

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
DE LOS RECURSOS NATURALES**

*Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Ingeniera en
Biotecnología de los Recursos Naturales*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**“DETERMINACIÓN DE LA INCIDENCIA DE LOS FACTORES pH Y
MEDIO DE CULTIVO EN LA OBTENCIÓN DEL PIGMENTO (cinabarina)
A PARTIR DEL HONGO *Pycnoporus sanguineus*”**

AUTORA:

YANELA MADELEINE TOLEDO LOAIZA

TUTORA:

DRA. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, Ph.D

CUENCA - ECUADOR

2021

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Yanela Madeleine Toledo Loaiza con documento de identificación N° 1106087792, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: **“DETERMINACIÓN DE LA INCIDENCIA DE LOS FACTORES pH Y MEDIO DE CULTIVO EN LA OBTENCIÓN DEL PIGMENTO (CINABARINA) A PARTIR DEL HONGO *Pycnoporus sanguineus*”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora, me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, abril del 2021.



Yanela Madeleine Toledo Loaiza

C.I. 1106087792

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación:
“DETERMINACIÓN DE LA INCIDENCIA DE LOS FACTORES pH Y MEDIO DE CULTIVO EN LA OBTENCIÓN DEL PIGMENTO (CINABARINA) A PARTIR DEL HONGO *Pycnoporus sanguineus*”, realizado por Yanela Madeleine Toledo Loaiza, obteniendo el *Trabajo Experimental*, que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, abril del 2021.



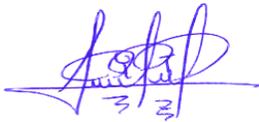
Dra. Inés Patricia Malo Cevallos, Ph.D

C.I. 0102291044

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Yanela Madeleine Toledo Loaiza con documento de identificación N° 1106087792, autora del trabajo de titulación: **“DETERMINACIÓN DE LA INCIDENCIA DE LOS FACTORES pH Y MEDIO DE CULTIVO EN LA OBTENCIÓN DEL PIGMENTO (CINABARINA) A PARTIR DEL HONGO *Pycnoporus sanguineus*”**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental*, es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, abril del 2021.



Yanela Madeleine Toledo Loaiza

C.I. 1106087792

DEDICATORIA

A mis padres, Milton y Rosario, por ayudarme a cumplir mis objetivos como persona y estudiante, brindándome los recursos necesarios para poder culminar con esta etapa. Por su apoyo, sus consejos y su comprensión, todo lo que hoy soy es gracias a ustedes; a mis hermanos Wendy, Lili, Andres y Josuhe, que con el pasar del tiempo nos hemos convertido en los mejores amigos; a mis sobrinos Mateo, Joaquín y Luciana, con su presencia y ocurrencias llenan de alegría mi vida; a mi fiel compañera, mi Tyka, por ser mi ángel de cuatro patas en la tierra y demostrarme su amor incondicional.

Con amor y cariño Yanela...

AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco a Dios, la Virgen del Cisne y del Quinche, por bendecirme en cada momento de mi vida y proteger cada paso que doy, le agradezco eternamente por la familia maravillosa que tengo, por su amor infinito, por aumentar mi fe y confianza además de nunca dejarme caer en los momentos difíciles.

A mis padres que a pesar de la pequeña distancia siempre estuvieron para darme un consejo, unas palabras de aliento y poder seguir adelante, les agradezco infinitamente todo el apoyo que me han brindado, por su esfuerzo y sacrificio que hoy por hoy da fruto. Gracias por enseñarme que las cosas se pueden lograr con sacrificio y responsabilidad, por su confianza y por estar siempre para mí, los amo eternamente.

A mis hermanos y hermanas por siempre estar cuando los necesite, por sus consejos, sus palabras de aliento y sobre todo por ser los mejores amigos, siempre estaremos unidos a pesar de todo.

A mis sobrinos, Mateo, Joaquín y Luciana que con su inocencia me llenan de felicidad, gracias por ser la luz que ilumina nuestra familia, gracias por tanto amor.

A Vladimir, por creer y confiar en mí, por brindarme su apoyo y amor sincero, gracias por estar en los buenos y en los malos momentos demostrándome que siempre podré contar con él.

A mi chiquita, mi Tyka, que me enseñó a luchar por la vida a pesar del dolor.

Extiendo mi sincero agradecimiento a mi tutora, Dra. Inés Malo, por su colaboración desinteresada, por brindarme sus conocimientos científicos y por guiarme en la elaboración de este trabajo, más que una docente una gran amiga.

A mis profesores Dra. Myriam Mancheno. Dra. Silvia Torres, Dr. Mario Arévalo, Ing. Hernán Avilés, Ing. Jhison Romero, Ing. Juan Loyola, Ing. Xavier Armijos, por haber impartido grandes conocimientos que serán de gran ayuda en mi vida profesional, de manera muy especial al Ing. Pablo Arévalo por su colaboración en este estudio y por su amistad brindada en el transcurso de la carrera.

A mis mejores amigas Michelle y Anabel, por su amistad incondicional y sincera desde el primer día, gracias por compartir tantas experiencias.

A la Ingeniera Sandy Gavilanes y la Dra. Mónica Espadero por su apoyo dentro del laboratorio, gracias por compartirme sus conocimientos y brindarme una gran amistad.

ABREVIATURAS

Abs: Absorbancia

ANOVA: Análisis de varianza

CEM: Caldo extracto de levadura

C-H: Enlace carbono - hidrógeno

Conc: Concentración

CPD: Caldo papa dextrosa

DOE: Diseño factorial

FTIR: Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier

HCL: Ácido clorhídrico

mg/L: Miligramos sobre litros

mL: Mililitros

NAOH: Hidróxido de sodio

nm: Nanómetros

ppm: Partes por millón

Rf: Frente de retención

SAB: Agar sabouraud

TCL: Cromatografía de capa fina

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1.....	19
INTRODUCCIÓN.....	19
2.1 El problema de Investigación	20
2.2 Antecedentes	21
2.3 Justificación	22
2.4 Objetivos	23
2.4.1 <i>Objetivo general</i>	23
2.4.2 <i>Objetivos específicos</i>	23
2.5 Hipótesis	24
CAPÍTULO 2.....	25
MARCO DE REFERENCIA.....	25
2.1 Hongos.....	25
2.1.1 <i>Generalidades</i>	25
2.1.2 <i>Morfología de los hongos</i>	26
2.1.3 <i>Medios de cultivo para hongos</i>	28
2.2 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	28
2.2.1 <i>Ciclo biológico</i>	30
2.2.2 <i>Características macroscópicas</i>	31
2.2.3 <i>Características microscópicas</i>	31
2.2.4 <i>Recolección</i>	32

2.2.5	<i>Aislamiento</i>	33
2.2.6	<i>Medios de cultivo</i>	34
2.2.7	<i>Producción de metabolitos secundarios</i>	34
2.2.8	<i>Usos</i>	35
2.2.8.1	Degradación de compuestos xenobióticos.	35
2.2.8.2	Control biológico.....	35
2.2.8.3	Extracto de <i>Pycnoporus sanguineus</i> utilizado como biosensor.....	35
2.3	Cinabarina	36
2.3.1	<i>Producción</i>	36
2.3.2	<i>Extracción</i>	37
2.3.3	<i>Cromatografía de capa fina</i>	39
2.4	Pigmentos	41
2.4.1	<i>Pigmentos sintéticos</i>	41
2.4.2	<i>Pigmentos naturales</i>	41
2.4.3	<i>Análisis físico químico</i>	43
CAPÍTULO 3.....		44
MATERIALES Y MÉTODOS.....		44
3.1	Nivel de investigación	44
3.2	Diseño de investigación	44
3.3	Materiales	44
3.4	Procedimiento	47
3.4.1	<i>Obtención de la cepa axénica a partir de los basidiocarpos del hongo <i>Pycnoporus</i></i>	

<i>sanguineus</i>	47
3.4.1.1 Recolección del hongo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	47
3.4.1.2 Aislamiento, limpieza y siembra de tejidos.	48
3.4.2 <i>Obtención del pigmento cinabarina a partir de la siembra en medios líquidos</i>	51
3.4.2.1 Preparación de caldos de cultivo, siembra e incubación.	51
3.4.2.2 Extracción del pigmento cinabarina.	54
3.4.3 <i>Análisis del pigmento obtenido</i>	56
3.4.3.1 Concentración del pigmento mediante espectrofotometría UV-visible.....	56
3.4.3.2 Cromatografía de capa fina TLC.	57
3.4.3.3 Identificación de grupos funcionales mediante la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (<i>FTIR</i>).....	58
3.4.3.4 Determinación del porcentaje de humedad.....	59
3.4.3.5 Determinación del porcentaje de cenizas.	60
<i>CAPÍTULO 4</i>	61
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	61
4.1 Caracterización del hongo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	61
4.1.1 <i>Identificación macroscópica y microscópica de los carpóforos recolectados</i>	61
4.1.2 <i>Caracterización de la cepa axénica del hongo <i>Pycnoporus sanguineus</i></i>	62
4.1.2.1 Características macroscópicas de la cepa axénica.....	62
4.1.2.2 Características microscópicas de la cepa axénica.	64
4.2 Caracterización del pigmento cinabarina	65
4.2.1 <i>Concentración y rendimiento del pigmento cinabarina</i>	65
4.2.1.1 Concentración del pigmento.....	65

4.2.1.2 Rendimiento del pigmento.....	66
4.2.2 Cromatografía de capa fina	68
4.2.3 Identificación de grupos funcionales por FTIR.....	69
4.2.4 Humedad del colorante final	70
4.2.5 Cenizas del colorante final	71
4.3 Evaluación de las variables de estudio mediante el diseño factorial 2²	72
<i>CAPÍTULO 5.....</i>	79
<i>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</i>	79
5.1 Conclusiones	79
5.2 Recomendaciones	81
<i>BIBLIOGRAFÍA.....</i>	82
<i>ANEXOS.....</i>	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Nombres de las diferentes partes de los hongos</i>	26
Figura 2: <i>Micelio vegetativo en su hábitat natural</i>	27
Figura 3: <i>Formas que pueden presentar las esporas</i>	27
Figura 4: <i>Hongo Pycnoporus sanguineus</i>	29
Figura 5: <i>Ciclo de vida del hongo Pycnoporus</i>	30
Figura 6: <i>Partes del carpóforo</i>	31
Figura 7: <i>Vista de poros del hongo Pycnoporus sanguineus</i>	32
Figura 8: <i>a) esporas y b) micelio del hongo Pycnoporus sanguineus</i>	32
Figura 9: <i>Siembra a partir del tejido de un hongo</i>	33
Figura 10: <i>Estructura y nombre IUPAC de la cinabarina</i>	36
Figura 11: <i>Proceso de obtención del pigmento de Pycnoporus sanguineus</i>	38
Figura 12: <i>Partes de una cromatografía de capa fina (TCL)</i>	39
Figura 13: <i>Cálculo del Rf</i>	40
Figura 14: <i>Clasificación de los colorantes</i>	42
Figura 15: <i>Troncos con basidiocarpos de P. sanguineus, a) mayo 2020 y b) enero 2021</i>	48
Figura 16: <i>Vertido del medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar</i>	49
Figura 17: <i>Limpieza y desinfección de tejidos</i>	49
Figura 18: <i>Muestra de basidiocarpos sobre portaobjetos</i>	50
Figura 19: <i>Cajas de medio SAB con tejidos del hongo Pycnoporus sanguineus</i>	50
Figura 20: <i>Resiembra del hongo Pycnoporus sanguineus</i>	51
Figura 21: <i>Medición del pH de caldos de cultivo a) caldo de papa (pH 7 y 8) y b) caldo de malta (pH 7 y 8)</i>	52

Figura 22: <i>Caldos de cultivo esterilizados</i>	53
Figura 23: <i>a) Siembra en caldos de cultivo b) Incubación</i>	54
Figura 24: <i>Filtración del caldo de cultivo</i>	55
Figura 25: <i>Extractos de pigmento</i>	55
Figura 26: <i>a) Mezcla en el agitador Orbital, y, b) evaporación y concentración de pigmento</i> ..	55
Figura 27: <i>Filtración y almacenamiento del pigmento</i>	56
Figura 28: <i>Muestras para el espectrofotómetro: a) cubeta con acetona pura, b) muestra de rojo de metilo con acetona pura, y, c) muestras de los 12 tratamientos listos para ser leídos</i>	57
Figura 29: <i>Cromatografía de capa fina: a) preparación de la cubeta de vidrio y b) preparación de la placa de silicagel 60G F254</i>	58
Figura 30: <i>Equipo Thermo Scientific, modelo Nicolet i510 serie 912A0607 para el análisis de grupos funcionales presentes en el pigmento cinabarina</i>	59
Figura 31: <i>Equipo Mettler Toledo HB43-S Halogen</i>	59
Figura 32: <i>Proceso para la determinación de ceniza: a) crisoles dentro de la estufa, b) eliminación de la humedad en el desecador, y, c) incineración en la mufla</i>	60
Figura 33: <i>Características microscópicas y macroscópicas de los carpóforos del hongo Pycnoporus sanguineus: a) capa de tubos, b) micelio del hongo, c) capa superior, y, d) capa posterior</i>	62
Figura 34: <i>Cultivo significativo de la primera siembra: a) base de la Caja Petri, y, b) parte superior</i>	63
Figura 35: <i>Cepa axénica del hongo Pycnoporus sanguineus: a) primeros estadios del hongo b) parte posterior de la Caja Petri, y, c) parte superior de la Caja Petri</i>	63

Figura 36: *Características microscópicas de la cepa axénica del hongo Pycnoporus sanguineus:*
a) esporas, b) hifas esqueléticas, c) hifas generativas, d): 1. hifas conectivas 2. esporangios,
y, e) basidiocarpos..... 64

Figura 37: *Cromatografía de capa fina TLC..... 69*

Figura 38: *Espectro obtenido en el FTIR correspondiente al pigmento (cinabarina) 70*

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Taxonomía de Pycnoporus sanguineus</i>	29
Tabla 2: <i>Medios de cultivo para el crecimiento de Pycnoporus sanguineus</i>	34
Tabla 3: <i>Equipos y materiales utilizados en la obtención de la cepa axénica a partir de los basidiocarpos del hongo Pycnoporus sanguineus</i>	45
Tabla 4: <i>Equipos materiales y reactivos utilizados en la obtención del pigmento cinabarina a partir de la siembra en medios líquidos</i>	46
Tabla 5: <i>Equipos materiales y reactivos utilizados en el análisis del pigmento</i>	47
Tabla 6: <i>Diseño experimental utilizado en la producción del pigmento cinabarina</i>	53
Tabla 7: <i>Características macroscópicas de los carpóforos</i>	61
Tabla 8: <i>Valores correspondientes a la extracción en medio Caldo Papa Dextrosa</i>	66
Tabla 9: <i>Valores correspondientes a la extracción en medio Caldo Extracto de Malta</i>	67
Tabla 10: <i>Porcentaje de humedad del pigmento</i>	71
Tabla 11: <i>Porcentaje de cenizas del pigmento</i>	72
Tabla 12: <i>Diseño y datos para el análisis estadístico</i>	72
Tabla 13: <i>Coefficientes codificados del estudio</i>	74
Tabla 14: <i>Análisis de Varianza (ANOVA)</i>	75

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: <i>Curva de calibración del rojo de metilo</i>	65
Gráfica 2: <i>Concentración y rendimiento del pigmento en Caldo Papa Dextrosa</i>	67
Gráfica 3: <i>Concentración y rendimiento del pigmento en Caldo Extracto de Malta</i>	68
Gráfica 4: <i>Representación geométrica del estudio</i>	73
Gráfica 5: <i>Diagrama de Pareto con respecto a los efectos</i>	76
Gráfica 6: <i>Efectos principales para concentración</i>	77
Gráfica 7: <i>Interacción para concentración</i>	78

RESUMEN

Los bioprocesos en la actualidad se encuentran en auge, a partir de estos se obtienen productos más saludables y amigables con el ambiente, además, son una gran alternativa biotecnológica, el problema radica en que existen variables que inciden de manera fundamental en el producto final o en alguna parte del bioproceso, en el presente estudio se buscó la determinación de la incidencia de los factores medio de cultivo y pH en la obtención del pigmento cinabarina a partir del hongo *Pycnoporus sanguineus*, para trabajar a nivel de laboratorio se obtuvo la cepa axénica a partir de los carpóforos, la misma tiene características sobresalientes, capa algodonosa y color anaranjado brillante.

El pigmento obtenido tiene una concentración máxima 8.0216 ppm en medio Caldo Papa Dextrosa a un pH 7, los Rf correspondientes a la cinabarina son 0.40. 0.41 y 0.39, los compuestos encontrados fueron, el grupo amino que es sobresaliente en los pigmentos, además, del grupo C-H y el ac. carboxílico, el porcentaje de humedad es de 90.81-92.22 y finalmente el porcentaje de cenizas es de 0.5239.

Para determinar la incidencia de las variables de estudio se realizó un DOE 2², en el cual, el efecto A (medio de cultivo) es el factor que índice de manera más significativa $p = 0.000$, el efecto (B) índice de manera significativa, pero es muy baja $p = 0.034$ y la interacción de estos dos factores es nula. Finalmente se realizó una propuesta de artículo científico para una posible divulgación de los resultados obtenidos.

Palabras clave: Bioproceso, medio de cultivo, pH, pigmento, *Pycnoporus sanguineus*.

ABSTRACT

Bioprocesses are currently booming, as they are used to obtain healthier and more environmentally friendly products, and they are also a great biotechnological alternative. The problem lies in the fact that there are variables that fundamentally affect the final product or some part of the bioprocess; in the present study was searched the determination of the incidence of the factors culture medium and pH in obtaining the pigment cinnabarin from the fungus *Pycnoporus sanguineus*, to work at laboratory level, the axenic strain was obtained from the carpophores, which has outstanding characteristics, cottony layer and bright orange color.

The pigment obtained has a maximum concentration of 8.0216 ppm in Broth Potato Dextrose medium at pH 7, the Rf corresponding to cinnabarin are 0.40. 0.41 and 0.39, the compounds found were, the amino group which is outstanding in the pigments, besides, the C-H group and the carboxylic ac., the percentage of humidity is 90.81-92.22 and finally the percentage of ashes is 0.5239.

To determine the incidence of the study variables, a 2² DOE was performed, in which effect A (culture medium) is the factor that most significantly indexed $p = 0.000$, effect (B) indexed significantly, but with a very low $p = 0.034$, and the interaction of these two factors is null. Finally, a proposal was made for a scientific article for a possible dissemination of the results obtained.

Key words: Bioprocess, culture medium, pH, pigment, *Pycnoporus sanguineus*.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El avance en los procesos biotecnológicos y la problemática ambiental existente ha generado la necesidad de buscar aplicaciones alternativas y amigables con el ambiente. Diferentes industrias se han interesado actualmente en extraer los componentes necesarios de microorganismos para utilizarlos como agentes biodegradantes (Lomascolo *et al.*, 2011). A partir de los hongos filamentosos se puede obtener diferentes productos tales como antibióticos, enzimas, colorantes entre otros productos. La extracción de colorantes naturales se ha dado desde hace varios años sin embargo su uso ha disminuido debido a que las industrias prefieren los colorantes sintéticos debido a que estos generan menos costos de producción, asimismo cuentan con un alto grado de toxicidad debido a que para su obtención se utilizan diferentes químicos los cuales a mediano y largo plazo pueden causar efectos secundarios.

Varias clases de la familia *Polyporaceae* descomponen madera, pueden producir pigmentos, además, [son derivados de ácidos polipóricos y terpenilquinones] (Velisek y Cejpek, 2011). Se puede encontrar cuatro clases de esta especie: “*P. cinnabarinus*, *P. puniceus*, *P. sanguineus* y *P. coccineus*” (Lomascolo *et al.*, 2011). *P. sanguineus* es un hongo saprofito que tiene un inmenso potencial lignocelulítico, se determina por la coloración anaranjado brillante que se puede observar a simple vista en sus basidiocarpos; esto es debe a compuestos procedentes de la cinabarina “*ácido cinabarínico* y *tramesanguina*” (Cruz Muñoz, 2015).

Los bioprocesos son una gran alternativa para la obtención de productos amigables con el ambiente, además de ser económicamente favorables, reducen los riesgos que pueden ocasionar productos sintéticos, debido a la intervención de sustancias químicas para su obtención, el

pigmento cinabarina se obtiene de un bioproceso, ya que se utiliza el hongo *Pycnoporus sanguineus* para su obtención, en este proceso intervienen diferentes variables de manera significativa y no significativa, pocos son los estudios que se enfocan en buscar o determinar cómo estos afectan al proceso o al producto final.

Existen varios estudios relacionados al hongo *Pycnoporus sanguineus* y al pigmento cinabarina, pero en la actualidad no se ha investigado los factores que interviene para su obtención y si los mismos tienen incidencia en el proceso de obtención, en la presente investigación se pretende determinar la incidencia de los factores pH y medio de cultivo en la obtención del pigmento (cinabarina) a partir del hongo *Pycnoporus sanguineus*, para llevar a cabo el estudio primero se caracterizara la cepa axénica del hongo utilizando claves taxonómicas, luego se caracterizara el pigmento obtenido en medios de cultivo líquidos empleando diferentes pruebas físico químicas, posteriormente se evaluara las variables de estudio mediante un diseño factorial 2² para determinar su influencia en la obtención del pigmento y finalmente se presentará el borrador de un artículo científico para una futura publicación, este estudio trata de encontrar si los factores que se consideran incidentes son significativamente fundamentales y así tener un mejor control del bioproceso e incentivar a las industrias a obtener productos más saludables.

2.1 El problema de Investigación

En la actualidad los bioprocesos están en auge, porque resultan ser una alternativa saludable para el ambiente; a partir del hongo *Pycnoporus sanguineus* podemos obtener el pigmento cinabarina que resulta ser una alternativa para la sustitución de pigmentos sintéticos que pueden causar efectos secundarios en las personas, dentro de este proceso existen variables muy importantes que son fundamentales para obtener un proceso correcto y así no afectar al producto final, pero no existen estudios de cómo estos pueden incidir en dicha obtención, por esta razón se

realiza la presente investigación que trata de determinar la incidencia de los factores pH y medio de cultivo en la obtención del pigmento (cinnabarina) a partir del hongo *Pycnoporus sanguineus*.

2.2 Antecedentes

Un primer estudio corresponde a (Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2013) con el título “Pigmentos antimicrobianos de *Pycnoporus sanguineus*” el objetivo de este fue valorar la producción de cinnabarina en caja y en cultivo sólido; se incubo en medios hechos a partir del aserrín de pino, encino y cedro. Se realizó la extracción de cinnabarina mediante el cuerpo del hongo y el micelio empleando dos solventes, acetona y acetato de etilo. Mediante cromatografía de capa fina se encontró frentes de retención (Rfs) de 0.41 y 0.45 que pertenecen a la cinnabarina. En los extractos que se obtuvieron a partir del cultivo de caja de Petri se consiguió Rfs de 0.43 y 0.48 que de igual manera pertenecen a la cinnabarina (0.43 y 0.47). La cinnabarina y sus cambios en estos extractos se cuantificaron con una curva estándar de absorbancia vs concentración. Finalmente se probó la actividad antimicrobiana frente a bacterias gram “+” y gram “-” (Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2013).

Un segundo estudio realizado por (Cruz Muñoz *et al.*, 2015) con el título “Producción de pigmentos de *Pycnoporus sanguineus* en medio de cultivo sólido” tuvo como objetivo la evaluación del crecimiento del hongo *P. sanguineus* y la producción del pigmento en cuatro medios de cultivo sólido, en esta investigación se utilizaron los carpóforos del hongo *P. sanguineus* que se encontraban en árboles en descomposición El diseño empleado en este estudio fue al azar con un arreglo de métodos donde los elementos y niveles fueron: medio de cultivo [agar harina integral de trigo, agar de papa dextrosa, agar extracto de malta, agar extracto de casuarina, y agar extracto de mango]; y el pH [7.0, 8.0 y 9.0], la investigación se realizó por 30 días y se definieron las condiciones de desarrollo y rendimiento del pigmento del hongo. Como resultado se obtuvieron las siguientes variables: diámetro de la colonia, velocidad de crecimiento, cantidad y concentración

del pigmento extraído. Con los datos se realizó un ANOVA y a las medias se las relacionaron contra los contrastes ortogonales, las condiciones de desarrollo para el aislamiento H1 fueron: agar extracto de casuarina a pH 7.0 y 9.0; y para H2 fue agar extracto de mango a pH 7.0. “La mayor velocidad de desarrollo en ambos casos fue el medio de cultivo con el extracto de donde fueron aislados. Las mayores concentraciones del pigmento se obtuvieron en agar papa dextrosa y agar extracto de malta” (Cruz Muñoz *et al.*, 2015; p 347).

Estos trabajos se relacionan con la investigación en curso, ya que los dos hablan sobre el hongo *P. sanguineus* y la extracción del pigmento cinabarina, en los cuales se ha estudiado datos importantes como sus medios cultivo, solventes para su extracción, y el pH. Estos estudios son de vital importancia ya que se tiene una idea de cuál es el procedimiento que se debe seguir para obtener el pigmento (cinabarina), dentro de la presente investigación se determinará la incidencia de los factores pH y medio de cultivo en la obtención del pigmento a partir del hongo *P. sanguineus*, la cual resulta ser una investigación nueva ya que este estudio no se ha realizado con anterioridad. La finalidad es encontrar si los factores considerados en este bioproceso son significativos y así tener un mejor control del bioproceso e incentivar a las industrias a obtener productos mediante los bioprocesos.

2.3 Justificación

En la actualidad la investigación de las propiedades y usos que poseen los hongos está en crecimiento debido a que son alternativas saludables para la obtención de diferentes productos. En el Ecuador contamos con una amplia riqueza fúngica esto se debe al clima tropical y húmedo que se da en diferentes zonas, el macromiceto *P. sanguineus* perteneciente a la familia *Polyporaceae*. Según (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017; p 60) “posee una gran capacidad para la obtención de pigmentos naturales, especialmente cinabarina, que junto con otras sustancias producidas por el

hongo presenta actividades biológicas antivirales, antioxidantes, antifúngicas, antibacterianas y antiparasitarias lo que le confiere diversas aplicaciones en sectores de la biotecnología”.

Los bioprocesos resultan ser muy favorables en la actualidad ya sea a nivel económico como ambiental, la presente investigación pretende determinar la incidencia de los factores pH y medio de cultivo en la obtención del pigmento (cinabarina) a partir del hongo *Pycnoporus sanguineus* con la finalidad de saber si estos son significativos o no dentro del proceso, con esto se tendría un mejor control y se tomarían en cuenta las variables que realmente afectan de manera significativa determinando cuáles son las mejores.

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo general

Determinar la incidencia de los factores pH y medio de cultivo en la obtención del pigmento (cinabarina) a partir del hongo *Pycnoporus sanguineus*.

2.4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar el hongo *Pycnoporus sanguineus* utilizando claves taxonómicas para emplearlo en la producción del pigmento (cinabarina).
- Caracterizar el pigmento (cinabarina) mediante análisis físico químico determinando sus propiedades.
- Evaluar las variables de estudio a través de pruebas experimentales determinando su influencia en la obtención del pigmento (cinabarina).
- Elaborar una propuesta de artículo científico respetando los formatos internacionales para la posible divulgación de los resultados obtenidos.

2.5 Hipótesis

Los factores pH y medio de cultivo influyen en el rendimiento del pigmento (cinabarina) produciendo variación.

CAPÍTULO 2

MARCO DE REFERENCIA

2.1 Hongos

2.1.1 Generalidades

Los hongos son organismos eucariotas, tienen digestión exterior con absorción, y que fabrican un micelio [salvo algunas excepciones debido a que algunos son unicelulares], conformado por hifas septadas o sifonales, estas paredes celulares están cubiertas por quitina y glucanos. Varios ejemplares se reproducen de forma sexual y asexual, las células o compartimientos poseen por lo común varios núcleos haploides. Los *basidiomycetes* son los más diversos, de estos tipos se puede encontrar alrededor de unos 20 000 tipos entre los cuales se pueden distinguir: las setas, los bejines, hongos maderables, las royas y carbones, también, los hongos de aspecto gelatinosos, entre otras especies forman alrededor del 30% de los hongos que se conocen. La principal particularidad es la formación de basidios, meiosporangios que producen basidiosporas exógenas, uninucleadas y haploides (Menéndez, 2014).

Los hongos son los organismos más comunes en nuestro planeta, los podemos encontrar en la tierra, bajo el agua, en el aire, en objetos inanimados, en el entorno cerrado de casas, hospitales, además, son muy comunes en animales y en el propio ser humano. Son los encargados de descomponer la materia orgánica en el planeta y tienen una gran capacidad de adaptación, por lo que resisten y se reproducen en diferentes medios, temperaturas y condiciones atmosféricas (Riera *et al.*, 2019). Según (Equihua *et al.*, 2007), a pesar de la importancia ecológica y el potencial económico de los hongos, su uso y conocimiento tradicional en zonas rurales se ve enormemente afectado por la reducción de zonas boscosas provocada por la deforestación.

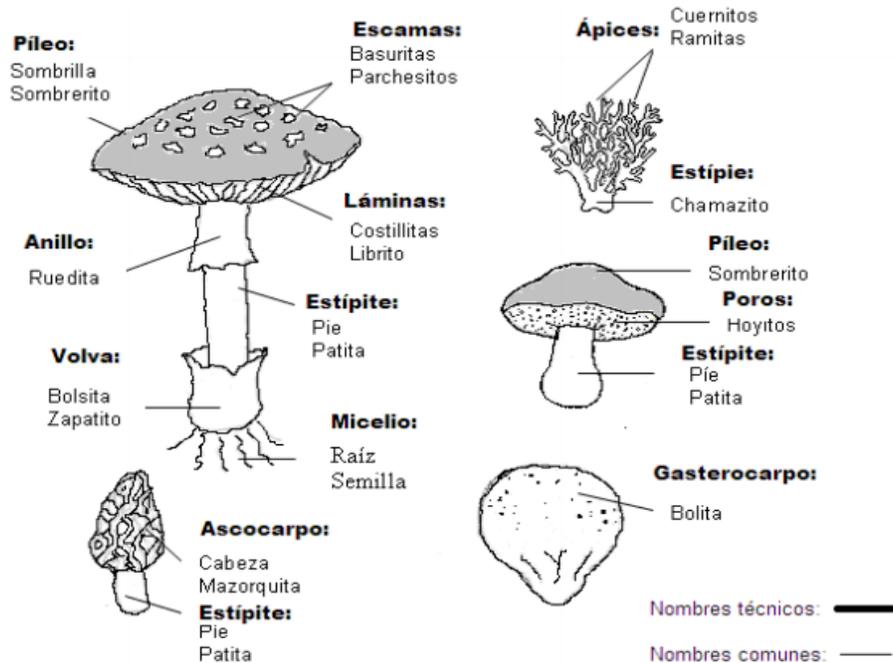


Figura 1: Nombres de las diferentes partes de los hongos

Nota. La figura muestra los nombres técnicos y comunes de las partes de diferentes tipos de hongos.

Fuente: (Equihua *et al.*, 2007; p 43).

2.1.2 Morfología de los hongos

Según Navarro (2013), los hongos se encuentran formados por dos estructuras las cuales se detallan a continuación:

a) Micelio

Es una estructura que está compuesta de filamentos más conocidos como hifas que se entrecruzan, las mismas le otorgan una apariencia algodonosa, lanosa o aterciopelada. Las hifas por su función son: vegetativas [responsables de abastecerse de alimento mediante el medio] y fértiles [con fines reproductivos, es decir, producen esporas].



Figura 2: *Micelio vegetativo en su hábitat natural*

Fuente: (López, 2016; p 23).

b) Esporas

Según (Navarro, 2013; p 21) estas “son los órganos que proporcionan color a la colonia y pueden ser: negros, verdes, azules, marrón, etc. Además, son los órganos encargados de la reproducción ya sea sexual [en los cuales intervienen órganos masculinos y órganos femeninos] o asexual [se producen a partir de una parte del hongo, el tallo, o de sus esporas]”.



Figura 3: *Formas que pueden presentar las esporas*

Nota. Las esporas varían en su tamaño y forma dependiendo. Fuente: (Salazar Vidal, 2016; p 22).

2.1.3 Medios de cultivo para hongos

Según Gaitán Hernández (2006), para la siembra y crecimiento de los hongos a nivel de laboratorio, se utilizan medios de cultivo que suministran los nutrientes necesarios para su crecimiento, los mismos se los puede encontrar en casas comerciales en diferentes presentaciones. La totalidad de los hongos son nutricionalmente poco rigurosos y crecen en medios sencillos, estos medios deben contener hidratos de carbono {almidón, celulosa, glucosa, maltosa, sacarosa}, sales de nitrógeno o peptonas y diminutas cantidades de oligoelementos: Fe, Mg, P, K Zn, Cu, Mn y Mo (Pinto, 2017).

Según Pinto (2017), podemos encontrar tres medios de cultivo:

a) Medios naturales

Son pedazos o infusiones de diferentes frutas, restos vegetales, granos de cereales o tejidos de animales.

b) Medios semisintéticos

Son extractos de plantas, peptonas, agar entre otros elementos.

c) Medios sintéticos

La composición química se encuentra definida, son los medios más conocidos y utilizados, dentro de los más comunes se encuentra el Agar Sabouraud.

2.2 *Pycnoporus sanguineus*

Pycnoporus sanguineus pertenece a la familia *Polyporaceae*, esta clase no solamente abarca a los hongos ligninolíticos sino a los más competentes destructores de madera, su color anaranjado intenso lo hace un hongo más fácilmente observable siendo muy frecuente en zonas húmedas, además, se lo puede encontrar en ambientes naturales, troncos tanto de zonas urbanas como rurales. (Papinutti, 2013).

Según (Cruz Muñoz *et al.*, 2015) los metabolitos secundarios del hongo *Pycnoporus sanguineus* son importantes en la búsqueda para la obtención de diferentes productos dentro de los cuales podemos encontrar las sustancias antivirales, antioxidantes, antifúngicas, y antibacterianas.



Figura 4: Hongo *Pycnoporus sanguineus*

Nota. Esta fotografía fue tomada en el año 2020 al momento de recolectar los troncos que contenían los hongos. Fuente: Autora.

Tabla 1: Taxonomía de *Pycnoporus sanguineus*

Taxonomía <i>Pycnoporus sanguineus</i>.	
Reino	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Orden	Polyporales
Familia	Polyporaceae
Género	<i>Pycnoporus</i>
Especie	<i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.) Murrill

Nota. La tabla muestra la taxonomía referente al hongo de estudio. Fuente: (Papinutti, 2013; p 32).

2.2.1 Ciclo biológico

Los hongos *Pycnoporus* son homobasidiomicetos heterotálicos con un estilo de apareamiento tetrapolar (Herpoël *et al.*, 2000). “Mediante el ciclo de vida de los basidiomicetos se puede observar un desarrollo sexual a partir de basidiopores haploides, que se producen, al germinar, una hifa con un núcleo por célula [*monokaryon*]. Las dos cepas monocariotas con diferentes alelos de apareamiento pueden fusionarse y fabricar un micelio dicariota, particularizado por conexiones de pinza, en el que los dos núcleos parentales no se fusionan mientras se da el crecimiento vegetativo. El crecimiento vegetativo se detiene hasta que las condiciones ambientales inducen a la formación de cuerpos frutales. Luego de la cariogamia y la meiosis dentro de los basidios, se producen cuatro esporas uninucleadas que dan lugar a líneas celulares monocariotas” (Lomascolo *et al.*, 2002; p 1201).

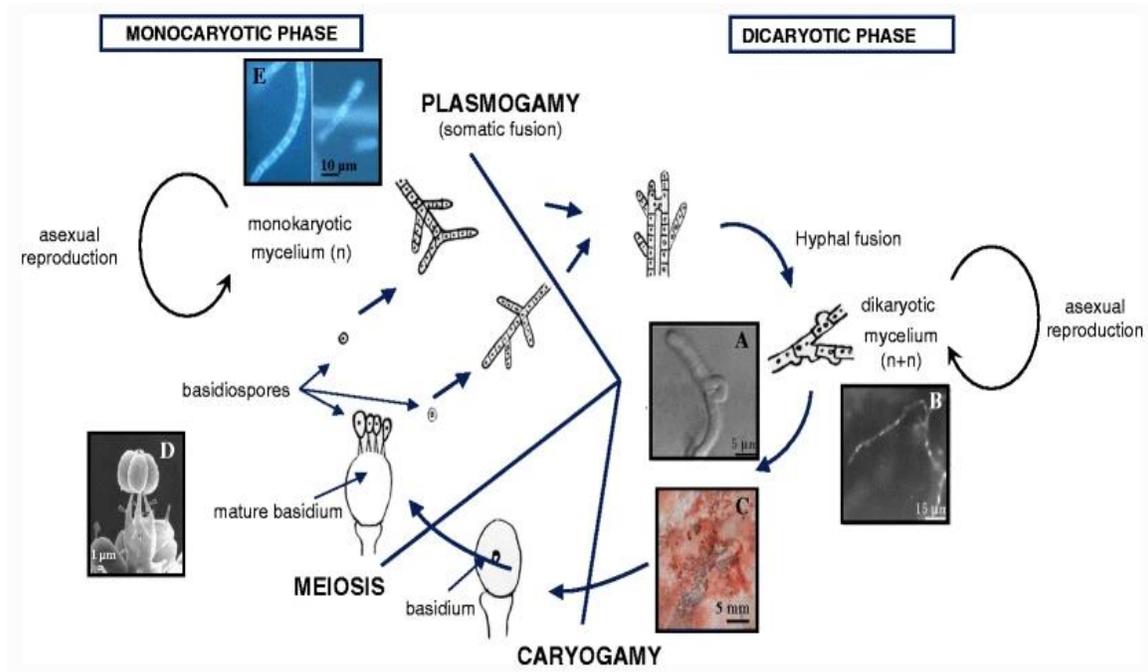


Figura 5: Ciclo de vida del hongo *Pycnoporus*

. Fuente: (Lomascolo *et al.*, 2011; p 1130).

2.2.2 Características macroscópicas

Los basidiomas o cuerpos fructíferos de esta familia son flabeliformes [forma de abanico] y estas están pegadas al sustrato por su base, muchas veces esta base se puede ser más ancha y dar la apariencia de ser subestipitados, “Las medidas varían bastante pero por lo general el rango va desde 1,2 cm-3,5 cm largo X 1,5 cm-5 cm ancho X 0,1 cm-0,45 cm grosor, ocasionalmente son confluentes por sus laterales es decir se pegan basidiomas contiguos” (Papinutti, 2013; p 33).

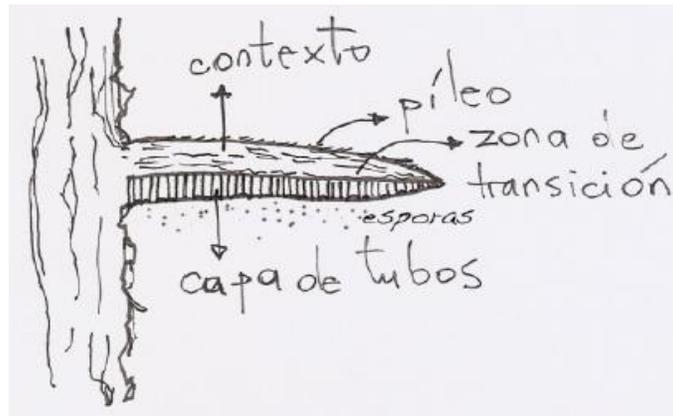


Figura 6: *Partes del carpóforo*

Fuente: (Papinutti, 2013; p 33).

Según Ramos (2014), la superficie del hongo es aterciopelada cuando es este es joven y lisa cuando tiene varios años, varias veces es rugosa, el color va desde anaranjado brillante {cuando esta húmedo} a anaranjado rojizo o anaranjado amarillento [cuando está seco].

2.2.3 Características microscópicas

Según el estudio de Chamorro y Osorio (2017; p 108) “esta especie cuenta con tres tipos de hifas, hifas generativas de paredes delgadas, hialinas, ramificadas y anastomosadas, de 1-3.5 μm de ancho y con conexiones clamps, hifas esqueléticas de paredes gruesas hialinas, de 4-7 μm de ancho, sin septos y de anchura desigual, hifas conectivas con paredes gruesas, ligeramente

ramificadas y estrechas, de 2-3.5 μm de ancho, con paredes gruesas formada por una banda delgada y estrecha de hasta 0,5 μm de ancho, frecuentemente con ramificaciones cortas y curvadas”.

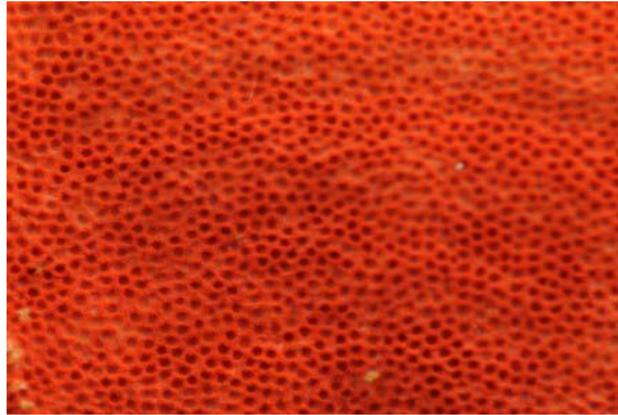


Figura 7: Vista de poros del hongo *Pycnoporus sanguineus*

Nota. Los poros pertenecen a la capa de tubos. Fuente: (Papinutti, 2013; p 32).

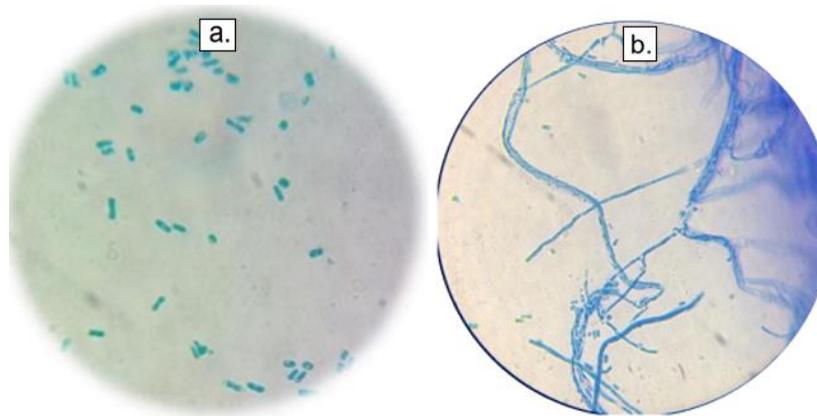


Figura 8: a) esporas y b) micelio del hongo *Pycnoporus sanguineus*

Nota. Las estructuras que se presentan en esta imagen están teñidas con azul de lactofenol. Fuente:

(Rodríguez, 2020; p 55).

2.2.4 Recolección

Pycnoporus sanguineus muchas veces puede estar presente en sustratos lignocelulósicos que se encuentran en degradación, sobre estos crece de manera natural (Borderes *et al.*, 2011).

“Para la recolección es necesario conocer de antemano las características macroscópicas del

cuerpo fructífero del hongo” (Ortiz *et al.*, 2016; p 140). Luego de reconocer al hongo, con mucho cuidado se toma el cuerpo fructífero de manera manual; se debe registrar los datos del lugar, fecha y sustrato donde fue encontrado.

2.2.5 Aislamiento

Según (Andrade *et al.*, 2020), para la siembra se puede utilizar medios de cultivo como el Agar Papa Dextrosa o Agar Sabouraud Dextrosa, se debe tomar con mucho cuidado una pequeña muestra del tejido del hongo y colocarlo con mucho cuidado en la caja Petri que contiene el medio y se incuba durante 10 a 20 días a 25 °C en la oscuridad. “El rango de crecimiento puede darse a temperaturas entre 24-30 °C. Una vez que el hongo se haya desarrollado se deben realizar diferentes repiques hasta obtener la cepa pura” (Cruz Muñoz *et al.*, 2015; p 351).

Se recomienda adicionar al medio antibióticos como el cloranfenicol o la gentamicina, con la finalidad de inhibir el crecimiento bacterias contaminantes, o antifúngicos especiales (Rodríguez, 2020).



Figura 9: *Siembra a partir del tejido de un hongo*

Nota. La figura muestra la forma de colocar el fragmento de tejido en medio de cultivo. Fuente: (Gaitán Hernández, 2006; p 20).

2.2.6 Medios de cultivo

En el estudio realizado por (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017; p 61), “*pycnoporus spp.* puede crecer de manera fácil a nivel de laboratorio, los medios de cultivo para este hongo pueden ser a partir del uso de sustratos como el almidón, extracto de malta, diferentes azúcares, caldos suplementados con extracto de levadura o fosfolípidos, además, se reporta el uso de diferentes residuos como el bagazo de la caña de azúcar, residuos de plátano, residuos de madera, cáñamo, cáscaras, hojas de palma y residuos de frutas, entre otros”.

Tabla 2: Medios de cultivo para el crecimiento de *Pycnoporus sanguineus*

Medios de cultivo
Agar Papa Dextrosa
Agar Harina Integral de Trigo
Agar Extracto de Malta
Medios afines al material vegetal de donde se recolectó (Agar Extracto de Casuarina, Agar Extracto de Mango)
Agar Extracto de levadura

Nota. Estos medios de cultivo fueron reportados por diferentes autores. Fuente: (Gómez, 2017; p 25).

2.2.7 Producción de metabolitos secundarios

P. sanguineus presenta un gran potencial biotecnológico, esto se debe al poder lignocelulítico que presenta y debido a la producción de metabolitos secundarios. Las enzimas que produce son exopoligaracturonasa, lacasas, invertasas, alfa amilasas y celulasas con aplicación industrial y para los pigmentos “*cinnabarina, tramesanguina, ácido cinabarinico, picnosanguina;* y varios derivados de *2-amino-feroxazina-3* y por último uno que se está identificando con actividad antimicrobiana usado en humanos y animales” (Rodríguez, 2020; p 21). “Es importante conocer, que los metabolitos secundarios, derivados de esta especie, tienen un gran potencial

antioxidante, y la eficiencia de este hongo para la producción de diferentes compuestos, no está relacionada con la velocidad de crecimiento” (Borderes *et al.*, 2011; p 1173).

2.2.8 Usos

2.2.8.1 Degradación de compuestos xenobióticos.

La familia de los *Pycnoporus spp*, tienen la capacidad de descomponer compuestos de estructura polifenólica similar a la lignina, esto se debe a las de enzimas extracelulares que producen estas especies, además, actúan despolimerizando diferentes unidades no repetitivas de fenilpropanoide ligadas por diferentes enlaces C-C (Pointing, 2001).

2.2.8.2 Control biológico.

Según (Infante *et al.*, 2009; p 14), “la utilización de hongos antagonistas es una opción de gran ayuda para realizar control biológico de diferentes fitopatógenos causantes de diferentes enfermedades los cultivos”. “La investigaciones en *P. sanguineus* muestran la capacidad antifúngica frente al hongo *Mycena citricolor*, causante de la afección "ojo de pollo" presente en las siembras de café, provocando parasitosis y daño en las hifas” (Ojeda y Suescum, 2012; p 8). En el estudio realizado por (Viecelli *et al.*, 2010), los resultados semejantes contra *Pseudocercospora griseola*, responsable de la "mancha angular" en la mayoría de los cultivos de fréjol.

2.2.8.3 Extracto de *Pycnoporus sanguineus* utilizado como biosensor.

Según (Borderes *et al.*, 2011; p 1169), “el extracto de *P. sanguineus* se utilizó en un biosensor para poder encontrar poder compuestos fenólicos, las mejores respuestas fueron para el *catecol*, *hidroquinona* y *resorcina* ya que se demostró que este presento actividad enzimática en solución he inmovilizo en transductores electroquímicos de pasta de carbono”.

En resumen

P. sanguineus tiene aplicaciones relevantes dentro de las diferentes industrias como lo son la alimentaria, farmacéutica y biotecnológica debido a la actividad biológica: actividad

antibacteriana, antioxidante, y antifúngica; tiene un mayor impacto, el cual se presenta en la industria de los pigmentos obtenidos mediante bioprocesos (Cruz Muñoz *et al.*, 2015).

2.3 Cinabarina

Según Loaiza (2016), la cinabarina es un pigmento que otorga el color anaranjado intenso al hongo *P. sanguineus*, esta cuenta con una estructura básica “3-fenoxazina, con un grupo carbonilo en C-1, un grupo amino en C- 14 2 y un grupo hidroxilo en C-9”; es una sustancia que puede inhibir bacterias Gram (+) que Gram (-).

La figura 10 se muestra la estructura y el nombre *IUPAC* de la cinabarina.

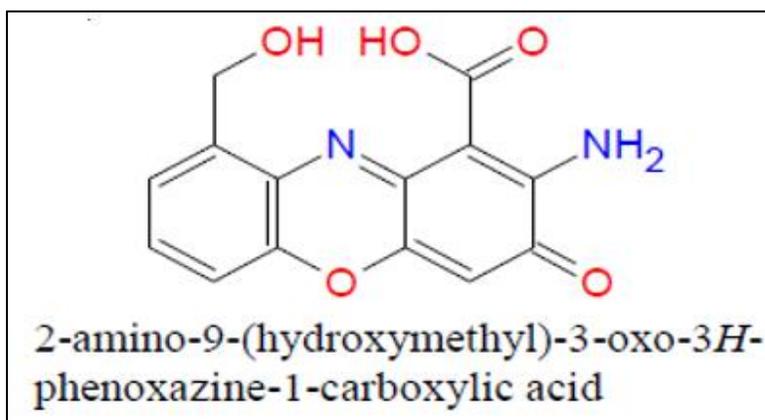


Figura 10: Estructura y nombre *IUPAC* de la cinabarina

Fuente: (Télez-Télez *et al.*, 2016; p 1510).

2.3.1 Producción

La producción de cinabarina, puede hacerse de manera *in vitro* en diferentes medios entre líquidos y sólidos, o *in vivo* mediante el tejido de esta especie, dicha producción, es más práctica. “Las mayores concentraciones de este pigmento se obtienen en Agar Papa Dextrosa [PDA, por sus siglas en inglés] y Agar Extracto de Malta [MEA, por sus siglas en inglés], mientras el mayor crecimiento micelial se obtiene en medios conformados por los extractos de los materiales lignocelulósicos de donde las cepas fueron aisladas” (Cruz Muñoz *et al.*, 2015; p 355).

Investigaciones efectuadas por (Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2010; p 557), “demuestran que los mejores sustratos para la producción de cinnabarina a partir de primordios es el residuo de pino, encino y el de cedro. En estas investigaciones, la concentración promedio de cinabarina en fue de 6-9 mg/g, mientras que en primordios fue de 56 mg/g y en cuerpos fructíferos desarrollados completamente fue de 68 mg/g. Una de las ventajas de usar basidiocarpos en lugar de primordios para la obtención de cinabarina es la posibilidad de realizar de dos o tres cosechas del hongo, para lo cual se necesitaría de 242 a 356 días. Por lo contrario, el cultivo mediante caja Petri permite extraer cinabarina en un tiempo más corto [de 7 a 15 días], con mayor actividad antioxidante”. En el estudio realizado por (Cruz Muñoz, 2015), utilizan el caldo de papa y el extracto de casuarina para la producción de cinabarina en medio líquido.

Dependiendo de la situación, si se necesita la cinabarina para diferentes investigaciones es conveniente que desarrolle el hongo en cajas de Petri, pero si esta es necesitada en usos industriales, se recomienda producirla mediante primordios o cuerpos fructíferos (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017).

2.3.2 Extracción

En la investigación realizada por (Cruz Muñoz *et al.*, 2015; p 351), “se manifiesta que luego de haber finalizado el tiempo de prueba, el cultivo sólido se secó en un horno de convección HCM-A45 [*TecniLab Equipment*, México] a temperatura de 35 ± 2 °C alrededor de 14 días. Luego se adicionó 50 mL del solvente acetato de etilo encima de la superficie de la capa seca de agar y se raspó hasta obtener todo el pigmento. El extracto reposó durante 4 días en la oscuridad, con una muestra del pigmento obtenido se midió la absorbancia a una longitud de 490 nm en un espectrofotómetro Lambda XLS [Perkin Elmer, EE. UU.]. Para la determinación de la concentración del pigmento (mg mL^{-1}), se realizó la curva con concentraciones conocidas del rojo

de metilo [Sigma-Aldrich, MA, EE. UU.] y la concentración de este pigmento se calculó con la ecuación de regresión lineal $[y=107.19x+0.0001]$. La cantidad de pigmento se determinó por diferencia de masas (mg) de la capa de agar antes y después de la extracción. Las muestras obtenidas se guardaron en viales, se almacenaron y guardaron a una temperatura ambiente (23 ± 3 °C) hasta su uso”.

En la investigación realizada por (Cruz Muñoz, 2012; p 31), “el crecimiento del hongo se dio en cultivos líquidos los cuales se incubaron a $25\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ durante 20 días. Después del periodo de incubación, se decantó el caldo de papa con micelio de color naranja y se filtró con papel Whatman No.1, previamente pesado. Se pesó 1 g de cada muestra y se secaron a 105 °C durante 20h. Al micelio sobrante, se lo maceró con 10 mL del solvente acetato de etilo para poder obtener el pigmento. Se completo a un volumen de 50 mL con el mismo solvente empleado en la extracción. El extracto reposo alrededor de 2 días”.

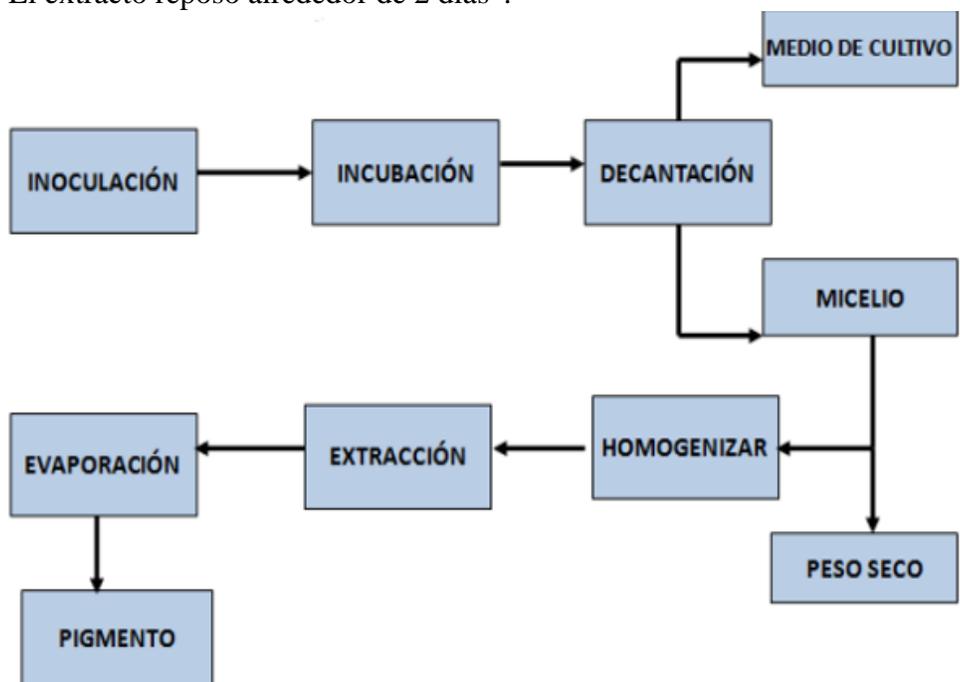


Figura 11: *Proceso de obtención del pigmento de Pycnoporus sanguineus*

Nota. El proceso que se presenta en la imagen corresponde a la extracción en medios de cultivo sólidos.

Fuente: (Cruz Muñoz, 2012; p 30).

2.3.3 Cromatografía de capa fina

La cromatografía es un método físico que separa excepcionalmente versátil, en una o varias de sus formas. Esta destaca entre los nuevos métodos analíticos ya que ayuda a clasificar, identificar y evaluar el número de especies, sola o en combinación con otras técnicas de investigación instrumental como la espectrofotometría (Corzo, 2019).

Según Guarnizo Franco y Martínez Yepes (2009), “la técnica de Cromatografía en capa fina o también conocida como TLC, tiene un sistema de dos fases, la primera es sólida [conocida como fase estacionaria] que es una capa delgada, absorbente, generalmente tiene un grosor de 0.10 a 0.25 mm de espesor para diferentes fines analíticos y caso de que se quiera aislar un compuesto el grosor de la placa varía entre 0.5 y 2.0 mm. La capa delgada puede colocarse dentro de un recipiente de vidrio, aluminio o plástico que servirá como soporte, mediante la fase estacionaria va a circular el solvente que se conoce como fase móvil o también eluyente”.

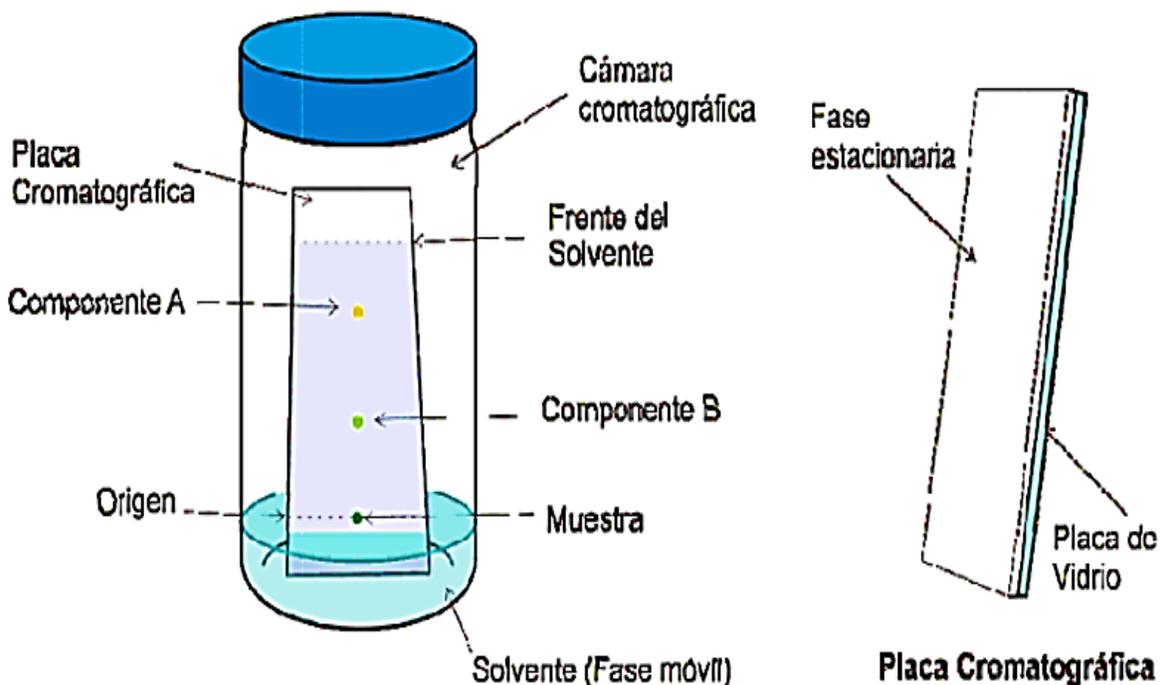


Figura 12: Partes de una cromatografía de capa fina (TCL)

Fuente: (Guarnizo Franco y Martínez Yepes, 2009; p 101).

Según (Corzo, 2019), el coeficiente R_f o también conocido como “Relación de Frentes”, es una constante para cada sustancia siempre y cuando la determinación se realice en las mismas condiciones en cuanto al papel de sílice, la temperatura, tiempo de corrida, solventes usados, volumen y concentración de las sustancias a determinarse. Este coeficiente se define por la siguiente expresión:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por el frente del solvente}}$$

En la figura 13 se muestra un ejemplo del cálculo de R_f :

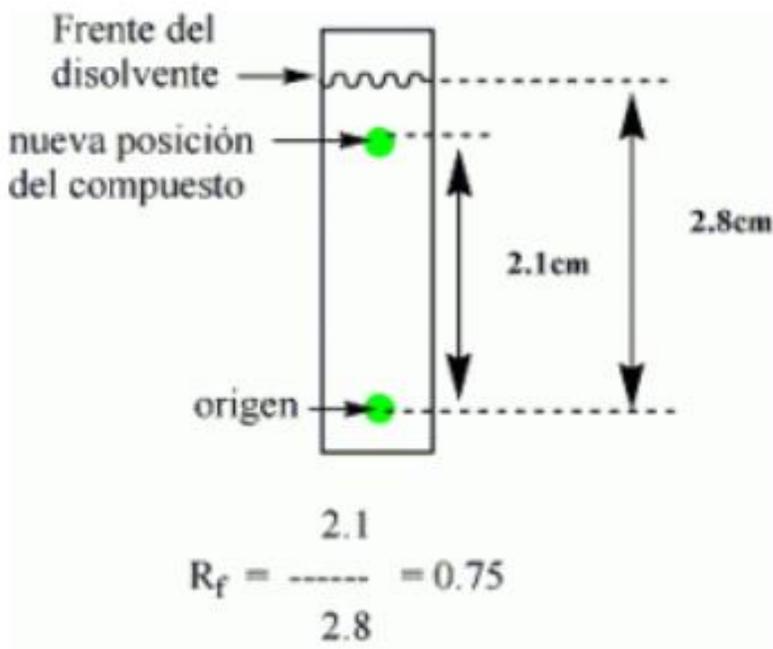


Figura 13: Cálculo del R_f

Nota. Se debe recordar que $0 < R_f < 1$. Fuente: (Corzo, 2019; p 31).

Siguiendo con el estudio realizado por (Cruz Muñoz *et al.*, 2015; p 351), “con los extractos obtenidos en acetato de etilo se hizo una cromatografía de capa fina para poder comparar y encontrar los frentes de retención (R_f) del pigmento obtenido a partir de los aislamientos de *P. sanguineus* en comparación con el rojo de metilo. Las muestras se ubicaron en una placa

cromatográfica 60 F254 [Merck®, Alemania], y se colocó una mezcla de solventes [acetato de etilo-metanol (1:2)] como fase móvil. Se hizo un barrido espectrofotométrico en una longitud de onda entre 200 a 700 nm”.

2.4 Pigmentos

Los pigmentos otorgan color a diferentes materiales, esto se debe al efecto de la refracción de la luz del sol. También, se define como una sustancia [en polvo] que al momento de mezclar con un líquido puede impartir color a la superficie. “Debido a estas características, son de vital importancia para las diversas industrias, entre ellas, la alimentaria [aditivos, intensificadores de color], farmacéutica [coloración de vehículos, cosméticos], textil [coloración de prendas], etc.” (Aguilar Pompa, 2017; p 5).

2.4.1 Pigmentos sintéticos

Los pigmentos sintéticos o artificiales se producen mediante reacciones químicas [síntesis química]. El proceso actual para fabricación de pigmentos sintéticos puede involucrar métodos complejos, ya que se producen en masa y buscando reducir el costo y el impacto ambiental. Para poder obtener determinado pigmento se debe estudiar el mecanismo de reacción entre reactivos (González y Cerón, 2014).

La producción de pigmentos sintéticos en la actualidad no resulta conveniente tanto para los productores como para los compradores, debido a que los costos son elevados, además, las personas conocen de los riesgos que pueden presentar en la salud y el medio ambiente, de tal manera que cada vez se consume menos los productos que los contienen (Galarza, 2013).

2.4.2 Pigmentos naturales

Los pigmentos naturales se extraen de sustancias animales, vegetales o minerales y los grupos principales de estos colorantes son las antocianinas, abetalinas, caramelo, carotenoides,

clorofilas, riboflavina, etc. En general, la capacidad de pigmentación de muchos pigmentos naturales es inferior a la de los artificiales. Los colorantes que se obtienen a partir muchos vegetales o de sus restos a menudo suelen causar serios problemas con el sabor y aroma frente a la luz, es por ello que, existen problemas en el gusto y olor de los diferentes alimentos (Carrillo Ruiz, 2017). “La tendencia mundial se inclina al consumo de colorantes procedentes de fuentes naturales porque los consumidores han incrementado su interés por los beneficios para salud porque no solo cumplen la función de colorear, sino que también de actuar como oxidantes gracias a los grupos funcionales por los que están compuestos” (Galarza, 2013; p 43).

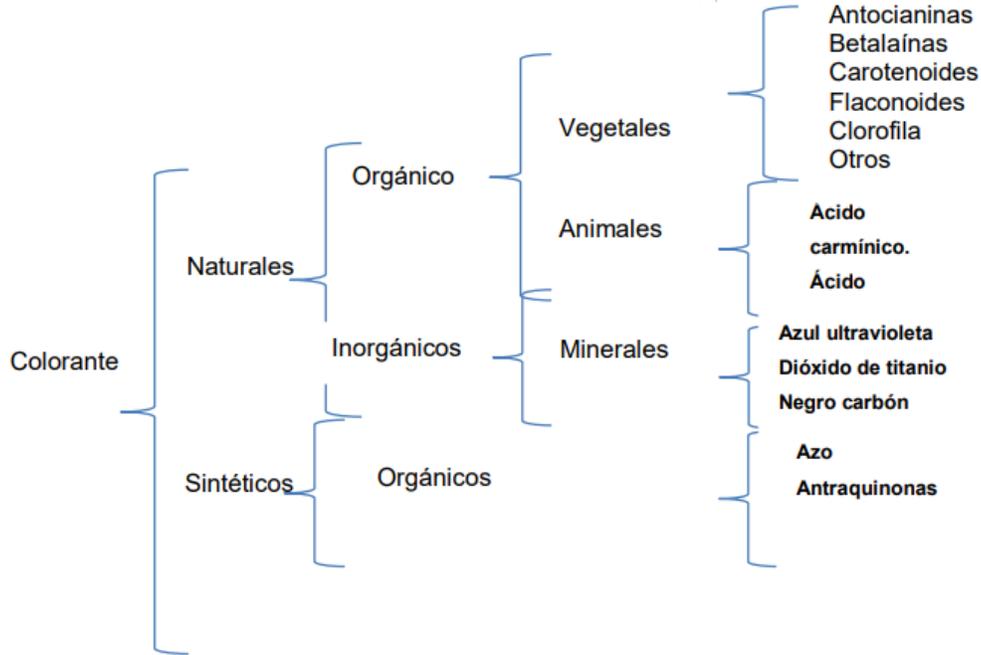


Figura 14: *Clasificación de los colorantes*

Nota. La figura presenta la clasificación general de los colorantes, los mismos pueden ser naturales o sintéticos. Fuente: (Carrillo Ruiz, 2017; p 12).

2.4.3 Análisis físico químico

Según el estudio realizado por (Carrillo Ruiz, 2017), una vez que se haya obtenido el colorante se debe caracterizar y así encontrar el porcentaje de humedad, porcentaje de cenizas, la actividad de agua, los frentes de retención y los principales microelementos [As, Hg, Pb, Cr].

- **Cenizas:** permite conocer el volumen de las sustancias inorgánicas no combustibles presentes en el colorante final.

- **Humedad:** se refiere al porcentaje de agua que se puede encontrar en el producto final, para la realización de este estudio se puede utilizar equipos de laboratorio.

- **Actividad de agua:** se desarrolla con el fin de saber la disposición de agua que tienen los microorganismos para desarrollarse. El valor máximo es de 1 y mínimo de 0.

- **Microelementos:** para este estudio se utiliza la absorción atómica que es un método experimental, por el cual se determina la presencia o ausencia de distintas sustancias entre ellas contaminantes.

La revisión bibliográfica es necesaria para poder llevar a cabo las siguientes etapas de la presente investigación, ya que es de vital importancia tener conocimientos previos para ponerlos en práctica dentro del desarrollo de la parte experimental.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se divide en cuatro etapas: obtención de la cepa axénica del hongo *Pycnoporus sanguineus*, obtención del pigmento cinabarina, análisis físico químico del pigmento y elaboración de una propuesta de artículo científico.

3.1 Nivel de investigación

La actual investigación es de tipo explicativa, porque al determinar la incidencia de los factores pH y medio de cultivo en la obtención del pigmento se busca definir cuál de estos es significativo en el proceso, en una relación causa-efecto.

3.2 Diseño de investigación

El trabajo de investigación consiste en un diseño experimental con un modelo básico pre experimental que consiste en un diseño *pretest-postest* en el cual se someterá a un objeto (hongo *P. sanguineus*) a determinados factores de cultivo y pH con la finalidad de conocer cuáles son los más incidentes en la obtención del pigmento.

3.3 Materiales

Los materiales, equipos y reactivos que se utilizaron en el desarrollo de la parte experimental de este estudio se describen en las siguientes tablas 3, 4 y 5:

Tabla 3: *Equipos y materiales utilizados en la obtención de la cepa axénica a partir de los basidiocarpos del hongo Pycnoporus sanguineus*

Equipos	Materiales
Autoclave	Medio SAB
Cámara de flujo laminar	Agua destilada
Microscopio	Hipoclorito de sodio
Estufa	Alcohol
Hornilla	Mechero
Balanza	Erlenmeyer
	Varilla
	Espátula
	Cajas Petri
	Cubre y portaobjetos
	Asa bacteriológica

Fuente: Autora

Tabla 4: *Equipos materiales y reactivos utilizados en la obtención del pigmento cinabarina a partir de la siembra en medios líquidos*

Equipos	Materiales	Reactivos
Autoclave	Papa	Acetona
Cámara de flujo laminar	Agua destilada	Azul de lactofenol
Microscopio	Extracto de malta	Solución de NaOH
Estufa	Dextrosa	Solución de HCl
Hornilla	Mechero	
Balanza	Erlenmeyers	
Cámara de extracción	Varilla	
Equipo de filtración con bomba de extracción	Espátula	
Agitador orbital	Aluminio	
	Cubre y portaobjetos	
	Papel filtro	
	Frascos color ámbar	
	Asa bacteriológica	
	Vasos de precipitación	
	Tubos de ensayo	

Fuente: Autora.

Tabla 5: Equipos materiales y reactivos utilizados en el análisis del pigmento

Equipos	Materiales	Reactivos
Espectrofotómetro <i>Jasco V-630</i>	Puntas para micropipeta	Rojo de metilo
Cubetas	Micropipetas	Acetona
Microscopio	Agua destilada	Hexano
Estufa	Placas de silicagel	Acetato de etilo
FTIR <i>Nicolet i510</i>	Regla	
Balanza	Cubetas de vidrio para <i>TCL</i>	
Lámpara de luz UV	Varilla	
Desecador	Espátula	
<i>HB43-S Halogen</i>	Aluminio	
Mufla	Papel filtro	
	Vaso de precipitación	
	Probeta	
	Crisoles	
	Pinza para crisoles	
	Luna de reloj	

Fuente: Autora

3.4 Procedimiento

3.4.1 Obtención de la cepa axénica a partir de los basidiocarpos del hongo *Pycnoporus sanguineus*

3.4.1.1 Recolección del hongo *Pycnoporus sanguineus*.

En el mes de mayo del año 2020 en la parroquia Zumbi del cantón Yantzaza provincia de Zamora Chinchipe se recolectó los troncos que contenían los basidiocarpos del hongo *Pycnoporus sanguineus*, fueron trasladados a la ciudad de Catacocha provincia de Loja hasta su uso, los mismos se mantuvieron sin ningún problema gracias a la humedad que existe en esta ciudad.



Figura 15: Troncos con basidiocarpos de *P. sanguineus*, a) mayo 2020 y b) enero 2021

Nota. Los troncos se encontraban en estado de pudrición. Fuente: Autora.

3.4.1.2 Aislamiento, limpieza y siembra de tejidos.

Primero se realizó el medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar, del mismo se preparó 20 cajas correspondientes a 300 mL -figura 16-, las mismas se dejaron reposar por 24 horas, una vez realizado el medio se seleccionaron los basidiocarpos más adecuados entre jóvenes y viejos, se realizó diferentes cortes de aproximadamente 3 a 4 mm a los mismos se les hizo una limpieza y desinfección siguiendo el método recomendado por (Suárez Arango, 2010) el cual consiste en hacer tres lavados con cloro (hipoclorito de sodio) al 3% alrededor de un minuto, con enjuagues en cada uno (agua estéril por 1 minuto). Luego se lava con alcohol al 70 % y por último con agua destilada por un minuto -figura 17- también se tomó una pequeña muestra del tejido la cual se colocó en un portaobjetos -figura 18- para ser observado en el microscopio con un lente de 40X. Posteriormente se realizó la siembra de los tejidos con mucho cuidado para no romper el agar -figura 19- se incubó en una estufa a una temperatura de 25 ± 3 °C durante 15 días y se realizaron controles para contaminación cada 24 horas, además se realizaron diferentes repiques -figura 20- para obtener la cepa pura del hongo *Pycnoporus sanguineus*, de nuevo se tomó una muestra de cada cultivo y se colocó en un cubre objetos y se le agregó azul de lactofenol para poder observar las esporas y las hifas en el microscopio utilizando objetivos de 10X, 20X y 40X.



Figura 16: *Vertido del medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar*

Nota. Las placas con medio de cultivo se pueden almacenar en la refrigeradora hasta su uso. Fuente: Autora.



Figura 17: *Limpieza y desinfección de tejidos*

Nota. Este proceso es de mucha importancia ya que evita el crecimiento de otros microorganismos al momento de la siembra. Fuente: Autora.



Figura 18: Muestra de basidiocarpos sobre portaobjetos

Nota. Se agregó una gota de agua para tener una mejor observación. Fuente: Autora.

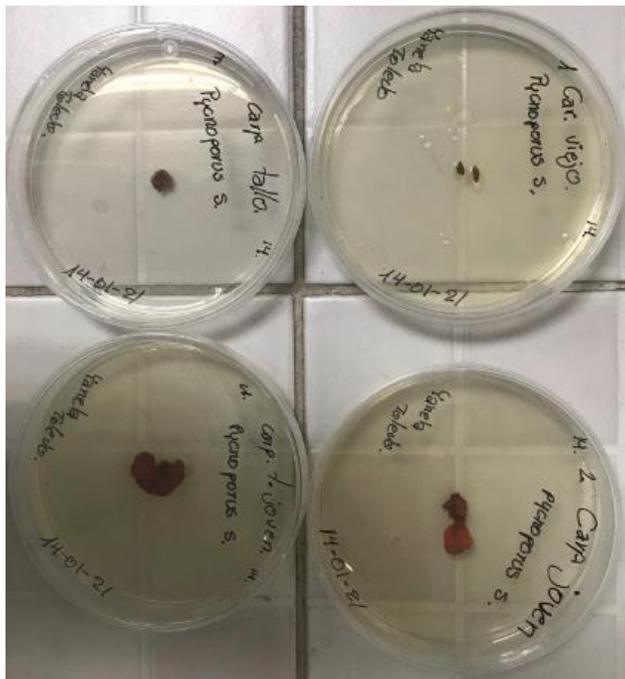


Figura 19: Cajas de medio SAB con tejidos del hongo *Pycnoporus sanguineus*

Nota. Las cajas fueron incubadas a una temperatura de 25 ± 3 °C. Fuente: Autora.



Figura 20: Resiembra del hongo *Pycnoporus sanguineus*

Nota. Las resiembras se realizan para la obtención de la cepa pura. Fuente: Autora.

3.4.2 Obtención del pigmento cinabarina a partir de la siembra en medios líquidos

3.4.2.1 Preparación de caldos de cultivo, siembra e incubación.

Se preparó dos medios de cultivo, caldo dextrosa de papa y caldo dextrosa de malta, para la elaboración del caldo dextrosa de papa se pesó 250 gramos de papa la cual se dejó hervir en una hornilla por alrededor de 30 minutos en un volumen aproximado de 800 mL de agua destilada, una vez transcurrido este tiempo se filtro la papa con la ayuda de un embudo y de una gasa, posteriormente se ajustó el volumen a 1000 mL y se agregó 20 g de dextrosa.

Para la elaboración del medio caldo dextrosa de malta se utilizó el medio comercial ya preparado *Malt Extract Powder*, del cual se pesó 20 g para el volumen de 1000 mL de agua destilada, una vez elaborados los medios de cultivo se agregó 500 mg de cloranfenicol en cada uno para evitar el crecimiento de bacterias contaminantes.

Se dividió cada medio en vasos de precipitación, en cada uno se colocó 500 mL, se midió el pH con ayuda del pH metro de mesa -figura 21- y se ajustó el pH siguiendo el arreglo experimental, a continuación, se dividió cada medio en 12 matraces de Erlenmeyer (250 mL) cada uno contenía 150 mL de medio -tabla 3- y posteriormente se esterilizó -figura 22-; una vez enfriados los medios se midió nuevamente el pH con ayuda de las tiras de pH para controlar que este no haya cambiado.

Se tomó una caja Petri que contenía la cepa pura del hongo *Pycnoporus sanguineus*, esta se dividió con ayuda de un asa bacteriológica en cuadros de aproximadamente 5 mm, se depositaron 4 cuadros en cada Erlenmeyer de manera que tope el micelio con el caldo de cultivo -figura 23 a-, estos se incubaron en una estufa a 27 °C durante 20 días -figura 23 b-.



Figura 21: Medición del pH de caldos de cultivo a) caldo de papa (pH 7 y 8) y b) caldo de malta (pH 7 y 8)

Nota. La medición del pH se realizó con el pH metro de mesa. Fuente: Autora.

Tabla 6: *Diseño experimental utilizado en la producción del pigmento cinabarina.*

Caldo de papa		Caldo de malta	
pH 7.0	pH 8.0	pH 7.0	pH 8.0
			
			
			

Fuente: Autora.



Figura 22: *Caldos de cultivo esterilizados*

Nota. Se esterilizó dos tubos con medio para luego poder medir el pH en estos. Fuente: Autora.



Figura 23: a) *Siembra en caldos de cultivo* b) *Incubación*

Nota. El micelio del hongo debe estar en contacto con el medio para un mejor crecimiento. Fuente: Autora.

3.4.2.2 Extracción del pigmento cinabarina.

Luego del periodo de incubación, se filtró el medio con ayuda del sistema de filtración con bomba de vacío -figura 24-, se pesó el micelio húmedo y registró sus datos, se colocó el micelio en cada Erlenmeyer limpio, luego se maceró con 10 mL de acetona pura para extraer el pigmento, posteriormente se ajustó el volumen a 50 mL, se cubrió cada extracto con papel aluminio y estos reposaron durante 4 a 5 días en la oscuridad -figura 25-.

Una vez transcurrido este tiempo, se colocó los tratamientos en el agitador orbital durante 4 minutos -figura 26 a- luego se ubicó dentro de la cabina de extracción sin el papel aluminio -figura 26 b-, esto fue con la finalidad de evaporar la mayor cantidad de acetona y así concentrar el pigmento, después de transcurrir un cierto periodo de tiempo se filtró, para separarlo del micelio y finalmente se almacenó en frascos color ámbar hasta su uso -figura 27 -.



Figura 24: *Filtración del caldo de cultivo*

Nota. El sistema de filtración con bomba de vacío agilizó el proceso. Fuente: Autora.



Figura 25: *Extractos de pigmento*

Nota. Utilizar todas las medidas de seguridad al momento de utilizar la acetona. Fuente: Autora.

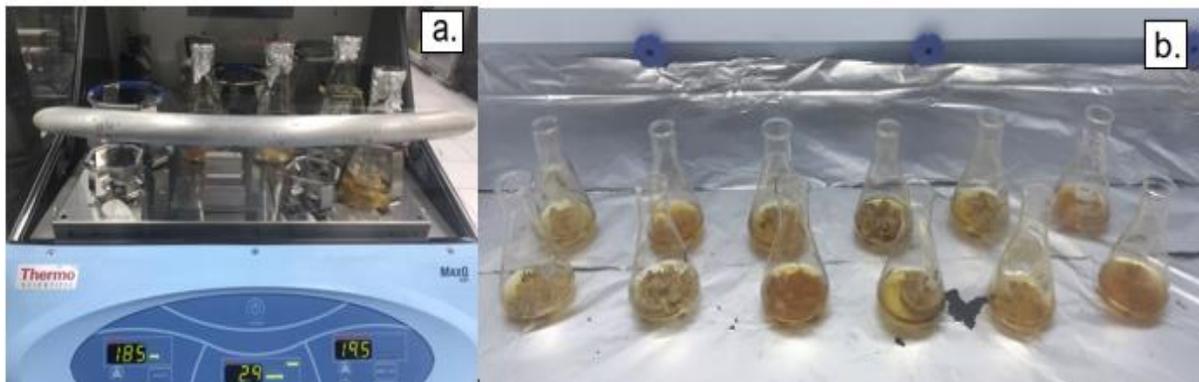


Figura 26: *a) Mezcla en el agitador Orbital, y, b) evaporación y concentración de pigmento*

Nota. Se utilizó el orbital con el fin de obtener una mejor mezcla. Fuente: Autora.



Figura 27: *Filtración y almacenamiento del pigmento*

Fuente: Autora.

3.4.3 Análisis del pigmento obtenido

3.4.3.1 Concentración del pigmento mediante espectrofotometría UV-visible.

Para determinar la concentración del pigmento, se hizo una curva con concentraciones del colorante rojo de metilo (2.4, 4.8 y 9.7 ppm), las muestras se prepararon con 50:50 de agua y acetona, se tomó esta decisión debido a que la acetona se evapora y cristaliza de manera muy rápida -figura 28, a y b-, una vez obtenida la recta se corrieron los 12 tratamientos, ubicando 1 mL del pigmento obtenido y un 1 mL de la solución agua-acetona en cada cubeta -figura 28 c-, todo este proceso se realizó en el espectrofotómetro *Jasco V-630*.

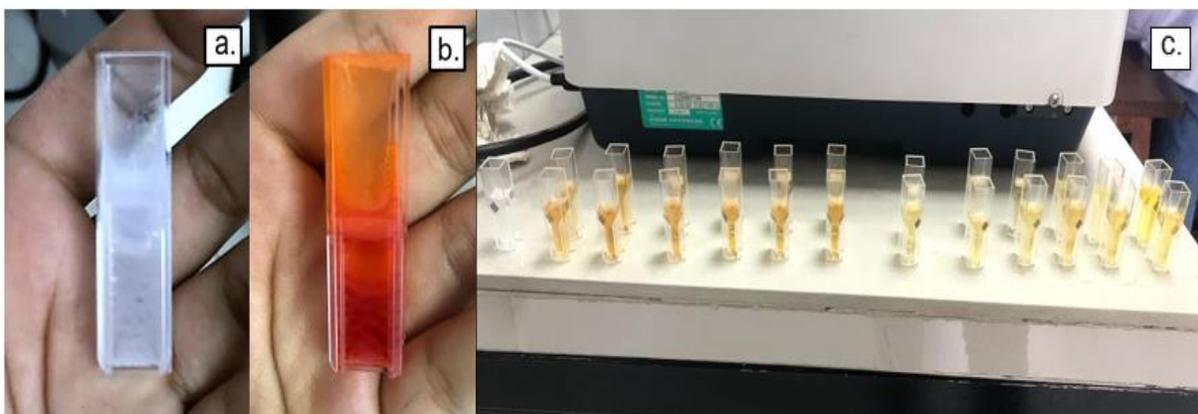


Figura 28: Muestras para el espectrofotómetro: a) cubeta con acetona pura, b) muestra de rojo de metilo con acetona pura, y, c) muestras de los 12 tratamientos listos para ser leídos

Nota. Las dos primeras imágenes muestran a la acetona cristalizada. Fuente: Autora.

3.4.3.2 Cromatografía de capa fina TLC.

Posteriormente, se realizó la cromatografía de capa fina con el fin de obtener los frentes de retención (R_f) identificando los diferentes pigmentos, para esto se preparó la fase móvil con una mezcla 30:10 de los solventes hexano:acetato de etilo, luego se dividió las placas de silicagel 60G F₂₅₄ en tres partes dejando 1 cm entre cada punto y en la parte inferior, con la micropipeta se colocó 10 μ l, en el primer punto, la solución de rojo de metilo y en los otros dos los pigmentos obtenidos, dentro de la cubeta de vidrio se colocó papel filtro alrededor y vertió la mezcla de solventes, se introdujo las placas y se tapó la cubeta, después de transcurrir alrededor de 10 minutos se retiró las placas y se dejó secar; para la revelación de placas se utilizó una lámpara de luz UV.

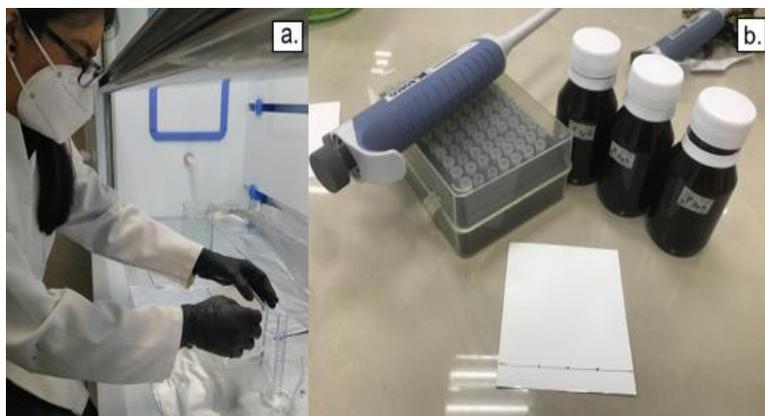


Figura 29: *Cromatografía de capa fina: a) preparación de la cubeta de vidrio y b) preparación de la placa de silicagel 60G F254*

Nota. Se utilizó una micropipeta con el fin de tener una mejor precisión al momento de colocar las respectivas muestras. Fuente: Autora.

3.4.3.3 Identificación de grupos funcionales mediante la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Para la identificación de grupos funcionales se utilizó el equipo marca *Thermo Scientific*, modelo *Nicolet i510* serie *912A0607* que se encuentra en el laboratorio de cromatografía de la UPS, antes de colocar la muestra, se limpió el cristal con los paños para lentes; para este estudio se utilizó como blanco el aire, posteriormente, se colocó el pigmento con ayuda de una micropipeta para una mejor precisión, para finalizar se observó y analizó el espectro obtenido.

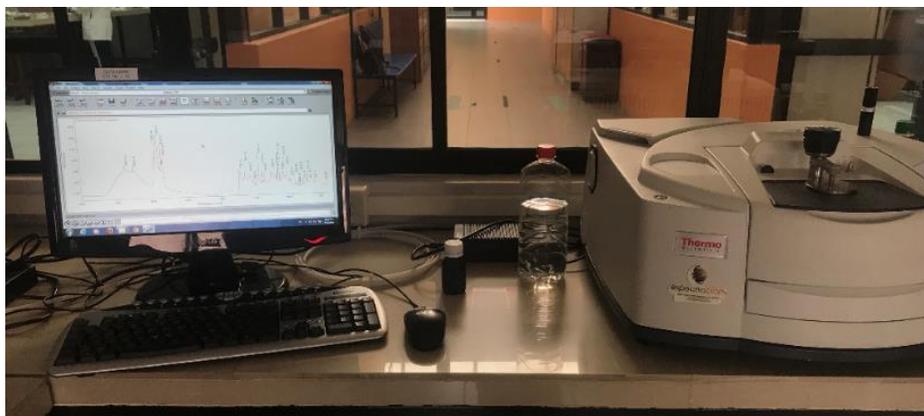


Figura 30: *Equipo Thermo Scientific, modelo Nicolet i510 serie 912A0607 para el análisis de grupos funcionales presentes en el pigmento cinabarina*

Fuente: Autora.

3.4.3.4 Determinación del porcentaje de humedad.

Como parte del análisis físico, se realizó la determinación del porcentaje de humedad en el equipo *Mettler Toledo HB43-S Halogen*, en el cual se colocó de 2.6 a 3.5 g del pigmento más concentrado, este procedimiento se realizó por triplicado para posteriormente obtener un promedio de los resultados obtenidos.



Figura 31: *Equipo Mettler Toledo HB43-S Halogen*

Fuente: Autora.

3.4.3.5 Determinación del porcentaje de cenizas.

Continuando con el análisis físico, se realizó la determinación del porcentaje de cenizas; siguiendo el método convencional, se tomó tres crisoles de porcelana los cuales se colocaron dentro de la estufa a 75 °C alrededor de 45 minutos, luego se trasladaron al desecador por una hora, pesando uno a uno los crisoles en la balanza analítica y se registraron los datos. Posteriormente se colocó 5 g de pigmento en cada crisol, nuevamente se pesó y registró los datos, a continuación, se puso los crisoles dentro de la mufla a una temperatura de 325 °C por 2 horas, siguiendo con el método se tomó los crisoles con una pinza y se colocaron dentro del desecador hasta que estos se encuentren a una temperatura ambiente y para finalizar se pesó el crisol con la muestra incinerada.

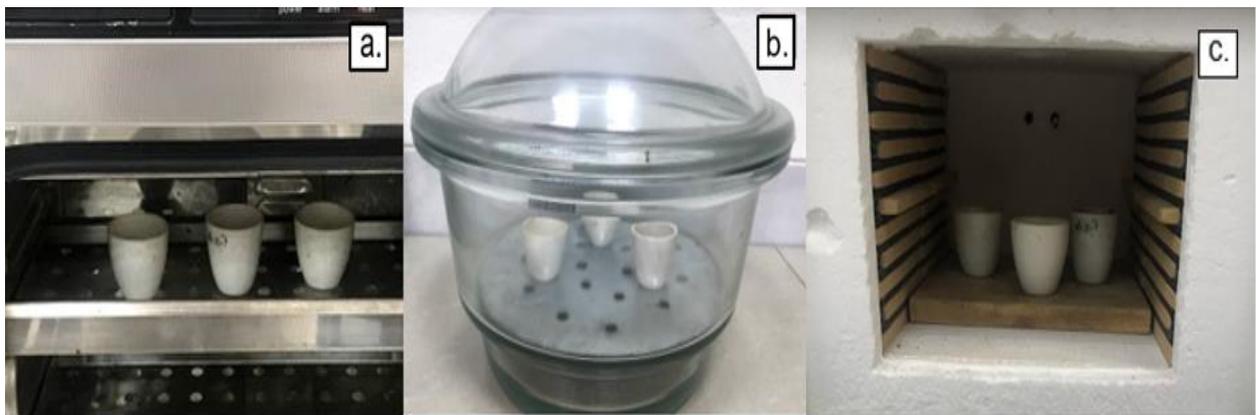


Figura 32: *Proceso para la determinación de ceniza: a) crisoles dentro de la estufa, b) eliminación de la humedad en el desecador, y, c) incineración en la mufla*

Nota. Se recomienda utilizar las pinzas de crisol para tener una mejor manipulación. Fuente: Autora.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización del hongo *Pycnoporus sanguineus*

4.1.1 Identificación macroscópica y microscópica de los carpóforos recolectados

De los troncos recolectados, se extrajo los carpóforos que se encontraban en perfecto estado, además, se tuvo mucho cuidado para no dañar su tejido, luego se limpiaron para eliminar los restos de tierra y posteriormente se los caracterizó mediante claves taxonómicas; las características a nivel macroscópico se detallan en la tabla 7 y a nivel microscópico se pudo observar la capa de tubos -figura 33 a-, además, se realizó un corte longitudinal donde se puede observar el micelio del carpóforo del hongo *Pycnoporus sanguineus* -figura 33 b-.

Tabla 7: Características macroscópicas de los carpóforos

Claves de identificación	Carpóforos
Color	Anaranjado brillante
Forma	Flabeliformes y continuos
Capa superior	Lisa
Capa posterior	Rugosa
Aspecto	Cauchoso
Largo	2 - 3 cm
Ancho	2 - 3 – 4.5 cm
Grosor	0.30 – 0.40 cm
Adhesión	Lateral a la madera en descomposición

Nota. Las características se encuentran acorde a los estudios realizados por (Papinutti, 2013). Fuente:

Autora.

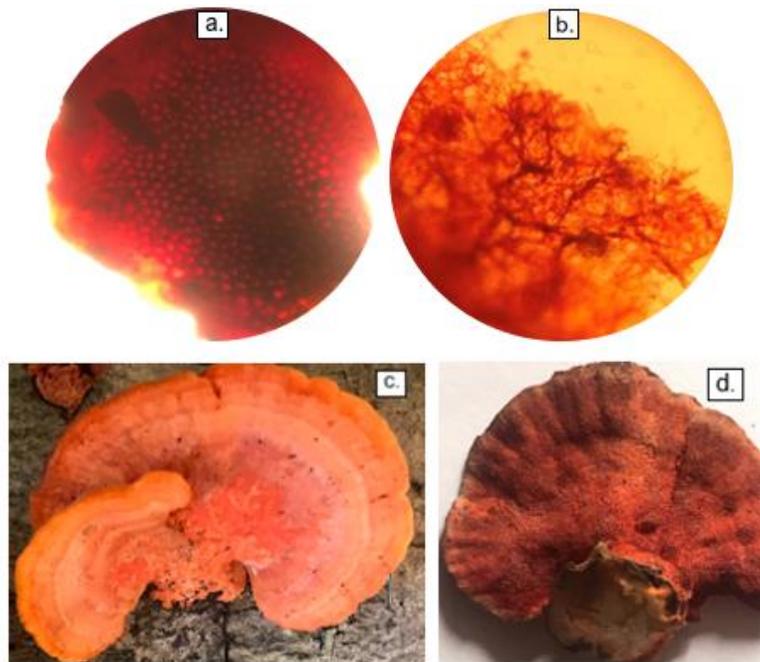


Figura 33: *Características microscópicas y macroscópicas de los carpóforos del hongo Pycnoporus sanguineus: a) capa de tubos, b) micelio del hongo, c) capa superior, y, d) capa posterior*

Fuente: Autora.

4.1.2 Caracterización de la cepa axénica del hongo *Pycnoporus sanguineus*.

Al cultivo obtenido luego de varias resiembras se lo identifico como supuesta cepa axénica de hongo *Pycnoporus sanguineus*, se lo caracterizó mediante claves taxonómicas tanto a nivel macroscópico como microscópico.

4.1.2.1 Características macroscópicas de la cepa axénica.

Para la caracterización macroscópica se observó a simple vista las estructuras y rasgos que presentaba la cepa; de la primera siembra, luego de 9 días, se obtuvo un cultivo el cual fue el más significativo, en la base de la Caja Petri se observó una coloración naranja/amarillenta -figura 34 a-, y en la parte superior un aspecto algodonoso -figura 34 b-, de este cultivo se realizó las diferentes resiembras, de las cuales se obtuvo la cepa axénica del hongo *Pycnoporus sanguineus*,

el color de la cepa vario de blanco a naranja intenso esto se pudo observar en la base de la Caja Petri -figura 35 b-, la superficie se cubrió con micelio aéreo de textura algodónosa y aterciopela - figura 35 c-.

La velocidad de crecimiento es relativamente lenta, a los tres días se observó un crecimiento significativo -figura 35 a- y a los 14 días se pudo observar el total crecimiento como se menciona anteriormente.

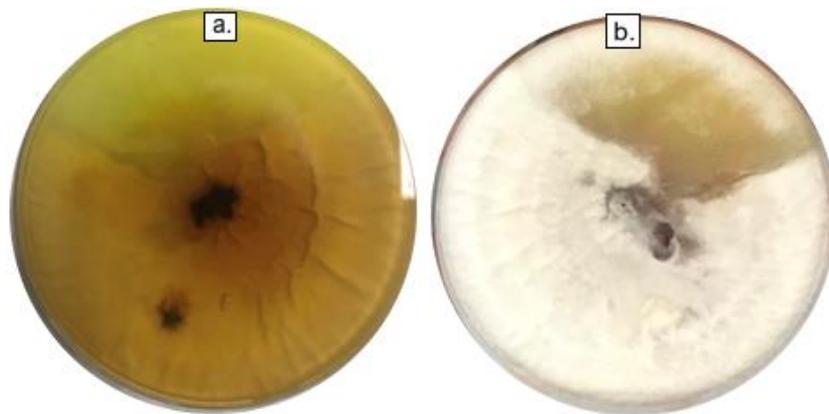


Figura 34: Cultivo significativo de la primera siembra: a) base de la Caja Petri, y, b) parte superior

Fuente: Autora.

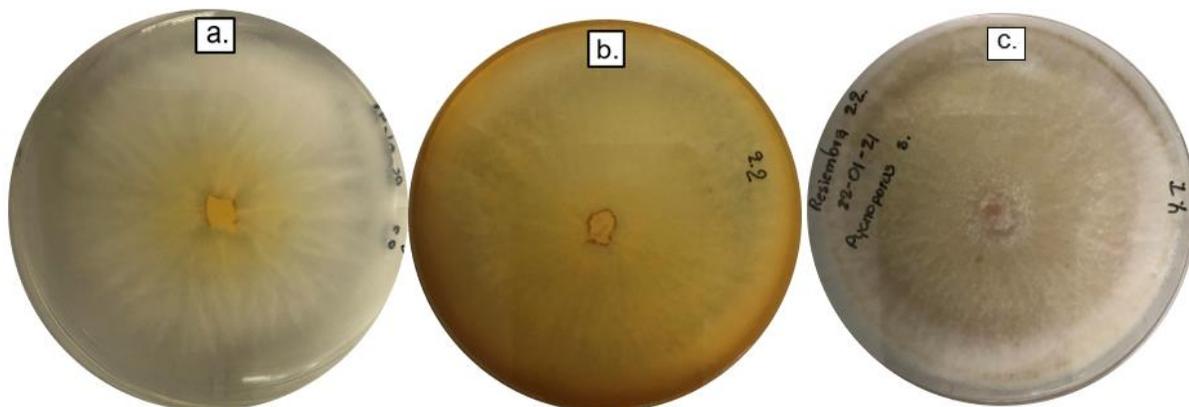


Figura 35: Cepa axénica del hongo *Pycnoporus sanguineus*: a) primeros estadios del hongo b) parte posterior de la Caja Petri, y, c) parte superior de la Caja Petri

Fuente: Autora.

4.1.2.2 Características microscópicas de la cepa axénica.

Para la caracterización microscópica se tomó una muestra de la cepa axénica la cual se colocó en un portaobjetos y se tiñó con azul de lactofenol para tener una mejor observación, las esporas encontradas en el hongo *Pycnoporus sanguineus* son cilíndricas, lisas y de pared delgada, miden de 40 a 50 μm^2 -figura 36 a- esto coincide con lo reportado por Sánchez Huamán y Bautista Valverde (2011), con respecto al sistema hifal es trimíctico, es decir se encontró hifas generativas septadas sin fíbulas -figura 36 c-, hifas esqueléticas de pared delgada -figura 36 b- e hifas conectivas de pared gruesa -figura 36 d 1-, además, se pudo observar basidiocarpos -figura 36 e-, y esporangios como se muestra en la -figura 36 d 2- estas características concuerdan con lo reportado en los estudios de (Rodríguez, 2020; Sánchez Huamán y Bautista Valverde, 2011).

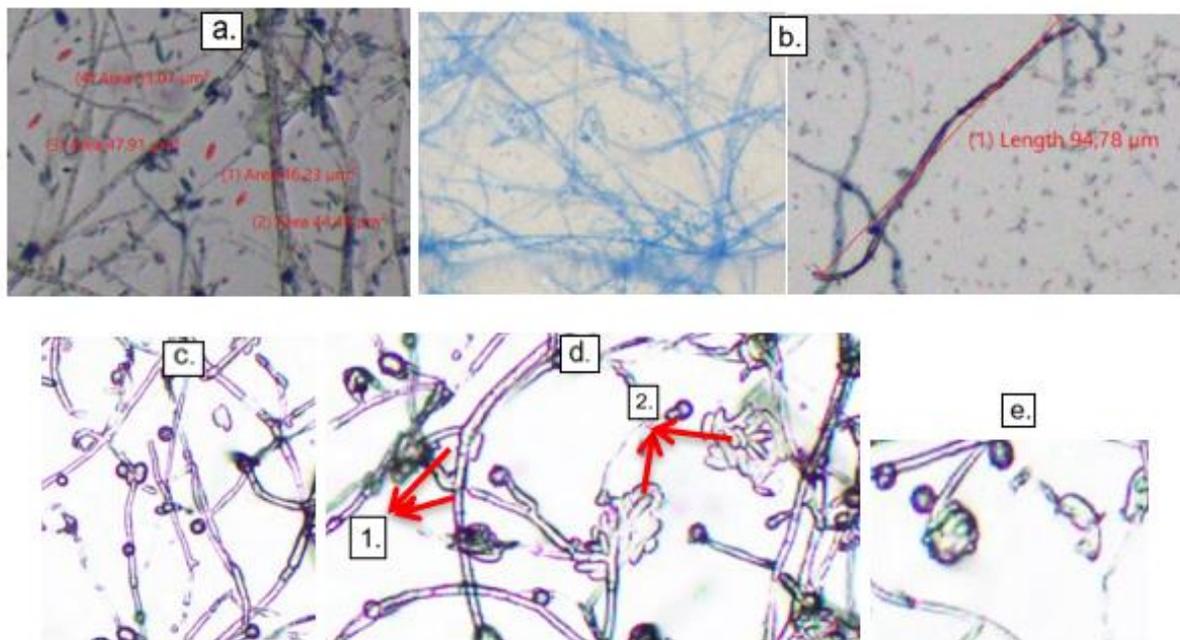


Figura 36: Características microscópicas de la cepa axénica del hongo *Pycnoporus sanguineus*: a) esporas, b) hifas esqueléticas, c) hifas generativas, d): 1. hifas conectivas 2. esporangios, y, e) basidiocarpos

Fuente: Autora.

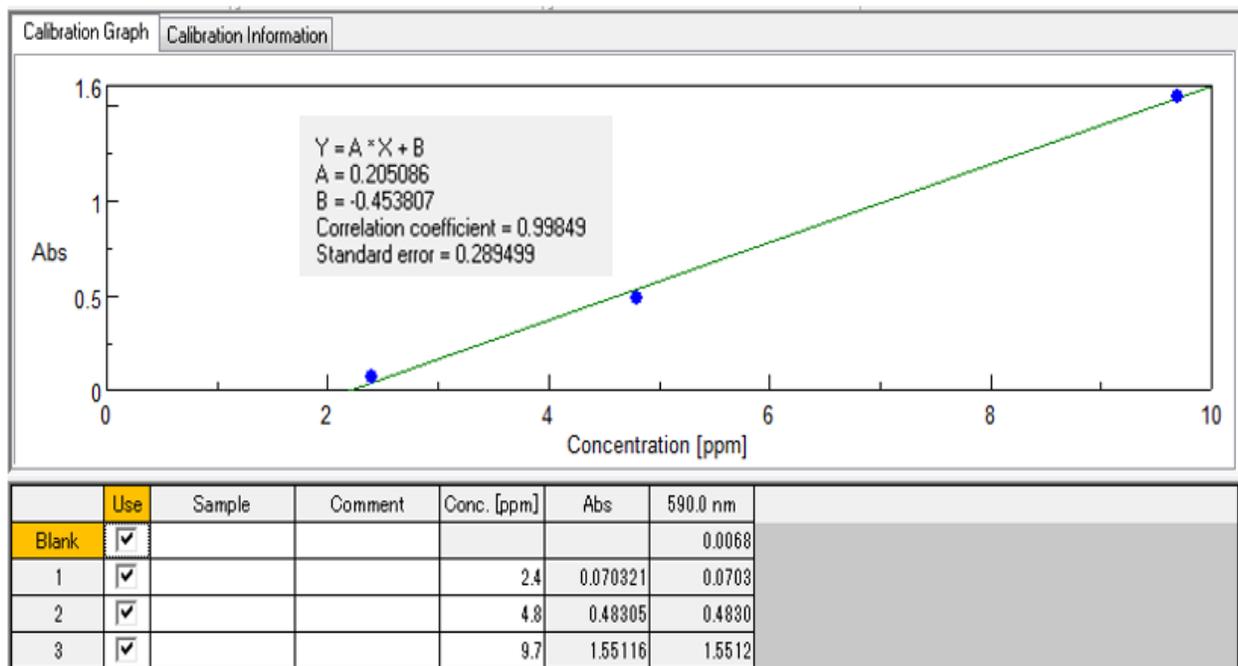
4.2 Caracterización del pigmento cinabarina

4.2.1 Concentración y rendimiento del pigmento cinabarina

Una vez realizados los medios de cultivo siguiendo el arreglo experimental que se muestra en la tabla 6 y obtener el pigmento, se registraron todos los datos necesarios -tabla 8 y 9- para poder realizar los análisis correspondientes.

4.2.1.1 Concentración del pigmento.

Para determinar la concentración del pigmento, se trabajó en una relación de 50/50 agua acetona para evitar la evaporación y cristalización de la acetona; la longitud de onda encontrada fue de 590 nm, la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación con el cual se trabajó se muestra en la gráfica 1, esto se obtuvo en el software *Quantitative Calibration-UVVIS/c228661148*.



Gráfica 1: Curva de calibración del rojo de metilo

Fuente: Autora.

Posteriormente, se corrió las muestras de cada tratamiento en la curva encontrada, una vez obtenidos los datos se registraron y multiplicaron por 2, esto se debe a que las muestras de pigmento se trataron con las mismas condiciones del rojo de metilo, estos datos se pueden observar en la tabla 8 y 9.

4.2.1.2 Rendimiento del pigmento.

El rendimiento del colorante extraído se determinó por diferencia de peso de los micelios obtenidos antes y después de la extracción con acetona, los datos constan en la tabla 8 y 9; la fórmula utilizada para hallar el porcentaje fue:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{Pm_f}{Pm_i}$$

Donde:

Pm_f = Peso del micelio final en g (luego de la extracción).

Pm_i = Peso del micelio inicial en g (antes de la extracción).

Tabla 8: Valores correspondientes a la extracción en medio Caldo Papa Dextrosa

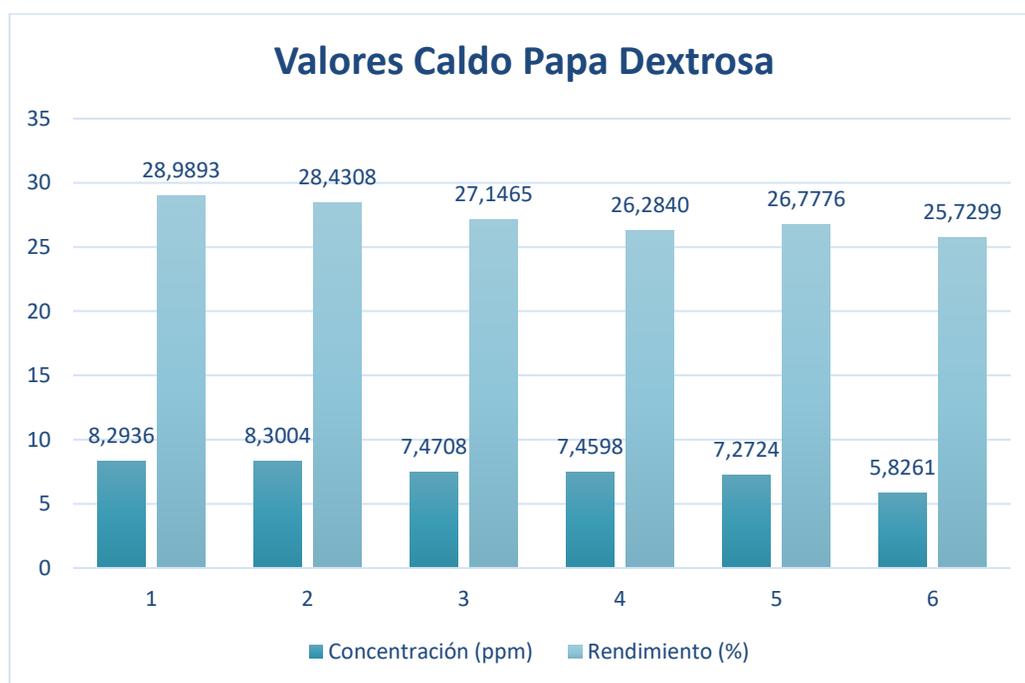
Código (pH)	Peso inicial del micelio (g)	Peso final del micelio (g)	Volumen acetona inicial (mL)	Volumen acetona final (mL)	Concentración (mg/L)	Rendimiento (%)
PpH 7-1	6.2899	1.8234	50	30	8.2936	28.9893
PpH 7-2	6.1254	1.7415	50	39	8.3004	28.4308
PpH 7-3	6.3894	1.7345	50	33	7.4708	27.1465
PpH 8-1	8.3762	2.2016	50	31	7.4598	26.2840
PpH 8-2	7.2568	1.9432	50	40	7.2724	26.7776
PpH 8-3	8.9631	2.3062	50	34	5.8261	25.7299

Fuente: Autora.

Tabla 9: Valores correspondientes a la extracción en medio Caldo Extracto de Malta

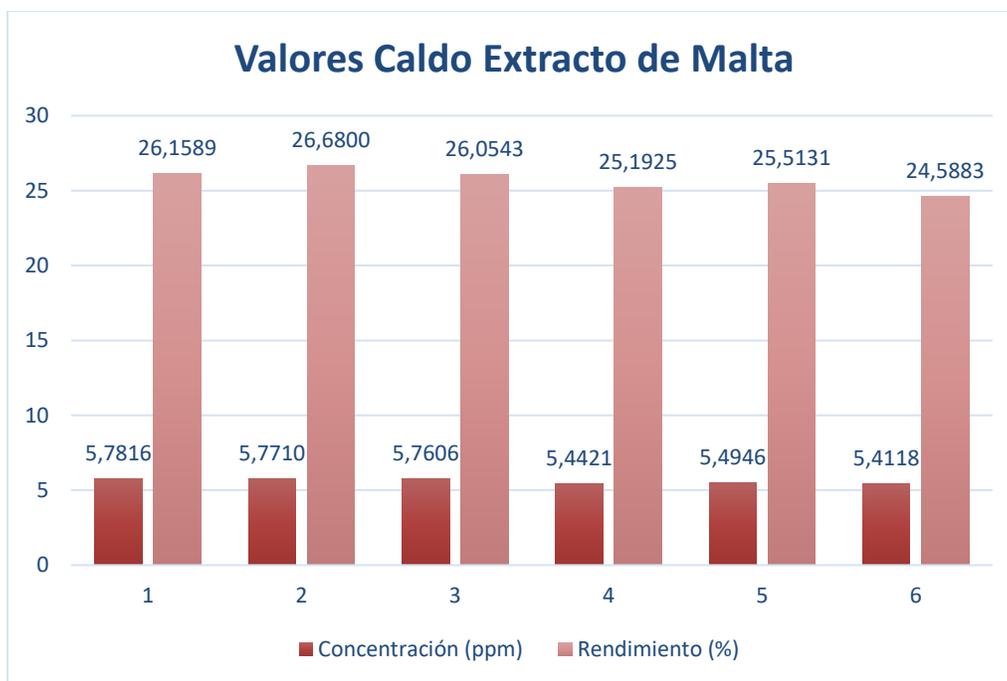
Código (pH)	Peso inicial del micelio (g)	Peso final del micelio (g)	Volumen acetona inicial (mL)	Volumen acetona final (mL)	Concentración (ppm)	Rendimiento (%)
MpH 7-1	13.7743	3.6032	50	33	5.7816	26.1589
MpH 7-2	10.5896	2.8253	50	30	5.7710	26.6800
MpH 7-3	11.1540	2.9061	50	29	5.7606	26.0543
MpH 8-1	10.7425	2.7063	50	30	5.4421	25.1925
MpH 8-2	12.2431	3.1236	50	36	5.4946	25.5131
MpH 8-3	11.9012	2.9263	50	43	5.4118	24.5883

Fuente: Autora.



Gráfica 2: Concentración y rendimiento del pigmento en Caldo Papa Dextrosa

Nota: Gráfica realizada en el programa *Microsoft Excel*, los números de la parte inferior representan los tratamientos realizados. Fuente: Autora.



Gráfica 3: Concentración y rendimiento del pigmento en Caldo Extracto de Malta

Nota: Gráfica realizada en el programa *Microsoft Excel*, los números de la parte inferior representan los tratamientos realizados. Fuente: Autora.

4.2.2 Cromatografía de capa fina

La polaridad de los solventes interviene directamente en la extracción de compuestos, así se puede observar en la cromatografía de capa fina (TLC), al exponer la placa bajo luz UV se observó los frentes de retención (R_f) de las muestras con respecto al rojo de metilo siendo estos de 0.73 para PpH 7 – MpH 7 y 0.72 para PpH 8 – MpH 8, de acuerdo con (Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2010), quien encontró R_f de 0.57 y 0.75, estos frentes de retención corresponderían a compuestos no identificados; además, se encontró bandas a 0.41 y 0.39 para PpH 7 – MpH 7 respectivamente, también para PpH 8 – MpH 8 se encontró bandas representativas a 0.40, con base en los estudios realizados por (Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2010; Cruz Muñoz, 2012) estos frentes de retención corresponden a la cinabarina y R_f cercanos a 0.30 o menores corresponden al ácido cinabárico.

Estos resultados se pueden observar en la figura 37:



Figura 37: Cromatografía de capa fina TLC.

Nota: De izquierda a derecha se observa, R (muestra de rojo de metilo), P_7 (muestra de pigmento en CPD a pH 7), M_7 (muestra de pigmento en CEM a pH 7), P_8 (muestra de pigmento en CPD a pH 8) y M_8 (muestra de pigmento en CEM a pH 8). Fuente: Autora

423 Identificación de grupos funcionales por FTIR

Según (Téllez-Téllez *et al.*, 2016; p 1510), “la cinabarina tiene una estructura básica 3-fenoxazina, con un grupo carbonilo en C-1, un grupo amino en C-2 y un grupo hidroxilo en C-9”. Para la posible identificación del pigmento se procedió a relacionar los grupos funcionales presentes en el espectro de la muestra, que si bien es concentrada se desconoce su pureza al no disponer de un patrón contra el cual compararse. El espectro obtenido mostró la presencia de dos bandas representativas correspondientes a una amina primaria, tensión N-H, estas se encuentran a 3382.61 cm^{-1} , asimétrica y 3266.88 cm^{-1} , simétrica, además, se pudo observar dos bandas (flexión N-H) a 1655.43 y 1589.70 cm^{-1} ; se encontró una banda a 1730.53 correspondiente al ácido carboxílico.

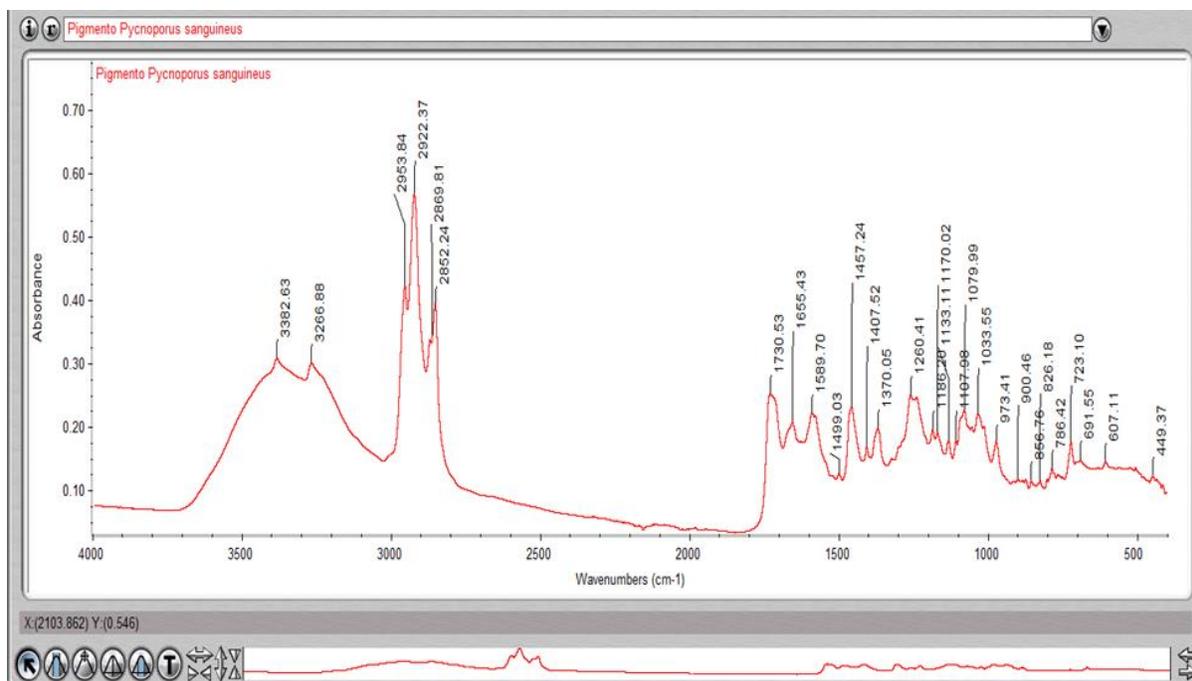


Figura 38: Espectro obtenido en el FTIR correspondiente al pigmento (cinabarina)

Nota. El espectro muestra los grupos funcionales presentes en la cinabarina (estructura), como lo son el grupo amino y el ácido carboxílico. Fuente: Autora.

4.2.4 Humedad del colorante final

El porcentaje de humedad se midió en dos muestras del pigmento cinabarina siendo estas PpH 7-1 y MpH 7-2 con tres repeticiones, en las cuales se obtuvo un porcentaje de 92.22 y 90.8 respectivamente como se muestra en la tabla 10, esta característica del pigmento se la tomó en cuenta gracias al estudio realizado por (Carrillo Ruiz, 2017), en esta investigación se obtuvo un porcentaje de humedad del 10.06 en pigmento seco, por lo cual, tiene una gran diferencia de porcentaje con el presente estudio.

Tabla 10: *Porcentaje de humedad del pigmento*

Muestra	Valores	Promedio
PpH 7-1	90.55	92.22
	92.45	
	93.66	
MpH 7-2	89.14	90.81
	91.23	
	92.05	

Fuente: Autora.

4.2.5 Cenizas del colorante final

El porcentaje de cenizas se realizó en las muestras más concentradas, PpH 7-1, PpH 7-2 Y MpH 7-1, el resultado obtenido fue de 0.5198, 0.4350 y 0.6170 respectivamente como se muestra en la tabla 11, esta característica del pigmento al igual que la humedad fue planteada por (Carrillo Ruiz, 2017), en esta investigación se obtuvo un porcentaje de cenizas del 0.35 en pigmento seco, por lo cual, no se tiene una gran diferencia de porcentaje con el presente estudio; la fórmula que se utilizó fue la planteada por (Rea-Páez, 2017):

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(P - p) \times 100}{M}$$

Donde:

P = Peso del crisol con las cenizas (g).

p = Peso del crisol vacío (g).

M = Peso de la muestra (g).

Tabla 11: *Porcentaje de cenizas del pigmento*

Peso del crisol vacío (g)	Peso de la muestra (g)	Peso del crisol con las cenizas (g)	% Cenizas
26.0768	5.0019	26.1028	0.5198
26.0879	5.0113	26.1097	0.4350
26.0696	5.0084	26.1005	0.6170

Fuente: Autora.

4.3 Evaluación de las variables de estudio mediante el diseño factorial 2²

Para determinar si los factores pH y medio de cultivo influyen en la obtención del pigmento cinabarina, se realizó un diseño factorial (DOE) 2² en el software estadístico Minitab 19.

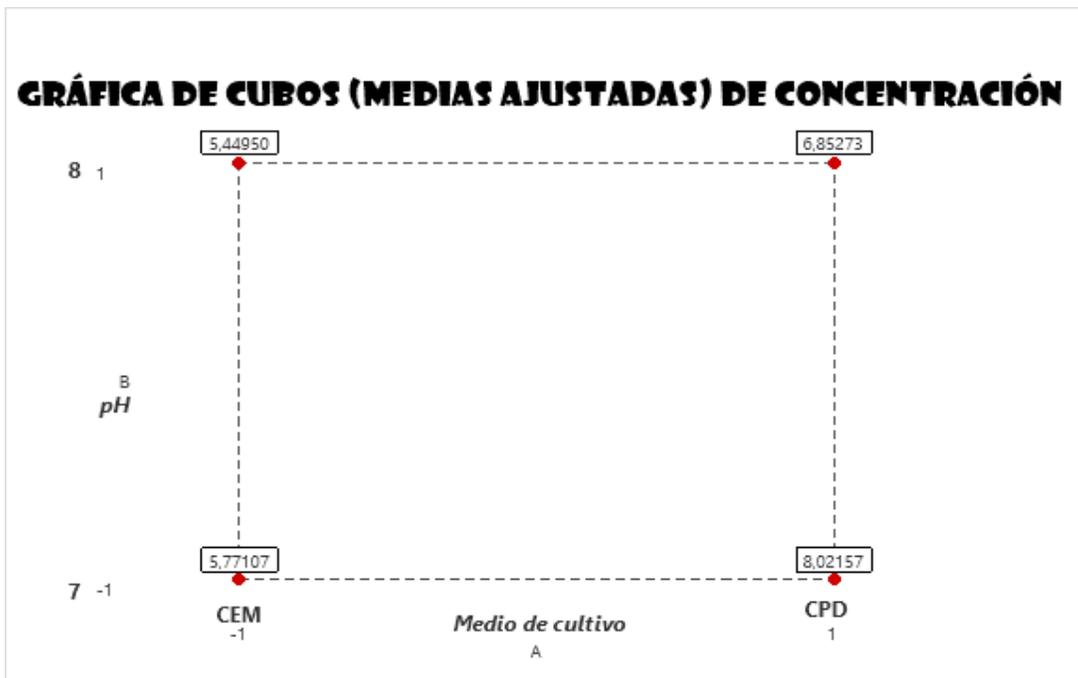
Según (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008), “el diseño factorial 2² estudia el efecto de dos factores considerando dos niveles en cada uno” (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008; p 168), los cuales se representan con un signo “+” para el nivel alto y “-” para el nivel bajo. En el presente análisis se normalizaron los datos, es decir, A hace referencia al medio de cultivo, el nivel alto es el medio CPD (Caldo Papa Dextrosa) representado por +1, el nivel bajo es el medio CEM (Caldo Extracto de Malta) representado por -1 y B el pH, el nivel alto es el 8 representado por +1, el nivel bajo es 7 representado por -1, el diseño y los datos correspondientes se muestran en la tabla 12:

Tabla 12: *Diseño y datos para el análisis estadístico*

A: Medio	B: pH	A	B	x₁	x₂	Concentración			Total
CEM	7	-	-	-1	-1	5.7816	5.7710	5.7606	17.3132 = (1)
CPD	7	+	-	+1	-1	8.2936	8.3004	7.4708	24.0647 = a
CEM	8	-	+	-1	+1	5.4422	5.4946	5.4118	16.3485 = b
CPD	8	+	+	+1	+1	7.4598	7.2724	5.8261	20.5582 = ab

Fuente: Autora.

La representación geométrica o también conocida como dominio experimental de este estudio se puede observar en la gráfica 4, cada punto representa un posible tratamiento, donde -1: -1 corresponde al medio CEM a pH 7, 1:-1 a CPD 7, -1:1 a CEM 8 y 1:1 a CPD 8. Según (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008), “el área limitada por este cuadrado se conoce como región experimental y, en principio, las conclusiones que se obtengan del experimento sólo tienen validez sobre esta región” (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008; p 169).



Gráfica 4: Representación geométrica del estudio

Fuente: Autora.

En este estudio hay tres efectos de interés A, B y la interacción AB, estos datos se pueden observar en la fila 2 de la tabla 13:

Tabla 13: *Coefficientes codificados del estudio*

Término	Efecto	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante		6.524	0.146	44.56	0.000	
A	1.827	0.913	0.146	6.24	0.000	1.00
B	-0.745	-0.373	0.146	-2.55	0.034	1.00
A*B	-0.424	-0.212	0.146	-1.45	0.186	1.00

Fuente: Autora.

El efecto de A (medio de cultivo) al ser positivo 1.827 nos sugiere que, al utilizar el nivel alto (CPD) se incrementará la concentración, el efecto de B (pH) es negativo -0.745 esto sugiere que, al elevar el pH (nivel alto) el rendimiento que se obtendrá será menor y por ende afectará a la obtención del pigmento cinabarina, la interacción AB resulta ser negativa -0.424 y baja por lo cual no se considera relevante.

Posteriormente se realizó el análisis de varianza (ANOVA) -tabla 14-, con el fin de investigar si alguno de los efectos es estadísticamente significativo y responder a las hipótesis, según Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar (2008), en la estructura del diseño se plantean tres hipótesis de nulidad relativas a las variables:

$$H_0 = \text{Efecto } A = 0$$

$$H_A = \text{Efecto } A \neq 0$$

$$H_0 = \text{Efecto } B = 0$$

$$H_A = \text{Efecto } B \neq 0$$

$$H_0 = \text{Efecto } AB = 0$$

$$H_A = \text{Efecto } AB \neq 0$$

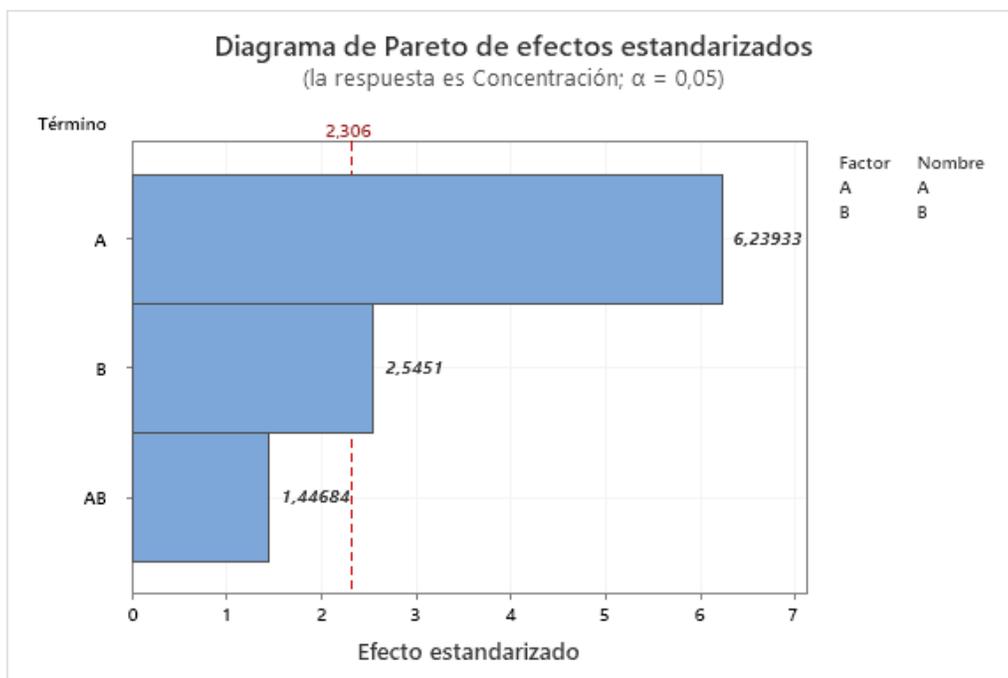
Tabla 14: Análisis de Varianza (ANOVA)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	12.2167	4.0722	15.83	0.001
Lineal	2	11.6783	5.8391	22.70	0.001
A	1	10.0123	10.0123	38.93	0.000
B	1	1.6660	1.6660	6.48	0.034
Interacciones de 2 términos	1	0.5384	0.5384	2.09	0.186
A*B	1	0.5384	0.5384	2.09	0.186
Error	8	2.0575	0.2572		
Total	11	14.2742			

Fuente: Autora.

De acuerdo con el valor p, si este es menor al grado de significancia $\alpha = 0.05$, se rechaza la H_0 y H_A se acepta, si este es mayor se acepta la hipótesis H_0 y se rechaza la H_A . Para los efectos A y B se rechaza la hipótesis nula ya que el valor de p es 0.000 y 0.034 respectivamente, esto quiere decir que, si son significativos y hay incidencia de estas variables sobre la concentración del pigmento, para la interacción AB resulta ser no significativa por tanto se acepta la hipótesis nula. Del valor F se aprecia que el efecto que más incide en la obtención del pigmento es el A que corresponde al medio de cultivo.

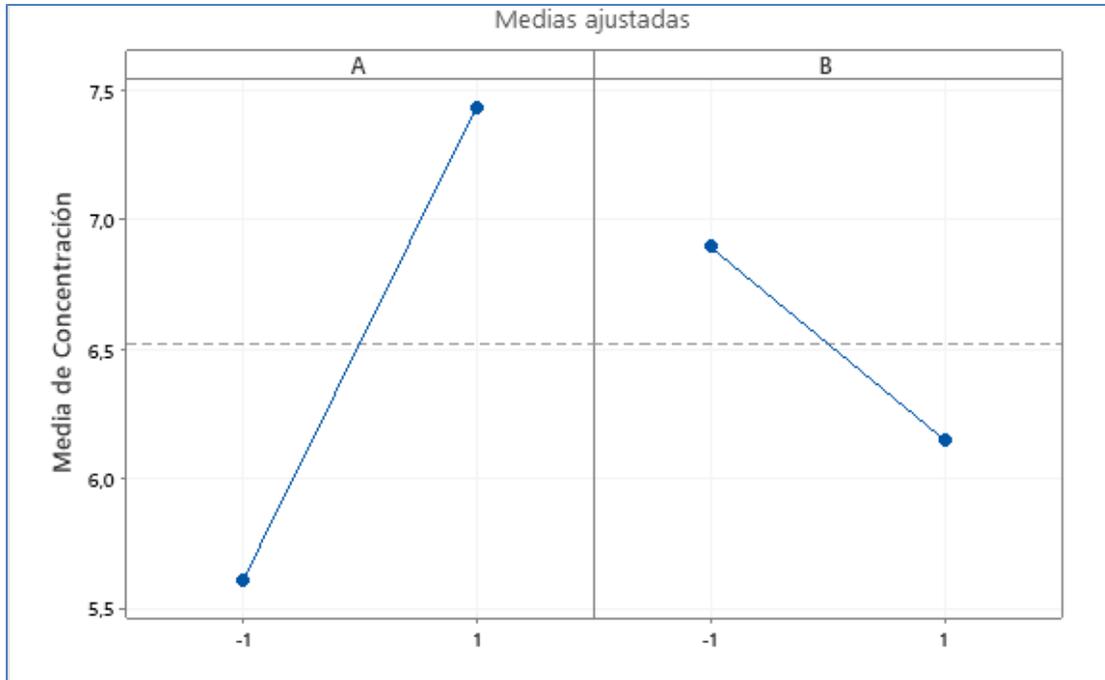
En la gráfica 5 se muestra el Diagrama de Pareto, donde se puede observar el valor absoluto de los efectos, los cuales si se extienden más allá de la línea de referencia 2.036 son significativos como es el caso del efecto A y B, lo cual concuerda con el Análisis de Varianza.



Gráfica 5: *Diagrama de Pareto con respecto a los efectos*

Fuente: Autora.

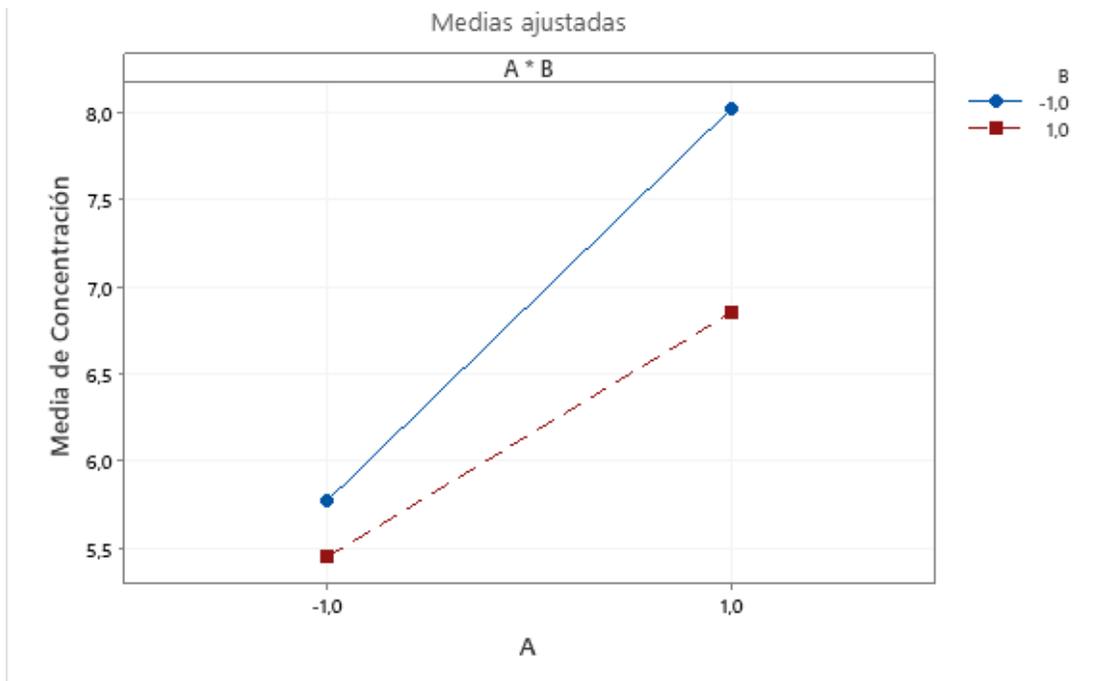
Dentro de las gráficas factoriales podemos observar, la gráfica de efectos principales, en donde constan los efectos A y B con las respectivas medias ajustadas para cada nivel, cada punto representa las medias de todos los tratamientos, con respecto al efecto A al ser muy significativo incide muy por encima del factor B lo que quiere decir que si solo nos basamos en el pH nuestra concentración de pigmento sería mínima.



Gráfica 6: *Efectos principales para concentración*

Fuente: Autora.

Con respecto a la gráfica de interacción se puede observar que esta es nula porque las rectas son casi paralelas y como tal no existe interacción, esto quiere decir que cada variable es independiente.



Gráfica 7: *Interacción para concentración*

Fuente: Autora.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Los bioprocesos son una gran alternativa para la obtención de productos amigables con el ambiente, además de ser económicamente favorables, reducen los riesgos que pueden ocasionar productos sintéticos, debido a la intervención de sustancias químicas para su obtención; existen factores que influyen significativamente en estos procesos pero pocos son los estudios que se enfocan en determinar cómo estos afectan al producto final, es por ello que, se planteó determinar la incidencia de dos factores importantes como son el medio del cultivo y el pH en la obtención del pigmento cinabarina a partir del hongo *Pycnoporus sanguineus*.

Luego de culminar con los diferentes procedimientos establecidos en este estudio se obtienen las siguientes conclusiones:

- El hongo *Pycnoporus sanguineus* posee una gran capacidad para producir pigmentos, esto se pudo observar a simple vista debido al color anaranjado brillante que este presenta, permitiendo así una fácil obtención de dicho compuesto.
- La obtención del pigmento en medios líquidos, resulta ser una técnica bastante satisfactoria, debido a la fácil extracción luego del tiempo de incubación, además, el pigmento cinabarina es una gran alternativa para suplantar a los pigmentos sintéticos utilizados en la industria textil brindando así una alternativa más saludable a las personas y al medio ambiente.
- Con este estudio se pudo constatar que los parámetros pH y medio de cultivo influyen de manera significativa en la obtención del pigmento cinabarina ya que se ha podido registrar que el compuesto cinabarina tuvo una variación que es medible, por lo que es importante el estudio de las variables que intervienen dentro de este bioproceso.

- Las variables estudiadas demostraron no tener una interacción entre ellas, es decir el valor p de esta interacción es de 0.186 mayor al nivel de significancia 0.05, por lo que se concluye que se deben estudiar de forma independiente, no afectando en conjunto a la obtención del pigmento cinabarina.
- Con todo lo expuesto anteriormente se establece que los factores medio de cultivo y pH inciden de manera independiente en la obtención del pigmento cinabarina a partir del hongo *Pycnoporus sanguineus*, y se puede establecer que el mejor medio de cultivo para esta obtención es el medio Caldo Papa Dextrosa a un pH 7.

5.2 Recomendaciones

Referente a la cepa axénica del hongo *Pycnoporus sanguineus* sería pertinente la identificación a nivel molecular.

Con respecto a los solventes utilizados en la extracción del pigmento cinabarina, se recomienda utilizar solventes no tan volátiles, y de ser el caso la acetona utilizar una solución agua/acetona para evitar cualquier problema de cristalización o evaporación.

Para encontrar adecuadamente la concentración del pigmento se sugiere utilizar el estándar de cinabarina o ácido cinabárico para obtener resultados que sean confiables.

En relación con la producción del pigmento, utilizar medios de formulación convencional para determinar qué tan alto puede llegar a ser su rendimiento además de diferentes rangos de pH.

Investigar sobre nuevas variables de estudio que intervengan significativamente y tengan interacción en la obtención del pigmento, como la temperatura, lugar de fructificación, tiempo, etc.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Urdapilleta, L., Paz, G., Rodriguez, A., Adame, M., Salgado, D., Salgado, J. y Villegas, E. (2010). *Pycnoporus sanguineus un hongo con potencial biotecnológico*. (pp. 531-537). <https://bit.ly/3vIsXEv>
- Acosta-Urdapilleta, L., Vega, F. y Villegas, E. (2013). *Pigmentos antimicrobianos de Pycnoporus sanguineus* (pp. 339-348). <https://bit.ly/2RTKAm5>
- Aguilar Pompa, C. A. (2017). *Pigmentos fúngicos en el control de hongos postcosecha y bacterias de interés clínico*”. <https://bit.ly/3sn1nKo>
- Andrade, W. E. G., Insuasti, J. A. P. y Checa, A. (2020). *Banco de recursos genéticos para Pycnoporus spp.* 3(3), 10. <https://bit.ly/2Qzo40C>
- Borderes, J., Costa, A., Guedes, A. y Tavares, L. B. B. (2011). Antioxidant activity of the extracts from *Pycnoporus sanguineus* mycelium. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(6), 1167-1174. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000600012>
- Carrillo Ruiz, L. (2017). *Extracción de colorante natural (cinabarina) del hongo rojo Pycnoporus sanguineus, utilizando dos solventes* [Tesis Pregrado, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Técnica del Norte]. <https://bit.ly/3aIr55n>
- Chamorro, H. A. y Osorio, Y. S. (2017). *Macrohongos de un fragmento de bosque seco tropical en la localidad de San Antonio, departamento de Sucre, Colombia* [Tesis Pregrado, Facultad de Educación y Ciencias, Universidad de Sucre]. <https://bit.ly/3gkIRQr>
- Corzo, A. (2019). *Técnica de Análisis en Química Orgánica. Cromatografía* (1a ed.). <https://bit.ly/2QdBNKD>

- Cruz Muñoz, R. (2012). *Producción de extractos de Pycnoporus sanguineus con actividad antimicrobiana de hongos y bacterias fitopatógenas* [Tesis de Maestría, Ciencias en bioprocesos, Instituto Politécnico Nacional]. <https://bit.ly/3x2PdKf>
- Cruz Muñoz, R. (2015). *Caracterización de los pigmentos de Pycnoporus sanguineus y su citotoxicidad sobre hongos y bacterias fitopatógenas* [Tesis Doctoral, Instituto Politécnico Nacional]. <https://bit.ly/3mXRnWH>
- Cruz Muñoz, R., Piña-Guzmán, A. B., Yáñez-Fernández, J., Valencia-Del Toro, G., Bautista-Baños, S. y Villanueva Arce, R. (2015). Producción de pigmentos de *Pycnoporus sanguineus* en medio de cultivo sólido. *Agrociencia*, 49(4), 347-359. <https://bit.ly/3c91WCa>
- Equihua, V., Peralta, M., Vázquez- Marrufo, G., Del, M. y Angon, M. D. P. (2007). *Conocimiento etnomicológico de hongos silvestres comestibles registrados para la zona de Tancítaro, Michoacán*. <https://bit.ly/2TBgPH9>
- Gaitán Hernández, R. (2006). *Manual práctico del cultivo de setas: Aislamiento, siembra y producción*. Instituto de Ecología. <https://bit.ly/3yUYpRE>
- Galarza, C. (2013). *Obtención de un colorante a partir de las flores de ataco o sangorache (Amaranthus sp.)* [Tesis Pregrado, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos Universidad Técnica de Ambato]. <https://bit.ly/2REturD>
- Gómez, W. E. (2017). *Desarrollo de un proceso para el aislamiento, conservación y producción del hongo medicinal oreja de palo (Pycnoporus spp.) a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana*. [Tesis de Maestría, Universidad Técnica del Norte]. <https://bit.ly/3dsnpar>
- González, C. V. y Cerón, M. (2014). *III Certamen de Proyectos Educativos en Ingeniería Química en la UAL*. Universidad de Almeida. <https://bit.ly/3js3DNt>

- Guarnizo Franco, A. y Martínez Yepes, P. N. (2009). *Experimentos de Química Orgánica—Con enfoque en ciencias de la vida*. (1.^a ed.). Elizcom S.a.s. <https://bit.ly/2QCeIRD>
- Gutiérrez Pulido, H. y De la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (Segunda). Editorial S. A. <https://bit.ly/3uV2fHG>
- Herpoël, I., Moukha, S., Lesage-Meessen, L., Sigoillot, J.-C. y Asther, M. (2000). Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production. *FEMS Microbiology Letters*, *183*(2), 301-306. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08975.x>
- Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fito patógenos. *Revista de Protección Vegetal*, *24*(1), 14-21. <https://bit.ly/2S6sygh>
- Loaiza, E. M. (2016). *Extracción del pigmento natural del hongo Pycnoporus sanguineus como colorante orgánico para teñido de fibras de algodón*. [Tesis Pregrado, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Central del Ecuador]. <https://bit.ly/3ei5OBk>
- Lomascolo, A., Cayol, J.-L., Roche, M., Guo, L., Robert, J.-L., Record, E., Lesage-Meessen, L., Ollivier, B., Sigoillot, J.-C. y Asther, M. (2002). Molecular clustering of *Pycnoporus* strains from various geographic origins and isolation of monokaryotic strains for laccase hyperproduction. *Mycological Research*, *106*(10), 1193-1203. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006494>
- Lomascolo, A., Uzan-Boukhris, E., Herpoël-Gimbert, I., Sigoillot, J.-C. y Lesage-Meessen, L. (2011). Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *92*(6), 1129-1149. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3596-5>

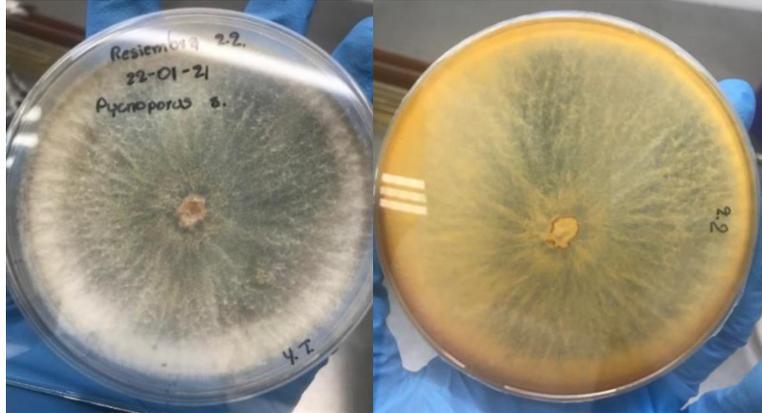
- López, A. (2016). *Manual de Producción de Micelio de Hongos Comestibles (Edición 2016)*.
<https://bit.ly/34Gqcr7>
- Menéndez, J. L. (2014). *Características generales de los hongos*. Naturaleza y turismo.
<https://bit.ly/3gruqtI>
- Navarro, O. (2013). *Manual de micología veterinaria*. <https://bit.ly/2RJHrop>
- Ojeda, K. y Suescum, J. (2012). *Evaluación de cinco cepas de hongos nativos como controladores biológicos de la enfermedad “Ojo de Pollo” (Mycena citricolor) en café (Coffea arabica) en condiciones in vitro*. [Tesis Pregrado, Universidad Técnica Particular de Loja].
<https://bit.ly/2RjiOPC>
- Ortiz, E., Arroyave, C. S., Saransi, C., Ayala, K., Faz, L., Benavides, N., Vela, P., Rosero, P., Gómez, W., Pinchao, J. H., Lara, G. R., Torres, R. D. G., Castro, G. P., S. D. y Soto, A. P. (2016). *Banco de recursos genéticos de Auricularia spp. Con fines industriales*. 7.
<https://bit.ly/32vNwXr>
- Papinutti, L. (2013). *Pycnoporus sanguineus*. Ficha de identificación. *REVISTA BOLETÍN BIOLÓGICA*, 29, 32-33. <https://bit.ly/3wOM6of>
- Pineda-Insuasti, J. A., Gómez-Andrade, W. E., Duarte-Trujillo, A. S., Soto-Arroyave, C. P., Pineda-Soto, C. A., Fierro-Ramos, F. J., Mora-Muñoz, E. S. y Álvarez-Ramos, S. E. (2017). Producción de *Pycnoporus* spp. y sus metabolitos secundarios: Una revisión. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 51(2), 60-69. <https://bit.ly/3yVsmBm>
- Pinto, J. (2017). *Micología*. Microbiología Ambiental. <https://bit.ly/3r1eGR9>
- Pointing, S. B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1-2), 20-33. <https://doi.org/10.1007/s002530100745>

- Ramos, H. M. (2014). *Durabilidad natural de tres especies forestales a la acción de dos hongos xilófagos* [Universidad Nacional Agraria La Molina]. <https://bit.ly/3akuLL6>
- Rea-Páez, H. (2017). *L-Manuals T-II Manual de Prácticas de la Unidad de Aprendizaje de Bromatología* (Primera). ECORFAN. <https://bit.ly/3geAm9A>
- Riera, F., Celi, A., Thompson, L. y Rabagliati, R. (2019). *Manual de infecciones fúngicas sistémicas*. 224. Editorial Recursos Fotográficos. <https://bit.ly/3wQITVb>
- Rodríguez, N. V. R. (2020). *Evaluación del crecimiento in vitro del hongo Pycnoporus sanguineus en residuos agroforestales, en Montería Córdoba*. [Tesis Pregrado, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Córdoba]. <https://bit.ly/3fFGN4Q>
- Salazar Vidal, V. (2016). *Manual de Micología Básica: Introducción al Estudio de los Hongos*. <https://bit.ly/3wSt5Bw>
- Sánchez Huamán, P. R. y Bautista Valverde, N. C. (2011). Cultivo del hongo *Pycnoporus sanguineus* (L:Fr) Murr. Para evaluar la actividad leishmanicida en promastigotes de leishmania. *Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco*. <https://bit.ly/2QdCeEL>
- Suárez Arango, C. (2010). *Obtención in vitro de micelio de hongos comestibles, shiitake (*Lentinula edodes*) y orellanas (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*) a partir de aislamientos de cuerpos fructíferos, para la producción de semilla*. <https://bit.ly/3ghsFzh>
- Téllez-Téllez, M., Villegas, E., Rodriguez, A., Acosta-Urdapilleta, L., A, O. y Díaz-Godinez, G. (2016). Mycosphere Essay 11: Fungi of *Pycnoporus*: Morphological and molecular identification, worldwide distribution and biotechnological potential. *Mycosphaera*, 7. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/si/3b/3>
- Velisek, J. y Cejpek, K. (2011). Pigments of Higher Fungi: A Review. *Czech Journal of Food Sciences*, 29, 87-102. <https://doi.org/10.17221/524/2010-CJFS>

Viecelli, C. A., Stangarlin, J. R., Kuhn, O. J. y Schwan-Estrada, K. R. F. (2010). Resistance induction in bean plants against angular leaf spot by extracts from *Pycnoporus sanguineus* mycelium. *Summa Phytopathologica*, 36(1), 73-80. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052010000100013>

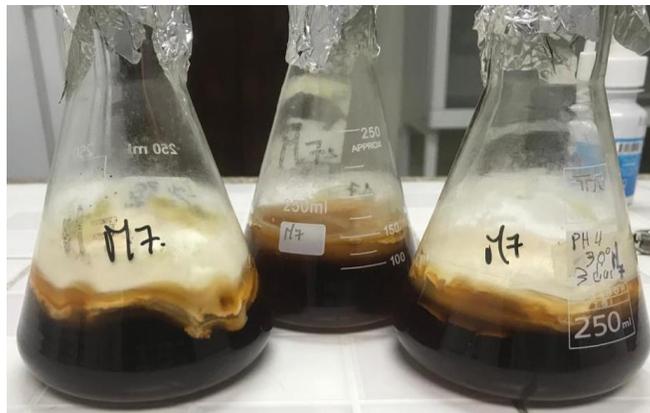
ANEXOS

ANEXO I. Ceba axénica del hongo *Pycnoporus sanguineus*



Fuente: Autora.

ANEXO II. Medios líquidos con micelio del hongo para producción del pigmento cinabarina



Fuente: Autora.

ANEXO III. *Pigmento (cinabarina) extraído en medio CPD y CEM*



Fuente: Autora.

ANEXO IV. *Preparación de muestras de pigmento para TLC*



Fuente: Autora.