



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y
MATERIALES

**DESARROLLO DE UN NUEVO BIOMATERIAL COMPUESTO BASADO EN
MICELIO DE HONGO FILAMENTOSO PARA IMPRESIÓN 3D**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

LULU ROBESON BAHAMONDE

PROFESOR GUÍA:
HUMBERTO PALZA CORDERO

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
FRANCK JEAN CHRISTOPHE QUERO
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

SANTIAGO DE CHILE
2023

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL
EN BIOTECNOLOGÍA
POR: LULU ROBESON BAHAMONDE
FECHA: 2023
PROF. GUÍA: HUMBERTO PALZA CORDERO

DESARROLLO DE UN NUEVO BIOMATERIAL COMPUESTO BASADO EN MICELIO DE HONGO FILAMENTOSO PARA IMPRESIÓN 3D

La construcción es de las principales industrias contribuyentes a la contaminación ambiental debido a su importante huella de carbono. A raíz de esto, surge la necesidad de buscar formas de mitigar el impacto negativo asociado a esta actividad económica. Una solución es el uso de materiales que provengan de fuentes naturales, presentándose como una alternativa a los materiales convencionales, dado su gran consumo energético y de recursos naturales que son cada vez más escasos. Los compósitos de micelio (MBC) son un ejemplo de estas nuevas opciones, sin embargo, sus aplicaciones se ven limitadas por el método de fabricación común de amoldado.

El objetivo general del trabajo de investigación es el desarrollo de un biomaterial compuesto de micelio que permita la fabricación de estructuras mediante impresión 3D. A su vez, se busca revalorizar un desecho orgánico rico en lignocelulosa como fuente de Carbono que sustente el cultivo en estado sólido del hongo *Ganoderma lucidum*. La optimización de la formulación de la tinta se lleva a cabo mediante el estudio de su reología y ajuste de su viscosidad. Para ello, se evalúa el comportamiento de la tinta tras la adición de quitosano o alginato como aglomerantes. Se prueban concentraciones del 2 %p/p y 3 %p/p de quitosano y cuatro concentraciones distintas para alginato: 4 %p/p, 10 %p/p, 12 %p/p y 14 %p/p. Además, se realizan pruebas de extrusión para los sustratos aserrín de roble y coronta de maíz.

Finalmente, se escoge imprimir un prototipo con una biotinta compuesta por alginato al 14 %p/p y coronta de maíz inoculada. Se incubó la estructura durante tres semanas en un rango de temperatura de 25°C-30°C, obteniendo una colonización superficial del micelio sobre el sustrato. A partir de la impresión se construyeron probetas para realizar ensayos de tracción-deformación y compresión. Las propiedades mecánicas del biomaterial aumentaron significativamente en comparación al hidrogel con el sustrato puro, mejorando su módulo de elasticidad sobre un 100 % y el de compresión en aproximadamente un 45 %. Con esto, se puede concluir que se logró avanzar en la fabricación de biocompósitos de micelio por impresión 3D.

A la Mona,

Agradecimientos

Gracias a mi familia. A mi mamá y papá por apoyarme, admirarme e impulsarme. Por entregarme todo lo que han tenido a su alcance para verme feliz. A mi abuelo por su inteligencia desafiante. A la Mona, porque con su suavidad y distinción fue el perfecto ejemplo de que las mujeres tenemos nuestro lugar en la ciencia. A mis hermanas, sobrin@s y cuñados por darme aire limpio cuando lo necesité. A mi tío por su bondad y disposición a ayudar, a mi tía por su cariño. A mi compañero, amigo y pareja, por darme la mano en este arduo camino, por celebrar cada uno de mis logros y sacar lo mejor de mí. Por su comprensión. A mis grandes amigos, que la vida los hizo mis hermanos. Sin ustedes nada sería igual. A amigos y amigas, ahora oficialmente colegas, que llenaron de buenos momentos estos años y los hicieron más amenos. A Owen por acompañarme en mis noches en vela.

Al profesor Humberto, por confiar en mi idea y apoyar la iniciativa. A todas las personas que me entregó el Laboratorio de Ingeniería de Polímeros, que nunca dudaron en ayudarme ni dejaron de alentarme.

Con esto concluye un reto que alguna vez quise enfrentar y prometí superar. Así que gracias a tod@s por creer en mi, más de lo que yo lo hago. O más bien, hacía.

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. Antecedentes Generales	1
1.1.1. La industria de la construcción y su impacto	1
1.1.2. Hongos en la industria y en la biotecnología	2
1.1.3. Revalorización de residuos	2
1.2. Motivación	3
2. Marco Teórico	4
2.1. Reino Fungi	4
2.1.1. Basidiomicetos	4
2.1.2. Hongos filamentosos	6
2.1.3. Hongos de pudrición	7
2.1.4. <i>Ganoderma lucidum</i>	7
2.1.4.1. Crecimiento y cultivo	8
2.1.4.2. Factores nutricionales y ambientales de cultivo	10
3. Estado del Arte	12
3.1. Impresión 3D	12
3.1.1. Biotintas para impresión 3D	13
3.2. Impresión 3D con lignocelulosa	15
3.3. Impresión 3D con materiales celulósicos	16
3.4. Impresión 3D de hidrogeles de alginato y celulosa	17
3.5. Biocompuestos de micelio (MBC)	18
3.5.1. Propiedades mecánicas	19
3.5.2. Propiedades aislantes	20
3.6. MBC para impresión 3D	22
3.6.1. Propiedades mecánicas	24
4. Objetivos	26
4.1. Objetivo General	26
4.2. Objetivos Específicos	26
5. Metodología	27
5.1. Materiales	27
5.2. Fabricación del ladrillo	27
5.3. Formulación de la tinta	27
5.3.1. Reología de la tinta	27
5.3.2. Extruíbilidad de los sustratos	28

5.4. Preparación de la biotinta	28
5.5. Impresión del prototipo	28
5.6. Incubación	29
5.7. Secado	29
5.8. Propiedades Mecánicas	29
6. Resultados y Discusiones	30
6.1. Formulación de la tinta	32
6.1.1. Reología de la tinta	32
6.1.2. Extruíbilidad de los sustratos	35
6.2. Preparación de la biotinta	37
6.3. Impresión del prototipo	39
6.4. Propiedades mecánicas	44
7. Conclusiones y Proyecciones	49
8. Nomenclatura	50
Bibliografía	51
Anexos	59
A. Cálculos realizados	59
A.1. Cálculo de la concentración de esporas con Cámara de Neubauer	59

Índice de Tablas

2.1.	Tabla comparativa de fuerza tensora para materiales naturales y sintéticos [36].	7
3.1.	Tabla comparativa de la densidad y rigidez de MBCs fabricados a partir de distintos sustratos [7].	20
6.1.	Resumen de la composición de las tintas preparadas para las pruebas de extruibilidad del sustrato.	35
6.2.	Resumen de la composición de las biotintas formuladas.	39
6.3.	Parámetros utilizados para la impresión en Bioplotter 3D con las tintas de proporciones en peso 60:40 y 70:30.	41
6.4.	Resumen de los resultados de ensayos de tracción-deformación.	47
6.5.	Resumen de los resultados de ensayos de compresión.	47

Índice de Ilustraciones

2.1.	Estructura del esporocarpio (basidiocarpio) de un basidiomiceto y sus partes [26].	5
2.2.	Reproducción sexual de un hongo basidiomiceto. Adaptado de [30].	6
2.3.	Esporocarpio de <i>Ganoderma lucidum</i> [42].	8
2.4.	Estructura química de la celulosa, hemicelulosa y lignina, componentes de la lignocelulosa [43].	8
2.5.	Curvas de la formación de biomasa de <i>Ganoderma lucidum</i> en medio líquido en función del tiempo de cultivo [48].	10
2.6.	Factores que afectan a la fabricación y el uso de compuestos a base de micelio. Adaptado de [52].	11
3.1.	Producción científica anual en la investigación de construcción impresa en 3D entre 1998 y 2019 [58].	13
3.2.	Tipos de bioimpresión 3D [61]	14
3.3.	Ilustración de una biotinta a base de alginato. Compuesta por el hidrogel de alginato, células, otros polímeros y péptidos funcionales. Adaptado de [62]. . .	14
3.4.	Peso molecular medio en número y peso (izquierda) e índices de polidispersidad (derecha) de las soluciones de alginato después de la esterilización [65].	15
3.5.	Viscosidades dinámicas de los tres grupos de solución de alginato esterilizada y uno de control a una velocidad de cizallamiento de 0.1 s^{-1} [65].	15
3.6.	Diagrama con distribución de las áreas con publicaciones de artículos científicos sobre materiales compuestos en base a micelio [76].	18
3.7.	Diagrama de flujo del proceso de fabricación de compósitos de micelio. Adaptado de [7].	19
3.8.	Comparación de los materiales en términos del costo y rigidez. Módulo de Young (elasticidad) en función del costo de producción de los compósitos de micelio y otros materiales comunes [6].	20
3.9.	Comparación de las propiedades aislantes térmicas y acústicas de los MBC y otro materiales comercializados . (a) Absorción de sonido por MBC formados por un sustrato puro (en color naranja) en contraste con materiales de referencia (en gris) [51]. (b) Conductividad térmica y densidad de MBC usando distintos sustratos (cuadrados blancos) versus aislantes comerciales (cuadrados negros) [6].	21
3.10.	Aumento de la propiedad de aislantes térmicos de MBC con sustrato formado 50:50 con un relleno (en los ejes se tienen las composiciones). Se representa la disminución del ruido percibido, resaltando en azul sus valores más bajos [51].	22
3.11.	Muestras de extrusión de pastas de fibra de bambú y quitosano. Imágenes muestran la concentración de quitosano y la relación quitosano/fibras de bambú [6].	23

3.12.	Muestra de extruibilidad previo a la colonización de material compuesto por sustrato comercial y diferentes proporciones de <i>psyllium husk</i> . (a) $p/v=1:40$, (b) $p/v=2:40$ y (c) $p/v=3:40$. [79].	23
3.13.	Propiedades mecánicas de los materiales compuestos de fibra de bambú y micelio [6].	24
3.14.	Rigidez en función de la densidad para distintos materiales de micelio. A la derecha se tiene las fibras de bamboo sólo con micelio (círculo) y la versión extruible (cuadrado) [6].	25
6.1.	Imágenes de ladrillos de micelio con 4 semanas de incubación y tras un proceso de secado. (a) Ladrillo de referencia. Fabricado con aserrín de roble y micelio de <i>Ganoderma lucidum</i> . (b) Intento 1: Ladrillo de elaboración propia con grano de centeno y micelio de <i>Ganoderma lucidum</i> . (c) Intento 2: Ladrillo de elaboración propia con aserrín de roble y micelio de <i>Ganoderma lucidum</i> . Elaboración propia.	31
6.2.	Imágenes de pruebas de extrusión manual para tintas de quitosano y aserrín. (a) Muestra de extrusión de la pasta hecha con quitosano al 2 %p/p. 30 % de sustrato (2g aserrín peso húmedo) y 70 % de quitosano. (b) Muestra de extrusión de la pasta hecha con quitosano al 3 %p/p. 30 % de sustrato (2g aserrín peso húmedo) y 70 % de quitosano. Elaboración propia.	33
6.3.	Imágenes de pruebas de extrusión manual para soluciones de alginato al 4 %p/p. (a) Muestra entrecruzada y en reposo. (b) Muestra entrecruzada con inclinación. Elaboración propia.	34
6.4.	Imágenes de pruebas de extrusión manual para soluciones de alginato a distintas concentraciones. Al momento de la extrusión (a)-(c). (a) 10 % p/p, (b) 12 % p/p y (c) 14 % p/p. Luego de entrecruzados con cloruro de calcio (d)-(f). (d) 10 % p/p, (e) 12 % p/p y (f) 14 % p/p. Elaboración propia.	34
6.5.	Imágenes de pruebas de extrusión manual para tintas formuladas con distintas proporciones de los sustrato y alginato. (a) 50 % aserrín y 50 % alginato, (b) 60 % aserrín y 40 % alginato, (c) 70 % aserrín y 30 % alginato, (d) 50 % coronta y 50 % alginato, (e) 60 % coronta y 40 % alginato, (f) 70 % coronta y 30 % alginato. Elaboración propia.	36
6.6.	Imágenes de los filamentos tras 5 minutos de ser extruídos. (a) 50 % aserrín y 50 % alginato, (b) 60 % aserrín y 40 % alginato, (c) 70 % aserrín y 30 % alginato, (d) 50 % coronta y 50 % alginato, (e) 60 % coronta y 40 % alginato, (f) 70 % coronta y 30 % alginato. Elaboración propia.	36
6.7.	Muestra de las tintas preparadas con alginato al 14 % p/p y aserrín en proporciones 50:50, 60:40 y 70:30 (desde arriba hacia abajo) una hora después de la extrusión. Elaboración propia.	37
6.8.	Imagen del sustrato (coronta de maíz) después de dos días de incubación. Elaboración propia.	39
6.9.	Fotos de la estructura instalada sobre la impresora 3D para resguardar la esterilidad del lugar. (a) Sin estructura (b) Con estructura. Elaboración propia. . .	40
6.10.	Muestra de los prototipos impresos con tintas en base a coronta de maíz y alginato al 14 % p/p, después de 3 semanas de incubación. Se observa el micelio en blanco. (a) Tinta con proporción 60:40 (sustrato:alginato). (b) Tinta con proporción 70:30 (sustrato:alginato). Elaboración propia.	42

6.11.	Imágenes en detalle de secciones del prototipo para mostrar la penetración del micelio (superficie blanca) en el sustrato. (a) Sección transversal 1. (b) Sección transversal 2. (c) Sección transversal 3. Elaboración propia.	43
6.12.	Diagrama de bloques del proceso de fabricación del biomaterial con impresión 3D. Elaboración propia.	44
6.13.	Curvas de los ensayos de tracción-deformación para el biomaterial compuesto por coronta de maíz. (a) antes de la colonización (sin micelio) y (b) después de la colonización (con micelio). Elaboración propia.	45
6.14.	Resultados ensayos de tracción-deformación para prototipos impresos en 3D colonizados (con micelio) comparados con impresión de sustrato/aglomerante puro (sin micelio). (a) Módulo de Young. (b) Carga máxima. Elaboración propia.	45
6.15.	Curvas de los ensayos de compresión para el biomaterial compuesto por coronta de maíz y alginato. (a) antes de la colonización (sin micelio) y (b) después de la colonización (con micelio). Elaboración propia.	46
6.16.	Resultados ensayo de compresión para prototipos impresos en 3D colonizados por micelio comparados con impresión de sustrato/aglomerante puro (sin micelio). Elaboración propia.	46
A.1.	Cámara de recuento Neubauer [92].	60

Capítulo 1

Introducción

1.1. Antecedentes Generales

1.1.1. La industria de la construcción y su impacto

La industria de la construcción en conjunto con las demás asociadas a esta actividad presentan una alta huella de carbono, siendo la manufactura de los materiales necesarios la responsable de al menos el 45 % de la emisión de CO₂, no solo por ser altamente contaminantes, sino que también por agotar una importante cantidad de recursos naturales y energéticos. Más aún, se estima que la fabricación de estos materiales, junto con el transporte y uso de maquinarias es responsable de alrededor del 40 % del agotamiento de la energía a nivel mundial [1]. Además, el sector consume cerca de 3.000 millones de ton de materias primas al año [2] destinadas a la elaboración de productos de construcción y materiales, generando en consecuencia el 50 % de los residuos mundiales totales [3]. A su vez, los materiales utilizados comúnmente provienen de fuentes no renovables cada vez más escasos como áridos, arcilla, piedra caliza, espuma de poliestireno y minerales metálicos (hierro, cobre y zinc) [4]. Más aún, su extracción y producción requiere de combustibles fósiles, por ejemplo, el petróleo, indicando otro problema en términos de sustentabilidad [3].

Dado el progresivo crecimiento demográfico, se espera que la industria de la construcción crezca en conjunto con la población mundial, de manera de suplir la demanda habitacional y urbanizar espacios. De hecho, para 2030 se estima que entre un 30 % y 40 % de las emisiones totales de gases de efecto invernadero, estén asociadas al sector de la construcción y a sus industrias asociadas. [1]. A raíz de lo expuesto, surge la necesidad de encontrar soluciones que permitan mitigar el impacto ambiental que implican el aumento de habitantes y sus actividades inherentes.

Una alternativa es la búsqueda de nuevos materiales provenientes de fuentes naturales, con procesos de producción que involucren un menor consumo de energía y sean más económicos. Dentro de la gama de opciones novedosas y con menor impacto ambiental, están los biocompuestos. Los compósitos de micelio (MBC por su nombre en inglés, *mycelium-bound composites*) son constituidos únicamente por micelio de hongo filamentoso y un sustrato de lignocelulosa. El micelio corresponde a la parte vegetativa del hongo, específicamente a las hifas que crecen formando entramado [5–8].

1.1.2. Hongos en la industria y en la biotecnología

Los hongos han jugado un rol importante en la alimentación de la humanidad desde hace cientos de años. Un claro ejemplo son las levaduras, utilizadas para la producción de pan, quesos, bebestibles alcohólicos como cerveza y vino, como también bebidas no alcohólicas, soja, entre otros fermentados [9, 10]. Dentro de esta industria, actualmente se emplean hongos como bioproductores de ingredientes de gran interés en la producción de alimentos, enzimas como amilasas, celulasas y lipasas [9]. Más aún, *Quorn* ha desarrollado alternativas a la proteína animal obtenida por fermentación de un hongo filamentoso, conocidas como micoproteínas [11].

No obstante, la participación del reino Fungi en la vida humana, no se limita a nuestra alimentación. En Oriente, a los hongos se les han atribuido propiedades medicinales desde la antigüedad. Hoy en día, han captado la atención del resto del mundo, evidenciándose un creciente enfoque en reconocer y caracterizar sus compuestos bioactivos. Entre las especies estudiadas por sus propiedades son *Ganoderma lucidum*, *Hericiium erinaceus*, *Coriolus versicolor* y *Lentinula edodes* [12]. Además, a través de los hongos se han logrado producir compuestos de gran relevancia para la humanidad como antibióticos [9] y, recientemente, asparaginasas, medicamento utilizado para tratar la leucemia [13].

Luego, la producción de nuevos materiales en base a hongos no sería una primera integración de estos organismos a la industria. Actualmente, están adentrándose en otras industrias como la de la moda, diseño y construcción. Es aquí donde se presenta como una alternativa para la producción de nuevos materiales biodegradables y sustentables. *MycoWorks* responde a la necesidad de reducir el impacto asociado a la industria de la moda con un cuero alternativo, Reishi TM. Mientras el cuero animal es responsable de altas emisiones de carbono y contaminación tanto de suelo como de aguas, las alternativas sintéticas provienen de recursos fósiles y contaminan al finalizar su vida útil [14]. Sin embargo, la huella de carbono asociada a este producto es alrededor de un 90 % menor que para el cuero bovino [15].

En enfoques arquitectónicos, *Ecovative* comenzó con el desarrollo de compósitos de micelio utilizando sustratos ricos en lignocelulosa en la fabricación de ladrillos para construcción y como sustituto ante el uso de poliestireno expandido en empaques. Actualmente, concentra el 45 % de las patentes relacionadas a biomateriales de fuentes fúngicas [5]. También, se presenta como una herramienta ambiental en proceso de biorremediación de aguas y suelos [16].

Dicho lo anterior, el Reino Fungi presenta un gran potencial para solucionar problemáticas a las que se enfrenta la humanidad, dada su amplia variedad de organismos, versatilidad para crecer tanto en medios sólidos como líquidos, sumado a su resiliencia y adaptabilidad.

1.1.3. Revalorización de residuos

Los hongos son una buena opción para revalorizar residuos agroindustriales, aprovechando sus descartes ricos en lignocelulosa como sustratos para la obtención de productos de gran valor agregado. Con ello, es posible abordar la problemática con una solución desde una perspectiva de economía circular.

La industria agrícola produce alrededor de 140.000 millones de ton anuales de biomasa

descartada como residuo. El mayor de sus componentes es la lignocelulosa, convirtiéndola en la materia prima orgánica más abundante en el mundo [17, 18]. Dentro de los subproductos de la agroindustria está la coronta de maíz con una disponibilidad mundial de 144 millones de ton por año tras el procesamiento del maíz [19]. Corresponde a una fuente rica en lignocelulosa, compuesta por un 45 % de celulosa, 35 % de hemicelulosa y 15 % de lignina [18]. En Chile, el maíz se corresponde a uno de los principales cultivos, con una producción que entre 2017 y 2018 superó el billón de ton [20]. Se estima que a partir de cada 100 kg de grano de maíz, se generan 18 kg de coronta [17], traduciéndose en una disponibilidad local de aproximadamente 200 millones de ton del residuo.

1.2. Motivación

Dicho todo lo anterior, los MBC son una propuesta prometedora para la industria de la construcción, arquitectura y diseño. No obstante, las principales aplicaciones de este material están hasta ahora limitadas por su método de fabricación más común, el amoldado, permitiendo construir ladrillos, paneles o estructuras definidas por el molde en sí. De esta manera, resulta importante lograr desarrollar otra metodología para su fabricación, ampliando su diseño y utilidad. Así, surge la motivación de desarrollar un nuevo material basado en micelio del hongo filamentoso *Ganoderma lucidum*, encontrando una formulación que permita ser utilizado en procesos de manufactura aditiva por extrusión (impresión 3D).

En este contexto, la impresión 3D permite la fabricación de estructuras y diseños de alta complejidad a partir de sinfín de materias primas. Luego, se presenta como un método de construcción para la industria con un bajo costo y consumo energético [6, 21], alineándose con el enfoque sustentable del proyecto.

En base a lo expuesto, se propone un proceso de obtención de compósitos de micelio por impresión en 3D que se resumen en lo mostrado por la Ecuación 1.1, como una analogía a la respiración celular que realizan los organismos aeróbicos.



Capítulo 2

Marco Teórico

2.1. Reino Fungi

El reino Fungi está conformado por organismos Eucariontes¹ y heterótrofos², es decir, que deben obtener su energía a partir de fuentes orgánicas de carbono. En consecuencia, cumplen con un importante rol en la biogeoquímica³, dado que descomponen la materia muerta en nutrientes necesarios para otros organismos [22]. En particular, reciclan el carbono y movilizan el nitrógeno, fósforo y otros elementos indispensables para la vida de las plantas y animales [23]. Sin embargo, mucho tiempo se asoció a los hongos principalmente con agentes patógenos, dejando de lado su aporte a la ecología y naturaleza.

Debido a la complejidad del reino, ha sido difícil lograr clasificarlos, por su amplia variabilidad genética y morfológica. Dicha característica se refleja en la existencia desde organismos simples, como levaduras unicelulares, hasta otros multicelulares y complejos, como los filamentosos. A pesar de que aún existen especies que no han sido clasificadas ni identificadas, se estima que existen alrededor de 2.2 y 3.8 millones de especies en todo el mundo [24]. A su vez, según la taxonomía más actualizada, el reino Fungi está dividido en 9 filos⁴: *Opisthospordia*, *Chytridiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Blastocladiomycota*, *Zoopagomycota*, *Mucoromycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* and *Basidiomycota* [23].

2.1.1. Basidiomicetos

La actual sección se centra en los organismos *Basidiomicetos* por concentrar la mayor cantidad de hongos filamentosos existentes, en particular, el hongo *Ganoderma lucidum* utilizado para la fabricación de MBC. Este filo es responsable de la degradación de materia, promover el crecimiento de plantas, hasta infecciones de cultivos agrícolas y patógenos humanos como levaduras [25]. Su clasificación se basa en la capacidad de formar basidios, estructuras encargadas de producir cuatro esporas⁵ exógenas⁶, denominadas basidioesporas (ver Figura 2.1).

¹ Dominio de organismos cuyas células poseen un núcleo.

² Organismo que no es capaz de producir su propio alimento, sino que se nutre desde otras fuentes orgánicas de carbono.

³ Estudia la interacción entre los compuestos geoquímicos y los organismos vivos.

⁴ Categoría taxonómica que está entre el reino y la clase.

⁵ Células reproductivas que producen ciertos hongos, plantas o algas.

⁶ Son las que se forman en el exterior de una célula o aparato especializado.

Si bien todas sus especies tiene hifas septadas⁷ además de generan basidios en las células terminales de ellas, sólo algunas generan cuerpos fructíferos macroscópicos (esporocárpos), comúnmente conocidos como champiñones. En la Figura 2.1 también se puede apreciar un basidiocarpo con su píleo (sombrero) y estipe (tallo).

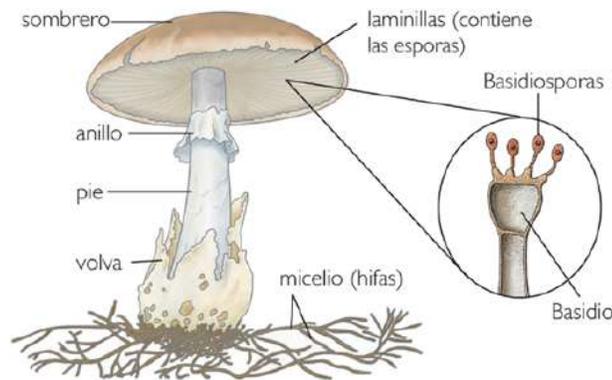


Figura 2.1: Estructura del esporocarpio (basidiocarpo) de un basidiomiceto y sus partes [26].

A diferencia de otros hongos, la reproducción de *Basidiomicetos* es sexual y no asexual [27]. Dicho proceso tiene dos formas, llamadas homotálico y heterotálico. La primera se refiere a la capacidad de reproducirse por sí mismo, fusionando hifas de un mismo micelio y autoreplicándose. En cambio, en el heterotalismo las hifas no son genéticamente compatibles, por lo que la reproducción requiere de la fusión de dos hifas distintas. El ciclo de vida representado en la Figura 2.2 se divide en cuatro etapas principales que favorecen la aparición del micelio: plasmogamia, cariogamia, meiosis y la germinación de esporas.

La formación del micelio comienza con la germinación de las esporas sexuales que se alargan y extienden originando hifas primarias que continúan dividiéndose y ramificándose hasta convertirse en micelio. La reproducción sexual tiene inicio cuando dos hifas haploides (n) compatibles y de distintos micelio, unen sus citoplasmas, pero manteniendo sus núcleos separados y formando un micelio diploide ($2n$), proceso conocido como plasmogamia. En los basidios de estas hifas, se fusionan los núcleos (cariogamia) de dos células, formando un cigoto diploide ($2n$). Luego de experimentar meiosis (I y II), se obtienen cuatro células haploides que se diferencian en basidiosporas que luego germinarán, siguiendo con el ciclo de vida. Según sea el caso, se pueden formar basidiocarpos a partir del desarrollo del micelio, dando pie a la aparición de nuevos basidios [25, 27–29].

⁷ Poseen paredes internas que dividen las hifas en células. Cuando no tienen septos son denominadas cenóticas.

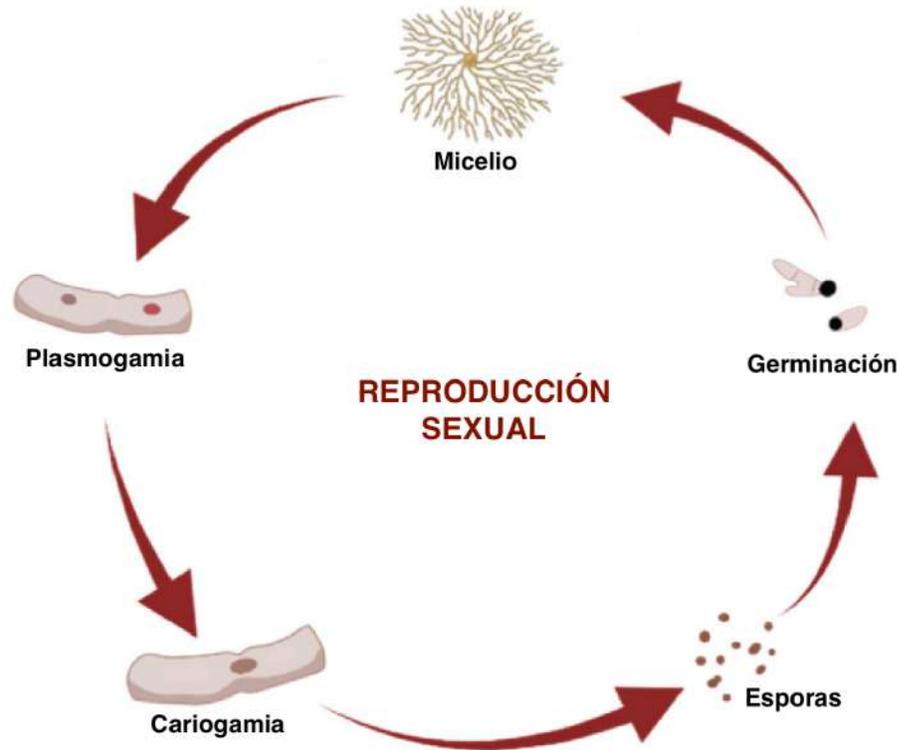


Figura 2.2: Reproducción sexual de un hongo basidiomiceto. Adaptado de [30].

2.1.2. Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son organismos multicelulares, por lo general saprófitos, es decir, obtienen su energía y nutrientes a través de la descomposición de la materia orgánica, ya sea de tejido animal o de plantas [31]. Sin embargo, también existen del tipo parasitarios y simbióticos. El nombre *filamentoso* proviene de su estructura formada por hebras, llamadas hifas, que crecen como un entramado y conforman la parte vegetativa del hongo. La red de hifas, conocida como micelio, penetra el sustrato para degradar los carbohidratos mediante la liberación de enzimas hidrolíticas desde los extremos de sus ramificaciones y, en consecuencia, actúa naturalmente como aglutinante [5–8].

La pared celular es una estructura crucial para mantener la integridad de la célula, protegiéndola ante estrés mecánico. En el caso de los hongos filamentosos, está formada principalmente por proteínas y polisacáridos que juntos constituyen glicoproteínas que le otorgan rigidez. Sus componentes más abundantes son los glucanos (50 %-60 %) del peso seco de la pared, particular el β -1,3-D glucano. A este polímero se le unen otros como la quitina que alcanza entre un 10 % y 20 % del peso seco de la estructura. Además, se encuentran proteínas glicosiladas (20 %-30 %), quitosano, melanina y lípidos en menor proporción [32, 33].

Dado que la quitina es un polímero inelástico y con módulo de Young comparable con otras fibras (Tabla 2.1), la presencia de este polisacárido en el micelio de los hongos filamentosos los posiciona como fuentes llamativas para la producción de biomateriales que aprovechen su propiedad de entramado. Si bien cualquiera de estos hongos cumplen con el requerimiento

de crecer formando una red para fabricar un biomaterial, existen especies que presentan mejores resultados como lo hace *Ganoderma lucidum*, sobresaliente por generar micelios con entramados más densos y, por ende, materiales más resistentes [7, 8, 34, 35].

Tabla 2.1: Tabla comparativa de fuerza tensora para materiales naturales y sintéticos [36].

Material	Tipo	Resistencia mecánica (MPa)
Quitina	Natural (Polisacárido)	4000
Fibras de boro	Sintético (Fibra sintética)	3400
Acero	Sintético (Aleación metálica)	2800
Fibras de carbono	Sintético (Fibra sintética)	1900-2600
Fibra de vidrio	Sintético (Fibra sintética) (Polisacárido)	1500-2000
Celulosa	Natural (Polisacárido)	900
Colágeno	Natural (Proteína)	100

2.1.3. Hongos de pudrición

Los hongos de pudrición son organismos filamentosos degradadores y descomponedores de madera, cruciales para el ciclo de los nutrientes. Son seres vivos capaces de transformar la lignocelulosa a su conformación más simple por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Dicha clasificación agrupa a los hongos que se alimentan de distintas formas de maderas y se basa en el tipo de pudrición que producen [37]. Los hongos de pudrición blanca y parda corresponden a organismos *Basidiomicotas*, mientras que los de pudrición blanda pertenecen al filo *Ascomicota* [38].

- Pudrición blanca: Pueden degradar lignina, celulosa y hemicelulosa, mediante la liberación de enzimas extracelulares, como lacasas y celulasas. Producto de su metabolismo se obtienen maderas de aspecto blanqueado y fibroso [37–39].
- Pudrición parda: No son capaces de degradar la lignocelulosa, sino que la modifican químicamente y atacan la holocelulosa⁸. Generan maderas marrones y sin resistencia que se disgregan fácilmente [38, 39].
- Pudrición blanda: Degradan celulosa o hemicelulosa en maderas con alto contenido de humedad, pero no saturadas. Su colonización superficial produce maderas blandas [38].

2.1.4. *Ganoderma lucidum*

Dentro de las especies más utilizadas para la fabricación de MBC se encuentran *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum*, siendo este último el utilizado para la presente investigación. *G. lucidum* es un hongo filamentoso perteneciente al filo *Basidiomicetos*. Pertenece al complejo *Ganoderma*, cuyas especies se caracterizan por un píleo brillante y lacado (ver Figura 2.3) [40]. Es un hongo degradador de madera, por lo que es capaz de deshacer los principales

⁸ Fracción del polisacárido de lignocelulosa una vez extraída la lignina. Constituido por celulosa y hemicelulosa.

componentes de la lignocelulosa: lignina, celulosa y hemicelulosa (2.4). La secreción de enzimas lignocelulolíticas como lacasas y peroxidasas, se evidencia con mayor notoriedad durante el crecimiento vegetativo, es decir, en la propagación del micelio. Por otro lado, durante la formación de cuerpos fructíferos existe mayor expresión de proteínas degradadoras de celulosa y hemicelulosa [41].



Figura 2.3: Esporocarpo de *Ganoderma lucidum* [42].

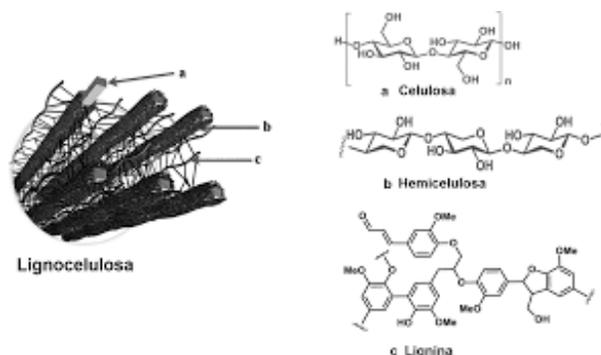


Figura 2.4: Estructura química de la celulosa, hemicelulosa y lignina, componentes de la lignocelulosa [43].

Es una especie poco abundante en la naturaleza, pero tiene un gran valor comercial, ya que se le atribuyen propiedades medicinales, sin embargo, estas cualidades no han sido su único atractivo. Recientemente, se ha descubierto que *G. lucidum* posee destacables propiedades físicas y mecánicas debido a la presencia de un sistema trimítico⁹ de hifas en su micelio, ampliando sus aplicaciones a la producción de biocompuestos [35]. Por las previas razones, existe una amplia cantidad de estudios sobre su cultivo para la obtención de cuerpos fructíferos o bien de su micelio.

2.1.4.1. Crecimiento y cultivo

El ciclo de vida de *Ganoderma lucidum* comienza con la dispersión de sus esporas y se divide en cuatro etapas típicas [44]:

⁹ Compuesto por los tres tipos de hifas: generativas, esqueléticas y conectivas. Estas últimas unen los otros filamentos hifales, actuando como refuerzo a la red y estructura.

1. Fase hifal: Corresponde al crecimiento vegetativo del hongo y consiste en la elongación de las hifas. Se forma el entramado llamado micelio que se extiende por el sustrato. La colonización completa del sustrato toma alrededor de 4 semanas.
2. Fase de brotación: Posteriormente, ocurre la formación y diferenciación del primordio¹⁰
3. Fase de elongación: Consiste en el alargamiento del primordio y formación del estipe.
4. Fase madura: En esta última etapa, aparecen las esporas en la superficie del píleo.

Para la fabricación de biomateriales se aprovecha únicamente el desarrollo vegetativo (Fase 1), mientras que el resto del ciclo es útil para el cultivo de sus cuerpos fructíferos.

Su cultivo puede ocurrir en un proceso de fermentación sumergida (SmF) o por fermentación en medio sólido (SSF), dependiendo del producto que se busque obtener. La primera forma corresponde a un medio líquido rico en nutrientes, mientras que en una fermentación sólida el sustrato está dispuesto en ausencia de agua libre [9]. Una curva teórica para el crecimiento de un organismo unicelular son las fases: lag o de adaptación (del inóculo al medio), fase exponencial (crecimiento celular), fase de desaceleración (la disponibilidad de la fuente de carbono comienza a disminuir) y la fase estacionaria (producto del agotamiento de la fuente de carbono). La producción de biomasa de *G. lucidum*, descrita por la Figura 2.5, construida a partir de datos experimentales, evidencia la cinética de proliferación celular del hongo filamentoso, permitiendo asemejarla a la curva teórica. Así, se permite comprender y predecir cómo evolucionará el cultivo, el consumo del sustrato y la acumulación tanto de los productos de interés, como de metabolitos [45].

Es importante destacar que generalmente las curvas describen el crecimiento en un medio líquido. En cambio, la dificultad de extraer datos desde el cultivo, dificulta el modelamiento del proceso fermentativo en estado sólido, limitando el acceso a una curva que describa el comportamiento del hongo bajo estas condiciones. Por ende, se restringe el entendimiento de la cinética del organismo. De todas formas, se identifican métodos utilizados para modelar la cinética de *Ganoderma lucidum* a través de la medición de su actividad enzimática, o bien, mediante cuantificación de densidad micelial. Lo anterior, ha hecho posible asemejar las curvas para ambos tipos de cultivo, identificando las mismas fases de crecimiento. Además, se ha llegado a la conclusión de que un cultivo SSF permite alcanzar mejores rendimientos dado que simula las condiciones de crecimiento naturales de los hongos filamentosos [46, 47].

¹⁰ Primera forma visible del esporocarpo.

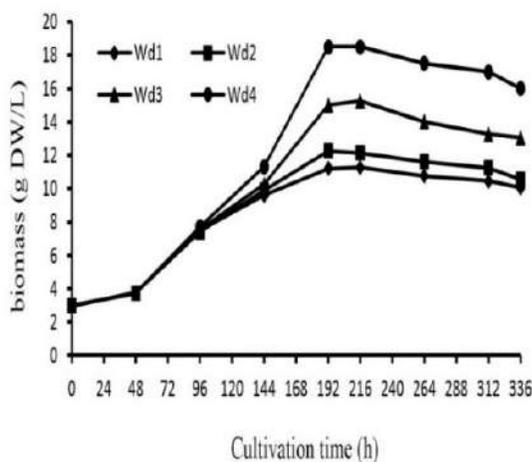


Figura 2.5: Curvas de la formación de biomasa de *Ganoderma lucidum* en medio líquido en función del tiempo de cultivo [48].

2.1.4.2. Factores nutricionales y ambientales de cultivo

A continuación se detallan los parámetros principales para el cultivo de micelio de *G. lucidum* [7, 41, 44, 49–51].

- **Fuente de carbono:** El carbono es necesario para el desarrollo y crecimiento por ser parte constitutiva tanto del micelio como de los cuerpos fructíferos del hongo. Como se mencionó anteriormente, la fuente de carbono de *G. lucidum* por definición es la lignocelulosa. Dentro de las alternativas de sustrato están documentados el aserrín de maderas latifoliadas¹¹, paja, coronta de maíz o subproductos agrícolas. De todos modos, para el cultivo de su micelio es posible utilizar azúcares simples (glucosa, sacarosa) y almidón.
- **Fuente de nitrógeno:** Es crucial puesto que es necesaria para la síntesis de proteínas y, por ende, para el crecimiento del organismo. Por lo general, se utiliza salvado de trigo, salvado de arroz junto con el sustrato o suplementación con fuentes de nitrógeno comunes como extracto de levadura, extracto de malta, peptona o sulfato de amonio. La proporción carbono:nitrógeno óptima es 20:1 para la etapa vegetativa.
- **Humedad:** Para un cultivo en estado sólido, la humedad óptima del medio es entre 60 % y 65 %, al igual que la humedad relativa del aire. En caso de usar un sustrato más disperso o disgregado debe aumentar a un 70 %.
- **Temperatura:** El rango de temperatura para *G. lucidum* es amplio, pudiendo crecer y proliferar su micelio en ambientes desde 20 °C hasta 35 °C. Sin embargo, su óptimo se encuentra entre 25 °C a 30 °C.
- **Nivel de oxígeno:** *G. lucidum* requiere de oxígeno durante todas las etapas de su crecimiento. Producto de su respiración celular este libera dióxido de carbono, el cual

¹¹ También conocidas como maderas frondosas o duras por su estructura leñosa, densa y poco porosa. Ejemplos: roble, nogal, castaño.

afecta su crecimiento en caso de encontrarse en concentraciones superiores al 0.1 % en el ambiente. Luego, en el cultivo del hongo se requiere de ventilación para evitar que dicho parámetro se eleve.

- **Iluminación:** El cultivo se debe realizar en oscuridad ya que el micelio es sensible a la luz, inhibiendo su crecimiento.

La producción de cuerpos fructíferos, etapa consecutiva a la vegetativa, requiere de valores distintos en los parámetros de cultivo. En la última etapa del crecimiento, se hace necesaria una temperatura entre 24 °C y 28 °C, mayor humedad del ambiente (85 % y 95 %) y presencia de luz suficiente para estimular la diferenciación celular y desarrollo de esporocarpos [41].

A lo largo del proceso de manufactura de MBC, se deberán tener en consideración las múltiples complicaciones que pueden surgir, afectando el crecimiento del hongo filamentoso. Las variables se resumen en la Figura 2.6.

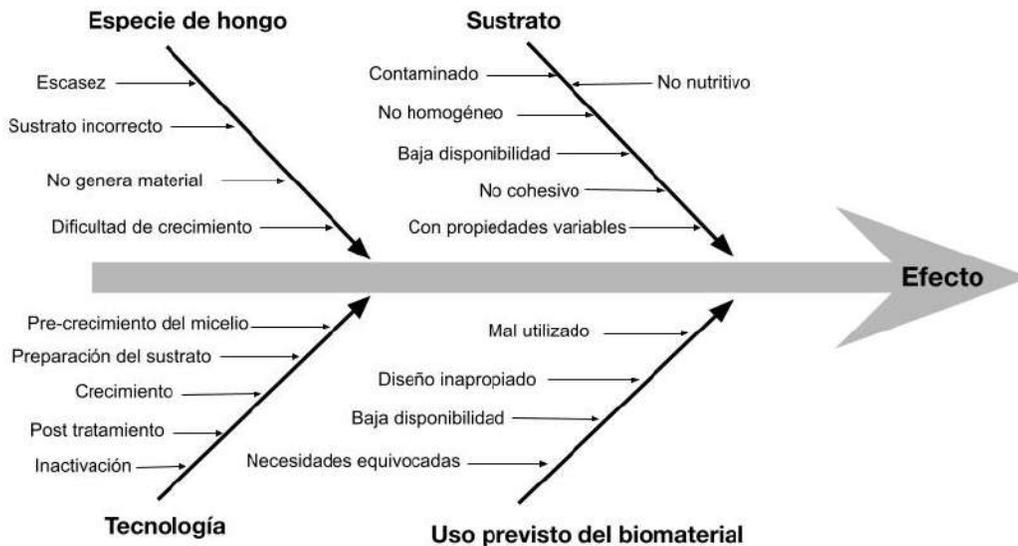


Figura 2.6: Factores que afectan a la fabricación y el uso de compuestos a base de micelio. Adaptado de [52].

Capítulo 3

Estado del Arte

3.1. Impresión 3D

La impresión 3D consiste en la deposición continua de un material para producir objetos tridimensionales. El proceso de adición de capas sucesivas permite obtener estructuras complejas, de cualquier forma y geometría [21]. Esta característica y su versatilidad para emplear distintos materiales han hecho popular a la impresión 3D en diversas áreas. Actualmente, es utilizada en ingeniería de tejidos hasta joyería o incluso en la industria alimentaria, ofreciendo la fabricación y diseño de estructuras complejas de manera rápida y con bajo costo asociado [53]. Existen distintos tipos de fabricación aditiva, dependiendo del material que se utilice y el fin de la impresión. Entre ellas están la inyección de aglutinante (*Binder jetting*), inyección de material (*Materials jetting*), deposición de Energía Dirigida, fusión por lecho de polvo (*Powder bed fusion*), extrusión de materiales (FDM) [54]. A su vez, cada uno de estas categorías tiene requerimientos físicos y reológicos distintos para lograr una tinta trabajable [55].

También en la construcción esta tecnología de manufactura se posiciona como una opción para reducir los costos de producción y tiempos de ciclo [56], ganando popularidad e interés dentro de la industria. En la Figura 3.1 se muestra el aumento en publicaciones ligadas a construcción mediante impresión 3D a lo largo de 30 años, conllevando a que hoy en día se emplee como método de fabricación. Dentro de los ejemplos de su aplicación se encuentra la impresión *in situ* (por FDM) de partes de una casa en Ámsterdam. Se trata del primer proyecto de este tipo en Europa y pretende comprobar la disminución de los residuos, los costos tanto de la obra como transporte [57].

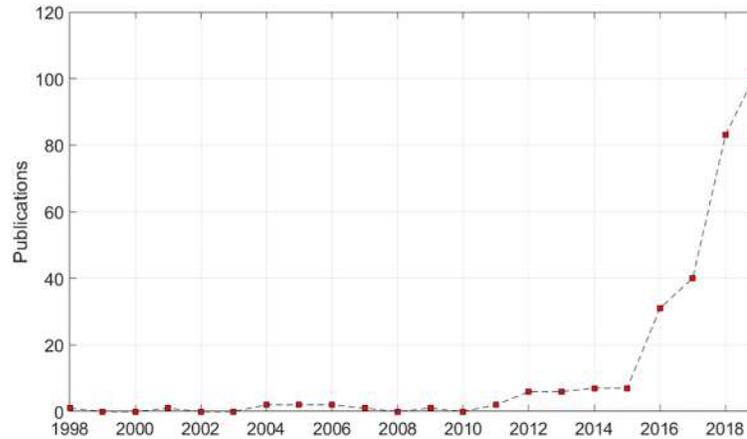


Figura 3.1: Producción científica anual en la investigación de construcción impresa en 3D entre 1998 y 2019 [58].

En paralelo, se reporta el método de impresión 3D por extrusión de material como el tipo más usado en las áreas de construcción, diseño y arquitectura. La extrusión de material se refiere al proceso de fabricación aditiva donde el material se dispensa a través de una boquilla [59]. El material más utilizado en la industria en cuestión es el hormigón y en particular, para impresión 3D también es el que presenta más uso [58]. La metodología de manufactura más prometedora para este material es conocida como *Contour Crafting* (CC), que consiste en la extrusión y deposición capa por capa del hormigón, directamente en el lugar de la construcción. Entre las ventajas se encuentran que permite la automatización del proceso, reducir costos y tiempos. Sin embargo, se requiere de estudios reológicos para lograr las propiedades necesarias del material en impresión 3D, puesto que difieren de las del hormigón estándar [58]. Se necesita que el material sea estable, resistente y que se endurezcan rápidamente después de la impresión, características faltantes en el concreto fresco. Por esta razón, se buscan soluciones como la adición de piedra caliza, cenizas volantes, áridos gruesos, escoria de cobre y arcilla, de manera de ampliar la variedad de materiales imprimibles [58]. Otra alternativa es el hormigón de azufre como potencial material para construcción en la Luna. Consiste en la mezcla de áridos y azufre, calentados sobre el punto de fusión del mineral para la extrusión que al enfriarse mantiene la forma y presenta resistencia en menor tiempo que el hormigón normal [57].

3.1.1. Biotintas para impresión 3D

En el vasto campo de la impresión 3D también se encuentra la bioimpresión, cuyos tres tipos están esquematizados en la Figura 3.2. Para esta forma de biofabricación se utilizan biotintas, término que alude a una formulación que obligatoriamente contiene células dentro de sus componentes [55]. Por una lado, la impresión por inyección consiste en la dispensación de gotas sobre un sustrato mediante estímulos piezoeléctrico o térmicos para facilitar la expulsión de la tinta por la boquilla. Por otro, la bioimpresión asistida por láser utiliza un pulso láser para impulsar la biotinta sobre una superficie colectora. Por último, la bioimpresión por extrusión usa jeringas cargadas con la biotinta, dispensando filamentos por un pistón o tornillo. Las características de cada tinta dependerán del método de impresión. En particular, por extrusión se tiene la ventaja de regular la presión de aire, permitiendo utilizarla para diversas viscosidades [60].

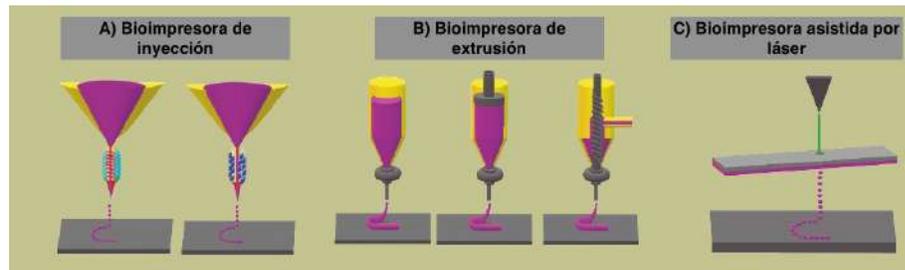


Figura 3.2: Tipos de bioimpresión 3D [61]

Actualmente, la fabricación de biotintas capta la atención dado que se trata de una limitante para la ampliación de la bioimpresión y sus usos [62]. La imprimibilidad de una biotinta está sujeta principalmente a parámetros como la viscosidad, tensión superficial y la capacidad de entrecruzamiento, por lo que requiere de la comprensión de la reología de la solución [54]. Por lo general, se prefieren soluciones con comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento (pseudoplásticos) dado que disminuyen su viscosidad ante un esfuerzo, por ejemplo, la presión de extrusión [63]. En caso contrario, un fluido dilatante aumenta su viscosidad ante una tensión de corte.

Gracias a su imprimibilidad, los hidrogeles son la base más recomendada para la formulación de biotintas. A su vez, el alginato es de los biopolímeros más utilizados en la creación de biotintas, dado que en contacto con iones divalentes que favorecen la formación de enlaces entre las cadenas poliméricas de alginato provocan una rápida estabilización del hidrogel [62]. Además, poseen propiedades como ser biocompatible, permitir la proliferación celular y ser no tóxico, pudiendo ser utilizado para múltiples fines [64]. Una biotinta en base a alginato está compuesta principalmente por la solución de este polisacárido y las células que se vayan a utilizar en la bioimpresión (ver Figura 3.3). Otros polímeros y péptidos funcionales son opcionales en la formulación, para mejorar propiedades, por ejemplo, mecánicas o estructurales y para potenciar la función biológica de las células, respectivamente [62].

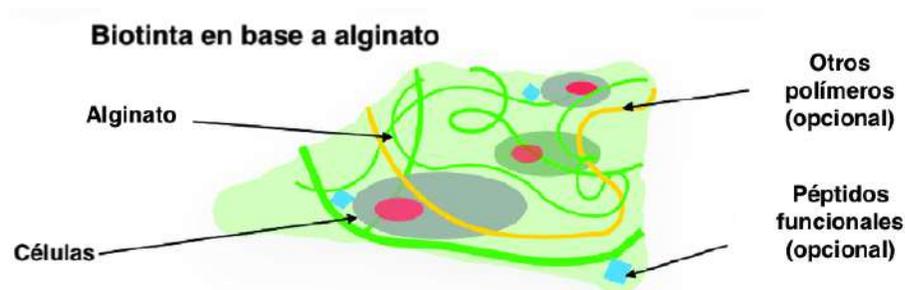


Figura 3.3: Ilustración de una biotinta a base de alginato. Compuesta por el hidrogel de alginato, células, otros polímeros y péptidos funcionales. Adaptado de [62].

Dada la importancia de la viscosidad en la formulación de una biotinta, se deben tener en cuenta factores que puedan modificarla en el transcurso de la preparación. Los factores incidentes incluso pueden ser propios del proceso productivo que terminen por afectar la estabilidad estructural y propiedades mecánicas de la impresión. Por ejemplo, la biotinta podría requerir de condiciones estériles. En las Figuras 3.4 y 3.5 se resumen los efectos de los métodos de esterilización en soluciones de alginato. La Figura 3.4 muestra que tanto los

pesos moleculares como el índice de polidispersión disminuyen después de ser autoclavado, indicando entonces que el calor y presión del equipo rompen los enlaces entre las moléculas constitutivas del alginato y, que además lo hace en tamaños relativamente homogéneos. Luego, en la Figura 3.5, se explicita una disminución en la viscosidad de la solución por efecto del autoclave, condiciéndose con la presencia de cadenas poliméricas más cortas y el aumento de la fluidez.

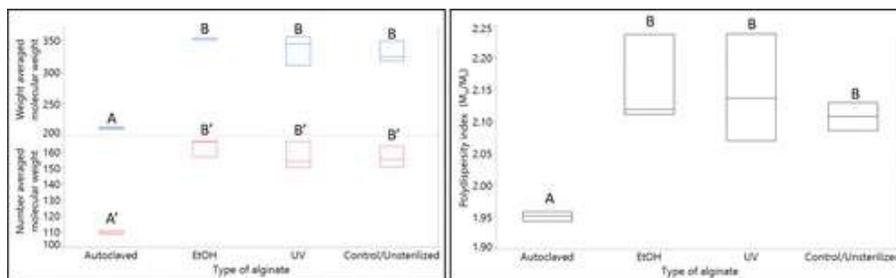


Figura 3.4: Peso molecular medio en número y peso (izquierda) e índices de polidispersidad (derecha) de las soluciones de alginato después de la esterilización [65].

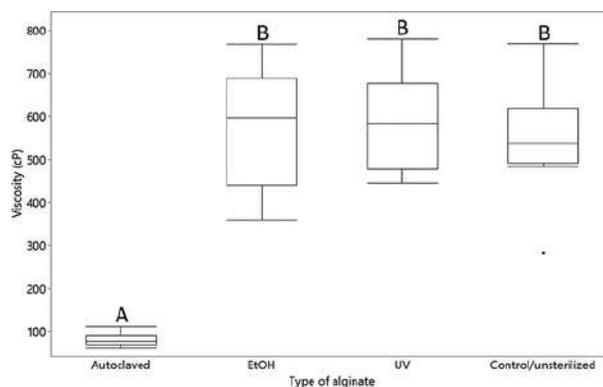


Figura 3.5: Viscosidades dinámicas de los tres grupos de solución de alginato esterilizada y uno de control a una velocidad de cizallamiento de 0.1 s^{-1} [65].

3.2. Impresión 3D con lignocelulosa

Uno de las tantas materias primas que se pueden utilizar es la lignocelulosa, como alternativa para la revalorización de este abundante residuo [66]. La lignocelulosa cumple con mejorar las propiedades mecánicas de estructuras impresas en 3D. De acuerdo a lo investigado, la utilización de lignocelulosa en impresión 3D está principalmente asociada al área de diseño, arquitectura y construcción, destacando la madera como una propuesta novedosa para la fabricación de biomateriales.

Por un lado, se pudo dar con la experimentación con viruta de madera y distintos aglomerantes, de manera de encontrar formulaciones que permitiera la impresión del material. Se probaron yeso, metilcelulosa, silicato sódico y diferentes tipos de cemento como aglutinantes.

Las conclusiones fundamentales del trabajo permitieron descartar la viabilidad de la metilcelulosa y silicato de sodio, mientras que el yeso permitió tener precisión en la impresión y fijar el aserrín. Los mejores resultados se obtuvieron con el cemento. La resistencia a la flexión de secciones compuestas por las capas impresas son comparables con tableros de construcción ligera de lana de madera [67].

Por otro lado, se encontró la impresión de polvo de madera con PVA y urea-formaldehído como adhesivos. Consistía en la optimización de las mezclas de los componentes y medición de sus parámetros de impresión. Se pudo ver que a medida que aumentaba la viscosidad, se debían aumentar la presión de extrusión para cualquiera de los aglutinantes que se estuviese usando. Además, se concluye que los bloques impresos con PVA tenían resistencia y rigidez inferiores al PVA puro, a diferencia de los impresos con urea-formaldehído que mantenían la resistencia propia del adhesivo [68].

En general, las estructuras obtenidas por manufactura aditiva presentan propiedades mecánicas inferiores que las fabricadas de manera convencional con este mismo material [69]. Luego, aún se requiere la optimización de este proceso y los materiales utilizados para dar con alternativas factibles para el área de la construcción.

Además, se reportan trabajos realizados con harina de madera en matrices poliméricas como PLA y polipropileno para extrusión de filamentos. En dichos casos, la limitante del uso de lignocelulosa se encuentra su degradación por el calor asociado al proceso [69], por lo que la formulación de una tinta extruible a temperatura ambiente, se cree puede ser una alternativa exitosa para aprovechar las propiedades de las fibras de celulosa sin comprometer su integridad.

3.3. Impresión 3D con materiales celulósicos

La celulosa es el polímero renovable más abundante en la naturaleza. Su gran disponibilidad y propiedades mecánicas la posiciona como gran atractivo para la impresión 3D dado que actúa como modificador reológico, aglutinante, matriz, refuerzo y excipiente. En particular, la presencia de celulosa en un compuesto aumenta la viscosidad, junto con la resistencia y rigidez, producto del ordenamiento de sus fibras [70].

Es posible obtenerla de manera pura, es decir, removiendo el contenido de lignina y hemicelulosa, de manera de aprovechar al máximo sus propiedades. Puede encontrarse en altas concentraciones en maderas (40 %-47 %), plantas y otras biomásas agroindustriales [70]. Esto último, permite que se trate de una alternativa para la revalorización de residuos de lignocelulosa. De la separación de las fibras de celulosa, se tienen distintas formas aisladas con distintas morfologías y estructuras. Se encuentran la celulosa microcristalina (MCC), microfibras de celulosa (MF), nanocristales de celulosa (CNC), las nanofibras de celulosa (CNF) y celulosa regenerada. Para impresión 3D, se distingue la nanocelulosa (nanocristales y nanofibras) por ser su bajo costo de producción, sus ventajas para mejorar las propiedades mecánicas y biocompatibilidad [71].

Por lo anterior, ha sido utilizada tanto en la formulación de hidrogeles y tintas como adi-

tivo para termoplásticos. El polímero que reporta más intentos por mejorar sus propiedades es el ácido poliláctico (PLA). Dentro de las formas que ha sido abordado se encuentra la impresión FDM de filamentos de PLA con micro y nanocelulosa. Por ejemplo, con la formación de compósitos de PLA con nanofibras de celulosa (5%), se presentaron mejoras en su módulo de Young [70]. Otros trabajos reportados utilizan nanocristales de celulosa como aditivo. Por un lado, para la formación de nanocompósitos de CNC y filamentos de alcohol polivinílico (PVOH). Por otro, para el reforzamiento de nanocompuestos de policaprolactona (PCL). Para ambos casos también se vio una mejora en las propiedades mecánicas [69]. Actualmente, se desarrolló un compósito para impresión 3D en base a resina epóxica y celulosa nanocristalina (CNC). Al alcanzar un contenido del biopolímero del 90%, se obtuvo un material resistente y con dureza comparable a algunas especies de nácar [72]. Entonces, se puede ver cómo la adición de celulosa a polímeros comúnmente utilizados en impresión 3D, mejora tanto la imprimibilidad como los resultados finales del material.

Al mismo tiempo, y más con el foco del trabajo de la presente tesis, la celulosa cumple con los requisitos más importantes para formular una biotinta: buena extruibilidad y filamentos de buena precisión, ambas producto de su comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento y viscosidad. Dentro de los factores que afectan la viscosidad de la tinta, se encuentra la concentración de la solución [69].

3.4. Impresión 3D de hidrogeles de alginato y celulosa

Como se mencionó anteriormente, la formulación exitosa de una biotinta depende de la reología del compósito, determinando la viabilidad del material. En el caso del alginato, aunque su entrecruzamiento permite su aplicación en impresión 3D, el colapso de las estructuras impresas y la baja precisión, limitan su uso, de modo que existe interés en mejorar su desempeño [64, 73]. Dadas las ventajas de la celulosa, su carácter de modificador reológico, permite mejorar la estabilidad de un hidrogel de alginato, evitando la pérdida de forma de la estructura impresa [74].

La nanocelulosa es la más utilizada como aditivo en hidrogeles de alginato. Si bien se encontraron numerosas investigaciones que combinan celulosa con alginato, principalmente asociadas al área de la biomedicina, debido a las propiedades del polisacárido [64, 73, 74]. A su vez, existen otras fuentes aún más novedosas para obtener nanocelulosa, como, por ejemplo, la síntesis mediante bacterias aeróbicas, conocida como celulosa bacteriana [71]. Este tipo de celulosa también presenta propiedades características de la celulosa proveniente de las plantas, por lo que es utilizable para impresión 3D y mejorar la calidad de la impresión. En toda la bibliografía revisada, se constata el mejoramiento del desempeño de hidrogeles de alginato con la adición de celulosa.

Pese a que el alginato está enfocado sobre todo al uso en ingeniería de tejidos, se rescata de los trabajos la utilización de alginato como aglomerante. En base a los resultados reportados se escoge utilizar alginato debido a que sus hidrogeles tienen una viscosidad conveniente para procesos de extrusión y permite el crecimiento celular. Además, se trata de un polímero natural y biodegradable extraído desde las paredes celulares de algas pardas, es decir, proviene también de una fuente renovable [62]. Con esto último, se alinea con un enfoque sustentable

e la producción de biomateriales novedosos.

3.5. Biocompósitos de micelio (MBC)

Actualmente, los hongos tienen un gran impacto en industrias como la alimentaria, textil, papelera, entre otras y representan un recurso sustentable para futuras aplicaciones y procesos [75]. En consecuencia, el estudio del uso de materiales provenientes de organismos fúngicos (MBCs) es extenso y cada vez de mayor interés, reportándose un número de 20 nuevas publicaciones en los últimos 6 años. Las principales áreas enfocadas en potenciar sus usos son la ciencia de los materiales e ingeniería, concentrando un 24 % y 22 %, respectivamente [76]. En particular, la producción sostenible de materiales es un aspecto importante para la industria y un punto donde convergen los campos de la biotecnología e ingeniería civil [77].

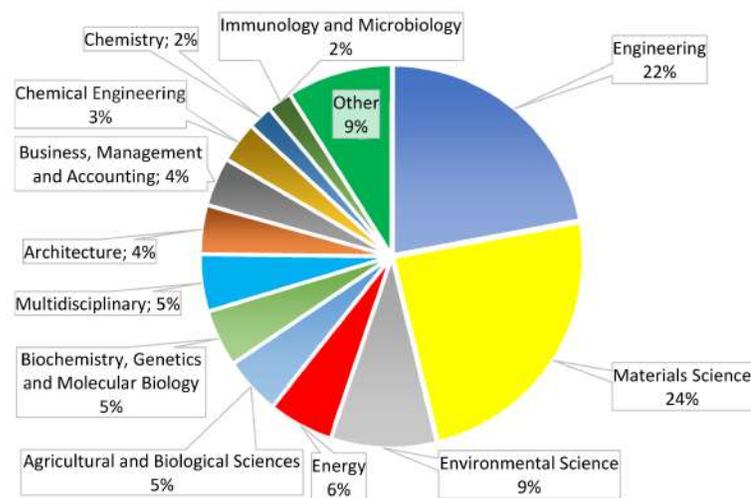


Figura 3.6: Diagrama con distribución de las áreas con publicaciones de artículos científicos sobre materiales compuestos en base a micelio [76].

Los MBC son biomateriales formados por el micelio de un hongo filamentoso que aglutina naturalmente el sustrato donde crece. En la Figura 3.7, se representa un proceso de tres etapas para la fabricación de MBC más comunes, correspondientes a ladrillos y paneles. En primera instancia, se tiene una inoculación que consiste en sembrar esporas o el mismo micelio en el sustrato escogido para que el hongo comience la colonización. El inóculo puede ser sólido, es decir, un sustrato previamente colonizado, o bien líquido, como suspensión de esporas y micelio disperso. Luego, se dispone el material en moldes para comenzar con el cultivo del hongo. Cuando el sustrato este completamente colonizado por el micelio, se procede a secar el MBC en un horno. De acuerdo a lo revisado, las condiciones de secado pueden variar, siendo posible realizarse a temperaturas entre 80°C y 100°C por 2 horas o incluso por 24 horas a temperaturas menores entre 50°C - 60°C.

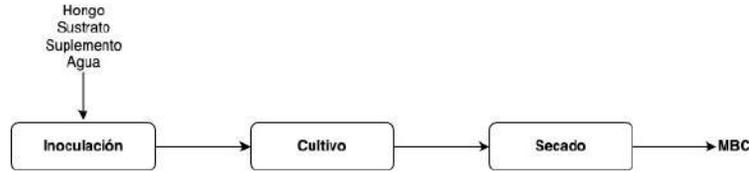


Figura 3.7: Diagrama de flujo del proceso de fabricación de compósitos de micelio. Adaptado de [7].

3.5.1. Propiedades mecánicas

Se ha visto que las propiedades mecánicas del material obtenido dependen de las condiciones de cultivo y especie del hongo utilizado [78]. Sin embargo, las variaciones más significativas en la calidad del material están sujetas al sustrato que se escoja para el crecimiento, dado que el tipo de fuente de Carbono afecta directamente la densidad del micelio. Luego, si el sustrato es rico en nutrientes permite obtener un micelio más denso, aumentando la rigidez del MBC y obteniendo propiedades de tensión con mejores resultados [36, 51]. A su vez, la producción de quitina dependerá también del sustrato en el que se realice el cultivo [34].

Ghazvinian et al. (2019) [7] describe las densidades y fuerza aplicada a seis compósitos fabricados a partir de sustratos distintos. En la Tabla 3.1 se muestra cómo afecta el tipo de sustrato en las propiedades mecánicas de un MBC, precisamente en su resistencia a la compresión. Al comparar cultivos con materiales particulados (aserrín) con uno fibroso (paja), se concluye que el compósito conformado por aserrín y micelio, posee un mayor módulo de compresión. Además, los resultados muestran una diferencia significativa cuando se mezcla el sustrato con salvado (fuente de nitrógeno). Este no solo airea y disminuye la densidad del sustrato, favoreciendo físicamente el crecimiento del micelio sino que suplementa la fuente de energía, facilitando el crecimiento celular. En consecuencia, aumenta la resistencia a la compresión del biomaterial. Bajo la misma lógica, se tiene que Joshi et al. (2020) [34] midieron las densidades y resistencia a la compresión de tres MBC fabricados a partir de sustratos diferentes. Las densidades calculadas fueron $0.33 \pm 0.05 \text{ g/cm}^3$ para el aserrín, $0.11 \pm 0.01 \text{ g/cm}^3$ para la caña de azúcar y $0.29 \pm 0.03 \text{ g/cm}^3$ para la mezcla de ambos, valores comparativamente mayores a la de materiales de poliestireno expandido (0.022 to 0.03 g/cm^3). También, la resistencia medida para los ladrillos fue 6.5 N/mm^2 , 5 a 6 veces mayor que para el material de empaque común (1.2 - 1.5 N/mm^2) [34].

Tabla 3.1: Tabla comparativa de la densidad y rigidez de MBCs fabricados a partir de distintos sustratos [7].

Sustrato	Densidad [g/cm ³]	Fuerza (KPa)	Fuerza máxima (KPa)
Aserrín	0.552	145.9	1018.4
Aserrín con suplemento (salvado de trigo)	0.493	188	1380.6
Paja	0.277	20	72.7
Paja con suplemento (salvado de trigo)	0.192	27	169.2
Aserrín y paja en partes iguales	0.253	29.7	105.9
Aserrín y paja con suplemento (salvado de trigo)	0.234	30.5	116.1

Las propiedades mecánicas de los compósitos de micelio se comparan con la de otros materiales comúnmente utilizados para construcción en la Figura 3.8. A partir de ella, se tiene que los MBC tienen propiedades mecánicas comparables con aislantes de espumas de poliestireno y polietileno (10^{-1} GPa). Sin embargo, el módulo de compósitos de micelio es inferior al de materiales estructurales (en negro). A su vez, se puede ver que el costo de producción de este tipo de biomaterial es considerablemente menor que el del resto de los materiales [6] no alejándose de manera considerable de las propiedades mecánicas de otros materiales destinados a funciones similares.

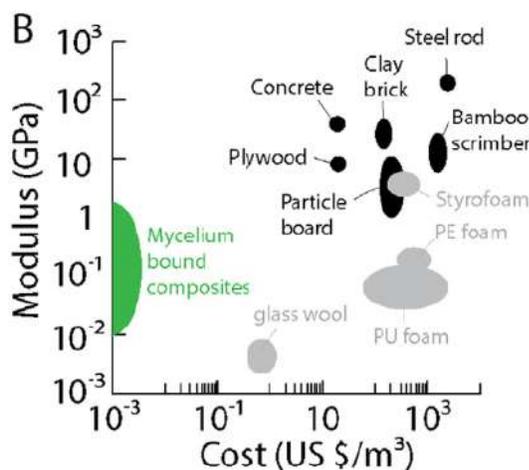


Figura 3.8: Comparación de los materiales en términos del costo y rigidez. Módulo de Young (elasticidad) en función del costo de producción de los compósitos de micelio y otros materiales comunes [6].

3.5.2. Propiedades aislantes

Otro aspecto prometedor de los MBC son sus propiedades aislantes, tanto térmicas como acústicas. En la Figura 3.9 se muestran las características comparadas con materiales comunes. En ambos casos, se puede apreciar que sus propiedades son competitivas respecto

a los demás materiales del mercados. Incluso, en cuanto a absorción de sonido, es una mejor alternativa que las referencias.

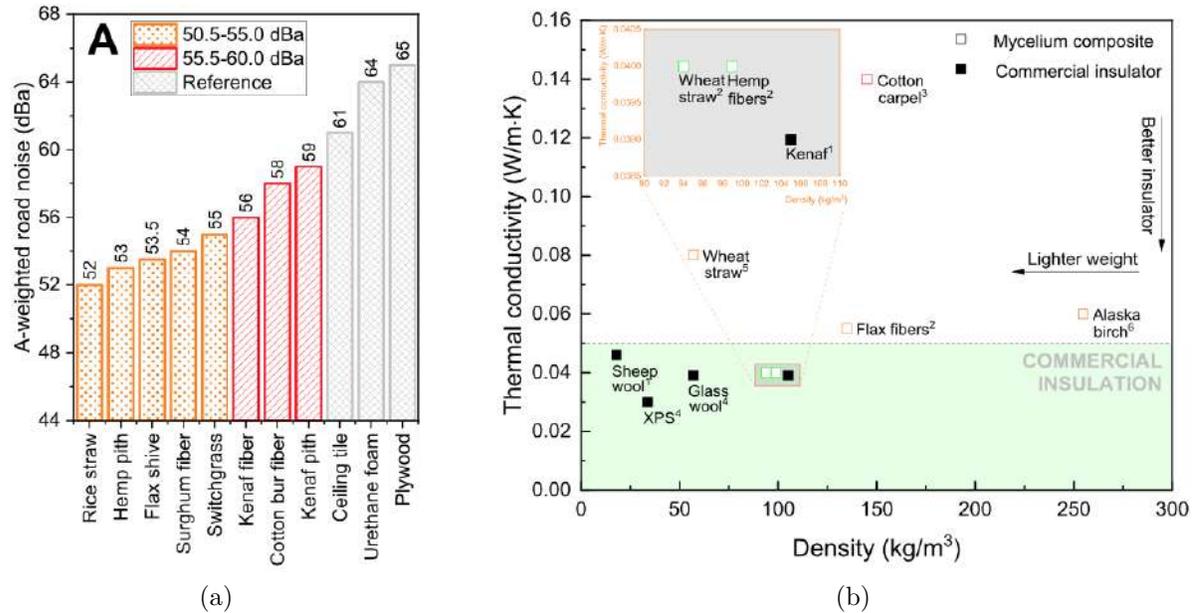


Figura 3.9: Comparación de las propiedades aislantes térmicas y acústicas de los MBC y otro materiales comercializados . (a) Absorción de sonido por MBC formados por un sustrato puro (en color naranja) en contraste con materiales de referencia (en gris) [51]. (b) Conductividad térmica y densidad de MBC usando distintos sustratos (cuadrados blancos) versus aislantes comerciales (cuadrados negros) [6].

Es preciso señalar que las propiedades de los MBC aún pueden ser mejoradas y serán optimizadas a medida que las investigaciones asociadas al tema avancen. Por ahora, el progreso puede evidenciarse en el aumento de la aislación térmica mediante la adición de polímeros, biopolímeros y/o rellenos al sustrato (ver Figura 3.10)[51].

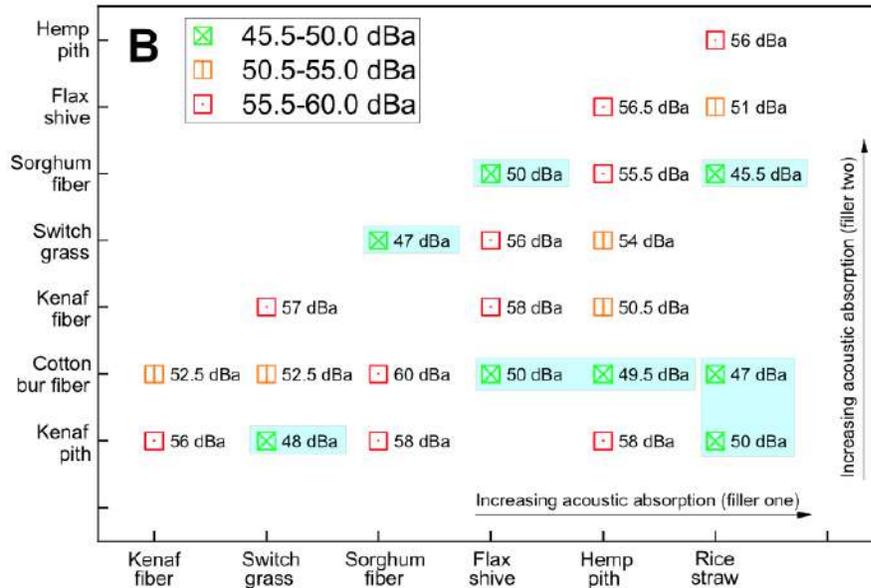


Figura 3.10: Aumento de la propiedad de aislantes térmicos de MBC con sustrato formado 50:50 con un relleno (en los ejes se tienen las composiciones). Se representa la disminución del ruido percibido, resaltando en azul sus valores más bajos [51].

3.6. MBC para impresión 3D

Las investigaciones centradas en la producción de compósitos y cuantificación de sus propiedades mecánicas están a su vez asociadas a MBC obtenidos por amoldado. En cuanto a su fabricación con impresión 3D o por extrusión se pudo notar que el área ha sido poco desarrollada académicamente, no así en la industria (según lo mostrado en la Sección 1.1.2). De la bibliografía revisada, resaltan dos trabajos en particular cuyos procesos de fabricación consisten en las mismas cuatro etapas. A diferencia del proceso de un MBC común (Figura 3.7), en este proceso existen etapas adicionales luego de la inoculación y crecimiento del micelio, en este caso se refiere a una primera colonización. Luego de la aparición de micelio visible en el sustrato, se agrega un aglomerante (biopolímero/polímero) para preparar una pasta viscosa que permita la extrusión del compósito. Finalmente, se extruye e incuba una segunda vez para dejar que el hongo colonice la estructura en su totalidad. En este proceso también existe una última etapa de secado para lograr dejar el material inerte.

Por un lado, Soh et al. (2020) [6], desarrollaron una pasta extruible mezclando bamboo como sustrato (residuo agroindustrial), un inóculo en aserrín y quitosano como aditivo (2 % y 3 wt % de quitosano disuelto en ácido acético al 1 %). Realizaron pruebas de extruibilidad para proporciones de quitosano:sustrato de 50:50, 60:40 y 70:30. De esta manera, se buscaba concluir si era posible crear un compósito de micelio utilizando un proceso fácil y con bajo costo energético como la extrusión. Los resultados obtenidos reflejaron que en presencia de quitosano el material se hacía más manejable y permitía construir formas en 3D. Las relaciones 60:40 y 70:30 mostraron una mejor extruibilidad y estabilidad (Figura 3.11).

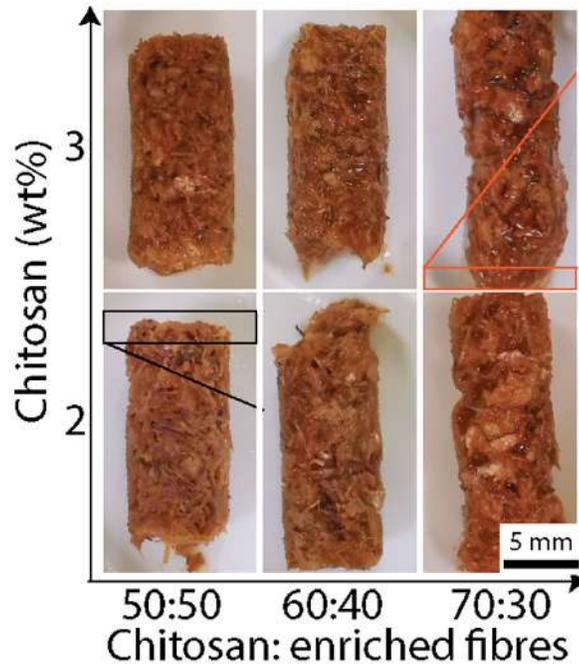


Figura 3.11: Muestras de extrusión de pastas de fibra de bambú y quitosano. Imágenes muestran la concentración de quitosano y la relación quitosano/-fibras de bambú [6].

Por otro lado, Bhardwaj et al. (2021) [79] utilizó únicamente la biomasa previamente crecida y adquirida de la empresa Ecovative. Se agregó harina de trigo disuelta en agua y *psyllium husk* como aglomerante, una fibra vegetal que naturalmente forma mucílagos. Lo que se buscaba era determinar una proporción óptima entre el contenido de agua del sustrato y el aditivo que permitiera su extruibilidad y evaluar sus efectos en la calidad de la impresión. Se agregaron tres proporciones de polvo de *psyllium husk* (p) en relación al volumen de agua (v): (a) $p/v=1:40$, (b) $p/v=2:40$ y (c) $p/v=3:40$, realizando tres muestras distintas que se muestran en la Figura 3.12. Se concluyó que las relaciones de 1:40 y 2:40 presentaban buena procesabilidad, siendo esta última la con mejor estabilidad estructural.

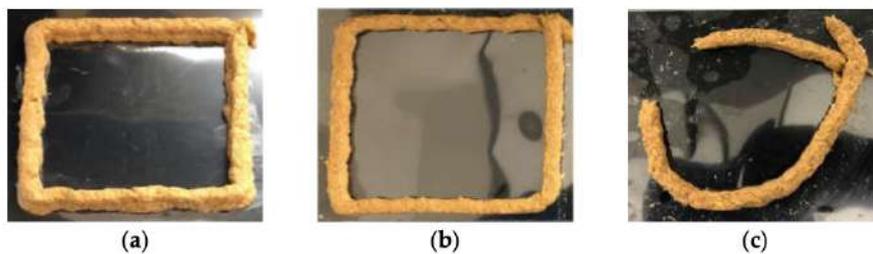
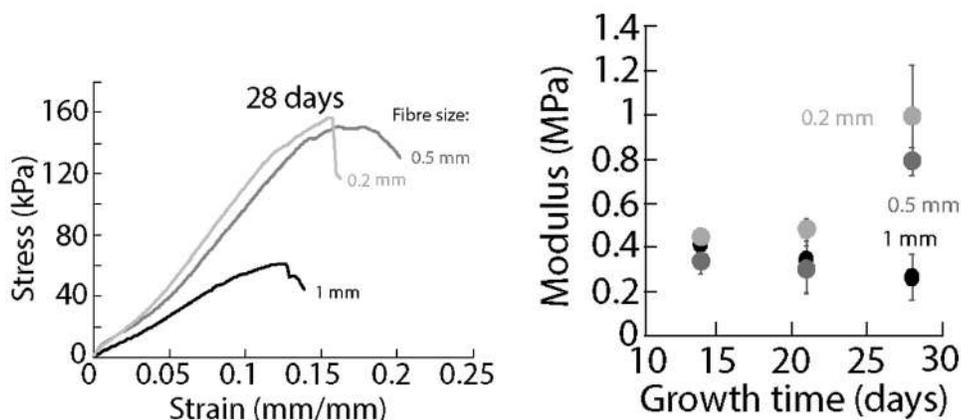


Figura 3.12: Muestra de extruibilidad previo a la colonización de material compuesto por sustrato comercial y diferentes proporciones de *psyllium husk*. (a) $p/v=1:40$, (b) $p/v=2:40$ y (c) $p/v=3:40$. [79].

3.6.1. Propiedades mecánicas

Para los MBC obtenidos en el trabajo de Soh et al. (2020) [6], en primer lugar, se pudo ver que existió desarrollo de micelio y colonización en los filamentos extruídos, tanto en la superficie como en el seno. Se cuantificaron los módulos de Young para sustratos de distintos tamaños de partículas (0.2mm, 0.5mm y 1mm) tras 14, 21 y 28 días de incubación. Se evidenció cómo aumentaba el valor de dicho módulo a medida que el micelio se hacía más denso, condiciéndose con que el entramado formado por el hongo sirve como soporte estructural. Además, se concluyó que finalizada la incubación, el sustrato de menor dimensión tenía un mayor valor de módulo (alrededor de 1MPa) y, por ende, era capaz de aguantar mayor tensión (Figura 3.13). A su vez, se relacionó la superioridad de la propiedad mecánica con una mayor densidad de micelio en ese mismo sustrato.



(a) Curvas promedio de tensión-deformación de los materiales compuestos en función del tamaño de la fibra de bambú y del tiempo de crecimiento del micelio.

(b) Módulo bajo tensión uniaxial en función del tiempo de crecimiento del micelio y del tamaño de la fibra de bambú.

Figura 3.13: Propiedades mecánicas de los materiales compuestos de fibra de bambú y micelio [6].

De todos modos, de acuerdo a lo reportado se encontró que para MBC fabricados por extrusión, las propiedades mecánicas disminuyen considerablemente en comparación con los MBC tradicionales. La Figura 3.14 resume los valores de 1MPa o incluso valores muy superiores como 10^4 MPa en contraste con un módulo de entre 10^{-1} - 10^{-2} MPa.

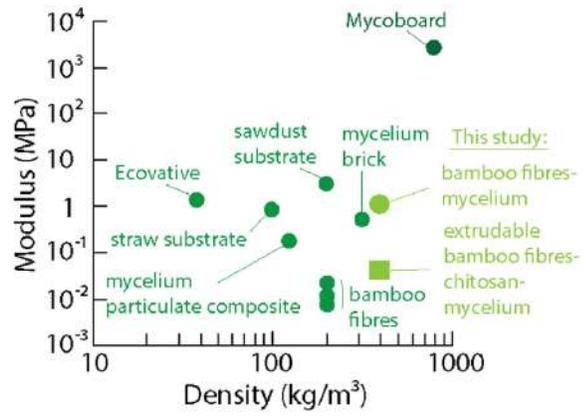


Figura 3.14: Rigidez en función de la densidad para distintos materiales de micelio. A la derecha se tiene las fibras de bamboo sólo con micelio (círculo) y la versión extruible (cuadrado) [6].

Capítulo 4

Objetivos

4.1. Objetivo General

Desarrollar un biomaterial compuesto de micelio de *Ganoderma lucidum* y coronta de maíz, residuo agroindustrial rico en lignocelulosa, que con la adición de un aglomerante permita la fabricación de estructuras mediante impresión 3D.

4.2. Objetivos Específicos

- Analizar el efecto de los biopolímeros quitosano y alginato en la extruibilidad y constructibilidad de la pasta, permitiendo formular una tinta en base al sustrato y aglomerante.
- Estudiar el efecto del sustrato en el crecimiento del hongo y propagación del micelio.
- Evidenciar la potencialidad del material impreso en 3D cuantificando sus módulos de elasticidad y compresión para comparar con los valores documentados de las propiedades mecánicas para este mismo método de fabricación de un MBC.

Capítulo 5

Metodología

5.1. Materiales

Para el desarrollo de la tesis se utilizó alginato de sodio de viscosidad media (A2033) proporcionado por Sigma-Aldrich, cloruro de calcio (Sigma-Aldrich, peso molecular 110.98 [g/mol]), quitosano (Sigma Aldrich, peso molecular medio, soluble en ácido acuoso diluido), ácido acético glacial (Merck, 100 % de concentración, densidad de 1,05 g/mL), etanol de grado técnico, coronta de maíz o viruta vegetal para roedores (100 % sustrato de maíz de Caima Chile), micelio en granos de centeno (inóculo sólido comercializado por Biomicelios), jeringa de esporas (5mL, Natural Magic), aserrín de roble (Natural Magic) y agua desionizada suministrada por el Laboratorio de Ingeniería de Polímeros.

Los equipos usados fueron una balanza analítica Precisa 100A-300M para masar, un agitador magnético VELP AREC.X para mezclar las soluciones, microscopio Leica modelo 020-520.007 con una cámara Leica MC 170 HD, una estufa de vacío Heraeus VTR 5022 y la impresora Bioplotter 3D de 4^a generación (EnvisionTEC, Alemania).

5.2. Fabricación del ladrillo

Para este método de fabricación común de MBC, se siguieron dos metodologías distintas, una para cada intento realizado. En primer lugar, se utilizó el inóculo sólido (grano de centeno) adquirido en Biomicelios y se dispone en un molde de 15 x 8 x 5 cm³ (largo x ancho x alto). En segundo lugar, se inocula una bolsa de 1kg de arroz integral con 5ml de solución de esporas (inóculo líquido). Se incuba por 2 semanas para realizar un pre-crecimiento del micelio. Luego, se mezcla con el sustrato (aserrín de roble) y se pone en el molde de 15 x 8 x 5 cm³ (largo x ancho x alto). En ambos casos se trabaja bajo una campana de bioseguridad y se incuba en el mismo lugar.

5.3. Formulación de la tinta

5.3.1. Reología de la tinta

Para la formulación de las tintas a probar, en primer lugar, se buscó un aglomerante que entregara la viscosidad deseada. Se replicó la publicación de Soh et al. (2020) [6] con quitosano en una concentración del 2%p/p y 3%p/p disuelto en ácido acético al 1%. Se prepararon

tintas con un 70 % de quitosano por cada 2g de aserrín húmedo para ambas concentraciones y se extruyó manualmente con jeringas de 5mL para observar su comportamiento. Además, se prepararon soluciones de alginato a concentraciones de 4 %p/p, 10 %p/p, 12 %p/p y 14 %p/p. Estas también fueron extruídas con jeringas y, finalmente, se entrecruzó con cloruro de calcio 0.1M.

5.3.2. Extruibilidad de los sustratos

Se molieron los sustratos aserrín y coronta de maíz en molino. Este servicio fue prestado por el Laboratorio de Procesamiento de Minerales del Departamento de Ingeniería Civil en Minas de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Las muestras fueron recibidas tamizadas y se especifica un tamaño de partículas entre 100-200 μm . Los sustratos se remojan por 24 horas con cuatro veces su peso de agua desionizada para hidratarlos. Al día siguiente, se remueve el exceso de agua con papel toalla y mezclan con una solución de alginato al 14 %p/p. Se preparan tres proporciones por cada 20g (peso húmedo) de sustrato: 50:50, 60:40 y 70:30, relación en peso de sustrato:alginato. Se extruyen con jeringas de 5mL, de manera de comparar su viscosidad y extruibilidad.

5.4. Preparación de la biotinta

Se humedece polvo de coronta (100-200 μm) durante 24 horas según lo descrito arriba. Luego, la coronta húmeda (sustrato) y agua desionizada son autoclavadas a 121°C por 20 minutos y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se inoculó el sustrato con 500 μL del vial de esporas (inóculo líquido) para ser incubado por 48 horas a 28°C con humedad entre 70 % y 85 %. Transcurrido el tiempo de incubación, se hizo la solución de alginato con agua estéril y con alginato en polvo previamente esterilizado por 20 minutos bajo luz UV.

Para la biotinta se utilizó la solución de alginato al 14 %p/p como aglomerante junto con coronta de maíz como sustrato para sustentar el crecimiento del hongo. Se preparan dos proporciones distintas donde por cada 20g de coronta (peso húmedo) se agregan un 60 % y 70 % de alginato. Luego, las pastas se introducen en cartuchos de 30cc compatibles con la impresora. Todo el procedimiento se realiza bajo una campana de bioseguridad.

5.5. Impresión del prototipo

Las estructuras de la biotinta fueron impresas en 3D con Bioplotter 3D de cuarta generación (EnvisionTEC, Alemania). Se dibujaron previamente con las dimensiones de 60 x 60 x 10 mm^3 (largo x ancho x alto) en el programa *Materialise Magics*. Utilizando el software *Visual-Machine*, que permite manejar la impresora, se construyó un patrón de “panal de abeja”. Se utilizaron cartuchos de polietileno de 30cc (Optimum Components, Nordson EFD) rellenos con las tintas de alginato y coronta, unidos al cabezal dosificador de baja temperatura a 20°C. La tinta se extruye a través de una punta modificada (diámetro original de 0.41 mm) en una placa de Petri a temperatura ambiente. Para la tinta conformada por la proporción de 60:40 (coronta:alginato) se usa una velocidad de impresión de 15 mm/s y presión de extrusión de 1 bar, mientras que para la tinta de 70:30 (coronta:alginato), se utilizan 10 mm/s y 1,2 bar.

5.6. Incubación

La incubación, tanto del ladrillo como de la estructura impresa en 3D, se realiza en una caja plástica de 61L. Dentro de ella se colocan una placa calefactora de 35W en la base para mantener la temperatura óptima, un termostato y un higrómetro. Sobre la placa es necesario poner un vaso precipitado con agua esterilizada para asegurar la humedad requerida. El periodo de incubación fue de 3 semanas a una temperatura entre 25°C-30°C y con humedad sobre el 70 %.

5.7. Secado

Se seca el prototipo en la estufa a 60°C durante 24 horas para eliminar la humedad del sustrato y evitar su posterior descomposición.

5.8. Propiedades Mecánicas

Para determinar las propiedades mecánicas de los prototipos impresos con el biomaterial, se realizaron ensayos de tracción-deformación y compresión. Para el primer caso, se utilizó el equipo Instron®, modelo EMIC 23-5D con una tasa de alargamiento de 1 [mm/min]. En las pruebas de compresión uniaxial no confinada se utiliza una tasa de compresión de 0.5 mm/[min]. El equipo corresponde a una máquina de ensayo universal electromecánica WDW-S5 (Jinan Testing Equipment IE Corporation, China), equipada con una célula de carga de 5 kN.

Las probetas del biomaterial se obtuvieron directamente del prototipo seccionando partes de él. Se cortaron secciones rectangulares de 10 mm de largo y 6mm de ancho para los ensayos de elongación y se fabricaron geometrías cilíndricas con un diámetro de 9 mm y una altura de 3 mm para compresión. Se realizaron 3 pruebas para muestras conformadas sólo por sustrato y aglomerante, es decir, de la tinta pura y para muestras de la tinta colonizada por micelio. De este modo, se reportan el promedio y la desviación estándar de los módulos de Young y de compresión permitiendo comparar sus valores para ambos casos.

Capítulo 6

Resultados y Discusiones

A continuación se exponen los resultados obtenidos con sus respectivas discusiones para el desarrollo del biomaterial y su impresión en 3D.

Antes de poner en marcha la formulación de una tinta para su aplicación en 3D, se intentó replicar un ladrillo común de micelio. En primer lugar, se escogió un inóculo sólido comercializado como grano de centeno con micelio de *G. lucidum*.

En la Figura 6.1 se muestran el resultado esperado contrastado con los resultados obtenidos, de manera de apreciar la divergencia entre ellos. El ladrillo de referencia fue suministrado por el proveedor del inóculo y consistía en un material sólido, rígido y ligero. El MBC obtenido en el primer intento (ver Figura 6.1(b)) presentó bajas propiedades mecánicas, desarmándose fácilmente. La explicación encontrada es la naturaleza del sustrato utilizado. A diferencia del referente que estaba compuesto por aserrín de roble, se usó grano de centeno puesto que era el sustrato e inóculo disponible hasta entonces. El resultado no fue satisfactorio, por lo que se decidió realizar un segundo intento. En comparación con el prototipo referencial donde el micelio se encontraba completamente desarrollado, para este caso la colonización del micelio en el sustrato fue escasa, no pudiendo dar con un ladrillo (ver Figura 6.1(c)). Se estima que una solución factible para la situación podría ser la inoculación de aserrín de roble con el inóculo sólido de centeno, es decir, la mezcla de ambas materias orgánicas. De esta forma, se podrían haber obtenido mejores resultados en la colonización debido a una mejor aireación del medio de cultivo y la suplementación de la fuente de carbono principal (aserrín) con una fuente de nitrógeno (centeno) [49].

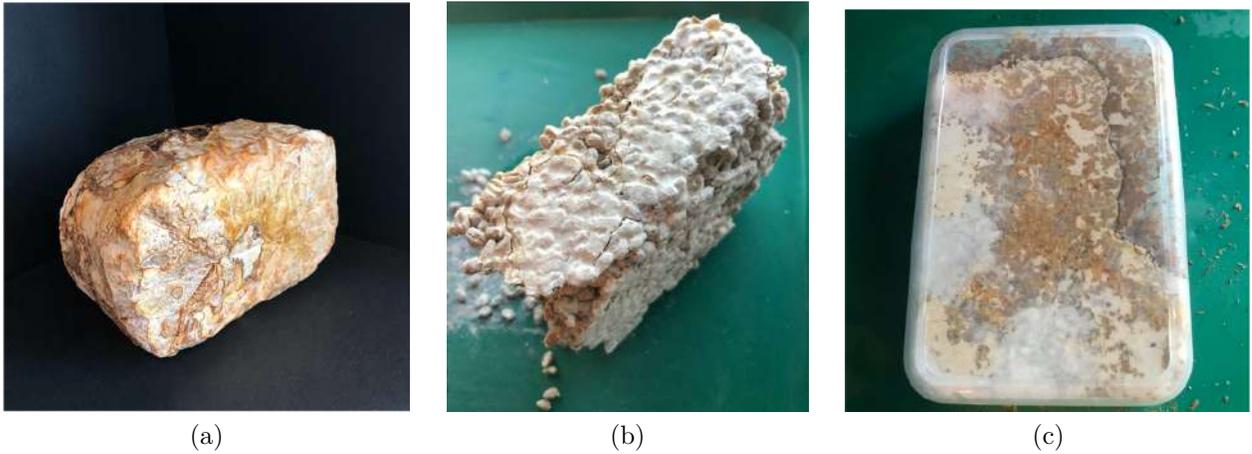


Figura 6.1: Imágenes de ladrillos de micelio con 4 semanas de incubación y tras un proceso de secado. (a) Ladrillo de referencia. Fabricado con aserrín de roble y micelio de *Ganoderma lucidum*. (b) Intento 1: Ladrillo de elaboración propia con grano de centeno y micelio de *Ganoderma lucidum*. (c) Intento 2: Ladrillo de elaboración propia con aserrín de roble y micelio de *Ganoderma lucidum*. Elaboración propia.

Un factor posible es la temperatura de incubación. La mayoría del periodo de incubación se encontró dentro de los valores óptimos para el hongo (25°C-30°C), pero la falta de control del montaje permitía que se escapara del rango, a veces bajando hasta 20°C en días fríos y aumentando hasta 31°C en los días más calurosos del verano. Aunque *G. lucidum* reporta crecimiento micelial en temperaturas entre 20°C-35°C, su elongación se ve afectada fuera de su óptimo [80]. Luego, la temperatura del cultivo era susceptible a la temperatura ambiental generando variaciones. En consecuencia, se cree que haya podido retrasar o inhibir el crecimiento del micelio.

Además, la humedad dentro de la incubadora no fue siempre la adecuada. En un principio, si la incubadora se dejaba cerrada de un día para otro, el higrómetro indicaba una humedad relativa del aire del 99%. Para solucionar este problema, se tuvo que ajustar el área de transferencia del vaso precipitado con agua introducido para que no se saturara el ambiente. A su vez, se dejó un orificio que permitiera la salida del vapor de agua. A pesar de lo anterior, la humedad con frecuencia estaba por sobre el 80%.

Junto con el problema de ventilación y aumento de la concentración de vapor de agua, aumentó también la concentración de dióxido de carbono (CO₂), producto de la respiración celular del hongo. La tasa de emisión depende del sustrato y especie, sin valores reportados para la coronta en particular. Sin embargo, se puede establecer que la fase de crecimiento micelial produce un mayor flujo de CO₂ por ser metabólicamente demandante [81]. Por consiguiente, se cree que se produjo un incremento del gas por sobre el óptimo (0.1%), sobresaturando el ambiente y frenando la colonización del sustrato. Otro factor importante es el suministro de O₂, tanto en el ambiente, como en el centro del sustrato. Es posible que el gas no haya permeado la materia orgánica, generando un déficit e impidiendo el óptimo crecimiento del hongo. Se proponen como soluciones proveer la incubadora de una correcta ventilación; desmoldar el biomaterial del contenedor al visualizar micelio (aproximadamente 2 semanas de incubación), de manera de permitir el ingreso de un flujo de aire a través de

otras secciones del compósito, como por ejemplo, los lados y base; o bien, construir moldes de materiales como rejillas. Para este último caso se debe considerar que el tamaño de la rejilla sea menor al de la partícula del sustrato para evitar un tamizado.//

6.1. Formulación de la tinta

En vista de los resultados desfavorables y dado los objetivos del trabajo de título, se decidió seguir adelante con una formulación de una pasta que permitiera su extrusión. Se probaron distintos aglomerantes¹² y sustratos de manera de evaluar su viscosidad y procesabilidad.

6.1.1. Reología de la tinta

En esta sección se detallan las pruebas realizadas para dar con un aglomerante adecuado.

Para comenzar se probó el quitosano en base a lo documentado por el trabajo de Soh et al. (2020) [6], anteriormente expuesto en la Sección 3.6. Se utilizaron soluciones de quitosano al 2%p/p y 3%p/p, disueltas en ácido acético al 1%, por ser las concentraciones que mostraron mejores resultados. En este caso, se eligió aserrín puro como sustrato, en vez de fibras de bambú inoculadas debido a la disponibilidad del aserrín en comparación con el bambú. Se prepararon dos tintas para cada concentración de quitosano con 2g de sustrato húmedo y quitosano siguiendo una proporción 70:30 en ambos casos. Como se puede apreciar en la Figura 6.2, los resultados difieren considerablemente de lo mostrado en la Figura 3.11. Aunque la extrusión de la pasta fue posible, los filamentos obtenidos no presentaron estabilidad estructural, puesto que inmediatamente después de finalizar su extrusión, escurrieron, perdiendo la forma inicial.

Se cree que el reemplazo del sustrato fue el causante de la pérdida de viscosidad, dado que el quitosano utilizado poseía las mismas características para ambas metodologías. En particular, puede deberse a las propiedades mecánicas de las fibras de bambú, contando con una alta tenacidad a la fractura [45]. Sumado a lo anterior, se encuentra el importante factor de que las fibras de bambú habían sido previamente enriquecidas con micelio de *Ganoderma lucidum*. Si bien la colonización fue sólo sobre el sustrato antes de la preparación del compósito, la estabilidad estructural también se le puede atribuir al entramado formado por el hongo. Así, se tendría una primera evidencia de la función aglomerante del micelio y su efecto en las propiedades mecánicas del biomaterial que constituye.

¹² Material utilizado con el propósito de mantener partículas sólidas unidas formando una masa coherente.

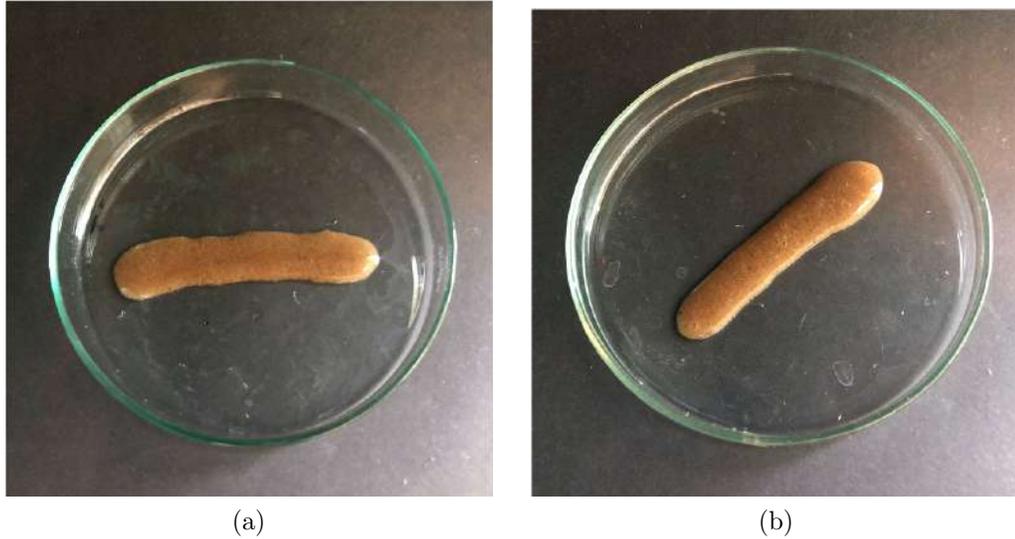


Figura 6.2: Imágenes de pruebas de extrusión manual para tintas de quitosano y aserrín. (a) Muestra de extrusión de la pasta hecha con quitosano al 2 %p/p. 30 % de sustrato (2g aserrín peso húmedo) y 70 % de quitosano. (b) Muestra de extrusión de la pasta hecha con quitosano al 3 %p/p. 30 % de sustrato (2g aserrín peso húmedo) y 70 % de quitosano. Elaboración propia.

A pesar de poder llevarse a cabo pruebas con aserrín enriquecido con el micelio, se decidió intentar con otro aglomerante, que permitiera evaluar su estabilidad sin necesidad de esperar 4 semanas de incubación. Por lo anterior, y por los resultados positivos encontrados para el alginato en impresión 3D, se decidió probar con este biopolímero. Por lo mismo, se comenzó con una solución de alginato al 4 %p/p y se entrecruzó con una solución de cloruro de calcio 0.1M. Sin embargo, los ensayos de extrusión para esta concentración mostraron que la viscosidad no era suficiente para mantener la forma, a diferencia de lo visto en la Sección 3.4 donde se expuso la exitosa impresión en 3D de un hidrogel de alginato al 4 %p/p. En la Figura 6.3 se muestra el polímero después de su extrusión en condiciones de reposo e inclinación, dejando en claro la falta de estabilidad. Una explicación probable es la escala de impresión (puntas de 0.3mm de diámetro interior) en comparación con la jeringa estándar utilizada para este caso haciendo que la hebra más gruesa colapsara. Se estima que puede deberse al colapso inherente a los hidrogeles de alginato puro, en comparación con la mejora de sus propiedades mecánicas con adición de celulosa [64]. Además, la estabilidad del gel está relacionada a la cantidad de enlaces de entrecruzamiento por unidad de volumen [82]. Luego, si se trata de una hebra más gruesa, los enlaces ocurren predominantemente en la superficie, reflejándose en un menor estabilidad estructural.



Figura 6.3: Imágenes de pruebas de extrusión manual para soluciones de alginato al 4%p/p. (a) Muestra entrecruzada y en reposo. (b) Muestra entrecruzada con inclinación. Elaboración propia.

En consecuencia, se subió la concentración para tres soluciones distintas a 10%p/p, 12%p/p y 14%p/p. En la Figura 6.4 se muestran imágenes del polímero al momento de ser extruído y es posible notar mayor estabilidad. De todos modos, para la concentración de 10% aún es necesaria más procesabilidad, como se aprecia para las otras dos concentraciones. Además, la solución más viscosa posee a la vez más elasticidad (Figura 6.4c), convirtiéndose en la alternativa escogida para la impresión. Es importante destacar que en la preparación del alginato al 14%, se percibe una consistencia gelificada, característica que suele afectar la imprimibilidad. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la pasta se forma con un sustrato húmedo y con un inóculo líquido, por lo que la presencia de agua disminuirá la viscosidad del hidrogel.

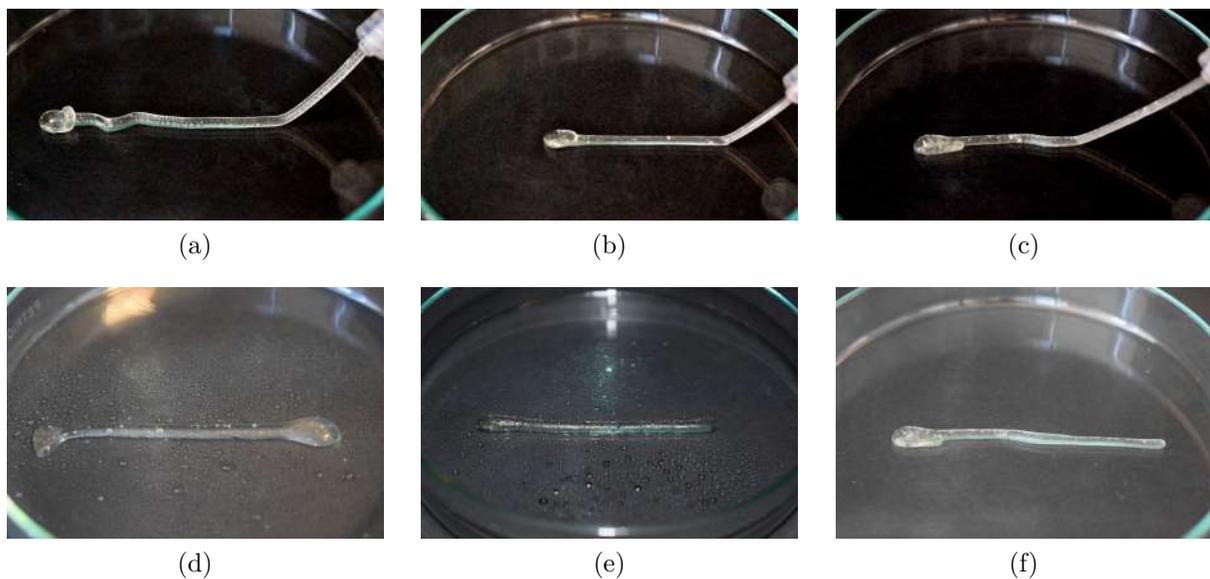


Figura 6.4: Imágenes de pruebas de extrusión manual para soluciones de alginato a distintas concentraciones. Al momento de la extrusión (a)-(c). (a) 10% p/p, (b) 12% p/p y (c) 14% p/p. Luego de entrecruzados con cloruro de calcio (d)-(f). (d) 10% p/p, (e) 12% p/p y (f) 14% p/p. Elaboración propia.

6.1.2. Extruibilidad de los sustratos

Posterior a la elección del aglomerante y encontrada la viscosidad necesaria, se procede a evaluar la extruibilidad de los posibles sustratos: aserrín de roble y coronta de maíz. Estos fueron elegidos en base a que el primero corresponde a un sustrato común para *Ganoderma* y, el segundo, por ser un residuo domiciliario y agroindustrial con un alto contenido de lignocelulosa como se detalla en la Sección 1.1.3. Se formulan tintas con tres proporciones distintas (ver Tabla 6.1) para los sustratos aserrín de roble y coronta, de manera de observar el efecto de ellos en la viscosidad y extruibilidad de la tinta. Se escoge fijar el contenido de sustrato en 20 gramos (peso húmedo) y variar el alginato de acuerdo a las formulaciones. El mínimo de sustrato se establece como un 50 % de la tinta ya que corresponde a la fuente de energía del hongo.

Tabla 6.1: Resumen de la composición de las tintas preparadas para las pruebas de extruibilidad del sustrato.

Proporciones sustrato:alginato	50:50	60:40	70:30
Sustrato [g]	20	20	20
Alginato [g]	20	13.4	8.6

Como se muestra en la Figura 6.5, para ambos casos se obtienen tintas imprimibles que además, no requieren de un entrecruzamiento con cloruro de calcio para mantener su estructura. La calidad de los filamentos extruídos para ambas tintas se puede fundamentar con la precisión documentada para biotintas formuladas en base a hidrogeles de alginato y aditivos de celulosa. Si bien, no poseen la fidelidad de los trabajos expuestos en la Sección 3.4, dado que no se trata de nanocelulosa, los hidrogeles de alginato puro mejoraron su estabilidad al mezclarse con el sustrato (lignocelulosa). No obstante, la coronta entrega un compósito de mayor estabilidad y procesabilidad, mientras que la tinta de aserrín tiende a disgregarse. Junto con el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina, existe presencia de almidón en la coronta, aunque en menor cantidad que en los granos del maíz [83]. No se sabe con exactitud el porcentaje, pero se estima que entre un 0.6 % y 6 % del peso seco de la coronta podría estar compuesto por almidón [84, 85], el que actúa como aglutinante, formando una masa semejante a la maicena. A esto también se le atribuye que la tinta de composición de 50 y 50, es decir, la con menor proporción de coronta, pero con mayor contenido de alginato, era menos viscosa que las demás, perdiendo su forma con mayor facilidad.

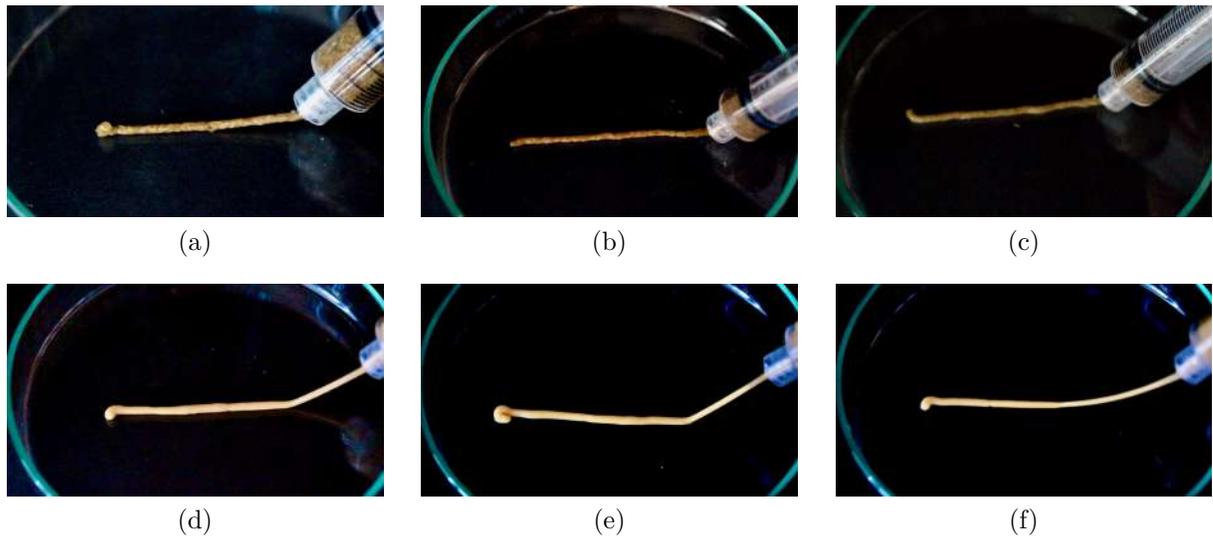


Figura 6.5: Imágenes de pruebas de extrusión manual para tintas formuladas con distintas proporciones de los sustrato y alginato. (a) 50 % aserrín y 50 % alginato, (b) 60 % aserrín y 40 % alginato, (c) 70 % aserrín y 30 % alginato, (d) 50 % coronta y 50 % alginato, (e) 60 % coronta y 40 % alginato, (f) 70 % coronta y 30 % alginato. Elaboración propia.

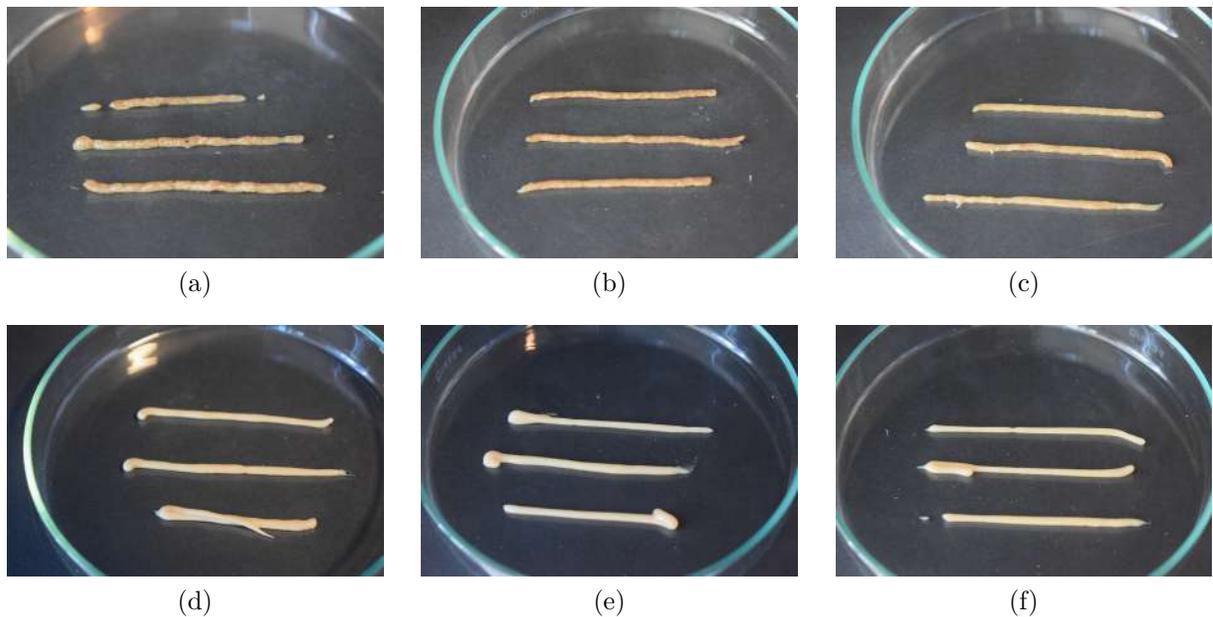


Figura 6.6: Imágenes de los filamentos tras 5 minutos de ser extruídos. (a) 50 % aserrín y 50 % alginato, (b) 60 % aserrín y 40 % alginato, (c) 70 % aserrín y 30 % alginato, (d) 50 % coronta y 50 % alginato, (e) 60 % coronta y 40 % alginato, (f) 70 % coronta y 30 % alginato. Elaboración propia.

La cualidad anteriormente comentada, también se pudo apreciar transcurrido un tiempo de cinco minutos desde la extrusión. Tanto las hebras de aserrín (Figura 6.6(a)-(c)), como las de coronta (Figura 6.6(d)-(f)) mantuvieron su estructura, sin embargo los hidrogeles en base a maíz conservaron sus propiedades físicas. Por el contrario, comenzaron a deshidratarse, situación que se hizo aún más crítica después de una hora (ver Figura 6.7). Dado que el roble

es una madera poco porosa, de poca permeabilidad y baja absorción de agua [86] se precisa que la mezcla tenía un menor contenido de agua, explicando la deshidratación observada para el compuesto con aserrín. Por el contrario, la coronta es capaz de absorber hasta cuatro veces su peso seco [87].



Figura 6.7: Muestra de las tintas preparadas con alginato al 14 % p/p y aserrín en proporciones 50:50, 60:40 y 70:30 (desde arriba hacia abajo) una hora después de la extrusión. Elaboración propia.

6.2. Preparación de la biotinta

De acuerdo con lo expuesto en la sección anterior, se escogió llevar a cabo una biotinta en base a coronta y alginato con una concentración del 14 %p/p. Se siguió adelante con las proporciones 60:40 y 70:30 ya que obtuvieron mejores resultados en las pruebas de extruibilidad. Esta parte del trabajo de laboratorio contempla la humectación del sustrato, esterilización, inoculación, primera incubación y preparación del compuesto.

Se trabajó con un inóculo líquido debido a tres principales ventajas frente al inóculo sólido:

1. **Disponibilidad inmediata.**
2. **Mayor tiempo de duración:** Se puede tener hasta 6 meses refrigerado a diferencia del sólido que debía usarse hasta 10 días desde que era recibido.
3. **Versatilidad:** Al ser una suspensión de esporas, se puede inocular cualquier sustrato que se deseara. En consecuencia, permitió que se usara el polvo de coronta (tamaño de partículas entre 100-200 μm) asegurando su extrusión por la boquilla. En cambio, no habría sido posible con el sustrato sólido, pues el grano no puede ser extruído por los tamaños de puntas disponibles para la impresora y molerlo una vez crecido el micelio, destruye sus células inhabilitando su colonización.

En primera instancia, se utilizó 1ml por cada 20 gramos de coronta (peso húmedo) para asegurar el crecimiento del hongo. Sin embargo, en varias ocasiones no se observó aparición

de micelio de *G. lucidum* sino que resultó en la contaminación del sustrato. Se debe dar énfasis a que dado que los viales no son comercializados por laboratorios ni profesionales del área de biotecnología o micología, no se asegura que la concentración sea la óptima. Además, no era posible inocular con un mayor volumen ya que implicaría agregar más agua a la tinta, disminuyendo su viscosidad y, por ende, la imprimibilidad. Entonces, se decide realizar un conteo de esporas para verificar la concentración de ellas en los viales adquiridos. El procedimiento se llevó a cabo con una Cámara de Neubauer y un microscopio (Leica modelo 020-520.007 con la cámara Leica MC 170 HD) y se calcula la concentración mediante la Ecuación 6.1.

$$\text{Concentración [esporas/ml]} = \frac{\text{número de células} \cdot 10.000}{4} \quad (6.1)$$

De acuerdo a lo anterior, se obtuvo que la solución poseía aproximadamente 10^4 [esporas/ml], valor inferior a lo recomendado. Luego, se opta por concentrar la suspensión del vial, tomando los 5ml de solución para centrifugarla por dos minutos en una microcentrífuga (RFC=2680xg). Se descartó el sobrenadante y resuspendió el pellet formado en un volumen de agua estéril de $500 \mu\text{L}$ que luego se utilizó como inóculo sobre el sustrato. De acuerdo a la Ecuación 6.2, el solución ahora debería contar con una concentración de 10^5 [esporas/ml], permitiendo una inoculación efectiva y sin afectar la viscosidad de la tinta. Todos los cálculos realizados se detallan en el Anexo A.1.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (6.2)$$

Producto de la inoculación, pasadas 48 horas de incubación es posible ver la aparición de micelio primario en el sustrato, mostrado en la Figura 6.8. Con ello, se comprueba que el método de inoculación fue efectivo y se descarta la posibilidad de contaminación hasta este punto. A partir de este sustrato, se procede a preparar las biotintas mezclando con alginato al 14% y en las proporciones de la Tabla 6.2.

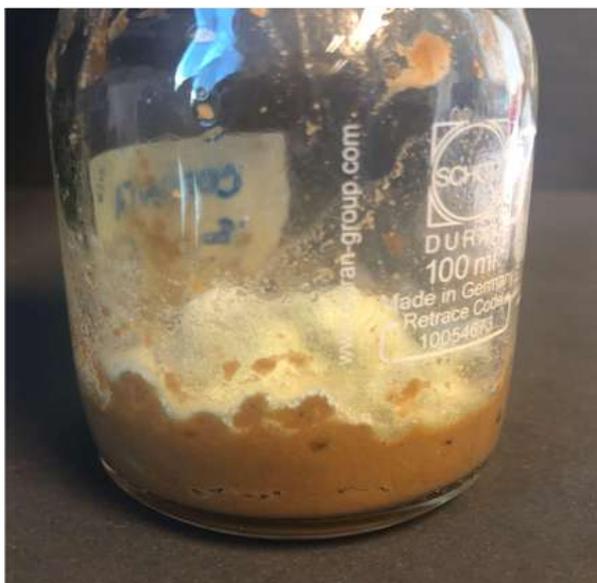


Figura 6.8: Imagen del sustrato (coronta de maíz) después de dos días de incubación. Elaboración propia.

Tabla 6.2: Resumen de la composición de las biotintas formuladas.

Proporciones sustrato:alginato	60:40	70:30
Coronta [g]	20	20
Alginato [g]	13.4	8.6

Si bien el sustrato y agua desionizada que se utilizaron para la biotinta fueron autoclavadas, este mismo procedimiento no se pudo realizar para el alginato. Al sacar la solución de aglomerante del autoclave se pudo observar que la viscosidad era menor a la inicial, producto de que la cadena polimérica del alginato se rompiera por efecto de los flujos de temperatura dentro del autoclave [65]. En base a los resultados observados, se decidió esterilizar el polvo de alginato mediante radiación UV por 20 minutos en la misma campana de bioseguridad que se trabajó para preparación del compuesto. Entonces, la solución se preparó con el polvo estéril y agua desionizada autoclavada a 121 °C por 20 minutos.

6.3. Impresión del prototipo

Se puede determinar que esta parte fue la más difícil de implementar ya que contempla los puntos críticos del proceso. La principal problemática que se enfrentó en el desarrollo fue mantener la esterilidad en el ambiente y lugares de trabajo, ambas cruciales a lo largo de las etapas de impresión e incubación.

La impresora 3D Bioplotter (proyecto Fondecap EQM 140012) se encuentra ubicada en el Laboratorio de Docencia dentro del Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB) de la facultad. Este es un espacio poco estéril y controlado, ya que además de trabajar con bacterias, microalgas y otros hongos, existe un gran flujo de personas constantemente. Las

dimensiones del equipo son muy grandes como para usarla dentro de una campana de seguridad, ni tampoco se contaba con campanas de flujo laminar de mayor profundidad y altura para poder instalar la bioimpresora. Dicho lo anterior, se ideó una forma de resguardar la impresora y la impresión para que la esterilidad no se viese perjudicada.

Se construyó una estructura para recubrir el equipo completo y así, en medida de lo posible, aislarlo del ambiente contaminante. Lo materiales usados fueron Film transparente de PVC, tubos de PVC de 25mm de diámetro, codos esquineros de polipropileno de 25mm de diámetro (Koalition) y guantes de neopreno para caja seca (Merck) que permitieran manipular las muestras dentro. Con los tubos y codos se arma un cubo que luego es cubierto por el film, de manera de sellar el espacio (ver Figura 6.9).



(a)



(b)

Figura 6.9: Fotos de la estructura instalada sobre la impresora 3D para resguardar la esterilidad del lugar. (a) Sin estructura (b) Con estructura. Elaboración propia.

Al mismo tiempo, debido a que la impresora 3D Bioplotter está diseñada para investigación en el campo de ingeniería de tejidos, las boquillas para las jeringas de extrusión van desde los diámetros 0.1mm - 0.51mm (diámetro interno). A pesar de que el tamaño de partícula del sustrato después de la molienda era entre 100-200 μm , la tinta no era capaz de ser extruída incluso usando la punta más ancha disponible en el laboratorio (0.41 mm). Por lo anterior, se optó por cortar una de las puntas por la mitad, alcanzando un mayor grosor. Sin embargo, a la hora de probarla en la impresora la boquilla era muy corta, traducándose en un error en la calibración del equipo en el eje z (altura). Entonces, se pegaron dos puntas, ambas cortadas por la mitad, de manera de conseguir el largo de una boquilla original.

Cabe destacar que el fin del biomaterial no requiere de una resolución pequeña como la ingeniería de tejidos, por lo que tampoco era necesario utilizar una boquilla delgada, es de-

cir, no se considera como una desventaja de la tinta requerir de adaptar la punta de jeringa. Incluso, en un futuro se pretendía seguir aumentando el diámetro de extrusión obteniendo resultados aún más favorables.

Una vez abordadas las problemáticas, es viable imprimir sin mayor riesgo de contaminación. Por un lado, se tiene la impresión del prototipo en sí con las tintas de mayor contenido de sustrato escogidas en base a la viscosidad que se percibió. Hasta este punto, todas las decisiones para la formulación de la biotinta habían sido cualitativas. Cuando se comenzó con la impresión y se ajustaron los parámetros se pudo evidenciar cuantitativamente la diferencia entre la reología. Como es posible ver en la Tabla 6.3, para un mayor contenido de coronta, se necesitó más presión de extrusión, pues como se comentó anteriormente, la viscosidad era mayor. Sin embargo, al incrementar la presión se debió imprimir a una menor velocidad ya que la extrusión se hacía más forzosa y afectaba la precisión.

Tabla 6.3: Parámetros utilizados para la impresión en Bioplotter 3D con las tintas de proporciones en peso 60:40 y 70:30.

Proporciones sustrato:alginato	60:40	70:30
Velocidad de impresión [mm/s]	15	10
Presión de extrusión [bar]	1	1.2

Por otro lado, se encuentra la correcta incubación para potenciar la colonización del micelio en la estructura una vez impresa. Pese a que es posible apreciar colonización en los prototipos de la Figura 6.10, aún se pueden ver zonas de él donde no se desarrolló micelio. Dado que la fuente de carbono utilizada estaba reportada como una viable para *G. lucidum* (Sección 2), se intenta dar con otras explicaciones para la falta de crecimiento. Se considera importante detenerse en el escaso crecimiento en la estructura impresa con la tinta con proporción 70:30 (Figura 6.10 (b)), dado que al tener un mayor contenido de sustrato respecto a alginato, se esperaba que el crecimiento fuera mayor. De todos modos, esta tinta presenta mayor encogimiento que la tinta formulada con proporciones 60:40 tras el tiempo de incubación, pudiendo tratarse de una mayor deshidratación del hidrogel que haya inhibido el crecimiento.

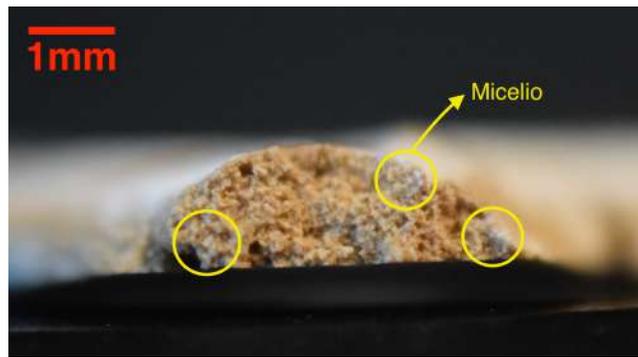


Figura 6.10: Muestra de los prototipos impresos con tintas en base a coronta de maíz y alginato al 14 % p/p, después de 3 semanas de incubación. Se observa el micelio en blanco. (a) Tinta con proporción 60:40 (sustrato:alginato). (b) Tinta con proporción 70:30 (sustrato:alginato). Elaboración propia.

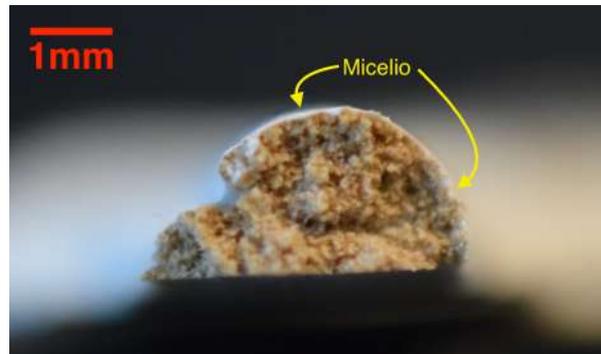
Al igual que lo argumentado en un principio, el escaso crecimiento se pudo deber a los problemas en la temperatura, humedad y saturación de CO_2 durante la incubación. A su vez, el crecimiento no sólo se ve afectado por la falta de oxigenación en el ambiente sino que a su vez, la baja disponibilidad de oxígeno en el medio dificulta la penetración del micelio en el sustrato [41]. Es decir, la porosidad del compuesto determinará si habrá crecimiento en la superficie donde hay fácil acceso al oxígeno o si será capaz de crecer hacia el seno del sustrato. Este fenómeno se puede visualizar en la Figura 6.11, donde se puede apreciar una colonización superficial y levemente hacia el centro. Entonces, se infiere que el hidrogel no posee una porosidad suficiente como para permitir la permeación del gas hacia el seno y aireación adecuada, coincidiendo así con que los hidrogeles de alginato tienen poros pequeños que no permiten el movimiento de las células [88].

Sumado a lo anterior, se pudo apreciar que el alginato sufrió una deshidratación que detuvo el crecimiento por completo en las primeras dos semanas. En este punto se decidió parar la incubación y secar el prototipo en la estufa. Dado que una mayor cantidad de entrecruzamiento genera menos hinchamiento y menor difusión de oxígeno en el hidrogel [60], se habría esperado que en ausencia de entrecruzante, como se trabajó en este caso, resultara en una estructura con mejor conservación de su hidratación y aireación. La pérdida de la integridad de los prototipos pueden deberse a la alta concentración de alginato en la tinta que a su vez puede ser perjudicial para la proliferación celular [69]. Basado en lo último, también se puede explicar la falta de crecimiento en la estructura hecha con la tinta de mayor contenido de coronta (70:30) como fue mencionado anteriormente.

Pese a que el tiempo fue menor a las 4 semanas presupuestadas para la incubación, se pudo ver que en la mitad del tiempo ya había colonización casi en la superficie completa. Esto se lo puede atribuir al tamaño de partícula del sustrato ($100\mu\text{m}$ - $200\mu\text{m}$), permitiendo asimilar con mayor facilidad los azúcares y la propagación del entramado [6].



(a)



(b)



(c)

Figura 6.11: Imágenes en detalle de secciones del prototipo para mostrar la penetración del micelio (superficie blanca) en el sustrato. (a) Sección transversal 1. (b) Sección transversal 2. (c) Sección transversal 3. Elaboración propia.

Las dificultades que se presentaron a la hora de una óptima incubación del prototipo, perjudicaron el crecimiento del micelio. A su vez, la tinta perdió hidratación y su baja porosidad afectaron la fase de elongación. Por consiguiente, se proponen nuevas formulaciones para la tinta, por ejemplo, agregando yeso al compuesto por las siguientes razones: provee al cultivo de sales inorgánicas (calcio), aumenta la porosidad y ventilación del sustrato [41], actúa como aglutinante y, finalmente, puede producirse a partir de residuos, siendo un relleno carbono neutral o incluso negativo [89]. Así, no se estaría perdiendo el foco sustentable del proyecto. Sin embargo, la presencia de sulfato de calcio en la tinta produciría un entrecruzamiento previo a la extrusión, aumentando la viscosidad [90]. En consecuencia, se puede predecir que se deberá disminuir la concentración de la solución de alginato.

De todos modos, es destacable que fue posible dar con una formulación para una biotinta que permitiera la biofabricación de un material. La tinta obtenida no sólo fue extruible, sino que evidenció poder sostener la proliferación celular y permitir el crecimiento del micelio del hongo filamentoso. En base a todos los resultados obtenidos y expuestos, se construye un diagrama de bloques que representa el proceso completo, desde la preparación de la biotinta hasta la extrusión, como se muestra en la Figura 6.12.

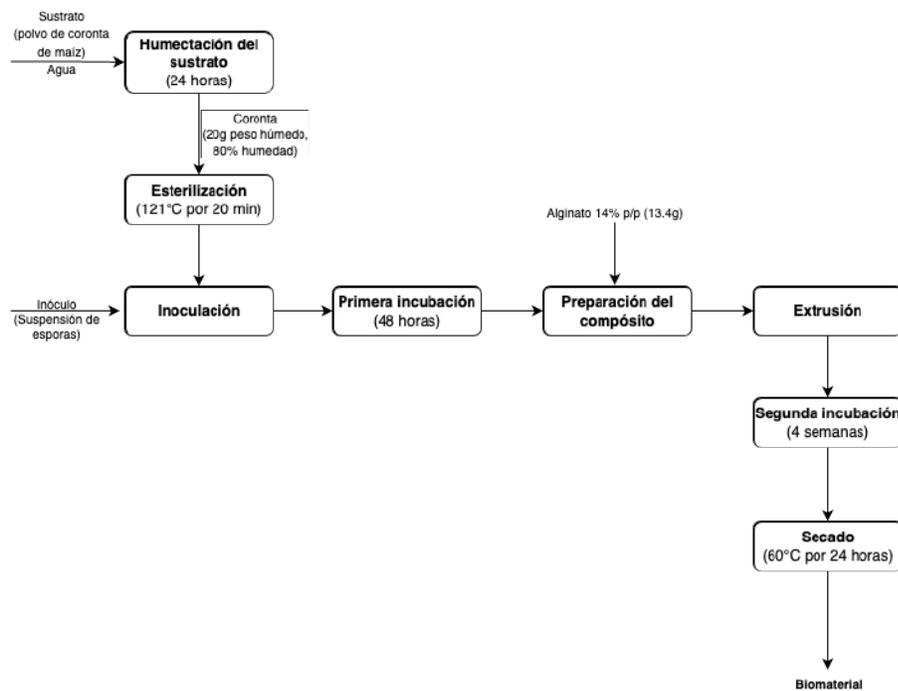


Figura 6.12: Diagrama de bloques del proceso de fabricación del biomaterial con impresión 3D. Elaboración propia.

6.4. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas documentadas para los compósitos impresos de micelio, indicaban que por ahora sólo serían apropiados para el uso en aplicaciones no estructurales, debido a la fragilidad asociada a su fabricación por impresión 3D [6]. Para cuantificar sus propiedades y evidenciar posibles mejoras, se realizaron ensayos de tracción-deformación y compresión para el biomaterial desarrollado.

En la Figura 6.13 se muestran las curvas obtenidas del ensayo de tracción-deformación para el material en estado puro, es decir, sin colonización de micelio y posterior a la colonización. A partir de la sección lineal de ellas, se calcularon los módulos de Young respectivos y la carga máxima de rotura, ambos valores representados en los gráficos de la Figura 6.14.

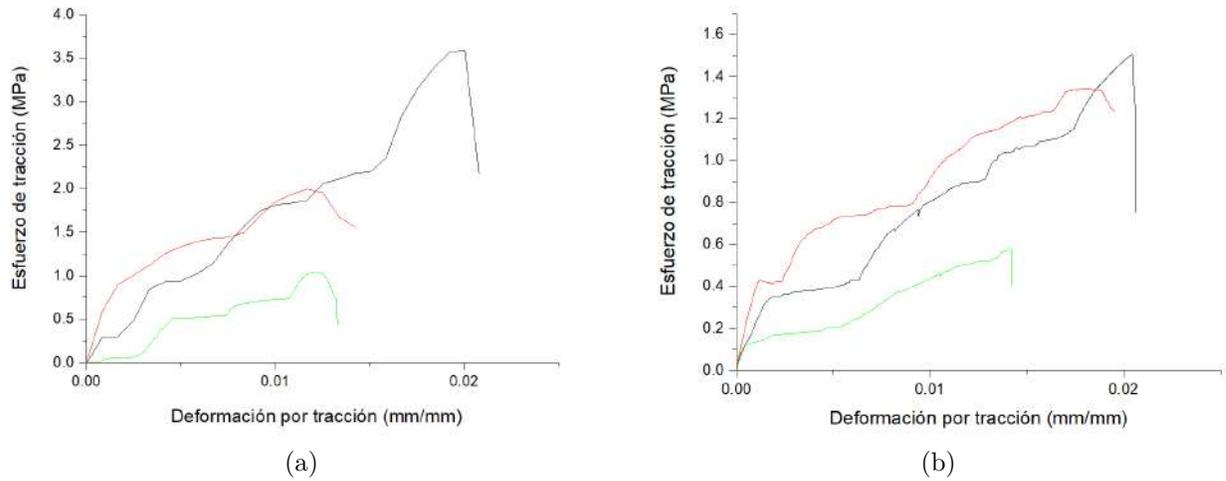


Figura 6.13: Curvas de los ensayos de tracción-deformación para el biomaterial compuesto por coronta de maíz. (a) antes de la colonización (sin micelio) y (b) después de la colonización (con micelio). Elaboración propia.

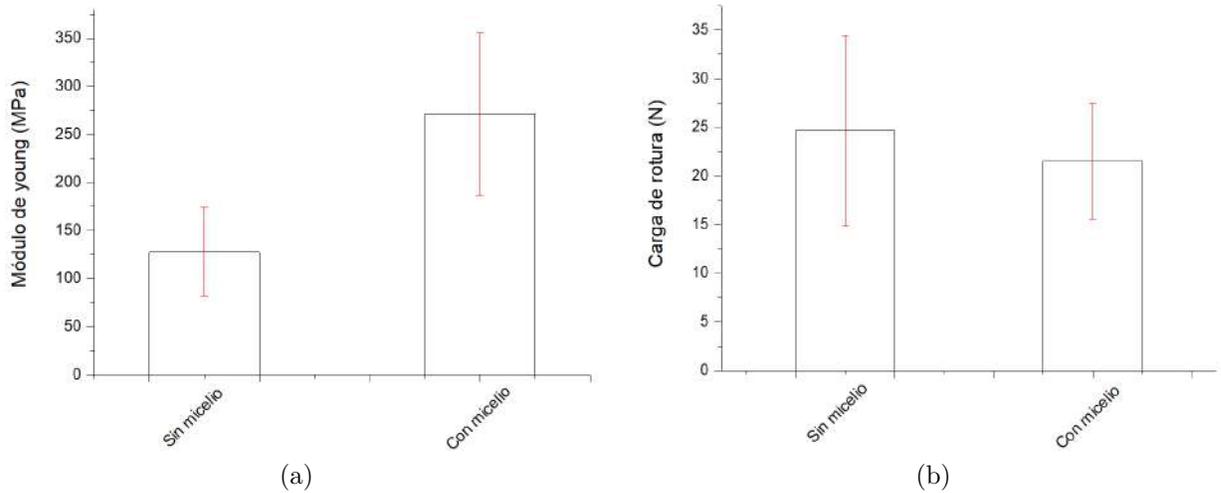


Figura 6.14: Resultados ensayos de tracción-deformación para prototipos impresos en 3D colonizados (con micelio) comparados con impresión de sustrato/aglomerante puro (sin micelio). (a) Módulo de Young. (b) Carga máxima. Elaboración propia.

En la Figura 6.15 se muestran las curvas obtenidas para el ensayo de compresión realizado sobre el biomaterial. Al igual que para las pruebas de elongación, a partir de ellas se calculan los módulos de compresión. Los resultados del módulo de compresión se grafican en la Figura 6.16.

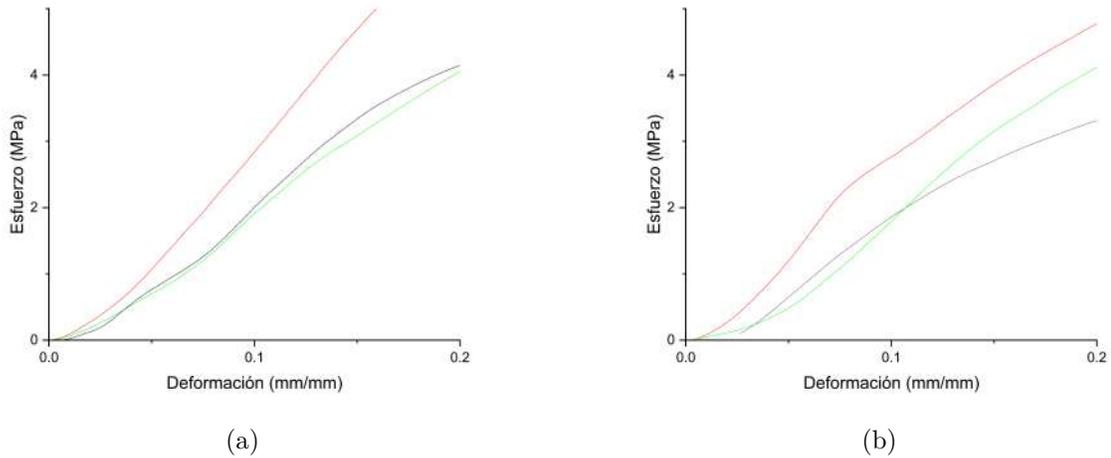


Figura 6.15: Curvas de los ensayos de compresión para el biomaterial compuesto por coronta de maíz y alginato. (a) antes de la colonización (sin micelio) y (b) después de la colonización (con micelio). Elaboración propia.

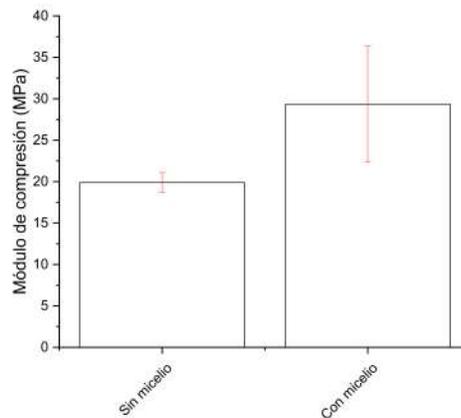


Figura 6.16: Resultados ensayo de compresión para prototipos impresos en 3D colonizados por micelio comparados con impresión de sustrato/aglomerante puro (sin micelio). Elaboración propia.

En base a los resultados resumidos en las Tablas 6.4 y 6.5, se distingue en primer lugar, un aumento en los módulos tanto de elasticidad como de compresión en presencia de micelio. El valor del módulo de Young para el material con micelio es aproximadamente el doble que en el caso inicial (sin micelio), mientras que el de compresión refleja un aumento cercano al 45%. Las propiedades mecánicas del material sin micelio se deben a la presencia de lignocelulosa, cuyas fibras se entrelazan entre ellas y a la función aglomerante del alginato [53]. Por lo anterior, se cree que la lignocelulosa y almidón de la coronta sirven como reforzamiento estructural para un hidrogel de alginato dado que no colapsó. Luego, el incremento evidenciado es un indicio de las propiedades aglomerantes propias del micelio, por lo que su presencia efectivamente actúa como aglutinante, mejorando las propiedades producto de la colonización.

Es importante detenerse en el valor de la desviación estándar para los dos casos expuestos. Es fácil notar que el rango es amplio, indicando a su vez que los valores obtenidos para los módulos de Young se encuentran dispersos (ver Figura 6.14). La explicación consiste en que la geometría de las probetas utilizadas no era homogénea ya que eran fragmentos del prototipo, variando en ancho y espesor. Este comportamiento también se puede apreciar en la Figura 6.16, aunque en menor medida. De todas formas, pese al desvío, sigue habiendo un incremento en la elasticidad y compresión del material. Mediante un análisis estadístico ($t > 0.05$) se determina que los datos no son significativos, independiente de la tendencia al aumento de las propiedades. En cuanto a los valores de la carga máxima de rotura, se puede ver que una disminución para el material con micelio. Sin embargo, la diferencia no es significativa y se encuentra dentro de un margen de error aceptable.

Tabla 6.4: Resumen de los resultados de ensayos de tracción-deformación.

	Módulo de Young [MPa]	Carga máxima [N]
Sin micelio	$128,1 \pm 46,9$	$24,6 \pm 9,7$
Con micelio	$271,0 \pm 84,6$	$21,5 \pm 5,9$

Tabla 6.5: Resumen de los resultados de ensayos de compresión.

	Módulo de compresión [MPa]
Sin micelio	19.9 ± 1.2
Con micelio	29.4 ± 7.0

Además, se compararon los módulos de Young (elasticidad) del prototipo impreso con los reportados y expuestos en la Sección 3.6. De acuerdo a la bibliografía, en particular en la Figura 3.13, los módulos se encuentran en el rango 10^{-1} - 10^1 MPa para MBC extruídos. En cambio, los valores obtenidos del ensayo de tracción-deformación son del orden de 10^2 MPa (ver Tabla 6.4). Pese a que se trata de un aumento a lo menos de un orden de magnitud, se debe caer en cuenta en la deformación sufrida por la probeta. Para el caso del prototipo se obtiene una deformación de fractura de 0.02 [mm/mm], o bien del 2%, considerablemente menor en contraste con el intervalo de 15%-25% mostrado en esta misma figura [6]. De todos modos, la diferencia en la capacidad de deformación entre la estructura biofabricada y los valores reportados se explica por la escasa colonización del micelio hacia el seno del sustrato. Dado que en el prototipo impreso e incubado se vio una detención del crecimiento del hongo, es de esperarse que sus propiedades mecánicas sean inferiores.

A su vez, se decidió cuantificar la resistencia a la compresión ya que se considera una propiedad de interés para la aplicación del biomaterial en áreas de la arquitectura y construcción. Como se muestra en la Figura 3.14 (Sección 3.6), dicha propiedad depende fuertemente de la fabricación del compuesto, pudiendo dar con módulos entre 10^{-2} - 10^4 MPa. Si se compara el módulo obtenido (10^1 MPa) con el de compresión cercano a 10^{-1} MPa de Soh et al. (2020) [6], se nota un incremento de dos órdenes de magnitud. Luego, al igual que para el módulo elástico, el resultado obtenido es mayor. No obstante, las comparaciones entre valores no puede hacerse de manera directa, dado que están sujetos a diferencias de metodologías al

no usarse una norma predeterminada, variaciones geométricas de las probetas construidas, en los tipos de sustratos utilizados y del biomaterial en sí. Sin embargo, la explicación más adecuada se considera la falta de calcinación o etapa de secado posterior a la extrusión de las fibras de bambú. En consecuencia, las pruebas mecánicas se realizaron sobre un material similar a una gelatina, reflejándose en valores mínimos para el módulo.

Se estima importante hacer hincapié en la desviación entre los módulos de Young de elasticidad y compresión obtenidos (revisar Tabla 6.4 y Tabla 6.5). Podría explicarse por el alineamiento de las fibras del micelio a favor del sentido de la carga. Ante fuerzas compresivas podría provocarse un fenómeno de pandeo, incrementando los esfuerzos que se generan en las fibras y provocando su colapso. Por lo tanto, si se considera que las fibras presentan algún grado de orden en el compósito, se espera que la resistencia a la tracción sea considerablemente mayor que a la compresión. Es más, Islam et al. (2017) [91], pudo ver que para deformaciones mínimas sobre una red micelial, la rigidez tracción y compresión era la misma. A medida que aumenta la carga y deformación, el módulo de compresión se estabiliza, mientras el de elongación continúa aumentando. Este comportamiento coincide con la hipótesis descrita anteriormente.

Por último y conforme con los resultados, la mejora en las propiedades mecánicas se deben al efecto del entramado, si se comparan los casos con y sin micelio. Además, se estima que se logró un avance en la fabricación de compósitos de micelio por impresión 3D, aportando en pos de la optimización del biomaterial. Aún así, dada la resistencia de un MBC producido por dicho método, sólo son apropiados para usos no estructurales. Para ampliar sus aplicaciones, se incita a continuar con sucesivas mejoras, de manera de optimizar las materias primas y el proceso en sí.

Capítulo 7

Conclusiones y Proyecciones

A partir de un análisis cualitativo de la reología de una solución de alginato, se formuló una biotinta con polvo de coronta como sustrato para el soporte del crecimiento del hongo filamentoso *Ganoderma lucidum*. Los aspectos críticos de la investigación radicaron en la mantención de la esterilidad del ambiente y en asegurar la proliferación del organismo. Pese a las dificultades enfrentadas, se logró crear una biotinta extruible y obtener una estructura colonizada por micelio. Así, se valida la fabricación de un MBC mediante impresión 3D.

Mediante ensayos de propiedades mecánicas, se evidenció cómo la presencia del hongo aportó a su mejora. En cuanto a la elasticidad del material, cuantificada por ensayos de tracción-deformación, se pudo ver un aumento del 110 % y para la resistencia a la compresión, un incremento de más del 45 %, en ambos casos gracias al crecimiento del micelio. De todas formas, los resultados no son directamente homologables con las propiedades reportadas por diferencias en la colonización y de metodologías. Así, se puede establecer que el perfeccionamiento de la etapa de incubación en el proceso, conllevará a un mejor crecimiento micelial que a su vez, beneficiaría las propiedades mecánicas del biomaterial.

Con todo lo anterior, se concluye que fue posible desarrollar un biocompósito en base a micelio del hongo filamentoso *G. lucidum*. A su vez, se cumplió con el objetivo de revalorizar un residuo orgánico rico en lignocelulosa como la coronta para su uso como sustrato. Así, se aporta a la ampliación de la aplicabilidad del un compósito de micelio, proponiendo un método de manufactura versátil como la impresión 3D. De acuerdo a los resultados favorables que se obtuvieron, es posible constatar el cumplimiento de los objetivos del trabajo de investigación.

En cuanto a proyecciones del trabajo, se estima que con estudios sucesivos se podrá optimizar el biomaterial compuesto de micelio y sus propiedades mecánicas, pudiendo dar con distintas formulaciones e incluso la revalorización de otros residuos asociados a la actividad humana. Consecuentemente, no sólo se ampliarían las aplicaciones del material producto de la posibilidad de elaborar estructuras complejas, sino que permitiría su uso para fines estructurales también. Finalmente, este nuevo material permite abordar el impacto de la industria de la construcción con una solución sustentable basado en una economía circular.

Capítulo 8

Nomenclatura

- mm: Milímetro
- ml: Mililitro
- μm : Micrómetro
- MBC: *Mycelium Bound Composite*
- MPa: Mega Pascales
- PVA: Polivinil alcohol
- PLA: Ácido poliláctico
- PVOH: Alcohol polivinílico
- PCL: Policaprolactona
- MF: Microfibras de celulosa
- CNF: Nanofibras de celulosa
- CNC: Celulosa nanocristalina

Bibliografia

- [1] Sizirici, B., Fseha, Y., Cho, C.-S., Yildiz, I., y Byon, Y.-J., “A review of carbon footprint reduction in construction industry, from design to operation,” *Materials*, vol. 14, no. 20, p. 6094, 2021, [doi:10.3390/ma14206094](https://doi.org/10.3390/ma14206094).
- [2] Almeida, P. R. D., Solas, M. Z., Renz, A., M.M. Bühler, Gerbert, P., Castagnino, S., y Rothballer, C., “Shaping the future of construction: a breakthrough in mindset and technology,” 2016, [doi:10.13140/RG.2.2.21381.37605](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.21381.37605).
- [3] Papadaki, D., Nikolaou, D. A., y Assimakopoulos, M. N., “Circular environmental impact of recycled building materials and residential renewable energy,” *Sustainability*, vol. 14, no. 7, p. 4039, 2022, [doi:10.3390/su14074039](https://doi.org/10.3390/su14074039).
- [4] Ruuska, A. y Häkkinen, T., “Material efficiency of building construction,” *Buildings*, vol. 4, no. 3, pp. 266–294, 2014, [doi:10.3390/buildings4030266](https://doi.org/10.3390/buildings4030266).
- [5] Cerimi, K., Akkaya, K. C., Pohl, C., Schmidt, B., y Neubauer, P., “Fungi as source for new bio-based materials: a patent review,” *Fungal Biology and Biotechnology*, vol. 6, no. 1, p. 17, 2019, [doi:10.1186/s40694-019-0080-y](https://doi.org/10.1186/s40694-019-0080-y).
- [6] Soh, E., Chew, Z. Y., Saeidi, N., Javadian, A., Hebel, D., y Le Ferrand, H., “Development of an extrudable paste to build mycelium-bound composites,” *Materials & Design*, vol. 195, p. 109058, 2020, [doi:10.1016/j.matdes.2020.109058](https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.109058).
- [7] Ghazvinian, A., Farrokhsiar, P., Vieira, F., Pecchia, J., y Gursoy, B., “Mycelium-based bio-composites for architecture: assessing the effects of cultivation factors on compressive strength,” en *Blucher Design Proceedings*, (Porto, Portugal), pp. 505–514, Editora Blucher, 2019, [doi:10.5151/proceedings-ecaadesigradi2019_465](https://doi.org/10.5151/proceedings-ecaadesigradi2019_465).
- [8] Haneef, M., Ceseracciu, L., Canale, C., Bayer, I. S., Heredia-Guerrero, J. A., y Athanassiou, A., “Advanced materials from fungal mycelium: fabrication and tuning of physical properties,” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 41292, 2017, [doi:10.1038/srep41292](https://doi.org/10.1038/srep41292).
- [9] Paul, S. y Joshi, S. R., “Industrial perspectives of fungi,” en *Industrial Microbiology and Biotechnology* (Verma, P., ed.), pp. 81–105, Singapore: Springer Singapore, 2022, [doi:10.1007/978-981-16-5214-1_3](https://doi.org/10.1007/978-981-16-5214-1_3).
- [10] Copetti, M. V., “Fungi as industrial producers of food ingredients,” *Current Opinion in Food Science*, vol. 25, pp. 52–56, 2019, [doi:10.1016/j.cofs.2019.02.006](https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.02.006).
- [11] Finnigan, T. J., Wall, B. T., Wilde, P. J., Stephens, F. B., Taylor, S. L., y Freedman, M. R., “Mycoprotein: the future of nutritious nonmeat protein, a symposium review,” *Current Developments in Nutrition*, vol. 3, no. 6, p. 3006010, 2019, [doi:10.1093/cdn/nz021](https://doi.org/10.1093/cdn/nz021).
- [12] Venturella, G., Ferraro, V., Cirlincione, F., y Gargano, M. L., “Medicinal mushrooms:

- bioactive compounds, use, and clinical trials,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 2, p. 634, 2021, [doi:10.3390/ijms22020634](https://doi.org/10.3390/ijms22020634).
- [13] Freitas, M., Souza, P., Cardoso, S., Cruvinel, K., Abrunhosa, L. S., Ferreira Filho, E. X., Inácio, J., Pinho, D. B., Pessoa, A., y O. Magalhães, P., “Filamentous fungi producing l-asparaginase with low glutaminase activity isolated from brazilian savanna soil,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 8, p. 1268, 2021, [doi:10.3390/pharmaceutics13081268](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081268).
- [14] Jones, M., Gandia, A., John, S., y Bismarck, A., “Leather-like material biofabrication using fungi,” *Nature Sustainability*, vol. 4, no. 1, pp. 9–16, 2020, [doi:10.1038/s41893-020-00606-1](https://doi.org/10.1038/s41893-020-00606-1).
- [15] Williams, E., Cenian, K., Golsteijn, L., Morris, B., y Scullin, M. L., “Life cycle assessment of MycoWorks’ Reishi™: the first low-carbon and biodegradable alternative leather,” *Environmental Sciences Europe*, vol. 34, no. 1, p. 120, 2022, [doi:10.1186/s12302-022-00689-x](https://doi.org/10.1186/s12302-022-00689-x).
- [16] Deshmukh, R., Khardenavis, A. A., y Purohit, H. J., “Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation,” *Indian Journal of Microbiology*, vol. 56, no. 3, pp. 247–264, 2016, [doi:10.1007/s12088-016-0584-6](https://doi.org/10.1007/s12088-016-0584-6).
- [17] Choi, J. Y., Nam, J., Yun, B. Y., Kim, Y. U., y Kim, S., “Utilization of corn cob, an essential agricultural residue difficult to disposal: Composite board manufactured improved thermal performance using microencapsulated PCM,” *Industrial Crops and Products*, vol. 183, p. 114931, 2022, [doi:10.1016/j.indcrop.2022.114931](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114931).
- [18] Prasad, S., Singh, A., y Joshi, H., “Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues,” *Resources, Conservation and Recycling*, vol. 50, no. 1, pp. 1–39, 2007, [doi:10.1016/j.resconrec.2006.05.007](https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2006.05.007).
- [19] Berber-Villamar, N. K., Netzahuatl-Muñoz, A. R., Morales-Barrera, L., Chávez-Camarillo, G. M., Flores-Ortiz, C. M., y Cristiani-Urbina, E., “Corncob as an effective, eco-friendly, and economic biosorbent for removing the azo dye Direct Yellow 27 from aqueous solutions,” *PLOS ONE*, vol. 13, no. 4, p. e0196428, 2018, [doi:10.1371/journal.pone.0196428](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196428).
- [20] Domínguez, J. I., Vergara, M. M., Aguirre, R., Barrera, D., Montero, J., Cáceres, L., Eguillor, P., y Espinoza, A., “Panorama de la agricultura chilena. Chilean agriculture overview,” rep. tec., Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), 2019.
- [21] Shahrubudin, N., Lee, T., y Ramlan, R., “An overview on 3d printing technology: technological, materials, and applications,” *Procedia Manufacturing*, vol. 35, pp. 1286–1296, 2019, [doi:10.1016/j.promfg.2019.06.089](https://doi.org/10.1016/j.promfg.2019.06.089).
- [22] Buckley, M., *The Fungal Kingdom: diverse and essential roles in earth’s ecosystem: This report is based on a colloquium, sponsored by the American Academy of Microbiology, convened November 2–4, 2007 in Tucson, Arizona. American Academy of Microbiology Colloquia Reports, Washington (DC): American Society for Microbiology, 2008*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559443/> (visitado el 2023-02-28).
- [23] Naranjo-Ortiz, M. A. y Gabaldón, T., “Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi,” *Biological Reviews*, vol. 94, no. 6, pp. 2101–2137, 2019, [doi:10.1111/brv.12550](https://doi.org/10.1111/brv.12550).
- [24] Hawksworth, D. L. y Lücking, R., “Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species,”

- Microbiology Spectrum, vol. 5, no. 4, p. 5.4.10, 2017, [doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016).
- [25] Coelho, M. A., Bakkeren, G., Sun, S., Hood, M. E., y Giraud, T., “Fungal sex: the basidiomycota,” *Microbiology Spectrum*, vol. 5, no. 3, p. 5.3.12, 2017, [doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0046-2016](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0046-2016).
- [26] Ltda, P., “Los hongos basidiomicetos,” 2012, <https://inmunosetas.wordpress.com/2012/02/21/los-hongos-basidiomicetos/> (visitado el 2023-02-28).
- [27] “Microbiology(Boundless),” 2017, [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_\(Boundless\)](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(Boundless)) (visitado el 2023-02-28).
- [28] Candia-Sanchez, L. F., Álvarez Cervantes, J., Díaz, R., Díaz-Godínez, G., y Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México, “Uso potencial de biorreactores para la producción de lacasas de hongos basidiomicetos,” *Mexican Journal of Biotechnology*, vol. 2, no. 1, pp. 15–36, 2017, [doi:10.29267/mxjb.2017.2.1.15](https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.1.15).
- [29] McConnaughey, M., “Physical chemical properties of fungi,” en *Reference Module in Biomedical Sciences*, p. B9780128012383052314, Elsevier, 2014, [doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.05231-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05231-4).
- [30] Barzee, T. J., Cao, L., Pan, Z., y Zhang, R., “Fungi for future foods,” *Journal of Future Foods*, vol. 1, no. 1, pp. 25–37, 2021, [doi:10.1016/j.jfutfo.2021.09.002](https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2021.09.002).
- [31] El-Enshasy, H. A., “Filamentous fungal cultures – process characteristics, products, and applications,” en *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, pp. 225–261, Elsevier, 2007, [doi:10.1016/B978-044452114-9/50010-4](https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50010-4).
- [32] Garcia-Rubio, R., De Oliveira, H. C., Rivera, J., y Trevijano-Contador, N., “The fungal cell wall: candida, cryptococcus, and aspergillus species,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, p. 2993, 2020, [doi:10.3389/fmicb.2019.02993](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993).
- [33] Rogers, H. J., Perkins, H. R., y Ward, J. B., “Cell walls of filamentous fungi,” en *Microbial Cell Walls and Membranes*, pp. 469–477, Dordrecht: Springer Netherlands, 1980, [doi:10.1007/978-94-011-6014-8_13](https://doi.org/10.1007/978-94-011-6014-8_13).
- [34] Joshi, K., Meher, M. K., y Poluri, K. M., “Fabrication and characterization of bio-blocks from agricultural waste using fungal mycelium for renewable and sustainable applications,” *ACS Applied Bio Materials*, vol. 3, no. 4, pp. 1884–1892, 2020, [doi:10.1021/acsabm.9b01047](https://doi.org/10.1021/acsabm.9b01047).
- [35] Porter, D. L., Hotz, E. C., Uehling, J. K., y Naleway, S. E., “A review of the material and mechanical properties of select Ganoderma fungi structures as a source for bioinspiration,” *Journal of Materials Science*, vol. 58, no. 8, pp. 3401–3420, 2023, [doi:10.1007/s10853-023-08214-y](https://doi.org/10.1007/s10853-023-08214-y).
- [36] Jones, M., Huynh, T., Dekiwadia, C., Daver, F., y John, S., “Mycelium composites: a review of engineering characteristics and growth kinetics,” *Journal of Bionanoscience*, vol. 11, no. 4, pp. 241–257, 2017, [doi:10.1166/jbns.2017.1440](https://doi.org/10.1166/jbns.2017.1440).
- [37] Li, T., Cui, L., Song, X., Cui, X., Wei, Y., Tang, L., Mu, Y., y Xu, Z., “Wood decay fungi: an analysis of worldwide research,” *Journal of Soils and Sediments*, vol. 22, no. 6, pp. 1688–1702, 2022, [doi:10.1007/s11368-022-03225-9](https://doi.org/10.1007/s11368-022-03225-9).

- [38] Schultz, T. P., Miltz, H., Freeman, M. H., Goodell, B., y Nicholas, D. D., eds., Development of commercial wood preservatives: efficacy, environmental, and health issues, vol. 982 de ACS Symposium Series. Washington, DC: American Chemical Society, 2008, doi:10.1021/bk-2008-0982.
- [39] Abdel-Hamid, A. M., Solbiati, J. O., y Cann, I. K., “Insights into lignin degradation and its potential industrial applications,” en *Advances in Applied Microbiology*, vol. 82, pp. 1–28, Elsevier, 2013, doi:10.1016/B978-0-12-407679-2.00001-6.
- [40] Zhou, L.-W., Cao, Y., Wu, S.-H., Vlasák, J., Li, D.-W., Li, M.-J., y Dai, Y.-C., “Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (Ganodermataceae, polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny,” *Phytochemistry*, vol. 114, pp. 7–15, 2015, doi:10.1016/j.phytochem.2014.09.023.
- [41] Zhou, S., Zhang, J., Ma, F., Tang, C., Tang, Q., y Zhang, X., “Investigation of lignocellulolytic enzymes during different growth phases of *Ganoderma lucidum* strain G0119 using genomic, transcriptomic and secretomic analyses,” *PLOS ONE*, vol. 13, no. 5, p. e0198404, 2018, doi:10.1371/journal.pone.0198404.
- [42] Grageas, “*Ganoderma lucidum*, un hongo que produce compuestos potencialmente antivirales | CienciaHoy,” 2023, <https://cienciahoy.org.ar/ganoderma-lucidum-un-hongo-que-produce-compuestos-potencialmente-antivirales/> (visitado el 2023-02-28).
- [43] Lérica Martínez, E., MEJORA DE FERMENTABILIDAD DE HIDROLIZADOS DE HOJA DE OLIVO. PhD thesis, Escuela Politécnica Superior de Linares, Universidad de Jaén, 2018.
- [44] Zhang, B., Yan, L., Li, Q., Zou, J., Tan, H., Tan, W., Peng, W., Li, X., y Zhang, X., “Dynamic succession of substrate-associated bacterial composition and function during *Ganoderma lucidum* growth,” *PeerJ*, vol. 6, p. e4975, 2018, doi:10.7717/peerj.4975.
- [45] Bhavar, V., Kattire, P., Thakare, S., Patil, S., y Singh, R., “A review on functionally gradient materials (Fgms) and their applications,” *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol. 229, p. 012021, 2017, doi:10.1088/1757-899X/229/1/012021.
- [46] Asgher, M., Sharif, Y., y Bhatti, H., “Enhanced production of ligninolytic enzymes by *ganoderma lucidum* ibl-06 using lignocellulosic agricultural wastes,” *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, vol. 8, no. 1, 2010, doi:10.2202/1542-6580.2203.
- [47] Viccini, G., Mitchell, D., Boit, S., Gern, J., Rosa, A., Costa, R., Dalsenter, F., Meien, O., y Krieger, N., “Analysis of growth kinetic profiles in solid-state fermentation,” *Food Technology and Biotechnology*, vol. 39, pp. 271–294, 2001.
- [48] Heydarian, M., Hatamian-Zarmi, A., Amoabediny, G., Ebrahimi-Hosseinzadeh, B., Alvandi, H., Doryab, A., y Salehi, A., “Growth kinetics and ganoderic acid production from *ganoderma lucidum* giran17: a real-time monitoring platform,” *Iranian Journal of Medical Microbiology*, vol. 15, no. 1, pp. 67–84, 2021, doi:10.30699/ijmm.15.1.67.
- [49] Zhou, X.-W., “Cultivation of *Ganoderma lucidum*,” en *Edible and Medicinal Mushrooms* (Diego, C. Z. y Pardo-Giménez, A., eds.), pp. 385–413, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017, doi:10.1002/9781119149446.ch18.
- [50] Liu, J., Fujita, R., Sato, M., Shimizu, K., Konishi, F., Noda, K., Kumamoto, S., Ueda,

- C., Tajiri, H., Kaneko, S., Suimi, Y., y Kondo, R., “The effect of strain, growth stage, and cultivating condition of *Ganoderma lucidum* on 5 α -reductase inhibition,” *Journal of Wood Science*, vol. 51, no. 2, pp. 189–192, 2005, [doi:10.1007/s10086-004-0645-z](https://doi.org/10.1007/s10086-004-0645-z).
- [51] Jones, M., Mautner, A., Luenco, S., Bismarck, A., y John, S., “Engineered mycelium composite construction materials from fungal biorefineries: A critical review,” *Materials & Design*, vol. 187, p. 108397, 2020, [doi:10.1016/j.matdes.2019.108397](https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.108397).
- [52] Sydor, M., Cofta, G., Doczekalska, B., y Bonenberg, A., “Fungi in mycelium-based composites: usage and recommendations,” *Materials*, vol. 15, no. 18, p. 6283, 2022, [doi:10.3390/ma15186283](https://doi.org/10.3390/ma15186283).
- [53] Dai, L., Cheng, T., Duan, C., Zhao, W., Zhang, W., Zou, X., Aspler, J., y Ni, Y., “3D printing using plant-derived cellulose and its derivatives: A review,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 203, pp. 71–86, 2019, [doi:10.1016/j.carbpol.2018.09.027](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.027).
- [54] Gopinathan, J. y Noh, I., “Recent trends in biopinks for 3D printing,” *Biomaterials Research*, vol. 22, no. 1, p. 11, 2018, [doi:10.1186/s40824-018-0122-1](https://doi.org/10.1186/s40824-018-0122-1).
- [55] Groll, J., Burdick, J. A., Cho, D.-W., Derby, B., Gelinsky, M., Heilshorn, S. C., Jüngst, T., Malda, J., Mironov, V. A., Nakayama, K., Ovsianikov, A., Sun, W., Takeuchi, S., Yoo, J. J., y Woodfield, T. B. F., “A definition of biopinks and their distinction from biomaterial inks,” *Biofabrication*, vol. 11, no. 1, p. 013001, 2018, [doi:10.1088/1758-5090/aaec52](https://doi.org/10.1088/1758-5090/aaec52).
- [56] Wang, Y.-C., Chen, T., y Yeh, Y.-L., “Advanced 3D printing technologies for the aircraft industry: a fuzzy systematic approach for assessing the critical factors,” *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, vol. 105, no. 10, pp. 4059–4069, 2019, [doi:10.1007/s00170-018-1927-8](https://doi.org/10.1007/s00170-018-1927-8).
- [57] Hager, I., Golonka, A., y Putanowicz, R., “3d printing of buildings and building components as the future of sustainable construction?,” *Procedia Engineering*, vol. 151, pp. 292–299, 2016, [doi:10.1016/j.proeng.2016.07.357](https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.07.357).
- [58] Schuldt, S. J., Jagoda, J. A., Hoisington, A. J., y Delorit, J. D., “A systematic review and analysis of the viability of 3D-printed construction in remote environments,” *Automation in Construction*, vol. 125, p. 103642, 2021, [doi:10.1016/j.autcon.2021.103642](https://doi.org/10.1016/j.autcon.2021.103642).
- [59] Friel, R., “Power ultrasonics for additive manufacturing and consolidating of materials,” en *Power Ultrasonics*, pp. 313–335, Elsevier, 2015, [doi:10.1016/B978-1-78242-028-6.00013-2](https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-028-6.00013-2).
- [60] Hölzl, K., Lin, S., Tytgat, L., Van Vlierberghe, S., Gu, L., y Ovsianikov, A., “Bioink properties before, during and after 3D bioprinting,” *Biofabrication*, vol. 8, no. 3, p. 032002, 2016, [doi:10.1088/1758-5090/8/3/032002](https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/3/032002).
- [61] César-Juárez, A., Olivos-Meza, A., Landa-Solís, C., Cárdenas-Soria, V. H., Silva-Bermúdez, P. S., Suárez Ahedo, C., Olivos Díaz, B., Ibarra-Ponce de León, J. C., César-Juárez, A., Olivos-Meza, A., Landa-Solís, C., Cárdenas-Soria, V. H., Silva-Bermúdez, P. S., Suárez Ahedo, C., Olivos Díaz, B., y Ibarra-Ponce de León, J. C., “Uso y aplicación de la tecnología de impresión y bioimpresión 3D en medicina,” *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, vol. 61, no. 6, pp. 43–51, 2018, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0026-17422018000600043&lng=es&nrm=iso&tlng=es (visitado el 2023-03-09).
- [62] Axpe, E. y Oyen, M., “Applications of alginate-based biopinks in 3d bioprinting,” *Inter-*

- national Journal of Molecular Sciences, vol. 17, no. 12, p. 1976, 2016, [doi:10.3390/ijms17121976](https://doi.org/10.3390/ijms17121976).
- [63] Siacor, F. D. C., Chen, Q., Zhao, J. Y., Han, L., Valino, A. D., Taboada, E. B., Caldoná, E. B., y Advincula, R. C., “On the additive manufacturing (3D printing) of viscoelastic materials and flow behavior: From composites to food manufacturing,” *Additive Manufacturing*, vol. 45, p. 102043, 2021, [doi:10.1016/j.addma.2021.102043](https://doi.org/10.1016/j.addma.2021.102043).
- [64] Gutierrez, E., Burdiles, P. A., Quero, F., Palma, P., Olate-Moya, F., y Palza, H., “3d printing of antimicrobial alginate/bacterial-cellulose composite hydrogels by incorporating copper nanostructures,” *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 5, no. 11, pp. 6290–6299, 2019, [doi:10.1021/acsbiomaterials.9b01048](https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01048).
- [65] Chansoria, P., Narayanan, L. K., Wood, M., Alvarado, C., Lin, A., y Shirwaiker, R. A., “Effects of autoclaving, etoh, and uv sterilization on the chemical, mechanical, printability, and biocompatibility characteristics of alginate,” *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 6, no. 9, pp. 5191–5201, 2020, [doi:10.1021/acsbiomaterials.0c00806](https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00806).
- [66] Osong, S. H., Norgren, S., y Engstrand, P., “Processing of wood-based microfibrillated cellulose and nanofibrillated cellulose, and applications relating to papermaking: a review,” *Cellulose*, vol. 23, no. 1, pp. 93–123, 2016, [doi:10.1007/s10570-015-0798-5](https://doi.org/10.1007/s10570-015-0798-5).
- [67] Henke, K. y Treml, S., “Wood based bulk material in 3D printing processes for applications in construction,” *European Journal of Wood and Wood Products*, vol. 71, no. 1, pp. 139–141, 2013, [doi:10.1007/s00107-012-0658-z](https://doi.org/10.1007/s00107-012-0658-z).
- [68] Kariz, M., Sernek, M., y Kuzman, M. K., “Use of wood powder and adhesive as a mixture for 3D printing,” *European Journal of Wood and Wood Products*, vol. 74, no. 1, pp. 123–126, 2016, [doi:10.1007/s00107-015-0987-9](https://doi.org/10.1007/s00107-015-0987-9).
- [69] Wang, Q., Sun, J., Yao, Q., Ji, C., Liu, J., y Zhu, Q., “3D printing with cellulose materials,” *Cellulose*, vol. 25, no. 8, pp. 4275–4301, 2018, [doi:10.1007/s10570-018-1888-y](https://doi.org/10.1007/s10570-018-1888-y).
- [70] Gauss, C., Pickering, K. L., y Muthe, L. P., “The use of cellulose in bio-derived formulations for 3D/4D printing: A review,” *Composites Part C: Open Access*, vol. 4, p. 100113, 2021, [doi:10.1016/j.jcomc.2021.100113](https://doi.org/10.1016/j.jcomc.2021.100113).
- [71] Ee, L. Y. y Yau Li, S. F., “Recent advances in 3D printing of nanocellulose: structure, preparation, and application prospects,” *Nanoscale Advances*, vol. 3, no. 5, pp. 1167–1208, 2021, [doi:10.1039/D0NA00408A](https://doi.org/10.1039/D0NA00408A).
- [72] Rao, A., Divoux, T., Owens, C. E., y Hart, A. J., “Printable, castable, nanocrystalline cellulose-epoxy composites exhibiting hierarchical nacre-like toughening,” *Cellulose*, vol. 29, no. 4, pp. 2387–2398, 2022, [doi:10.1007/s10570-021-04384-7](https://doi.org/10.1007/s10570-021-04384-7).
- [73] Markstedt, K., Mantas, A., Tournier, I., Martínez Ávila, H., Hägg, D., y Gatenholm, P., “3d bioprinting human chondrocytes with nanocellulose–alginate bioink for cartilage tissue engineering applications,” *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 5, pp. 1489–1496, 2015, [doi:10.1021/acs.biomac.5b00188](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00188).
- [74] Leppiniemi, J., Lahtinen, P., Paaajanen, A., Mahlberg, R., Metsä-Kortelainen, S., Pino-maa, T., Pajari, H., Vikholm-Lundin, I., Pursula, P., y Hytönen, V. P., “3d-printable bioactivated nanocellulose–alginate hydrogels,” *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 9, no. 26, pp. 21959–21970, 2017, [doi:10.1021/acsami.7b02756](https://doi.org/10.1021/acsami.7b02756).
- [75] Meyer, V., Andersen, M. R., Brakhage, A. A., Braus, G. H., Caddick, M. X., Cairns,

- T. C., De Vries, R. P., Haarmann, T., Hansen, K., Hertz-Fowler, C., Krappmann, S., Mortensen, U. H., Peñalva, M. A., Ram, A. F. J., y Head, R. M., “Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper,” *Fungal Biology and Biotechnology*, vol. 3, no. 1, pp. 6, s40694–016–0024–8, 2016, [doi:10.1186/s40694-016-0024-8](https://doi.org/10.1186/s40694-016-0024-8).
- [76] Sydor, M., Bonenberg, A., Doczekalska, B., y Cofta, G., “Mycelium-based composites in art, architecture, and interior design: a review,” *Polymers*, vol. 14, no. 1, p. 145, 2021, [doi:10.3390/polym14010145](https://doi.org/10.3390/polym14010145).
- [77] Alemu, D., Tafesse, M., y Mondal, A. K., “Mycelium-based composite: the future sustainable biomaterial,” *International Journal of Biomaterials*, vol. 2022, pp. 1–12, 2022, [doi:10.1155/2022/8401528](https://doi.org/10.1155/2022/8401528).
- [78] Bitting, S., Derme, T., Lee, J., Van Mele, T., Dillenburger, B., y Block, P., “Challenges and opportunities in scaling up architectural applications of mycelium-based materials with digital fabrication,” *Biomimetics*, vol. 7, no. 2, p. 44, 2022, [doi:10.3390/biomimetics7020044](https://doi.org/10.3390/biomimetics7020044).
- [79] Bhardwaj, A., Rahman, A. M., Wei, X., Pei, Z., Truong, D., Lucht, M., y Zou, N., “3d printing of biomass–fungi composite material: effects of mixture composition on print quality,” *Journal of Manufacturing and Materials Processing*, vol. 5, no. 4, p. 112, 2021, [doi:10.3390/jmmp5040112](https://doi.org/10.3390/jmmp5040112).
- [80] Jayasinghe, C., Imtiaj, A., Hur, H., Lee, G.-W., Lee, T.-S., y Lee, U.-Y., “Favorable culture conditions for mycelial growth of korean wild strains in ganoderma lucidum,” *Mycobiology*, vol. 36, no. 1, pp. 28–33, 2008, [doi:10.4489/MYCO.2008.36.1.028](https://doi.org/10.4489/MYCO.2008.36.1.028).
- [81] Pavlík, M., Fleischer, P., Fleischer, P., Pavlík, M., y Šuleková, M., “Evaluation of the carbon dioxide production by fungi under different growing conditions,” *Current Microbiology*, vol. 77, no. 9, pp. 2374–2384, 2020, [doi:10.1007/s00284-020-02033-z](https://doi.org/10.1007/s00284-020-02033-z).
- [82] Fernández Farrés, I. y Norton, I., “Formation kinetics and rheology of alginate fluid gels produced by in-situ calcium release,” *Food Hydrocolloids*, vol. 40, pp. 76–84, 2014, [doi:10.1016/j.foodhyd.2014.02.005](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.005).
- [83] Schwietzke, S., Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N., y Ladisch, M., “Ethanol production from maize,” en *Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement* (Kriz, A. L. y Larkins, B. A., eds.), vol. 63, pp. 347–364, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, [doi:10.1007/978-3-540-68922-5_23](https://doi.org/10.1007/978-3-540-68922-5_23).
- [84] Laborel-Préneron, A., Magniont, C., y Aubert, J.-E., “Characterization of barley straw, hemp shiv and corn cob as resources for bioaggregate based building materials,” *Waste and Biomass Valorization*, vol. 9, no. 7, pp. 1095–1112, 2018, [doi:10.1007/s12649-017-9895-z](https://doi.org/10.1007/s12649-017-9895-z).
- [85] Pointner, M., Kuttner, P., Obrlik, T., Jäger, A., y Kahr, H., “Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels,” vol. 12, 2014, https://www.researchgate.net/publication/284719513_Composition_of_corncobs_as_a_substrate_for_fermentation_of_biofuels.
- [86] LWF, B. L. f. W. u. F., “Utilization of the oak.”, <https://www.waldwissen.net/en/forestry/timber-and-markets/wood-processing/utilization-of-the-oak> (visitado el 2023-02-28).

- [87] Pinto, J., Cruz, D., Paiva, A., Pereira, S., Tavares, P., Fernandes, L., y Varum, H., “Characterization of corn cob as a possible raw building material,” *Construction and Building Materials*, vol. 34, pp. 28–33, 2012, [doi:10.1016/j.conbuildmat.2012.02.014](https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2012.02.014).
- [88] Eiselt, P., Yeh, J., Latvala, R. K., Shea, L. D., y Mooney, D. J., “Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 19, pp. 1921–1927, 2000, [doi:10.1016/S0142-9612\(00\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00033-8).
- [89] Sinka, M., Zorica, J., Bajare, D., Sahmenko, G., y Korjakins, A., “Fast setting binders for application in 3d printing of bio-based building materials,” *Sustainability*, vol. 12, no. 21, p. 8838, 2020, [doi:10.3390/su12218838](https://doi.org/10.3390/su12218838).
- [90] Kostenko, A., Swioklo, S., y Connon, C. J., “Effect of calcium sulphate pre-crosslinking on rheological parameters of alginate based bio-inks and on human corneal stromal fibroblast survival in 3d bio-printed constructs,” *Frontiers in Mechanical Engineering*, vol. 8, 2022, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmech.2022.867685> (visitado el 2023-02-28).
- [91] Islam, M. R., Tudryn, G., Bucinell, R., Schadler, L., y Picu, R. C., “Morphology and mechanics of fungal mycelium,” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 13070, 2017, [doi:10.1038/s41598-017-13295-2](https://doi.org/10.1038/s41598-017-13295-2).
- [92] “Equipos | productos | scharlab.”, <https://www.scharlab.com/productos-producto-catalogo-productos-detalle-referencia.php?c=13&sc=49&p=8774&r=022-718620> (visitado el 2023-02-28).

Anexos

Anexo A. Cálculos realizados

A.1. Cálculo de la concentración de esporas con Cámara de Neubauer

Se tomaron $10\mu\text{L}$ de la solución, se mezclaron con $10\mu\text{L}$ de azul tripan y se cargaron $10\mu\text{L}$ en la cámara de recuento. El conteo se realiza en los cuatro cuadrados de las esquinas (denotados con la letra L en la imagen A.1).

En general, la concentración de una solución se puede expresar según la ecuación A.1:

$$\text{Concentración [esporas/ml]} = \frac{\text{número de células}}{\text{volumen}} \quad (\text{A.1})$$

Según lo mostrado en la imagen A.1, el volumen de cada cuadro corresponde a

$$1\text{mm} \cdot 1\text{mm} \cdot 0.1\text{mm} = 0.1\text{mm}^3 = 0.0001\text{ml} \quad (\text{A.2})$$

En ese caso se contaron las esporas de los 4 cuadros extremos, por lo que el volumen total sería de

$$4 \cdot 0.0001\text{ml} = 4 \cdot 10^{-4}\text{ml} \quad (\text{A.3})$$

Así, reordenando la ecuación anterior, se obtiene la ecuación A.4.

$$\text{Concentración [esporas/ml]} = \frac{\text{número de células} \cdot 10.000}{\text{volumen}} \quad (\text{A.4})$$

Donde el número de células corresponde al total contado en los cuatro cuadrados de las esquinas de la cámara mostrada en la Figura A.1.

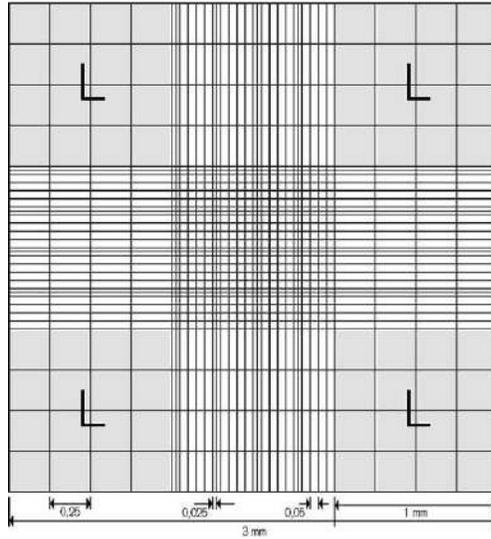


Figura A.1: Cámara de recuento Neubauer [92].

Para la concentración final se usa la Ecuación A.5:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (\text{A.5})$$

Dado que la concentración inicial era de 10^4 [esporas/ml] en un volumen total de 5ml de suspensión, se reemplazan los valores en la Ecuación A.6. El volumen final fue de $0.5 \mu\text{l}$. Luego,

$$10^4 \cdot 5 = C_2 \cdot 0.5 \quad (\text{A.6})$$

$$\implies C_2 = 10^5 [\text{esporas/ml}] \quad (\text{A.7})$$