciones; cada experimentación se realizó con 200 g de materia prima con 500 ml de agua destilada, con la adición de 2 variables el tiempo 30, 45 y 60 segundos y las revoluciones por minuto: alta y baja.

Tabla 3-4: Resultados del rendimiento en la extracción del micelio del hongo

N°	Tratamiento	Variables	Repetición	Volumen agua (ml)	Peso (gramos)			Rendimiento		Tiempo de secado	
					Materia prima (g)	Almidón		$R = \frac{\text{micelio obtenido}}{\text{materia prima}} \times 100$			
						R	PROMEDIO	TOTAL	R		PROMEDIO
1	T1	RPM A: 30 s	R1	500	200	15,11	15,41	61,64	7,56	7,71	48
2			R2			15,15			7,58		
3			R3			15,74			7,87		
4			R4			15,64			7,82		
5	T2	RPM A: 45 s	R1			19,19	19,26	77,02	9,60	9,63	48
6			R2			19,18			9,59		
7			R3			19,56			9,78		
8			R4			19,09			9,55		
9	T3	RPM A: 60 s	R1			25,56	25,49	101,94	12,78	12,74	48
10			R2			25,32			12,66		
11			R3			25,05			12,53		
12			R4			26,01			13,01		
13	T4	RPM B: 30 s	R1			12,13	12,38	49,51	6,07	6,19	48
14			R2			12,15			6,08		
15			R3			12,67			6,34		
16			R4			12,56			6,28		
17	T5	RPM B: 45 s	R1			17,04	17,13	68,52	8,52	8,57	48
18			R2			17,12			8,56		
19			R3			17,13			8,57		
0			R4			17,23			8,62		
21	T6	RPM B: 60 s	R1			21,45	21,12	10,62	10,73	10,62	48
22			R2			21,23			10,62		
23			R3			21,12			10,56		
24			R4			21,13			10,57		

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

4.1.5. Cantidad de humedad y materia seca del micelio del hongo *Pleurotus ostreatus*

Se realizaron 3 repeticiones por cada ensayo para obtener un promedio en cada uno de los ensayos.

Tabla 4-4: Resultados de humedad y materia seca

N°	(%) Humedad	Promedio	% Materia seca	Promedio
1	12,79	12,91	87,21	87,086
2	12,85		87,15	
3	13,10		86,90	

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

4.1.6. Contenido de ceniza

Se realizan 3 repeticiones por cada ensayo para obtener un promedio en cada uno de los ensayos.

Tabla 5-4: Resultados de ceniza

N°	(%) Ceniza	Promedio
1	0,11	0,11
2	0,12	
3	0,11	

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

4.1.7. Solubilidad

Se realizaron 3 repeticiones por cada ensayo para obtener un promedio en cada uno de los ensayos.

Tabla 6-4: Resultados de solubilidad

N°	Solubilidad
1	Ligera Opalencia
2	Ligera Opalencia
3	Ligera Opalencia

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

4.1.8. Viscosidad

Se realizaron 3 repeticiones por cada ensayo para obtener un promedio en cada uno de los ensayos.

Tabla 7-4: Resultados de viscosidad

N°	Viscosidad (poise)	Promedio
1	850,06	849,08
2	849,08	
3	848,12	

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

4.1.9. pH

Se realizaron 3 repeticiones por cada ensayo para obtener un promedio en cada uno de los ensayos.

Tabla 8-4: Resultados de pH

N°	pH	Promedio
1	5,09	5.06
2	5,04	
3	5,04	

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

4.1.10. Temperatura de gelatinización

Se realizaron 3 repeticiones por cada ensayo para obtener un promedio en cada uno de los ensayos.

Tabla 9-4: Resultados de Temperatura de Gelatinización

N°	Temperatura de Gelatinización (°C)	Promedio
1	77	77
2	77	
3	77	

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

4.1.11. Granulometría del micelio

Se realizan 3 repeticiones por cada ensayo para obtener un promedio en cada uno de los ensayos.

Tabla 10-4: Resultado de la granulometría

N°	Tamiz (um)	PROMEDIO (%)
1	425	14,45
2	300	12
3	150	34,5
4	106	35,22
5	53	2,03
6	Base	1,8
7	Total	100

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

4.1.12. Porcentaje de amilosa y amilopectina del micelio

Se realizaron 3 repeticiones por cada ensayo para obtener un promedio en cada uno de los ensayos.

Tabla 11-4: Datos del porcentaje de amilosa y amilopectina del almidón

N°	Prueba	Resultado (%)	Institución
1	Amilosa	21,81	INIAP
2	Amilopectina	78,19	INIAP

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

4.1.13. Análisis microbiológicos del micelio

Para los análisis microbiológicos del micelio del hongo la Aristizábal y Sánchez (2007, p.6), indica que para coliformes fecales presenta un valor de referencia <10 UFC/g, para los análisis de mohos y levaduras no debe superar un valor de 1000 a 5000 UFC/g.

Tabla 12-4: Resultados Análisis Microbiológicos

Micelio del Hongo				
Determinaciones	Unidades	Método de Análisis	Resultados	Valores de Referencia
Coliformes Fecales	UFC/g	Vertido en placa	Ausencia	<10 UFC/g
Mohos y Levaduras	UFC/g	Vertido en placa	100	1 000- 5 000 UFC/g

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

4.1.14. Parámetros físico-químicos y microbiológicos para el micelio

Posterior de la extracción del micelio se realizó la caracterización del mismo, realizando los ensayos químicos en el laboratorio de Bromatología y Productos Naturales de la ESPOCH, la prueba de fibra, proteína, grasa y análisis microbiológicos se realizó en el laboratorio SAQMIC a cargo de la Dra. Gina Álvarez, los análisis de amilosa se realizaron en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuarias en el laboratorio de INIAP.

Tabla 13-4: Datos de los análisis físicos, químicos y microbiológicos del micelio del hongo

Datos físicos, químicos y microbiológicos del micelio del hongo					
N°	Parámetros	Unidades	Valor	Estándar	Método de Ensayo
1	Tamaño del granulo	%		60-80%	(Aristizábal y Sánchez, 2007)
2	Humedad	%	12,91	10-13	(Aristizábal y Sánchez, 2007)
3	Materia seca	%	87,086	87-90	(Aristizábal y Sánchez, 2007)
4	Ceniza	%	0,11	< 0.12	(Aristizábal y Sánchez, 2007)
5	Solubilidad		Opalescencia	Opalescencia	(NTE INEN 1456, 2012)
6	pH		5,06	5--7	(NTE INEN 1456, 2012)
7	Grasa	%	0,351		Gravimétrico Extracción del solvente
8	Fibra	%	0,28	<2	Gravimétrico Acido Digestión
9	Proteína	%	0,345	>35	Micro-keldahl
10	Viscosidad	mPa	849,08	840-1500	(Aristizábal y Sánchez, 2007)

11	Temperatura de Gelatinización	°C	77	70 -79	(Aristizábal y Sánchez, 2007)
12	Amilosa	%	21,81	17-24	ISO 6647-1(2014)
13	Amilopectina	%	62,4	76-83	ISO 6647-1(2014)
14	Levaduras y mohos	UFC/g	100	1 – 5	(Aristizábal y Sánchez, 2007)
15	Coliformes Fecales	UFC/g	Ausencia	* 10 ⁵	(Aristizábal y Sánchez, 2007)
16	Aerobios Mesófilos	UFC/g	200		(Aristizábal y Sánchez, 2007)

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

4.2. Resultados obtenidos de la elaboración del bioplástico

Después de la caracterización del micelio se realizó la producción del Bioplástico mediante la extracción del quitosano y el diseño factorial 2k, en el cual se tiene dos variables como es la concentración del micelio y la quitina, obteniendo según los cálculos 4 tratamientos con 4 repeticiones consiguiendo 16 pruebas como se puede localizar en la tabla 15-3.

Tabla 14-4: Ensayos preliminares para la producción del Bioplástico

Tratamientos	Cantidad			
	Almidón (g)	Quitina (ml)	Agua (ml)	Ácido Acético
TA1	2	0,75	30	4
TA2	2	0,50	30	4
TA3	1,75	0,75	30	4
TA4	1,75	0,50	30	4

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

Tabla 15-4: Resultados de la elaboración del Bioplástico mediante el método diseño factorial 2k.

N ^o	Tratamiento	Variables	Repetición	Tiempo de elaboración (min)	Temperatura (°C)	Secado del micelio				Peso (g)	Espesor (mm)	
						Lugar	Temperatura (°C)	Método	Tiempo (h)			
1	TA1	CDM1 CP1	R1	5	77	LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE CIENCIAS	25°C	SECADO AL NATURAL		0,812	0,11	0,11
2			R2	5						0,815	0,10	
3			R3	5						0,821	0,12	
4			R4	5						0,817	0,11	
5	TA2	CDM1 CP2	R1	6						0,745	0,10	0,11
6			R2	6						0,753	0,11	
7			R3	6						0,768	0,11	
8			R4	6						0,745	0,12	
9	TA3	CDM2 CP1	R1	6						0,845	0,11	0,10
10			R2	6						0,843	0,10	
11			R3	6						0,856	0,10	
12			R4	6						0,857	0,10	
13	TA4	CDM2 CP2	R1	5						0,756	0,11	0,11
14			R2	5						0,754	0,11	
15			R3	4						0,759	0,12	
16			R4	5						0,753	0,11	

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

4.2.1. Análisis sensorial del bioplástico

Tabla 16-4: Resultados del análisis sensorial del Bioplástico

Tratamiento	% Micelio	% Quitina	Facilidad de moldeo	Forma de Película	Transparencia	Estabilidad
TA1	2	0,75	SI	SI	SI	SI
TA2	2	0,5	SI	SI	SI	SI
TA3	1,75	0,75	SI	SI	SI	SI
TA4	1,75	0,5	SI	SI	SI	SI

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

4.2.2. Análisis de los resultados de la caracterización del bioplástico

Para la elaboración del Bioplástico se empleó el método factorial 2^k obteniendo las concentraciones idóneas de micelio-plastificante siendo estas variables definidas para la elaboración del Bioplástico, para su formulación se realizaron 4 tratamientos, con un total de 16.

4.2.3. Cálculos de la caracterización físico-químico del bioplástico del micelio del hongo

4.2.3.1. Humedad

Para el contenido de humedad se analizó cada muestra por triplicado, para obtener un promedio de las repeticiones de los 4 tratamientos, de la ecuación 6-2. se tendrá el cálculo de la humedad del Bioplástico TA1.

$$\begin{aligned}\% \text{porcentaje de humedad} &= \frac{\text{Peso inicial muestra} - \text{Peso final muestra}}{\text{Peso inicial muestra}} * 100 \\ \% \text{porcentaje de humedad} &= \frac{0,58 - 0,45}{0,58} * 100 \\ \% \text{porcentaje de humedad} &= 22,41\end{aligned}$$

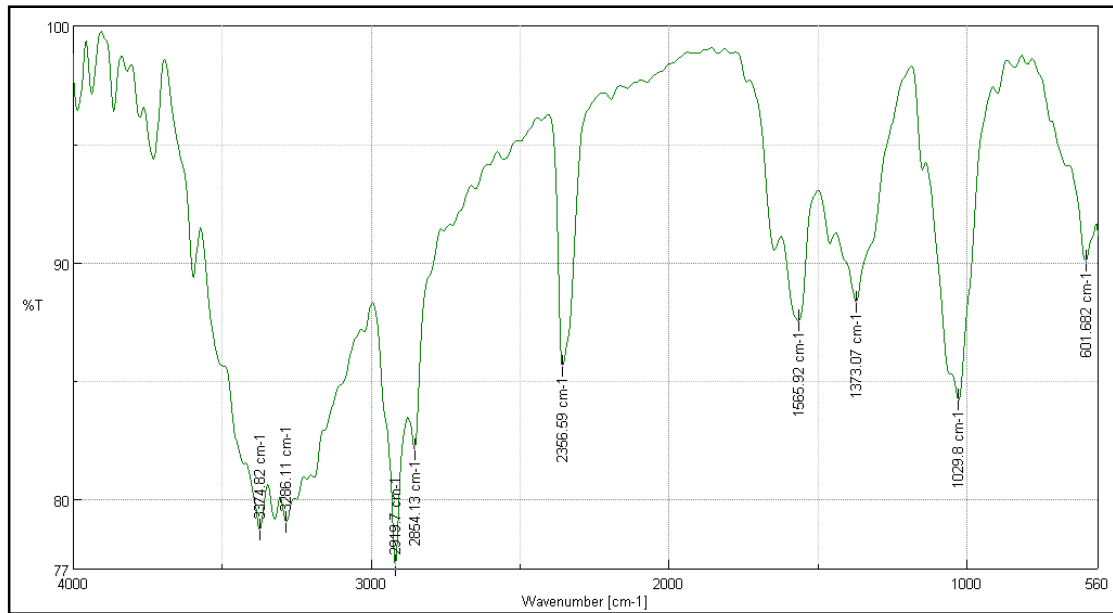


Ilustración 1-4: Análisis de la humedad del Bioplástico

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

Como se puede ver en la figura Análisis espectrofotométrico, se puede ver que la sintetizada tiene un poco de humedad sin embargo posee un espectro similar al de uno comercial de acuerdo a lo mencionado por Torres, 2022.

4.2.3.2. Cálculo de la solubilidad en agua

Se realizó por triplicado para obtener un promedio de los 4 tratamientos, de la ecuación 7-2 se tuvo el cálculo del porcentaje de solubilidad para el tratamiento TA1.

$$\%Solubidad = \frac{\text{Peso inicial muestra seco} - \text{Peso final muestra}}{\text{Peso inicial muestra}} * 100$$

$$\%Solubidad = \frac{0,30 - 0,18}{0,30} * 100$$

$$\%Solubidad = 40$$

4.2.3.3. Cálculo de la permeabilidad al vapor de agua

Para el cálculo de la permeabilidad tenemos que sacar primero la Tasa de transmisión de vapor (WVTR) para lo cual se utiliza la ecuación 8-3.

$$WVTR = \frac{Q}{t} \left(\frac{g}{h * m^2} \right)$$

Dónde:

Q= Peso ganado del desecante en gramos

WVTR= Tasa de transmisión del vapor de agua

t= tiempo de la prueba en horas

A= Área total de la biopelícula

$$WVTR_{TA1} = \frac{(30,191 - 30,185)}{2,06 \times 10^{-4} m^2} = 4,85 \frac{g}{h * m^2}$$

Tabla 17-4: Resultados de la tasa de transmisión de vapor del Bioplastico

N°	TA1	TA2	TA3	TA4
R1	4,85	4,90	6,07	3,16
R2	4,86	12,72	3,00	4,47
R3	8,56	3,80	3,15	2,26
Promedio	6,09	7,14	4,073	3,30

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

Posterior al cálculo de la Tasa de transmisión de vapor (WVTR) se calculó la permeabilidad al vapor de agua o transmisión de vapor de agua, utilizando la ecuación 9-3, descrita en el capítulo anterior.

$$WVP = \frac{WVTR * z}{S'(HR_2 - HR_1)}$$

Dónde:

WVP= Permeabilidad de vapor de agua

WVTR= Pendiente de la curva (g/h) sobre el área expuesta de la lámina

S´ = Presión de vapor de agua a la temperatura de ensayo (MPa)

HR2 = Humedad relativa de la cámara con solución de cloruro de sodio saturada

HR1 = Humedad relativa en el interior de la celda (HR1 = 0%)

z= espesor (m)

$$EEWVP_{TA1} = \frac{4,85 \frac{g}{h * m^2} * (1 \times 10^{-4} m)}{0,002392 MPa (75-0)}$$

4.2.3.4. Cálculo de la biodegradabilidad

Esta prueba se realizó en tres medios diferentes en agua, aire y tierra, se cortaron para cada tratamiento 4 Bioplásticos por cada medio, en la prueba del suelo se tomaron medidas cada dos días para conocer el peso exacto de su descomposición, de la ecuación 10-3 se procedió a calcular la biodegradabilidad del Bioplástico TA1 en los tres medios.

$$\% \text{ Pérdida de peso} = \frac{\text{Peso inicial muestra seco} - \text{Peso final muestra}}{\text{Peso inicial muestra}} * 100$$

$$\% \text{ Pérdida de peso}_{\text{agua}} = \frac{0,060 - 0,085}{0,060} * 100 = 38,33$$

$$\% \text{ Pérdida de peso}_{\text{aire}} = \frac{0,091 - 0,085}{0,091} * 100 = 6,593$$

$$\% \text{ Pérdida de peso}_{\text{suelo}} = \frac{0,150 - 0,118}{0,150} * 100 = 21,667$$

4.2.4. Resultados de la caracterización del bioplástico

4.2.4.1. Espesor

Para este ensayo se utilizó un pie de rey con la resolución de 0,002cm, tomando 4 Bioplásticos de cada uno de los tratamientos con las medidas de 2,5 x 2,5 cm y con los resultados se obtuvo un promedio.

Tabla 18-4: Resultados del ensayo de espesor del Bioplástico

N°	Tratamiento	Variables	Repetición	Espesor (mm)	Promedio (mm)
1	T1	CDM1 CP1	R1	0,10	0,11
2			R2	0,11	
3			R3	0,11	
4			R4	0,12	
5	T2	CDM1 CP2	R1	0,10	0,10
6			R2	0,10	
7			R3	0,10	
8			R4	0,10	
9	T3	CDM2 CP1	R1	0,11	0,11
10			R2	0,12	
11			R3	0,10	

12			R4	0,11	
13	T4	CDM2 CP2	R1	0,11	0,11
14			R2	0,11	
15			R3	0,12	
16			R4	0,11	
CP (cantidad de plastificante) , CDM (cantidad de micelio), T					

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

La norma NTE INEN 2542 (2006, p.4) establece un valor máximo de 0,2 mm para las láminas delgadas plásticas, por lo tanto, el Bioplástico obtenido del micelio del hongo se detalla en la Tabla 34-3 evidenciando que los 4 tratamientos T1, T2, T3, T4 cumplen con el rango establecido en la norma.



Ilustración 2-4: Espesor del Bioplástico

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

4.2.4.2. Contenido de humedad

Tabla 19-4: Resultados del ensayo de humedad del Bioplástico

Nº	Tratamiento	Variables	Repetición	Peso Inicial	Peso Final	Humedad (%)	Humedad Promedio (%)
1	T1	CDM1	R1	0,58	0,45	22,41	21,29
2			R2	0,36	0,28	22,22	
3		CP1	R3	0,26	0,21	19,23	
4	T2	CDM1	R1	0,37	0,20	21,62	21,12
5			R2	0,40	0,30	20,00	
6		CP2	R3	0,46	0,36	21,74	
7	T3	CDM2	R1	0,33	0,26	21,21	21,29
8			R2	0,23	0,18	21,74	
9		CP1	R3	0,43	0,34	20,93	
10	T4	CDM2	R1	0,27	0,24	22,22	21,65
11			R2	0,22	0,17	22,72	
12		CP2	R3	0,30	0,24	20,00	

CP (cantidad de plastificante) , CDM (cantidad de micelio), T (tratamiento)

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

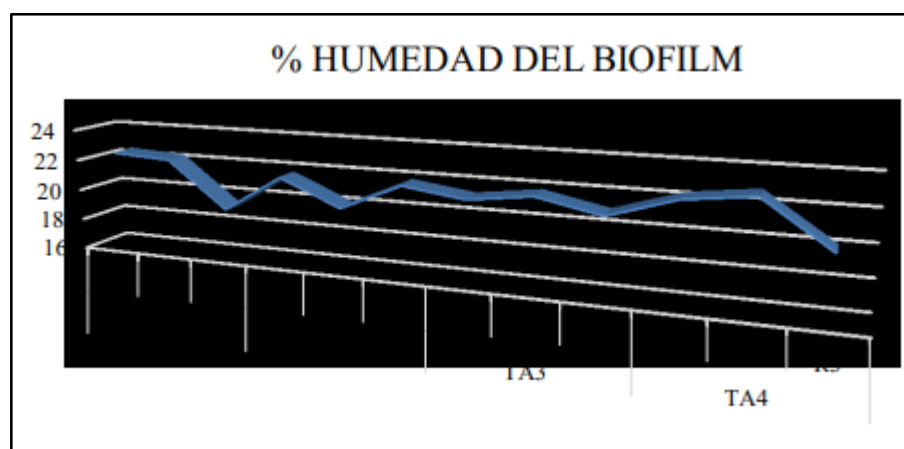


Ilustración 3-4: Análisis de la humedad de los Bioplástico

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

Según la investigación de Escobar, D. et al (2011, p.3) esta radica en eliminar toda el agua libre que se encuentra presente en el Bioplástico por volatilización, los rangos de humedad que debe ostentar los Bioplástico son entre 19,3 – 22,1 %, de tal manera los valores que se obtienen en los 4 tratamientos están dentro del rango de dicha investigación, como se detalla en la Tabla 19-4, el mayor porcentaje de humedad se encuentran en los tratamientos T1 (42,321%) y T4 (44,862%), es importante encontrarse dentro de los parámetros de la investigación para poder evitar el

crecimiento de organismos en el Bioplástico, las diferencias respecto a los valores se presentan por la relación de la materia prima con la que se elaboró.

4.2.4.3. Solubilidad del Bioplástico

Tabla 20-4: Resultados de análisis de Solubilidad en el Bioplástico

N°	Tratamiento	Variables	Repetición	Peso inicial seco (g)	Peso final seco (g)	Solubilidad (%)	Solubilidad promedio
1	TA1	CDM1 CP1	R1	0,300	0,180	40,000	42,321
2			R2	0,282	0,151	46,453	
3			R3	0,353	0,210	40,509	
4	TA2	CDM1 CP2	R1	0,202	0,122	39,603	41,084
5			R2	0,231	0,142	38,528	
6			R3	0,164	0,09	45,121	
7	TA3	CDM2 CP2	R1	0,217	0,118	45,622	44,862
8			R2	0,196	0,109	44,387	
9			R3	0,249	0,138	44,578	
10	TA4	CDM2 CP1	R1	0,028	0,018	37,931	40,341
11			R2	0,183	0,109	40,437	
12			R3	0,211	0,121	42,654	

CP (cantidad de plastificante), CDM (cantidad de micelio), T (tratamiento)

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

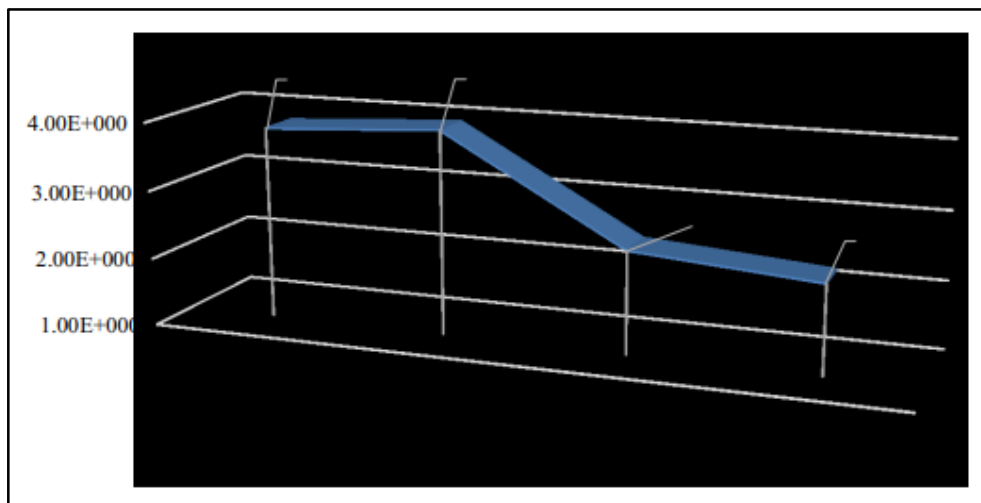


Ilustración 4-4: Análisis de solubilidad del Bioplástico

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

Según la investigación realizada por Chariguamán et al., (2015, p.17) los valores se encuentran en un rango de 39,88 – 54,76%, la solubilidad se asemeja como el % de materia seca del Bioplástico solubilizada después de 24 horas sumergida en agua, los porcentajes del Bioplástico del residuo del hongo se detallan en la tabla 20-4, el cual cumple con los valores establecidos con un valor de 44,862% y 42,321 %. Si se obtiene un Bioplástico con un porcentaje alto de solubilidad servirá

para aplicaciones de cubierta comestible o para recubrir pastillas lo cual es indispensable que se diluyan, en caso contrario que no se diluyan con facilidad es propicio para poder recubrir alimentos. Los valores con menor solubilidad son los tratamientos T2 Y T4 puestos que poseen una menor cantidad de plastificante de tal manera que contribuye a incrementar o reducir la solubilidad.

4.2.4.4. Permeabilidad del bioplástico

Para el cálculo de permeabilidad del Bioplástico se utilizaron los datos calculados previamente.

Tabla 21-4: Datos para calcular la permeabilidad del Bioplástico

N°	N°	Diámetro (mm)	Radio (mm)	Radio m	Área	Pi	P1	P2	P3	P4	P5	P6
TA1	R1	16,2	8,10	$8,10 \times 10^{-3}$	$2,06 \times 10^{-4}$	30,185	30,189	30,187	30,188	30,189	30,19	30,191
	R2	16,2	8,10	$8,10 \times 10^{-3}$	$2,06 \times 10^{-4}$	32,152	32,155	32,154	32,155	32,157	32,156	32,158
	R3	16,5	8,25	$8,25 \times 10^{-3}$	$2,14 \times 10^{-4}$	36,664	36,667	36,667	36,67	36,672	36,672	36,675
TA2	R1	16,1	8,05	$8,05 \times 10^{-3}$	$2,04 \times 10^{-4}$	30,791	30,794	30,792	30,793	30,795	30,795	30,797
	R2	16,3	8,15	$8,15 \times 10^{-3}$	$2,09 \times 10^{-4}$	29,958	29,961	29,962	29,964	29,967	29,97	29,974
	R3	16,7	8,35	$8,35 \times 10^{-3}$	$2,19 \times 10^{-4}$	30,781	30,782	30,784	30,784	30,785	30,785	30,786
TA3	R1	16,7	8,35	$8,35 \times 10^{-3}$	$2,19 \times 10^{-4}$	30,319	30,322	30,322	30,323	30,324	30,325	30,327
	R2	16,8	8,40	$8,40 \times 10^{-3}$	$2,22 \times 10^{-4}$	32,592	32,595	32,593	32,594	32,595	32,594	32,596
	R3	16,4	8,20	$8,20 \times 10^{-3}$	$2,11 \times 10^{-4}$	30,296	30,299	30,297	30,299	30,299	30,299	30,300
TA4	R1	16,4	8,20	$8,20 \times 10^{-3}$	$2,11 \times 10^{-4}$	29,002	29,004	29,002	29,004	29,004	29,005	29,006
	R2	16,9	8,45	$8,45 \times 10^{-3}$	$2,24 \times 10^{-4}$	30,401	30,404	30,405	30,405	30,405	30,406	30,407
	R3	16,8	8,40	$8,40 \times 10^{-3}$	$2,22 \times 10^{-4}$	29,005	29,006	29,006	29,007	29,007	29,008	29,008

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

Tabla 22-4: Resultados del ensayo de permeabilidad al vapor del agua para el Bioplástico.

N°	T1	T2	T3	T4
R1	0,00273	0,00325	0,00372	0,00194
R2	0,00709	0,00298	0,00201	0,00274
R3	0,00211	0,00525	0,00176	0,00221
PROMEDIO	0,00398	0,00383	0,00249	0,00229

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

De acuerdo con Charro (2015, p.7) el grado de permeabilidad de vapor de agua debe presentar valores menores puesto que interferirán en el proceso para la conservación de alimentos para esto se debe analizar los valores expuestos en la Tabla 22-4, T2 y T4 que son menores, ya que a mayor concentración de quitina aumentará la permeabilidad y por ende su higroscopicidad en los Bioplásticos laminados, puesto que la gran parte de los plastificantes que se utilizan para la fabricación de Bioplástico de almidón son de carácter hidrófilo, además presenta al producto final su peculiaridad elástica concediendo maleabilidad. Según la norma (ASTM 1653 – 93, 2008) la permeabilidad se entiende como la cantidad de vapor de agua que pasará por una unidad de superficie en un material con espesor conocida, la cual será inducida a una diferencia de presiones a través de dos superficies, con las respectivas condiciones de humedad relativa específica y de temperatura. A mayor cantidad del plastificante aumentará la permeabilidad por ende su higroscopicidad en los Bioplasticos laminados.

4.2.4.5. Ensayo de tracción

Tabla 23-4: Resultados del análisis de tracción

N°	Tratamiento	Carga Máxima (N)	Esfuerzo Máximo (Mpa)	Elongación (%)
1	T1	4,9	3,26	50
2	T2	3,9	2,6	70
3	T3	3,9	2,6	56,67
4	T4	2	1,33	50

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

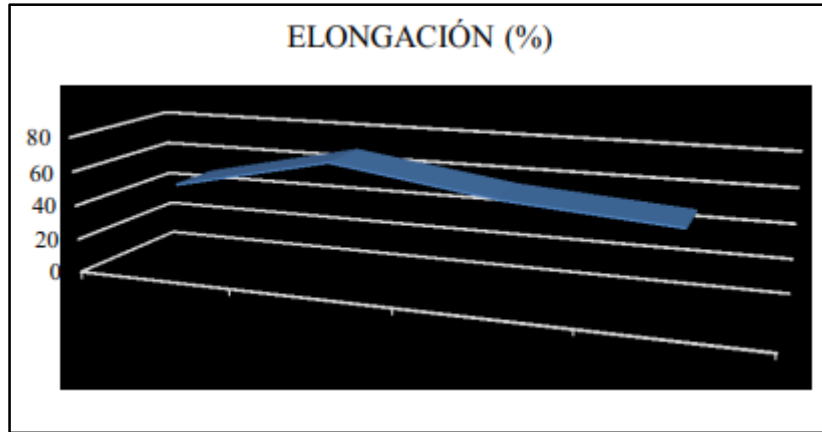


Ilustración 5-4: Análisis de elongación del Bioplástico

Realizado por: Naranjo, Leo, 2022.

Según la norma INEN NTE 2635 (2012, p.4) las propiedades de tracción de láminas plásticas delgadas, se utilizó probetas del Bioplástico del micelio del hongo de la cual se detalla en la tabla 23-4. Los resultados mostraron que se encuentran dentro del rango establecido como por ejemplo en el tratamiento T2 presenta una carga máxima de 3,9N, esfuerzo máximo de 2,6 MPa y un porcentaje de elongación de 70 %, cuyos valores según la investigación realizada por (Chariguamán, 2015, p.3) están dentro del rango ya que al aumentar las concentraciones de plastificante aumenta las variables de tracción.

CONCLUSIONES

- Se cultivó el micelio del hongo *Pleurotus ostreatus* mediante el residuo de cacao, como principal elemento para el crecimiento del mismo.
- Se extrajo el micelio del hongo (*Pleurotus ostreatus*) mediante el método húmedo con el diseño factorial 2k, con las variables de proceso: velocidad RPM A (20000), RPM B (6800) y el tiempo de trituración (30, 45 y 60 segundos). Obteniéndose que el mejor tratamiento es T3 con la velocidad RPM alta y 60 segundos con un rendimiento de 12,74%.
- Se caracterizó físico química y microbiológica el micelio del hongo *Pleurotus ostreatus*, mediante métodos de ensayos realizados en el laboratorio con resultados de humedad (12,91%), ceniza (0,11%), pH (5.06), temperatura de gelatinización (77°C), solubilidad (ligera Opalencia), viscosidad (849,08), grasa (0,351%), fibra (0,28%), proteína (0,436%), amilosa (21,81%), amilopectina (62,4%), coliformes fecales (Ausencia), levaduras y mohos (100 UFC/g) siendo valores aceptables para ser utilizado en la elaboración del Bioplástico.
- Se caracterizó el Bioplástico y se obtuvo mejores características en el T2 mediante los métodos de ensayo se obtuvieron resultados favorables para humedad de (21,12%), solubilidad (41,084%), obtuvo un espesor de (0,10 mm), para el ensayo de tracción se esfuerzo máximo (2,6 MPa) y por último la biodegradabilidad se realizó en tres medios: agua, aire y tierra durante 28 días, donde se obtuvo un porcentaje de degradación en agua del (83,206%), en aire del (35,897%) y en suelo del (91,463%).

RECOMENDACIONES

- Emplear diferentes tipos de residuos agroindustriales de la región interandina en esta investigación para así obtener mayor producción y rendimiento del micelio del hongo *Pleurotus ostreatus*.
- Aprovechar el residuo del micelio del hongo para la elaboración de abono orgánico o como complemento de balanceados para especies menores.
- Socializar la información encontrada en la investigación con empresas dedicadas a la actividad agrícola para impulsar el aprovechamiento del trigo en la producción del hongo *Pleurotus ostreatus* para obtener beneficios económicos, sociales y ambientales.
- Poseer moldes que faciliten que se elabore el Bioplástico de manera adecuada para que se evite desperdicios y pérdida de materia prima: micelio del hongo, plastificante y conservante.
- Valorar la biodegradabilidad del Bioplástico en un suelo que tenga una mayor textura

BIBLIOGRAFÍA

FEIJÓO VIVAS, K. et al., “Fungal mycelium-bioproducts development: A new material culture and its impact on the transition to a sustainable economy” [en línea], 2021, *Revista Bionatura*, 6(1), pp. 1637–1652. [Consulta: 15 enero 2023]. ISSN 1390-9355. Disponible en: 10.21931/RB/2021.06.01.29.

HERNANDEZ, R. & LÓPEZ, C. “Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del Departamento de Cundinamarca Ricardo”. *Revista Interés Bio*, vol.15, n°4 (2004), (Ecuador) p. 6.

HOLGADO ROJAS, M.E. et al. “Cultivo de *Pleurotus* sp. y *Lentinula edodes* bajo condiciones artesanales en comunidades campesinas de la Región Cusco / Perú”. *Ecología Aplicada* [en línea], 2019, 18(2), pp. 1-25. [consulta: 15 enero 2023]. ISSN 1726-2216. Disponible en: 10.21704/rea.v18i2.1331.

INSTITUTO, I. & INVESTIGACIÓN, N., “Encuentro latinoamericano y del caribe de biotecnología agropecuaria y xi simposio redbio Argentina”. *Libro de Resúmenes*, vol 6, n°2 (2019), p8.

LINDAO PÉREZ, J.D. “Producción y análisis bromatológico del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*), cultivado con sustratos de cáscara de cacao, plátano, coco y raquis de palma africana.” *Revista Universidad Técnica Estatal de Quevedo*, vol. 2, n°1 (2016), pp. 1–79.

MAGAE, Y. & MAGAE, J., “Effect of staurosporine on growth and hyphal morphology of *Pleurotus ostreatus*. *Journal of General Microbiology*” *Scielo*, [en línea], 2019, 139(1), pp. 161–164. [Consulta: 15 enero 2023] ISSN 00221287. Disponible: 10.1099/00221287-139-1-161.

MISHEL, A.S.S. “Producción y caracterización de un biopolímero obtenido a partir de residuos agroindustriales del cacao (CCN-51)”. *Scielo*, n78, n°2 (2019) pp:2-19.

OKYERE, E. “Evaluación del crecimiento micelial de cepas nativas de *Agrocybe cylindracea* (DC.:Fr) Maire, en diferentes medios de cultivo y pH”. *Scielo*, vol. 6, n°1 (2011), p. 53.

PEREZ, B., “Descripción de las características macroscópicas, de cultivo in vitro DE CEPAS DE Pleurotus AISLADAS EN GUATEMALA. 2006”. *Revista ESPOCH*, vol.6, n°1 (2006), p.67.

RAMÓN, P. & RAMÓN, D., “Análisis de la capacidad degradativa de residuos lignocelulósicos utilizando el hongo Pleurotus ostreatus var. Florida, 2012” *Scopus*, vol.3, n°3 (2012), pp. 122.

ROSA, D.C. et al., “Conversión de residuales agroindustriales en productos de valor agregado por fermentación en estado sólido”. *Tecnología Química*, vol. 34, no. 3 (2014), pp. 263–274.

SÁNCHEZ, C. “Cultivation of Pleurotus ostreatus and other edible mushrooms. Applied Microbiology and Biotechnology”. *Scielo*, vol. 85, no. 5 (2010), pp. 1321–1337.

TANIGUCHI, M. et al. “Evaluation of pretreatment with Pleurotus ostreatus for enzymatic hydrolysis of rice straw. Journal of Bioscience and Bioengineering”, *Scielo* [en línea], 2005, 20(5), pp. 637–643. [Consulta: 15 enero 2023]. ISSN 13891723. Disponible: 10.1263/jbb.100.637.



0788-DBRA-UPT-2023



epoch

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 24 / 05 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Leo Anderson Naranjo Calvopiña
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Facultad de Ciencias.
Carrera: Ingeniería en Biotecnología Ambiental.
Título a optar: Ingeniero en Biotecnología Ambiental.
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Rafael Inty Salto Hidalgo



0788-DBRA-UPT-2023