



PONTIFICIA **UNIVERSIDAD CATÓLICA** DEL PERÚ

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons
Reconocimiento-No comercial-Compartir bajo la misma licencia 2.5 Perú.

Para ver una copia de dicha licencia, visite
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>



Resumen

Se desarrolló un nuevo proceso para la fabricación de armazones (“scaffolds”) porosos para su aplicación en Ingeniería de Tejidos mediante una técnica de calentamiento por microondas. El objetivo del trabajo es producir estos armazones usando polímeros naturales biodegradables y caracterizarlos según sus propiedades físicas y mecánicas para así explorar su potencial uso en Ingeniería de Tejidos.

Para cumplir con las exigencias de biodegradabilidad y absorción se utilizó como material base almidón de tres tipos: papa, maíz y camote, que se mezclaron en diferentes proporciones con agua destilada, la cual funcionó como agente porógeno y lubricante.

Se obtuvieron todos los parámetros necesarios para definir este nuevo proceso de manufactura (temperatura, tiempo, composición de la muestra, etc.) y se estudió la influencia de los mismos en las propiedades del producto final. Además, se analizó el proceso paso por paso para presentar un modelo cualitativo del crecimiento de los poros para explicar el mecanismo por el cual se forman los armazones procesados por microondas.

Los armazones fueron caracterizados según sus propiedades físicas y mecánicas. Se midió la densidad por gravimetría y se calculó la porosidad correspondiente (60%-85%). Su morfología fue estudiada mediante estereomicroscopía y por medio del análisis de imágenes se obtuvieron características como el tamaño promedio de poros (100-800 μ m), la distribución de tamaños de poros según el porcentaje y tipo de almidón. El grado de uniformidad de los armazones se evaluó haciendo mediciones a diferentes alturas de una misma muestra. Las características mecánicas fueron evaluadas mediante ensayos de indentación y se halló una relación entre las propiedades geométricas (tamaño promedio de poro) y la presión de indentación.

Se verificó que los armazones procesados cumplen con los requerimientos de la Ingeniería de Tejidos para tejidos duros (óseos) con respecto a las propiedades físicas y mecánicas, al comparar los valores obtenidos con los descritos en la literatura.

INDICE

INTRODUCCIÓN	3
ARMAZONES POROSOS BIODEGRADABLES PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS	4
1.1 Ingeniería de tejidos	4
1.1.1 Ingeniería de tejidos y los “armazones” (<i>scaffolds</i>)	4
1.1.2 Armazones para tejidos duros	6
1.1.3 Materiales para la producción de armazones para ingeniería de tejidos	7
1.1.4 Técnicas de procesamiento	7
1.2 Almidones en la producción de polímeros biodegradables	9
1.2.1 Constituyentes del almidón	9
1.2.2 Gelatinización	11
1.2.3 Retrogradación	13
1.2.4 Termoplásticos de almidón	13
1.2.5 Estructuras porosas de almidón	15
1.3 Calentamiento por Microondas	16
1.3.1 Microondas	16
1.3.2 El horno de microondas	17
1.3.3 Polarización	18
1.3.4 Propiedades dieléctricas	19
1.3.5 Contenido de humedad y temperatura	20
1.3.6 Calentamiento volumétrico	21
PROCESAMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS POROSAS	27
2.1 Objetivo	27
2.2 Materiales	27
2.3 Equipo	28
2.4 Procedimiento	28
2.4.1 Determinación de los parámetros del procedimiento	30
2.4.2 Parámetros elegidos	32
2.5 Formación de poros	33
2.6 Análisis cualitativo del crecimiento de poros en armazones procesados por microondas	37
2.6.1 Procedimiento	37
2.6.2 Resultados y análisis	38
2.6.3 Modelo cualitativo del crecimiento de los poros	41
CARACTERIZACIÓN DE LOS ARMAZONES DE ALMIDÓN PROCESADOS POR MICROONDAS	48
3.1. Propiedades que caracterizan las estructuras porosas	48
3.1.1 Propiedades del material sólido	50
3.1.2 Densidad relativa	50

3.1.3	Topología y forma de las celdas	50
3.2.	Propiedades que caracterizan los armazones	51
3.2.1	Propiedades del material sólido	52
3.2.2	Densidad de la espuma	53
3.2.3	Microestructura	53
3.2.4	Temperatura de transición vítrea, temperatura de fusión y cristalinidad	59
3.2.5	Propiedades mecánicas	59
3.2.6	Propiedades biológicas	60
3.2.7	Propiedades de degradación	60
3.3	Caracterización de los armazones producidos por microondas en el presente trabajo para su uso en Ingeniería de Tejidos	61
3.3.1	Tamaño promedio de poro y distribución del tamaño de poro	61
3.3.2	Densidad aparente	64
3.3.3	Porosidad	64
3.3.4	Porcentaje de agua después del calentamiento	65
3.3.5	Morfología	66
3.3.6	Indentación	66
	EVALUACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	70
4.1	Morfología	70
4.2	Tamaño promedio de poro	71
4.3	Distribución del tamaño de los poros	76
4.4	Densidad y porosidad	79
4.5	Propiedades mecánicas	82
4.5.1	Modelamiento teórico de la deformación en estructuras porosas	82
4.5.2	Ensayo de indentación	85
	CONCLUSIONES	91
	BIBLIOGRAFÍA	93

INTRODUCCIÓN

La búsqueda del desarrollo de polímeros biodegradables ha sido una alternativa de solución ante los problemas de desechos en todo el mundo. Por otro lado, el uso de polímeros naturales se ve estimulado por los mismos principios de conservación y por el deseo de usar recursos diferentes a los derivados de la industria de los hidrocarburos. Otra aplicación que se ha encontrado para estos polímeros está en la medicina que busca materiales no tóxicos y que además se degraden y puedan ser absorbidos por el cuerpo.

La Ingeniería de Tejidos, en su objetivo por hacer crecer tejidos e incluso órganos, necesita que se desarrollen nuevas técnicas en el campo de la biología y la medicina, pero también requiere de nuevos materiales diseñados para los requerimientos específicos de esta nueva rama de la ingeniería. En este sentido, la Ciencia de los Materiales debe responder desarrollando nuevos materiales que cumplan con las exigencias de la Ingeniería de Tejidos.

Gran parte de los esfuerzos en la Ingeniería de Tejidos se concentra en el objetivo de hacer crecer órganos en el laboratorio para su posterior implante en el cuerpo humano. Es imprescindible, entonces, el desarrollo de estructuras sobre las cuales se pueda hacer crecer células, tejidos y órganos. Es decir, estructuras que cumplan con el rol de las matrices extra celulares conocidas con el nombre de armazones (*scaffolds*).

El objetivo de la presente tesis es producir estos armazones usando polímeros biodegradables naturales (almidones de papa, maíz y camote) y caracterizarlos en sus propiedades físicas y mecánicas para validar su posible uso en Ingeniería de Tejidos.

La tesis está cuatro capítulos y una sección final de conclusiones. El primer capítulo expone el marco teórico de todo el trabajo, donde se incluye información general sobre almidón, Ingeniería de Tejidos y procesamiento por microondas. En el segundo capítulo se describe el método usado para procesar los armazones, los parámetros elegidos y se da un modelo cualitativo para el crecimiento de los poros. En el tercer capítulo se discuten los métodos de caracterización de los armazones según las normas disponibles. En el cuarto capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos para finalmente dar las conclusiones en la última parte de la tesis.

CAPÍTULO 1

ARMAZONES POROSOS BIODEGRADABLES PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS

1.1 Ingeniería de tejidos

Para las personas que sufren por causa de alguna enfermedad que les haya hecho perder tejido o que les haya dejado órganos que no funcionan correctamente, no hay muchas opciones con respecto a las alternativas de solución. El uso de implantes o el trasplante de órganos permanecen como tratamientos imperfectos [1] debido a problemas como la poca disponibilidad de donadores, los problemas a largo plazo de las reconstrucciones quirúrgicas (Por ejemplo, el cáncer al colon que se desarrolla después del tratamiento de la incontinencia que dirige la orina al colon) y el deterioro progresivo del paciente que usa implantes mecánicos que no pueden cumplir con todas las funciones del órgano que reemplazan.

Una propuesta diferente es hecha por la ingeniería de tejidos que no busca reemplazar los órganos o tejidos, sino que busca una manera de regenerar los mismos sobre estructuras artificiales de carácter provisional. El reto que presenta esta aproximación es el de comprender mejor el funcionamiento de las células y el de utilizar esa información para desarrollar los materiales y procesos de fabricación necesarios.

1.1.1 Ingeniería de tejidos y los “armazones” (*scaffolds*)

“La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y de las biociencias para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren las funciones de los tejidos”¹ [2]. En otras palabras, resuelve problemas de la medicina usando células vivas como materiales de ingeniería; manipulándolas, a nivel de tejidos u órganos, para que crezcan en un ambiente distinto al natural.

Se busca que los nuevos tejidos cumplan funciones biomecánicas (huesos, cartílagos, etc.), funciones fisiológicas (hígado, nervios, etc.) o que liberen determinados fluidos como la insulina. Para cumplir con estos objetivos, se han usado varias técnicas para

¹ Traducción libre del autor de esta tesis.

manipular las células. Cuando éstas son cultivadas en una estructura –armazón- fuera del cuerpo, se trata de una síntesis “*in vitro*”, si son implantadas dentro del cuerpo, se dice que es una síntesis “*in vivo*” y si son encerradas dentro de una membrana semipermeable que las protege del sistema inmunológico pero que les permite obtener nutrientes y sregar sustancias terapéuticas, hablamos de una “encapsulación extracorpórea” (véase Fig. 1- 1).

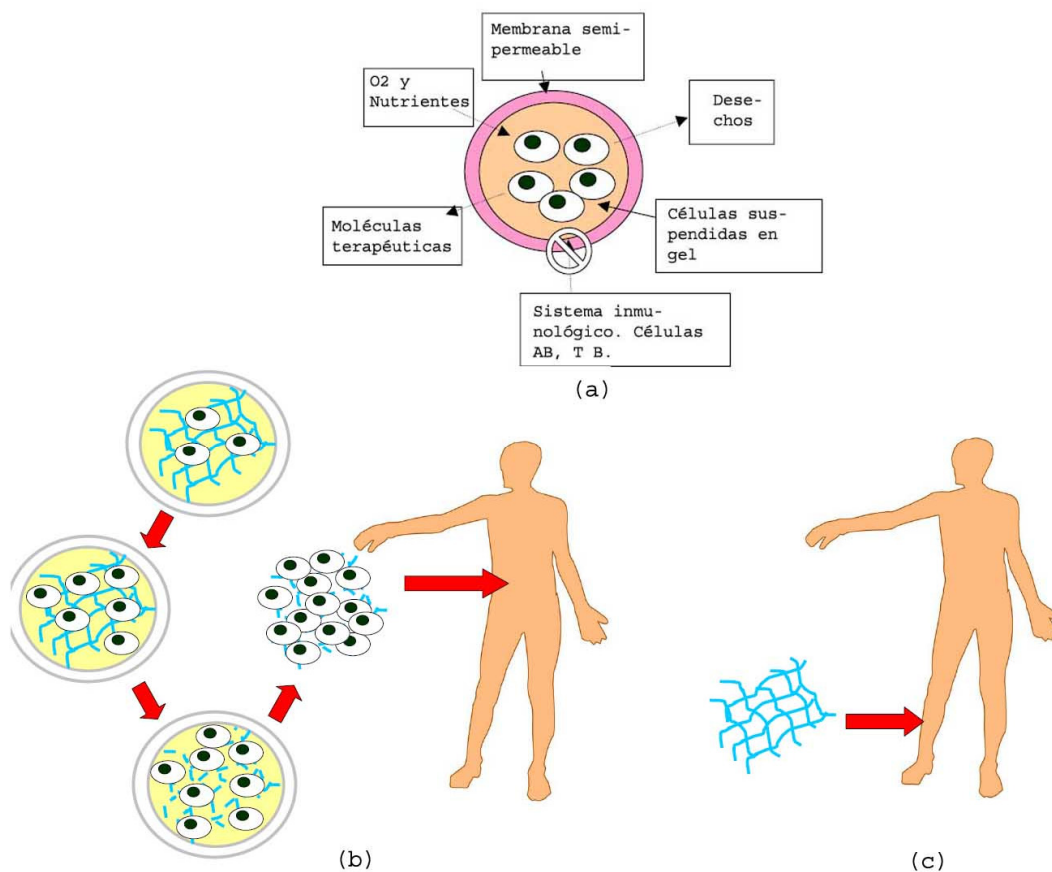


Fig. 1- 1 Técnicas de manipulación de células. (a) Encapsulamiento, (b) Síntesis *in vitro* y (c) Síntesis *in vivo*

Cualquiera sea el método empleado, siempre se requiere reemplazar el ambiente natural en el que las células crecen (matriz extracelular) por un armazón (*scaffold*) que cumpla con los requerimientos necesarios. La matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés. Fig. 1- 2) es todo el material de un tejido que no forma parte de ninguna célula y que contiene las proteínas y fluidos usados para la diferenciación, el anclaje, la orientación y el crecimiento de las células, dando también la integridad mecánica para el crecimiento del tejido.

Las estructuras que cumplen con el papel de la ECM son llamadas armazones y es en ellas donde se implantan las células que formarán los nuevos tejidos. Su rol es temporal, pues deben ser posteriormente absorbidos, pero crucial para la estrategia.

Las características de estos armazones dependerá del tipo de ECM que reemplaza y, finalmente, del tipo de célula que va a crecer en él. Los diferentes tipos de tejidos: Conectivo, epitelial, muscular, óseo, cartilaginoso, etc. demandarán sendos tipos de armazones. En el presente trabajo se han obtenido armazones en los que se implantaría tejidos duros (léase óseo o similar).

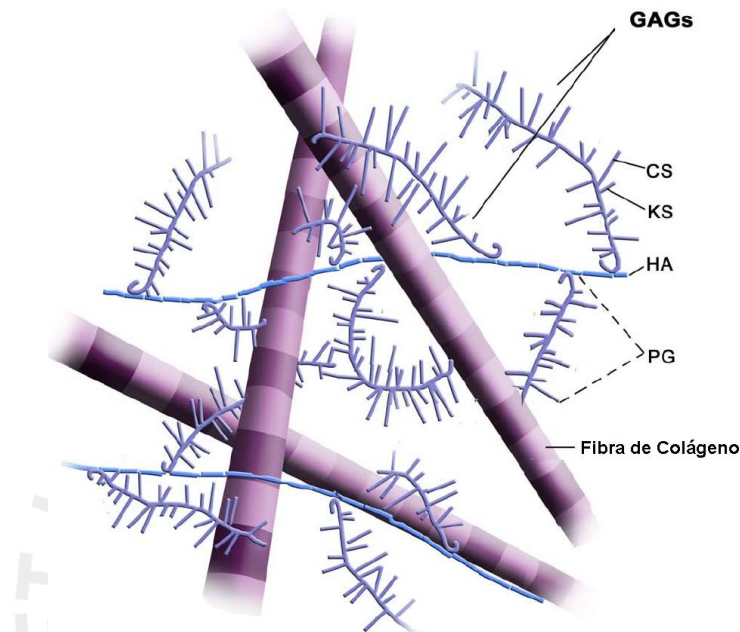


Fig. 1- 2 Matriz Extra Celular (ECM)

1.1.2 Armazones para tejidos duros

Entre las publicaciones referidas al tema, Hutmacher [3] ha resumido los requerimientos de los armazones diseñados para la implantación de tejido muscular u óseo: (i) Estructura tridimensional y porosa interconectada, (ii) biocompatibilidad y bioabsorbibilidad, (iii) características químicas adecuada en la superficie que permita el anclaje, la proliferación y la diferenciación y (iv) propiedades mecánicas cercanas a las de los tejidos donde van a ser implantados. Jones y Hench agregan (v) bioactividad y osteoconductividad [4].

Una estructura tridimensional, interconectada y porosa es necesaria para el crecimiento de las células y el flujo de nutrientes y de desechos metabólicos. Estos armazones proveerán un ambiente adecuado para la implantación de las células, su crecimiento, la producción de ECM y la vascularización. Para el caso de la regeneración de huesos un tamaño óptimo de poro varía de los 100µm a 500µm [5-7].

Además de no generar ningún rechazo, los armazones deben poder degradarse y ser absorbidos por el cuerpo. La idea es que a medida que vayan creciendo en el armazón las células, éste vaya degradándose y así permita que el nuevo tejido produzca su propia ECM por lo que la tasa de degradación y reabsorción debe igualar a la tasa de crecimiento de las células.

1.1.3 Materiales para la producción de armazones para ingeniería de tejidos

Para que los armazones cumplan con las exigencias químicas, morfológicas y mecánicas, en un principio se utilizaron polímeros sintéticos ya usados en medicina para su producción [8]. Así tenemos el ácido poliláctico (PLLA), el ácido poliglicólico (PGA) y sus copolímeros (PLGA). Éstos satisfacían la mayoría de requerimientos para las aplicaciones de la ingeniería de tejidos y estaban entre los pocos polímeros biodegradables aprobados por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) para su uso clínico.

En vez de usar los materiales ya disponibles, otros han preferido tomar un acercamiento diferente y buscar distintos polímeros biodegradables con propiedades mejoradas, diseñados específicamente para la ingeniería de tejidos [9]. Las investigaciones realizadas por Reis [10] nos presentan matrices de origen natural para producir armazones: proteínas (caseína² y soya, principalmente), quitina³ y quitosano⁴ y mezclas de almidón con polímeros sintéticos.

1.1.4 Técnicas de procesamiento

Son diversos los métodos usados para la producción de armazones dependiendo de las propiedades del polímero y el uso específico que se le va a dar. Por eso la técnica de producción debe ser escogida y desarrollada apropiadamente para alcanzar las características deseadas de tasa de degradación, porosidad, tamaño de poro, propiedades mecánicas, etc. En la Tabla 1-1 hay un breve resumen de algunas de estas técnicas.

² Grupo de proteínas que se producen por precipitación cuando la leche se acidifica.

³ Polímero que se encuentra en los caparazones de los mariscos.

⁴ Es producido comercialmente, teniendo como materia prima la quitina.

Tabla 1- 1 Técnicas de procesamiento de armazones. Adaptado de [10]

Método	Descripción	Observaciones
Unión de fibras (<i>Fiber bonding</i>)	Se alinean fibras de PGA ⁵ con la forma deseada y se sumergen en una solución de PLLA ⁶ /Cloruro de metileno (solvente). Luego, después de haberse evaporado el solvente, el compuesto se calienta por encima del punto de fusión de ambos polímeros. Finalmente, el PLLA es removido por disolución selectiva y las fibras de PGA quedan físicamente unidas.	Buena relación superficie/volumen.
Vaciado de solvente y extracción de partículas (<i>Solvent cast and particulate leaching</i>)	Un agente porógeno (sal, por ejemplo) es mezclado con una solución de polímero y solvente para ser vertidos en un molde. Después de que el solvente se ha evaporado, el agente porógeno se extrae por disolución selectiva.	Buen control de la porosidad y el tamaño de poros.
Laminado de membrana (<i>Membrane lamination</i>)	Se hace un armazón tridimensional al juntar muchas láminas (preparadas con el método de solvent cast and particulate leaching) cubriendo con cloroformo sus puntos en contacto.	Armazones tridimensionales de formas precisas.
Moldeo por fundición (<i>Melt Molding</i>)	Se vierte en un molde de teflón PLGA ⁷ y microesferas de gelatina (agente porógeno). Luego, todo es calentado por encima del punto de fusión del PLGA y la gelatina se extrae por disolución selectiva en agua desionizada.	No se usan solventes. Buen control de la porosidad, tamaño de poros y forma.
Separación de fases (<i>Phase separation</i>)	Se prepara una emulsión de polímero, solvente y agua. Al bajar la temperatura, una separación de fases líquido-líquido es inducida y se obtiene un sólido de dos fases. Finalmente, se va removiendo el solvente por sublimación.	

⁵ Ácido poli-glicólico.

⁶ Ácido poli-L-láctico.

⁷ Ácido poli (láctico-co-glicólico).

1.2 Almidones en la producción de polímeros biodegradables

En los últimos años ha habido un creciente interés en la protección del medio ambiente y el manejo de residuos que ha llevado a la búsqueda del desarrollo de polímeros biodegradables. El uso de almidones en la fabricación de polímeros que reemplacen a los derivados del petróleo se presenta como una alternativa viable y que ya esta siendo utilizada en la producción de películas y espumas. Una ventaja adicional de los productos hechos de almidón es que, como son biodegradables, pueden ser empleados en medicina e ingeniería de tejidos.

Después de la celulosa, el almidón es el recurso vegetal más abundante de la naturaleza. En el año 1997, su producción mundial llegó a 37 millones de toneladas [11], parte de las cuales tiene diferentes usos fuera de la industria alimentaria. Por ejemplo: gomas de cola de fusión, estampillas, encuadernación, sobres, etiquetas, adhesivo para la cabeza de los fósforos, recubrimientos de papel, pañales desechables, aglutinante para tabiques de concreto, adhesivo para madera laminada, acabado y estampado de telas, maquillajes, cremas faciales, revestimiento de cápsulas de medicamentos, separación de minerales por flotación y sedimentación, etc.

1.2.1 Constituyentes del almidón

El almidón es un polímero natural, compuesto por unidades de anhidroglucosa que constituye la mayor fuente de energía en muchas plantas. Esta energía es almacenada en raíces, semillas, frutas, tubérculos y hojas en dos formas poliméricas de la glucosa, amilosa y amilopectina.

La amilosa [Fig.1- 3] es un polímero lineal que tiene un grado de polimerización⁸ (DP) igual a 6000, una masa molar de aproximadamente $10^5 - 10^6$ g/mol y es soluble en agua. La amilopectina [Fig.1- 3], en cambio, es insoluble en agua, altamente ramificada, tiene un DP de 2×10^6 , aproximadamente y una masa molecular de $10^7 - 10^9$ g/mol, lo que la hace una de las moléculas más grandes de la naturaleza. La proporción de amilosa y amilopectina en el almidón varían dependiendo del tipo que se tenga pero valores típicos para el porcentaje de amilosa van desde 16% hasta 28% [12].

⁸ El grado de polimerización (DP) mide el número de unidades de monómero en una cadena de polímero. Es igual al peso molecular del polímero entre el peso molecular del monómero.

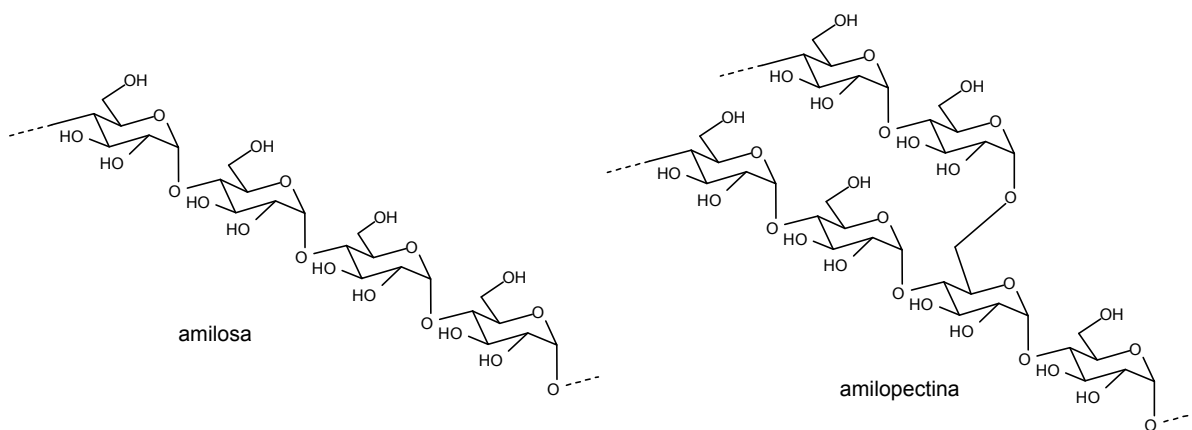


Fig. 1- 3 Cadenas de amilosa y amilopectina

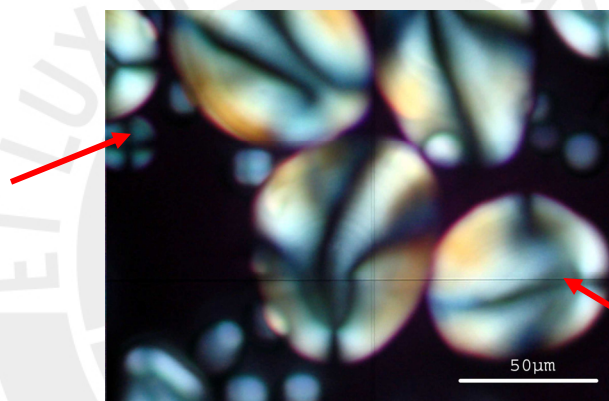


Fig. 1- 4 Almidón de papa bajo luz polarizada. La cruz de malta (flechas rojas) al centro de los granos revela cierta cristalinidad [46]

Los granos de almidón tienen un tamaño que varía según la fuente de 1-100 μ m y, además de la amilosa y la amilopectina, tienen pequeñas cantidades de agua, lípidos y proteínas [Tabla 1-2]. Se sabe que estos granos tienen un grado radial de organización debido a la interferencia en forma de “cruz de Malta” que se observa bajo un microscopio con luz polarizada [Fig.1- 4]. En el almidón natural, las cadenas de amilosa y las regiones ramificadas de la amilopectina son amorfas pero las regiones lineales no ramificadas de la misma son cristalinas. Es por eso que los cristales crecen en los granos del centro hacia fuera, provocando la organización radial. Se puede observar que el porcentaje de cristalinidad de los diferentes tipos de almidón varía entre un 20-28% mediante la de difracción por rayos X (X-ray diffraction) [13].

Tabla 1- 2 Características y composición de diferentes granos de almidón

Almidón	Composición ^a			Características del grano ^b		
	Amilosa (%)	Lípidos (%)	Proteínas (%)	Rango de diámetros (µm)	Diámetro promedio (µm)	Forma del grano
Maíz	28	0,8	0,35	2-30	10	Redonda, poligonal
Papa	21	0,1	0,1	5-100	28	Ovalada, esférica
Camote	20	0,21	0,23	4,1-27,5	11,6	Redonda, poligonal
Trigo	28	0,9	0,4	1-45	8	Redonda, lenticular
Yuca	17	0,1	0,1	4-35	15	Ovalada

^a Tomado de [14].^b Tomado de [12].

1.2.2 Gelatinización

Los granos de almidón se hinchan ligeramente al contacto con el agua fría pero al secarse vuelven a su estado anterior debido a su estructura semi-cristalina. Al ser calentados en agua por encima de cierta temperatura (55-80°C), dependiendo del tipo de almidón, ocurre un proceso llamado gelatinización en el que los granos comienzan a hincharse de manera irreversible. Primero se hinchan las regiones amorfas, con lo que se pierde la organización radial, y luego las regiones cristalinas. Al continuar el proceso, la amilosa comienza a salir del grano al agua aumentando la viscosidad de la suspensión hasta que los granos hinchados comienzan a romperse y colapsar para convertirse en una solución viscosa con apariencia de pasta [15].

Algunos de los viscosímetros más usados para estudiar el proceso de gelatinización en la industria son el Viscoamilógrafo Brabender (BRADENDER, Duisberg, Alemania) [16] y el más reciente pero bien aceptado y ampliamente comparable Analizador Rápido de Viscosidad (NEWPORT SCIENTIFIC PTY. LTD., Warriewood, Australia) [17]. Las unidades en las cuales miden la viscosidad son arbitrarias, conocidas como "Brabender Units (BU)" y "Rapid Viscosity Units (RVU)", respectivamente. En las Fig.1-5 y 1- 6 se muestran los resultados de los análisis dados por estos aparatos. También

es muy usado el Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC⁹) para encontrar la temperatura de gelatinización.

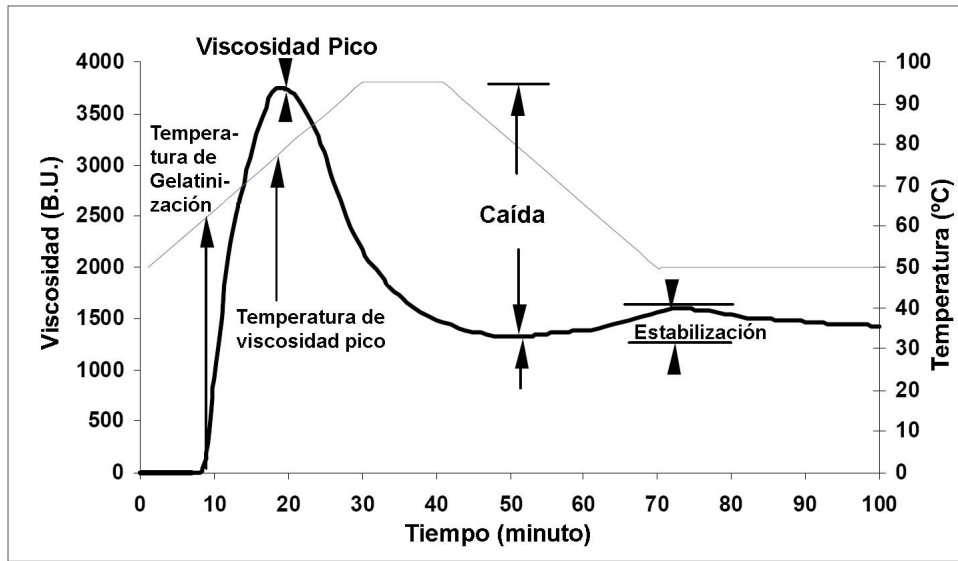


Fig. 1- 5 Amilograma Brabender [13]. La variación de la temperatura (—) hace que comience la gelatinización y el aumento de la viscosidad (—)

En el caso del Analizador Rápido de Viscosidad (RVA) la muestra es sometida a un ciclo térmico [Fig.1- 6]: Primero se calienta la muestra a una temperatura máxima, luego la muestra permanece en esa temperatura por un tiempo y después comienza a enfriarse hasta una temperatura mínima donde permanece por un tiempo. Así, se toman tres valores de viscosidad, en tres momentos diferentes del ciclo de calentamiento: La viscosidad pico (PV) es medida en el momento en el que se alcanza la máxima temperatura, la viscosidad en caliente (HPV) se mide al final del ciclo de calentamiento y la viscosidad en frío (CPV) se mide al final del ciclo de enfriamiento.

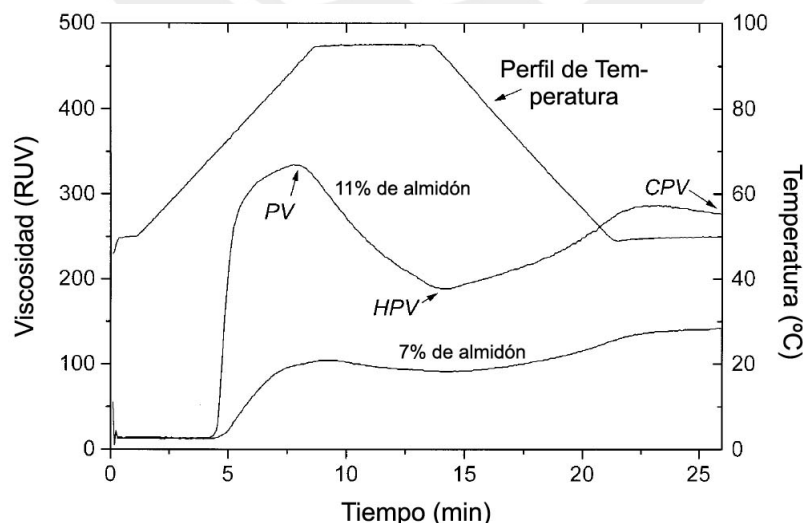


Fig. 1- 6 Resultado con el RVA (Analizador Rápido de Viscosidad). Se Observa el punto de viscosidad pico (PV), la viscosidad en caliente (HPV) y la viscosidad en frío (CPV) [18]

⁹ Ensayo que permite estudiar las transiciones térmicas de un polímero.

1.2.3 Retrogradación

Durante el almacenamiento, los productos de almidón atraviesan un proceso llamado retrogradación (retrogradation) [19-23] en el cual el almidón pasa a tomar una forma termodinámicamente más estable. La retrogradación de la amilosa hace que la misma cambie y adquiera una estructura cristalina. La amilopectina, en cambio, tiene una retrogradación lenta que sólo es importante con altas concentraciones de almidón o bajas temperaturas. La tasa y la intensidad de la retrogradación se incrementan a mayor contenido de amilosa. También depende del tipo de almidón, concentración, temperatura y Ph.

1.2.4 Termoplásticos de almidón

A bajas temperaturas, las cadenas de almidón tienen un movimiento restringido y forman un material frágil pero con un bajo contenido de humedad el almidón puede convertirse en un material termoplástico.

Se puede afirmar que la gelatinización ocurre cuando se procesa el almidón con exceso de agua y la cristalinidad de la amilopectina se pierde. Se obtienen propiedades mecánicas superiores cuando se procesa el almidón a contenidos bajos de agua ($\approx 15\%$), a volúmenes cerrados y a temperaturas por encima de 100°C ya que su estructura está basada en el componente ramificado de mayor masa molar (amilopectina) [24].

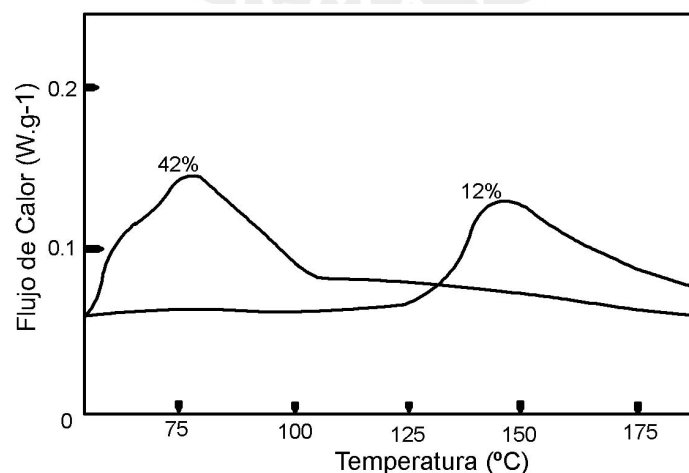


Fig. 1- 7 Curvas de DSC para almidón de papa con exceso de agua (42%) y con poca agua (12%). Tomado de [24]

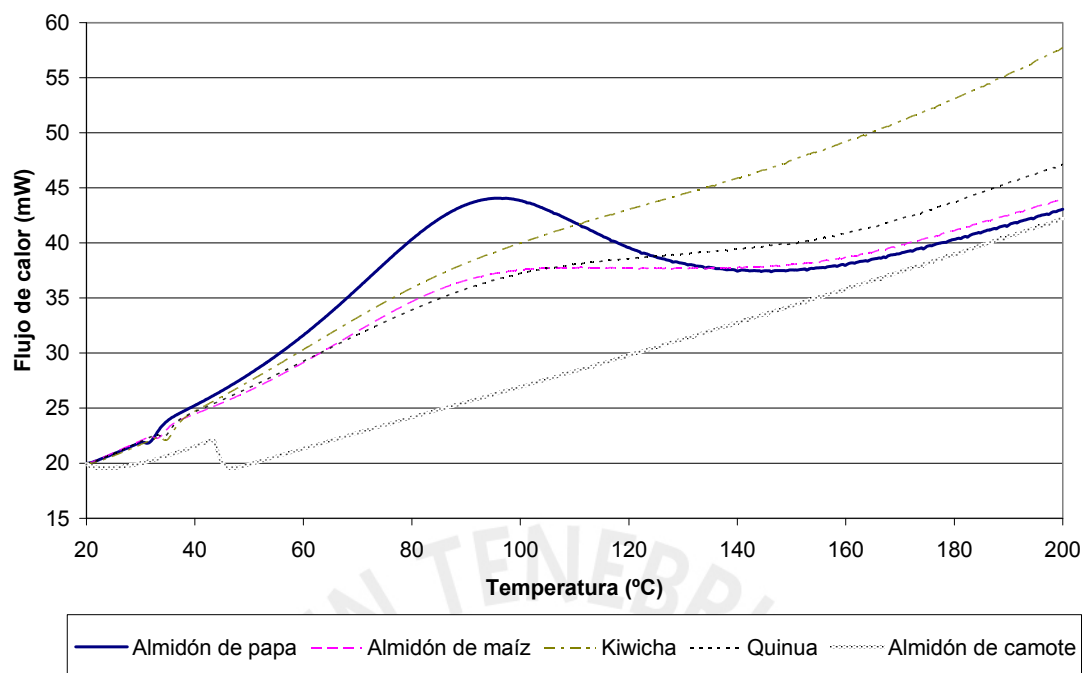


Fig. 1- 8 Curvas de DSC para almidones y harinas [25]

Tabla 1- 3 Ejemplos de termoplásticos de almidón [24]

Producto	Tipo de Producto	Fabricante
CAPILL	Cápsulas farmacéuticas	Capsule/Warner Lambert; West Pharmaceutical services
ECO-FOAM	Espuma de embalaje tipo pellet	National Starch
Mater-Bi (Almidón y mezclas de almidón con polímeros hidrofílicos).	Polvos de moldeo y extrusión	Novamont, Italy

En la Fig.1- 7 se observan las curvas de DSC de un almidón procesado con diferentes porcentajes de agua. La endoterma de mayor contenido de agua (42%) ocurre a menos de 100°C y es típica de la gelatinización cuando los granos de almidón se hinchan, se rompen y pierden amilosa por difusión. La endoterma de la muestra que contiene poco agua (12%) es típica de un termoplástico de almidón (TSP, *Thermoplastic Starch Polymer*) cuando hay una ruptura de las regiones cristalina de la amilopectina y un ordenamiento molecular en el grano sin difusión de agua. La Fig.1- 8

muestra las curvas de DSC para almidones y harina de kiwicha y de quinua. Con excepción de la papa, no se encuentran picos pronunciados.

Los TSP pueden ser producidos por métodos usados con polímeros sintéticos como son: moldeo por compresión, moldeo por inyección, extrusión, etc. En la Tabla 1-3 se muestran algunos ejemplos de TSP que se producen actualmente.

1.2.5 Estructuras porosas de almidón

Son variadas las aplicaciones que utilizan espumas debido a su reducido peso en comparación con los materiales sólidos. El uso de almidón en la producción de espumas no es nuevo y desde los años setenta se han estudiado mezclas de almidón con polietileno para la producción de las mismas [26, 27]. Estas mezclas tienen almidón como relleno de matrices de polímeros sintéticos se han convertido ya en materiales comerciales para propósitos de embalaje, principalmente.

Como ya hemos visto, el almidón se puede convertir en un material termoplástico con el que se forman espumas. Algunos métodos disponibles son: extrusión [28], cocción en molde caliente [29], moldeo por compresión [30] y liofilizado [31].

Son diversos los estudios que se han hecho con este tipo de espumas. Altieri y Lacourse [32] estudiaron la extrusión de espumas de diferentes tipos de almidones de maíz; Wang et al [33] midieron propiedades físicas de espumas hechas de almidón de trigo mezclado con 3% de polietileno; Bhatnagar y Hanna [34] trabajaron con almidón de maíz, tapioca, trigo arroz y camote con un 30% de poliestireno en una extrusora. Un ejemplo de patente es la obtenida por Chinnaswamy y Hana [35] por su espuma de 30% de poliestireno y 70% de almidón.

Todos estos métodos buscan producir materiales que no tengan una larga vida ni que estén expuestas a condiciones ambientales agresivas. Es por eso que las principales aplicaciones que se les ha dado son en el embalaje, en películas para agricultura y en materiales desechables en la industria de alimentos (platos, recipientes, bolsas, etc.). El presente estudio contempla una novedosa utilización para las espumas de almidón diferente a lo tradicionalmente investigado, es decir el uso de espumas biodegradables de almidón en aplicaciones médicas, concretamente para la ingeniería de tejidos.

1.3 Calentamiento por Microondas

El calentamiento por microondas tiene ventajas sobre los métodos convencionales debido a que el calor es generado directamente en la carga -no hay transferencia de calor- y la superficie externa no es afectada. Además, no hay necesidad de ningún portador de energía (líquido o gas), el tiempo es reducido y se pueden calentar objetos de formas irregulares.

A pesar de que esta tecnología es conocida desde los años cincuenta, su uso a nivel industrial no es tan difundido como a nivel doméstico debido que se debe comprender la interacción entre las microondas y el material a procesar. La aplicación ignorante trae, a menudo, resultados desalentadores.

Entre los usos actuales, podemos mencionar los que se dan en la industria química (secado, descomposición, hidrólisis, etc.), en el procesamiento de materiales por plasma, curado de polímeros, procesamiento de polvos en cerámicos, etc. [36]

1.3.1 Microondas

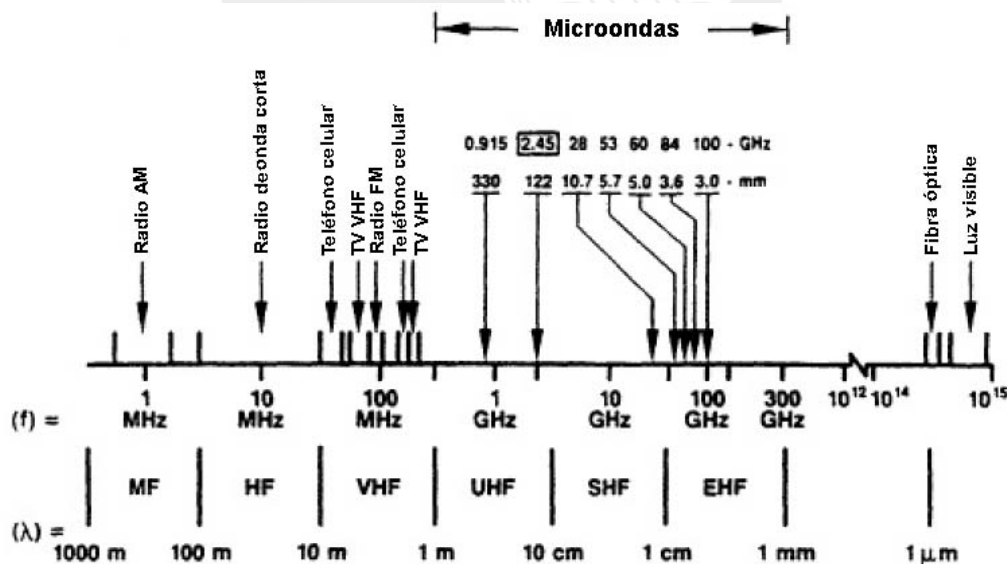


Fig. 1- 9 El espectro electromagnético

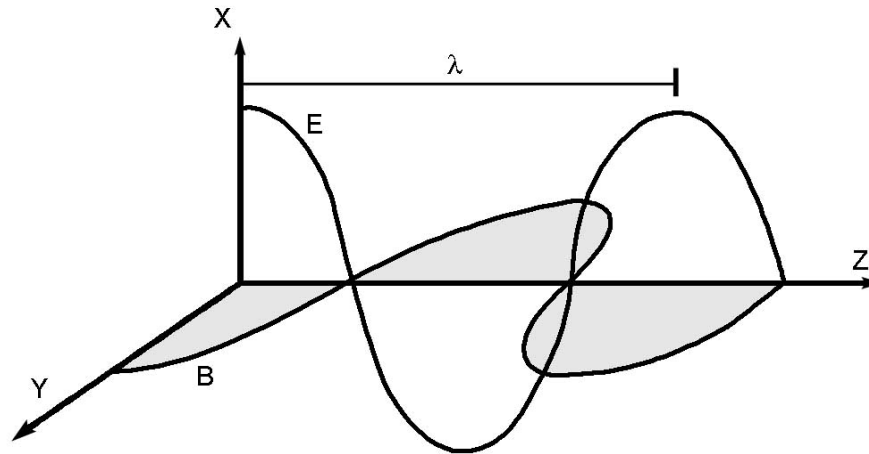


Fig. 1- 10 Onda electromagnética. Se observa el campo eléctrico (E) y el campo magnético (B)

En el espectro electromagnético, las microondas se encuentran entre los 300MHz y los 300GHz. Típicamente, las frecuencias usadas para el calentamiento por microondas son: 915MHz, 2.45GHz (usada en el microondas doméstico en nuestro medio), 5.8GHz y 24.124GHz. [Fig.1- 9]

Mediante las ecuaciones de Maxwell podemos concluir que las ondas electromagnéticas tienen dos componentes: El campo eléctrico (E, en V/m) y el campo magnético (B, en A/m) que son perpendiculares entre sí y a la dirección de propagación de la onda [Fig.1- 10].

1.3.2 El horno de microondas

Las microondas son generadas en un magnetrón. El magnetrón es un dispositivo que tiene un cátodo, formado por un cilindro metálico en el centro, y un ánodo, formado por otro cilindro hueco, metálico, concéntrico con el anterior, con cavidades de dimensiones características de la longitud de onda que emiten.

Un campo magnético atraviesa el eje del magnetrón de tal forma que, al aplicarse una corriente eléctrica entre el cátodo y el ánodo, los electrones no viajan directamente como en un tubo al vacío (del cátodo al ánodo), sino que se mueven dentro del espacio de interacción, rebotan y, por lo tanto, se aceleran, emitiendo ondas electromagnéticas de muchas frecuencias. Por resonancia, sólo perduran las que tienen longitudes de onda comparables con las dimensiones de las cavidades, mientras que las otras desaparecen [Fig.1- 11].

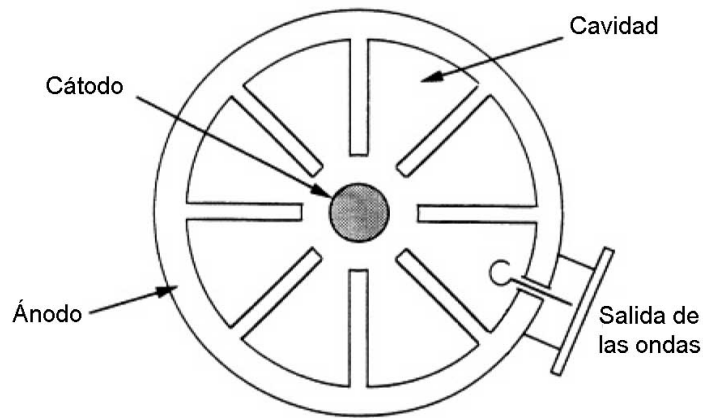


Fig. 1- 11 Esquema de un magnetrón

Las ondas generadas en el magnetrón son transmitidas por una antena al horno a través de las guías de onda (tubos huecos de material conductor). A medida que las ondas entran al horno, son dispersadas por un agitador (especie de ventilador). La eficiencia de todo este proceso para un microondas doméstico es de, aproximadamente, 60-65%. [37] [Fig.1- 12].

La potencia que recibe un horno doméstico varía entre los 600W y 800W. De ésta, un 90%, es absorbido por la carga (cuando se trata de comida) y un 10% es reflejado. Cuando la masa de la carga es menor a 500g, el porcentaje de absorción podría llegar sólo a un 40% - 50%, especialmente en los hornos pequeños [38].

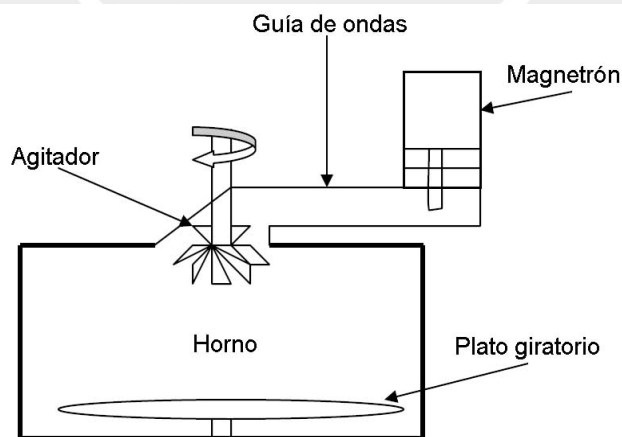


Fig. 1- 12 Esquema de un microondas doméstico

1.3.3 Polarización

El principio físico que explica el calentamiento por microondas es el de polarización. En presencia de un campo eléctrico, las cargas de un material se alinean según la

dirección del mismo. A diferencia de los conductores, en los aislantes los electrones están ligados a los átomos próximos y no pueden moverse libremente por lo que no logran alinearse en presencia de un campo eléctrico variable a una frecuencia lo suficientemente alta y la fricción entre las moléculas se disipa en forma de calor.

Los materiales aislantes también son llamados dieléctricos. Cuando las moléculas de éstos poseen momentos dipolares permanentes se dice que son moléculas polares. De acuerdo con la explicación dada en el párrafo anterior, en presencia de un campo eléctrico, los momentos dipolares¹⁰, orientados originalmente al azar, experimentan la acción de un par que tiende a alinearlos en la dirección del campo¹¹, en lo que se conoce como polarización por orientación.

Existen otros mecanismos como la polarización electrónica (desplazamiento de los electrones alrededor del núcleo), la atómica (desplazamiento de los núcleos atómicos debido a la distribución desigual de cargas en las moléculas), la iónica (desplazamiento de iones y cationes) y la conocida como polarización de Maxwell-Wagner (carga de interfaces entre componentes de un sistema heterogéneo) [39].

La medida de la facilidad con la que un material es polarizado es la permisividad (ϵ , $C^2/N.m^2$). Cuanto mayor sea ϵ , mayor será la capacidad del material para almacenar energía (carga eléctrica) debido a la presencia de un campo eléctrico.

El tipo de polarización que actúa ante la presencia de un campo variable depende de factores como la temperatura y la frecuencia. Mientras que la polarización atómica actúa en la banda infrarroja ($3 \times 10^{11} \text{Hz} - 4 \times 10^{14} \text{Hz}$), la electrónica se encuentra la banda óptica ($384 \times 10^{12} \text{Hz} - 769 \times 10^{12} \text{Hz}$) y las dos son prácticamente independientes de la temperatura.

1.3.4 Propiedades dieléctricas

Para comprender el calentamiento por microondas debe tenerse en cuenta que no toda la energía absorbida se convierte en calor. Conviene, entonces, definir la constante dieléctrica compleja –o permisividad compleja- (ϵ en $C^2/N.m^2$) mediante la siguiente expresión:

$$\epsilon^* = \epsilon' - j\epsilon'' \quad (1.1)$$

¹⁰ Un sistema de dos cargas iguales y opuestas, separadas por una pequeña distancia, se llama dipolo eléctrico. Su característica fundamental es el momento dipolar eléctrico o vector que apunta a la carga positiva y cuya magnitud es igual al producto de la carga por la separación.

¹¹ En el caso en que las moléculas del dieléctrico no sean polares poseerán momentos dipolares inducidos en presencia de un campo eléctrico.

Donde:

ϵ^* : Constante dieléctrica compleja.

ϵ' : Permisividad.

ϵ'' : Factor de pérdida.

La relación entre la permisividad y el factor de pérdida se conoce como tangente de pérdida:

$$\tan(\delta) = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad (1.2)$$

Podemos decir que ϵ'' es una medida de la tendencia que tiene el material de disipar la energía eléctrica en calor.

De todos los mecanismos de pérdida, el que se da en la polarización por orientación en los dipolos es el más importante en el calentamiento por microondas. Estas pérdidas son descritas teóricamente por las ecuaciones de Debye y en ellas se observa que dependen de la frecuencia. A bajas frecuencias, los dipolos tienen tiempo suficiente como para seguir las variaciones del campo magnético, la permisividad tiene su valor máximo y toda la energía es almacenada en el material. A medida que la frecuencia aumenta, los dipolos no son capaces de seguir los cambios del campo magnético, contribuyen menos a la polarización y el valor de ϵ'' se incrementa [Fig.1-13]. Además de la frecuencia, tanto ϵ' como ϵ'' son dependientes de la temperatura y del contenido de humedad.

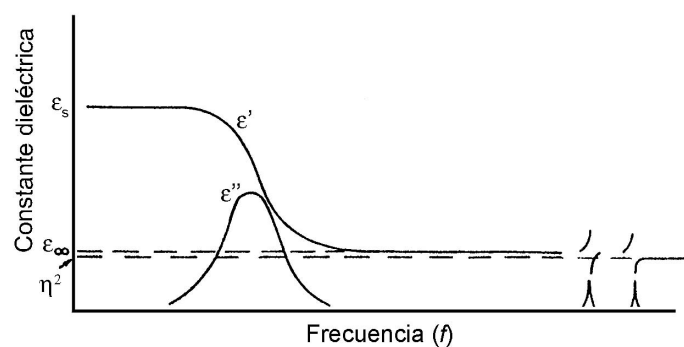


Fig. 1- 13 Dependencia entre las constantes dieléctricas y la frecuencia

1.3.5 Contenido de humedad y temperatura

El agua es un líquido polar, es decir, fácilmente absorbe la energía de las microondas y la convierte en calor. Sin embargo, las propiedades dieléctricas del agua pura y del agua en contacto con otro material –agua absorbida– son diferentes. Basta con mencionar que la frecuencia a la cual el agua pura alcanza su máximo factor de pérdida es de 18GHz, a diferencia del agua absorbida que la alcanza a frecuencias mucho más bajas [40].

El agua absorbida puede encontrarse como agua libre, enlazada sólo con otras moléculas de agua, y como agua ligada que es la que interactúa con otras moléculas presentes. Mientras más agua libre haya, mayor será el factor de pérdida del material [41, 42]. Para la mayoría de materiales existe un contenido de humedad crítico en el cual ϵ'' aumenta de valor drásticamente. Para materiales higroscópicos como el almidón, este punto crítico se da entre el 10% y 40% [43].

Por otro lado, estudios en diversos hidrocoloides, entre ellos almidón de papa y maíz, muestran que la constante dieléctrica y el factor de carga varían cuadráticamente con respecto a la temperatura [Fig.1- 14].

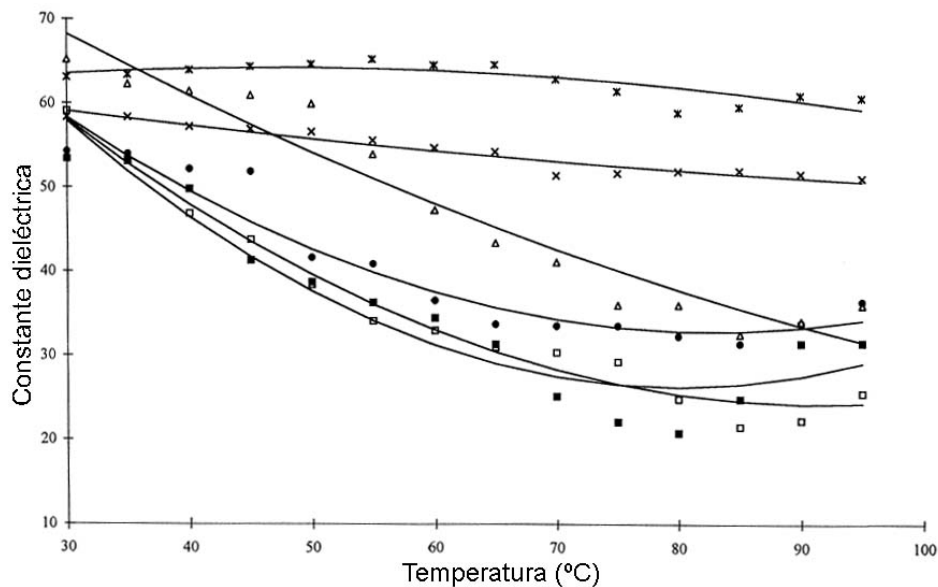


Fig. 1- 14 Dependencia de la constante dieléctrica con la temperatura para mezclas de almidón-agua en una concentración de 1:2 de almidón de: (■) maíz, (□) amilo-maíz, (Δ) trigo, (●) tapioca y (X) arroz [44]

1.3.6 Calentamiento volumétrico

En los procesos convencionales de calentamiento el calor se difunde de la superficie del material hacia el interior, en cambio, en el calentamiento volumétrico, los

materiales pueden absorber energía de microondas directamente y convertirla en calor en el interior.

La expresión que cuantifica el calor absorbido debido a la energía de microondas se obtiene de la formulación de la ecuación de la onda utilizando las leyes de Maxwell.

Para una onda electromagnética que se propaga en la dirección z, tenemos:

$$\frac{\partial^2 E}{\partial z^2} = \epsilon_0 \epsilon^* \mu_0 \mu^* \frac{\partial^2 E}{\partial t^2} \quad (1.3)$$

Y

$$\frac{\partial^2 H}{\partial z^2} = \epsilon_0 \epsilon^* \mu_0 \mu^* \frac{\partial^2 H}{\partial t^2} \quad (1.4)$$

Donde:

E: Campo eléctrico.

H: Campo magnético.

ϵ^* : Constante dieléctrica compleja (permisividad compleja).

ϵ_0 : Permisividad en el vacío.

μ^* : Permeabilidad compleja.

μ_0 : Permeabilidad en el vacío.

Para una onda plana que viaja en la dirección z se obtiene la expresión¹²:

$$E = E_{m\acute{a}x} e^{j\omega t - \gamma z} \quad (1.5)$$

Donde definimos:

$$\gamma = \alpha + j\beta \quad \text{Constante de propagación.}$$

$$\alpha = \omega \left(\frac{\mu_0 \mu' \epsilon' \epsilon_0}{2} \right)^{1/2} \left[\left(1 + \left(\frac{\epsilon''}{\epsilon'} \right)^2 \right)^{1/2} - 1 \right]^{1/2} \quad \text{Factor de atenuación}^{13}, \text{ Np/m.}$$

$$\beta = \omega \left(\frac{\mu_0 \mu' \epsilon' \epsilon_0}{2} \right)^{1/2} \left[\left(1 + \left(\frac{\epsilon''}{\epsilon'} \right)^2 \right)^{1/2} + 1 \right]^{1/2} \quad \text{Factor de fase, rad/m.}$$

¹² No consideraremos los efectos magnéticos porque el comportamiento de los materiales dieléctricos no lo requiere ya que prácticamente todo el calor producido por las microondas proviene de la polarización debida al campo eléctrico.

¹³ Nepers, adimensional. 1Np = 8,69dB.

Todas estas constantes dependen de las propiedades dieléctricas ya definidas:

- ϵ^* : Constante dieléctrica compleja (permisividad compleja).
- ϵ_0 : Permisividad en el vacío.
- ϵ' : Permisividad.
- ϵ'' : Factor de pérdida.
- μ^* : Permeabilidad compleja.
- μ_0 : Permeabilidad en el vacío.
- μ' : Permeabilidad.
- ω : Frecuencia natural.
- t : Tiempo.

Para un material dieléctrico $(\epsilon''/\epsilon') \ll 1$ y el factor de atenuación se reduce a:

$$\alpha = \frac{\omega}{2} \left(\frac{\mu_0 \mu' \epsilon_0}{\epsilon'} \right)^{1/2} \epsilon'' \tag{1.6}$$

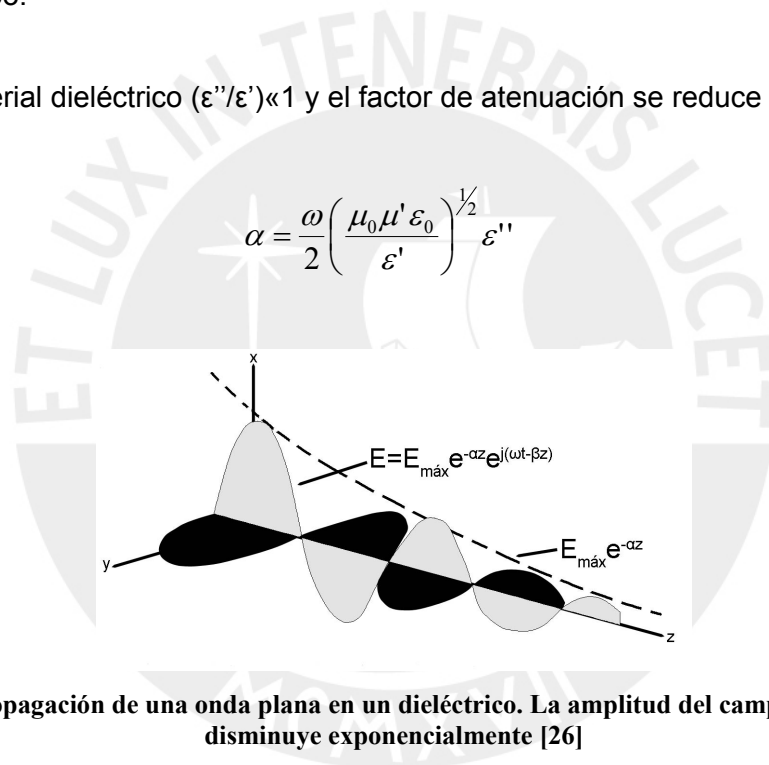


Fig. 1- 15 Propagación de una onda plana en un dieléctrico. La amplitud del campo eléctrico (E) disminuye exponencialmente [26]

Podemos ver en la Fig.1- 15 que la propagación de las microondas en un dieléctrico tiene la característica de disminuir su amplitud exponencialmente. Lo que sucede es que a medida que las ondas viajan por el material, parte de su energía se transforma en calor y, en consecuencia, la amplitud decrece [45]. El parámetro que describe este efecto se llama profundidad de penetración (D_p) y se define como la distancia que una onda electromagnética debe penetrar en un medio para reducir su potencia a 0.368 (e^{-1}) de su valor original:

$$D_p = \frac{1}{2\alpha} \tag{1.7}$$

Para conocer la potencia disipada podemos integrar el vector de Poynting (S en W/m^2):

$$\vec{S} = \vec{E} \times \vec{H} \quad (1.8)$$

De donde la potencia promedio de la onda (P_{prom}) es:

$$P_{prom} = \frac{1}{2} \omega \epsilon_0 \epsilon'' \int_V (E^* \cdot E) dV \quad (1.9)$$

Si consideramos el campo eléctrico como constante ($E^* \cdot E = E^2$) y sustituimos los valores de $\epsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12} C^2/N.m^2$ y $\omega = 2\pi f$ (con $f^{14} = 2450 MHz$), la potencia por unidad de volumen (W/m^3) queda descrita por:

$$\begin{aligned} P &= 0.556 \times 10^{-10} f \cdot \epsilon'' \cdot E^2 \\ P &= 0.136 \cdot \epsilon'' \cdot E^2 \end{aligned} \quad (1.10)$$

Para presentar una ecuación de transferencia de calor, juntamos los efectos de conducción y de la energía de microondas:

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla \cdot (k \nabla T) + P \quad (1.11)$$

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \nabla \cdot \left(\frac{k}{\rho C_p} \nabla T \right) + \frac{0.556 \times 10^{-10}}{\rho C_p} f \epsilon'' E^2 \quad (1.12)$$

Donde:

- ρ : Densidad.
- C_p : Calor específico.
- T : Temperatura.
- k : Conductividad térmica.

Observamos que es simplemente la ley de Fourier a la que se ha añadido el término que representa el calor debido a las microondas.

Con las condiciones de borde adecuadas se puede resolver esta ecuación diferencial para obtener un perfil de temperaturas en el que veríamos una de las más importantes

¹⁴ 2450MHz es el valor de la frecuencia de los microondas comerciales usados en el Perú.

características del calentamiento por microondas que es la distribución inversa de la temperatura, lo cual quiere decir que la máxima temperatura siempre está al interior del material y no en la superficie.

Otra característica resaltante es que el calentamiento no es uniforme debido a que la distribución del campo magnético E tampoco lo es, a la interacción entre las ondas y los materiales (paredes del horno, fenómenos de reflexión, etc.) y a la pérdida de calor en la superficie exterior del material.

Debido a lo expuesto en el párrafo anterior, es posible que se presente la formación de puntos calientes ya que si la rapidez a la cual se difunde el calor (conducción) es muy pequeña con respecto a la absorción de calor debido a las microondas, la temperatura de ciertos puntos crecerá rápidamente, esto haría que las propiedades en dicho punto varíen, haciendo que aumente aún más la temperatura.

Referencias

- [1]. Langer, R.; Vacanti, J.P.; Tissue Engineering; *Science* **1993**, 260, pp 920
- [2]. Skalak, R.; Fox, C.F.; (Eds) *Tissue Engineering*; Liss, New York, 1998
- [3]. Hutmacher, D.W.; Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **2000**, 21, pp 2529
- [4]. Jones, J.R.; Hench, L.L.; Biomedical materials for new millennium: perspective on the future; *Mater Sci Tech* **2001**, 17, pp 891
- [5]. Boyan, B.D.; Hummert, T.W.; Schwartz, Z.; Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response; *Biomaterials* **1996**, 17, pp 137
- [6]. Kim, H.; Smith, J.; Valenti, R.; Bone morphogenetic protein 2-coated porous poly-L-lactic acid scaffolds: release kinetics and introduction of pluripotent C₃H₁₀T1/2 cells; *Tissue Eng* **1998**, 4, pp 35
- [7]. Whang, K.; Healy, K.E.; Elenz, D.R.; Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture; *Tissue Eng* **1999**, 5, pp 35
- [8]. Lu, L.; Mikos, A.; The importance of new processing techniques in tissue engineering; *MRS Bulletin* **1996**, 21, pp 28
- [9]. Gomes, E.; Reis, R.; Tissue engineering: Key elements and some trends; *Macromolecular Bioscience* **2004**, 4, pp 737
- [10]. Reis, R.L.; Polymers in Tissue engineering: Basic principles and characterization requirements, ANTEC 2002
- Plastics Virtual Gold, Soc. Plastics Eng., San Francisco, USA, May, (2002)
- [11]. Ostertag, C.F.; *World production and marketing of starch*. Mimeo. CIAT, Colombia, 1993.
- [12]. Swinkels, J.J.M.; Sources of starch, its chemistry and physics. En: Starch Conversion Technology. van Beynum, G.M.A. and Roels, J.A. (Eds.) Marcel Dekker. Inc., New York, 1985,15
- [13]. Cooke, D.; Gidley, M.J.; Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate Res* **1992**, 227, pp 103
- [14]. BeMiller J.N., Whistler R.L. 1996. Carbohydrates. En: Fennema OR, (Ed.) Food Chemistry. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc. P191-195.
- [15]. Donald, A.M.; Physics of Foodstuffs; *Rep Prog Phys* **1994**, 57, pp 1081
- [16]. Dengage, H. N. Swelling, pasting and gelling of wheat starch. En Advances in Cereal Science and Technology; Pomeranz, Y. (Ed.); American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN, 1984; Vol. VI; pp 49-82.
- [17]. Deffenbaugh, L.B.; Walker, C.E.; Comparison of starch pasting properties in the Brabender Viscoamylograph and the Rapid Visco-Analyzer; *Cereal Chem* **1989**, 66, pp 493
- [18]. Collado, L.S.; Mabesa, R.C.; Corke, H.; Genetic Variation in the Physical Properties of Sweet Potato Starch; *J Agric Food Chem* **1999**, 47, pp 4195

- [19]. Gudmundsson, M.; Eliasson, A.C.; Retrogradation of amylopectin and the effects of amylose and added surfactants/emulsifiers; *Carboh Polym* **1990**, 13, pp 295
- [20]. Shi, Y.C.; Seib, P.A.; The structure of four waxy starches related to gelatinization and retrogradation; *Carboh Res* **1992**, 227, pp 131
- [21]. Gudmundsson, M.; Retrogradation of starch and the role of its components, *Thermochem Acta* **1994**, 246, pp 329
- [22]. Jacobson, M.R.; Obanni, M.; Bemiller, J.N.; Retrogradation of starches from different botanical sources, *Carbohydrates* **1997**, 74, pp 511
- [23]. van Soest, J.J.G.; Borger, D.B.; Structure and properties of compression-molded thermoplastic starch materials from normal and high-amylose maize starches; *J Appl Polym Sci* **1997**, 64, pp 631
- [24]. Stepto, R.F.T.; The processing of starch as a thermoplastic; *Macromol. Symp* **2003**, 201, pp 203
- [25]. Torres, F.G.; Boccaccini, A.R.; Troncoso, O.P.; Microwave Processing of Starch- and Protein-based Porous Structures for Tissue Engineering Scaffolds; *J Appl Polym Sci*, In press
- [26]. Griffin, G.J.L.; U.S. patent No. 4.021.388.
- [27]. Shogren, R.L.; Preparation, thermal properties, and extrusion of high-amylose starch acetates; *Carbohydrate Polymers* **1996**, 29, pp 57
- [28]. Della Valle, G.; Bouche, Y.; Colonna, P.; Vergnes, B.; The extrusion behaviour of potato starch; *Carbohydrate Polymers* **1995**, 28, pp 255
- [29]. Shogren, R.L.; Lawton, J.W.; Doane, W.M.; Tiefenbacher, K.F.; Structure and morphology of baked starch foams; *Polymer* **1998**, 39, pp 6649
- [30]. Glenn, G.M.; Orts, W.J.; Properties of starch-based foam formed by compression /explosion processin; *Ind Crops and Products* **2001**, 13, pp 135
- [31]. Glenn, G.M.; Irving, D.W.; Starch-Based Microcellular Foams; *Cereal Chemistry* **1995**, 72, pp 155
- [32]. Altieri, P.A.; Lacourse, N.L.; Starch-based protective loose-fill material. Proceedings of the third corn utilization conference; National Corn Growers Association St. Louis, MO, 1990; pp 159
- [33]. Wang, W.; Flores, R.A.; Huang, C.T.; Physical properties of two biological cushioning materials from wheat and corn starches. *Cereal Chem* **1995**, 72, pp 38
- [34]. Bhatnagar, S.; Hanna, M. A.; Effect of talc on properties of cornstarch extrudates; *Starch* **1996**, 48, pp 94
- [35]. Chinnaswamy, R.; Hanna, M. A. Biodegradable polymers. U.S. Patent No. 5,496,895
- [36]. Microwave processing of materials, Committee on Microwave Processing of Materials: An Emerging Industrial Technology, Commission on Engineering and Technical Systems, National Research Council, 1994
- [37]. Saltiel, C; Datta, A.K.; Heat and mass transfer in microwave processing; *Advances in heat transfer* **1999**, 33, pp 1
- [38]. Risman, P.O.; Hur fungerar mikrovägsugnen? *Vär Föda* **1989**, 41, pp 172
- [39]. R.C. Metazas, R.J. Meredith; Industrial microwave heating; Peter Peregrinus Ltd.; London, 1988
- [40]. Hasted, J. B.; Aqueous dielectric; Champan and Hall, London, 1973
- [41]. Calay, R.K.; Newborough, M.; Probert, D.; Calay, P.S.; Predictive equations for the dielectric properties of foods; *Int J Food Sci Technol* **1995**, 29, pp 699
- [42]. Ryyänen, S.; The electromagnetic properties of food materials: a review of the basic principles; *J Food Eng* **1995**, 26, pp 409
- [43]. Stuchly, S.S.; Dielectric properties of some granular solids containing water; *J Microwave power* **1973**, 8, pp 3
- [44]. Ndife, M.K.; Sumnu, G.; Bayindirli, L.; Dielectric properties of six different species of starch at 2450MHz, *Food Res Int* **1998**, 31, pp 43
- [45]. Clark, D.E.; Sutton, W.H.; Lewis, D.A.; Microwave processing of materials; In *Microwaves: Theory and Application in Materials Processing IV*, Ceramic Transactions, volumen 80, 1997. pp 61—98
- [46]. Gómez, C.; Torres, F.G.; Nakamatsu, J.; Arroyo, O.H.; Thermal and structural analysis of Natural Fibre Reinforced Starch - Based Biocomposites, *Int J Polym Mat* **2006**, 55, pp 893

CAPÍTULO 2

PROCESAMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS POROSAS

En la presente tesis el método que se usó para procesar las estructuras porosas de almidón fue el de calentamiento por microondas en el que se aprovecha la rápida ebullición del líquido que sirve como un agente generador de poros (porógeno) cuando el vapor es evacuado.

En este capítulo se describe la técnica utilizada para producir las estructuras porosas así como los parámetros más importantes del proceso. Además, se da un breve acercamiento teórico al crecimiento de poros en polímeros relacionándolo con nuestro caso particular. El comportamiento de nuestras estructuras con respecto a su formación es evaluado mediante un ensayo descrito en el punto 2.6 de este capítulo. Finalmente, se propone un modelo que explica cómo se forman las estructuras porosas utilizadas para el presente estudio.

2.1 Objetivo

El objetivo de esta técnica de procesamiento es la formación de estructuras porosas biodegradables de manera rápida y económica. Se propone un nuevo proceso de manufactura para la formación de armazones diferente a los que actualmente son utilizados y que han sido objetos ya de abundantes estudios como: la mezcla de fibras, la disolución de partículas, laminado de membranas, separación de fases, etc [1-3].

2.2 Materiales

El material elegido fue almidón comercial NEGRITA¹ de tres tipos: papa, maíz y camote. Esta es una elección que responde a las exigencias del producto que se desea fabricar ya que debe asegurarse su biodegradabilidad y bioabsorción. Como se usan materiales completamente biodegradables se está cumpliendo con uno de los requisitos más estrictos de los armazones.

Entre los materiales sintéticos usados en la Ingeniería de Tejidos para fabricar armazones tenemos: Poli(hidroxibutirato) [4, 5], Poli(ϵ -caprolactona) [6-11], Poli(anhídridos) [12, 13], Poli(fosfazona) [14-16], etc. También se han usado

¹ Marca comercial del Perú.

materiales de origen natural como: Colágeno [17-20], Fibrina [21-23], Quitosano [24-28], almidón [21, 29], etc.

Conociendo la capacidad del almidón de formar estructuras porosas [30-34] ha sido elegido por sobre otros materiales usados en medicina como el PLLA², PLGA³, PGA⁴, etc. por su bajo costo y su capacidad para desarrollar estructuras con mejores propiedades mecánicas.

Como plastificante y agentes porógenos se usaron agua destilada y glicerina. Ambos son materiales que ya han sido usados y que cumplen los requisitos de biodegradabilidad y bioabsorción [34, 35].

2.3 Equipo

Microondas comercial marca MYRAY con un magnetrón de 800W de potencia y una frecuencia de 2450MHz.

Vaso plástico con un diámetro de 35mm usado como molde para el microondas.

2.4 Procedimiento

Dos formas de procesamiento (rutas) fueron las que se siguieron para fabricar los armazones.

Ruta 1

Se mezclaron diferentes porcentajes de almidón (de papa, de maíz y de camote) con el agente porógeno. Como resultado se obtuvo almidón en suspensión que debía ser calentado en el microondas inmediatamente después de ser mezclado para evitar que todos los granos de almidón caigan al fondo del vaso debido a que el almidón no es soluble en agua.

La suspensión de almidón fue calentada por microondas a máxima potencia por un tiempo que se determinó en un proceso de prueba y error. El molde usado para el microondas (vaso de 35mm) fue colocado siempre en la misma posición, al centro del microondas para minimizar al máximo el problema de la distribución desigual de temperaturas. Véase el esquema del proceso en la Fig.2- 1

² Ácido poli-L-láctico.

³ Ácido poli(láctico-co-glicólico).

⁴ Ácido poli-glicólico.

Esta ruta no ofreció buenos resultados porque el armazón adquiriría una forma muy irregular con agujeros similares a grandes rechupes en una pieza de fundición. Véase la Fig 2- 2.

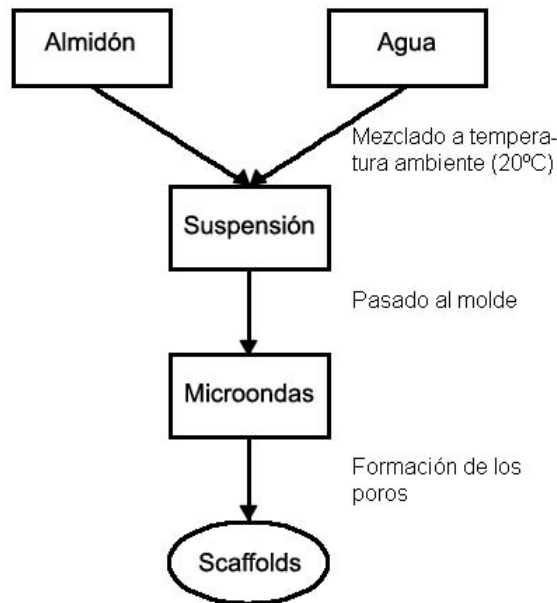


Fig. 2- 1 Ruta 1 de procesamiento

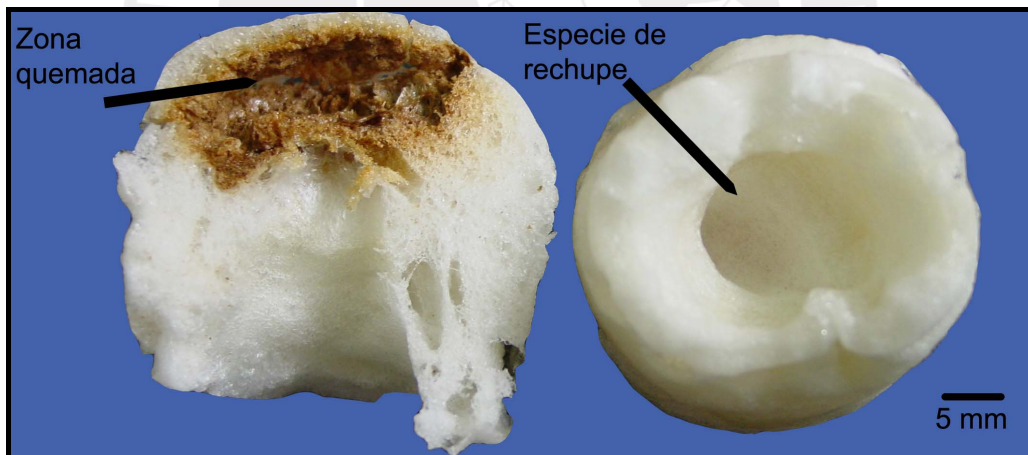


Fig. 2- 2 Armazón procesado mediante la ruta 1. La forma irregular y las partes quemadas son visibles.

Ruta 2

Se mezclaron diferentes porcentajes de almidón con el agente porógeno pero previamente al calentamiento por microondas la suspensión fue puesta en un baño maría donde alcanzó una temperatura de alrededor de 70°C para así permitir que la suspensión se gelatinizara y se volviera una mezcla homogénea [36, 37] hasta que adquiera la textura de una pasta.

Esta pasta se deja enfriar lentamente hasta que alcance la temperatura ambiente por espacio de dos horas.

Como en el caso de la ruta 1, la mezcla almidón fue calentada por microondas a máxima potencia por un tiempo determinado.

La Figura 2- 3 presenta un esquema del proceso descrito.

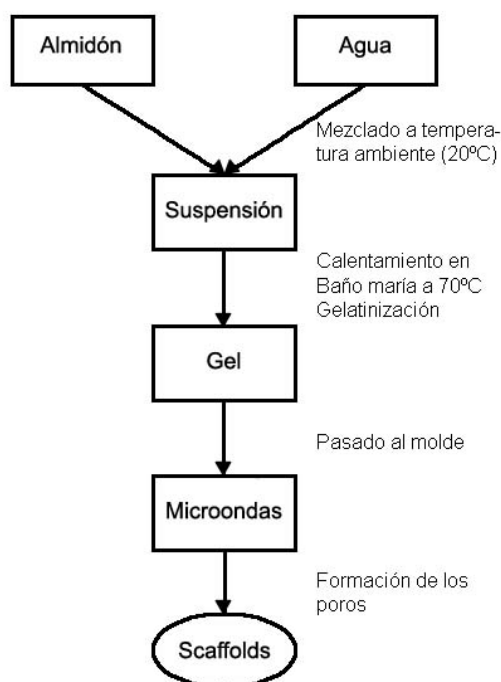


Fig. 2- 3 Ruta de procesamiento 2.

2.4.1 Determinación de los parámetros del procedimiento

Los parámetros a tomar en cuenta en este proceso son: (i) El tipo de agente porógeno, (ii) El porcentaje de almidón en la muestra, (iii) La potencia de trabajo del microondas y (iv) El tiempo de calentamiento.

Tipo de agente porógeno

Se consideraron dos agentes porógenos: Glicerina y agua destilada.

Se consideró la posibilidad de usar glicerina por ser completamente biodegradable y porque se ha usado antes para la fabricación de biopolímeros como los que están hechos a base de almidón [34, 35].

En las pruebas realizadas, se observó que la glicerina, en vez de entrar en ebullición para que el vapor se libere y forme una estructura porosa, hacía que la mezcla almidón-glicerina se degradara térmicamente haciendo que el sistema

parezca un fluido muy viscoso de color marrón oscuro que se quema sin pasar por la etapa de la formación de una estructura porosa.

El agua destilada, en cambio, sí dio buenos resultados y formó estructuras porosas por lo que se decidió usarla como único agente porógeno.

Porcentaje de almidón en la muestra

El porcentaje de almidón debía ser el que permitiera hacer una mezcla con una consistencia acuosa, porque si se calienta una mezcla con muy poco contenido de agua no llega a gelatinizarse ni, finalmente, a formar una estructura porosa. Si la mezcla tiene demasiado contenido de agua, se alcanza la gelatinización pero después es demasiado difícil evacuar todo el contenido de agua, lo que no favorece la formación de poros. Los porcentajes de almidón se tomaron entre 50% y 30%.

Potencia de trabajo del microondas

El microondas usado en este estudio ofrece cinco niveles de potencia expresados como porcentaje de la potencia máxima. Se pensó que sería conveniente investigar la influencia de la potencia del microondas en la formación de poros pero no fue posible.

Revisando los manuales de los fabricantes de microondas se comprobó que el magnetrón entrega sólo un nivel de potencia. Cuando se escoge otro nivel de potencia, lo que hace el microondas es programar un ciclo de encendidos y apagados para que así se tenga una potencia menor a la máxima. Es decir, que lo que se controla en realidad es el tiempo efectivo de exposición a las microondas y no la potencia entregada por el magnetrón. Por lo que se decidió usar solamente el nivel máximo de potencia.

Tiempo de calentamiento

El tiempo de calentamiento que se dio fue el máximo posible para tratar de que toda el agua se evaporara y formara poros antes de comenzar el proceso de degradación térmica. Se eligieron los tiempos máximos por un procedimiento de prueba y error. Éstos dependen del tipo y el porcentaje de almidón usado.

En las pruebas se pudo comprobar que el calentamiento no produce un perfil uniforme de temperatura porque la muestra comienza a quemarse en puntos diferentes, no adyacentes el uno del otro.

Además se intentó producir los armazones deteniendo el sistema de plato giratorio del microondas pero los resultados fueron peores. Así que las muestras no tenían un calentamiento muy homogéneo y el plato giratorio ayudaba a que este efecto fuera el mínimo posible.

2.4.2 Parámetros elegidos

En la Tabla 2-1 se muestran los parámetros que se eligieron para fabricar los armazones mediante la ruta 2 y en la Tabla 2-2 se muestra una lista de los tipos de armazones fabricados (9 tipos en total) según el tipo de almidón y el porcentaje en el que se usó.

En la Fig.2- 4 se muestran las estructuras producidas.

Tabla 2- 1 Parámetros escogidos para la producción de armazones

	50% ^a			40%			30%		
	Potencia	Masa ^b	Tiempo	Potencia	Masa	Tiempo	Potencia	Masa	Tiempo
Papa	Alta	15	2'30''	Alta	12	2'30''	Alta	9	3'15''
Maíz	Alta	20	2'10''	Alta	16	3'40''	Alta	12	4'30''
Camote	Alta	20	2'40''	Alta	16	4'	Alta	12	4'40''

^a Porcentaje en peso de almidón en la muestra.

^b Masa de almidón en gramos.

Tabla 2- 2 Tipos de armazones producidos

Tipo de Almidón	Porcentaje de Almidón	Código
Papa	50%	PA50
	40%	PA40
	30%	PA30
Maíz	50%	MA50
	40%	MA40
	30%	MA30
Camote	50%	CA50
	40%	CA40
	30%	CA30



Fig. 2- 4 Armazones producidos mediante la Ruta 2.

2.5 Formación de poros

La formación de poros en compuestos de almidón ha sido estudiada para diferentes casos aunque no hay muchos trabajos al respecto en el calentamiento por microondas. Algunos modelos cualitativos, sin embargo, pueden ser encontrados. Por otro lado, diversas investigaciones se han hecho en torno al caso de la formación de poros en la extrusión de polímeros basados en almidón [38-45, 47-49]. Algunas de las conclusiones a las que dichos estudios han llegado podrán ser de utilidad en esta tesis.

De los factores que influyen en la formación y el crecimiento de los poros, el primero es la estructura misma de los granos de almidón. Como se vio en el capítulo 1 de esta tesis, el almidón está formado por amilosa y amilopectina, cadenas de polímeros que tienen propiedades diferentes; entre ellas su estructura (ramificada o lineal), grado de polimerización, cristalinidad, etc. Con respecto a su influencia en la formación de poros, los datos experimentales nos sugieren que a mayores porcentajes de amilopectina las estructuras resultantes son más elásticas y homogéneas, lográndose una mayor expansión [38, 39]. Por el contrario, a mayor cantidad de amilosa, se obtiene una estructura más dura y menos expandida.

La manera cómo se encuentran la amilosa y la amilopectina en los granos de almidón es importante para explicar el proceso de formación de poros. Según diversas

investigaciones los granos de almidón tienen al centro un poro de alrededor de $0,5\mu\text{m}$ que es llamado hilum [40, 41]. Algunos investigadores [42-44] consideran que este hilum es el núcleo alrededor del cual se forman las burbujas de vapor al iniciar el proceso de formación de poros.

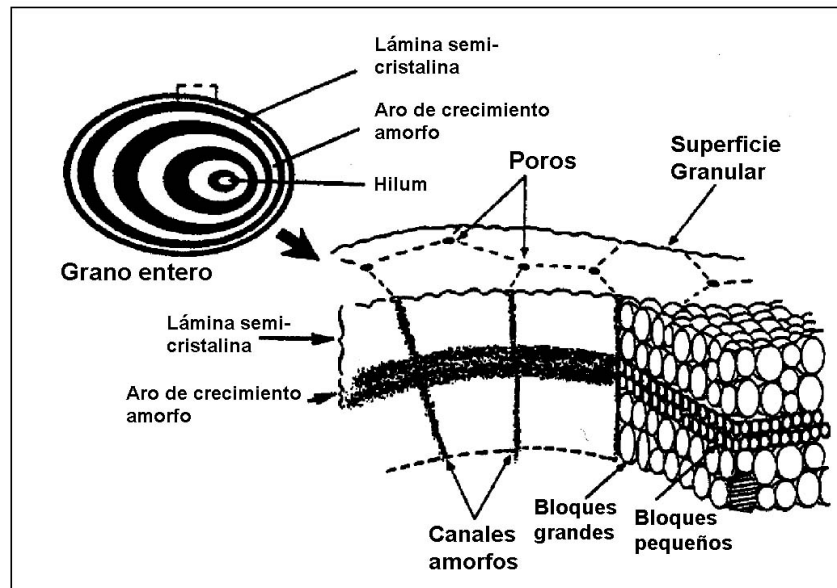


Fig. 2- 5 Corte transversal de un grano de almidón. Se aprecian los aros de crecimiento correspondientes a casquetes que tienen como centro el hilum [41]

Rodeando el hilum se encuentran unas paredes ovoides de unos 120 a 140nm de espesor que, a su vez, están formadas por láminas cristalinas y amorfas de unos 10nm de espesor que se alternan en forma de anillos ovoides [Fig.2- 5].

Aparte de la estructura del grano, el otro factor que influye en la formación y el crecimiento de los poros es la reología del material por lo que parámetros como el porcentaje de humedad y la temperatura se hacen importantes para comprender el proceso. Las observaciones experimentales han concluido que al tener una mayor temperatura de procesamiento, la viscosidad disminuye y la expansión es facilitada. Inclusive, para el proceso de extrusión, se ha encontrado una temperatura a la cual la expansión se hace máxima [45].

En el trabajo de Kokini [45] se definen varias etapas para la formación de estructuras porosas de almidón. Se entiende que primero hay una etapa de nucleación de burbujas (que pueden contener vapor o gas al interior) y otra etapa posterior de crecimiento de las burbujas.

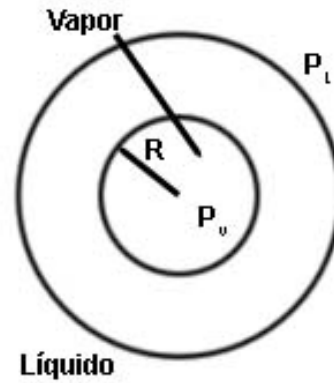


Fig. 2- 6 Representación de una burbuja en crecimiento

Para comprender los factores que controlan el proceso se ha tomado el concepto de expansión de burbuja de Amon y Denson originalmente desarrollado para la expansión de burbujas de jabón [46] [Fig.2- 6]. El equilibrio de fuerzas en una burbuja de vapor en un medio líquido se expresa mediante la ecuación de Laplace:

$$\Delta P = P_v - P_L - 2\sigma \left(\frac{1}{R} \right) \quad \dots (2.1)$$

Donde:

- ΔP : Diferencia de presiones.
- P_v : Presión de la fase gaseosa.
- P_L : Presión de la fase líquida.
- σ : Tensión superficial de la fase líquido-vapor.
- R : Radio de la esfera.

Esta ecuación es de ayuda para comprender el fenómeno del crecimiento de las burbujas pero no incluye ningún efecto de la presión atmosférica ni de los esfuerzos elástico y plástico del material. Una aproximación que incluye estos efectos ha sido propuesta por Schwartzberg et al [44] mediante la siguiente expresión:

$$\Delta P = P_v - P_L - P_{atm} - P_e - P_y - 2\sigma \left(\frac{1}{R} \right) \quad \dots (2.2)$$

Donde:

- P_{atm} : Presión atmosférica.
- P_e : Presión debida al esfuerzo elástico.
- P_y : Presión debida al esfuerzo plástico.

Se asume que el compuesto almidón-agua se comporta como un fluido pseudoplástico con una ley de potencia expresada por:

$$\eta = K(\dot{\gamma})^{n-1} \quad \dots (2.3)$$

Donde:

η : Viscosidad efectiva.

K, n: Constantes.

$\dot{\gamma}$: Razón de deformación tangencial.

De las ecuaciones anteriores notamos que el crecimiento de las burbujas depende de una diferencia de fuerzas que se traduce en una diferencia de presiones. La presión interna –de la fase gaseosa- tiene que vencer los efectos de las otras presiones para que así comience a crecer la burbuja. A medida que la burbuja se expande, el vapor de agua se difunde de la pared interna a la superficie exterior. La producción de vapor permite que se mantenga la presión P_{vap} y provee el vapor que llena los poros en expansión.

Varios trabajos han presentado métodos para modelar el crecimiento de la burbuja [44, 47-49]. Ellos evalúan todas las presiones de las ecuaciones (1) y (2) como polinomios de la temperatura y del porcentaje de humedad. Finalmente, encuentran una ecuación que describe el crecimiento de la burbuja:

$$\dot{R} = R \left[\frac{\Delta P}{4(2\sqrt{3})^{n-1} \left[\int_R^{R'} \frac{\partial K}{\partial r} \left(\frac{R}{r} \right)^{3n} dr + K_{bs} - K_{ds} (R/R')^{3n} \right]} n \right]^{1/n} \quad \dots (2.4)$$

Donde:

\dot{R} : Razón del crecimiento del radio de la burbuja.

R: Radio interior de la burbuja.

R': Radio exterior de la burbuja.

K_{bs} : Valor de K de la ley de potencia al interior de la burbuja.

K_{ds} : Valor de K de la ley de potencia al exterior de la burbuja.

2.6 Análisis cualitativo del crecimiento de poros en armazones procesados por microondas

Para comprender el proceso de formación de poros en los armazones procesados por microondas del presente estudio, se diseñó un experimento que ofrece resultados que relacionan el radio promedio de los poros, la temperatura y el porcentaje de humedad.

2.6.1 Procedimiento

Se prepararon muestras de almidón de papa al 50% como se ha descrito en el punto 2.4 del presente capítulo hasta la parte de formar la pasta homogénea. Las muestras gelatinizadas fueron pesadas y luego calentadas en el microondas durante diferentes intervalos de tiempos. Tres muestras a 15 segundos, otras a 30, 45, 60, hasta 2'30". Inmediatamente después de sacarlas del microondas, se midió la temperatura de la superficie de las muestras con ayuda de un termómetro infrarrojo Lutron TM-2000 y, finalmente, fueron pesadas.

Hay que tomar en cuenta que, debido a que el procedimiento exige la gelatinización de las muestras, no es posible que todas ellas tengan exactamente el mismo peso al entrar al microondas. Lo que sucede es que una vez que la suspensión de almidón-agua se vuelve una pasta espesa (gelatinizada) dentro del recipiente de mezclado, tiene que ser llevada a otro recipiente (molde para microondas) y se pierde materia en el proceso.

Los pesos tomados antes del calentamiento y después de éste sirvieron para estimar el contenido de agua que permanece en las muestras después del calentamiento (X_f). En efecto, si se considera que no hay pérdidas de almidón, el porcentaje en peso de agua que permanece en la muestra al 50% de almidón después del calentamiento, se halla mediante la siguiente expresión:

$$X_f(\%) = \frac{w_{final} - 0.5w_{mezcla}}{w_{final}} \quad \dots (2.5)$$

Donde:

- X_f : Porcentaje de agua después del calentamiento.
 W_{final} : Masa de la muestra después del calentamiento.
 W_{mezcla} : Masa inicial de la mezcla agua-almidón.

Al terminar el proceso, las muestras fueron observadas en el microscopio estereoscópico BRUNEL ZMZ para hallar el tamaño promedio de los poros, mediante un análisis de imágenes. La definición del parámetro que cuantifica el tamaño promedio de los poros está dada en el capítulo 3.

2.6.2 Resultados y análisis

Porcentaje de humedad

El porcentaje de agua que permanece después del calentamiento está graficado en la Fig.2- 7. En el punto inicial, el porcentaje de agua que contiene la muestra es el de la preparación (50%) pero a medida que pasa el tiempo, como era previsible, este porcentaje cae continuamente. Un ajuste de los datos nos muestra que la relación entre el tiempo y el porcentaje de agua es lineal con una pendiente de $-0,0026s^{-1}$. Es decir que cada 3.8s se pierde 1% de agua de la muestra de manera constante hasta llegar a los 150s. De esa forma la expresión del porcentaje de agua que queda en la muestra con respecto al tiempo es:

$$X_f(t) = -0,0026t + 0.5 \quad (2.6)$$

Las masas de las muestras a la entrada del microondas varían entre los 20-25g (no son iguales debido a las pérdidas al momento de pasar el gel al molde) y el promedio es $23.81g \pm 3.94\%$. Sin embargo, si tomamos la ecuación (2.5) y el arreglo lineal de la Fig.2- 7, podemos hallar una expresión para la variación del peso con respecto al tiempo:

$$w(t) = \frac{w_0}{1 + 0,0052 \cdot t} \quad \dots(2.7)$$

Donde w_0 es la masa inicial de la muestra. Para graficar la dependencia de la masa con respecto al tiempo hemos tomado el valor promedio $w_0 = 23,81g$.

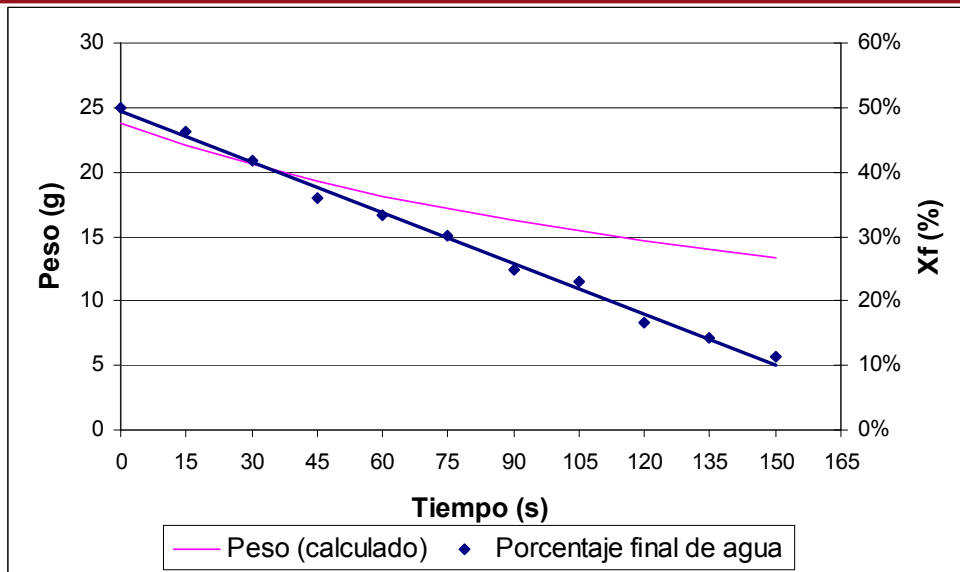


Fig. 2- 7 Variación del contenido de agua y del peso con respecto al tiempo de procesamiento

Según la ecuación (2.6), el tiempo en el cual el porcentaje de agua en la muestra se hace cero es 192,31 s. Sin embargo, la muestra sólo se ha calentado hasta un tiempo máximo de 150 s. debido a que a tiempos superiores no sólo se evapora el agua sino que comienza a degradarse térmicamente la estructura porosa (armazón).

Tamaño promedio de poros y temperatura superficial

Para observar la tendencia del crecimiento de los poros y la evolución de la temperatura con respecto al tiempo se han graficado esos datos en la Fig.2- 8.

Debe tenerse en cuenta que la medida tomada de la temperatura es la de la superficie externa de la muestra, la cual difiere de la temperatura interna de la misma. En realidad, la temperatura tiene valores diferentes en cada punto de la muestra porque depende de la ecuación de onda del campo eléctrico E (véase el capítulo 1, ecuación 1.12). De todas formas, la evolución de la temperatura externa nos da una idea del comportamiento de la muestra.

En la Fig.2- 8 se observa que en los primeros segundos del calentamiento, la muestra sufre un gran incremento de temperatura, pasando de la temperatura ambiente (20°C) a 80°C con una velocidad de calentamiento promedio de 4°C/s . Luego la temperatura sigue creciendo pero de una manera más pausada, con una tasa de calentamiento promedio de $0,22^{\circ}\text{C/s}$, hasta los 105 segundos. Finalmente, el calentamiento vuelve a ser más acelerado (pero no como durante los primeros segundos) y llega a tener una velocidad promedio de $0,33^{\circ}\text{C/s}$.

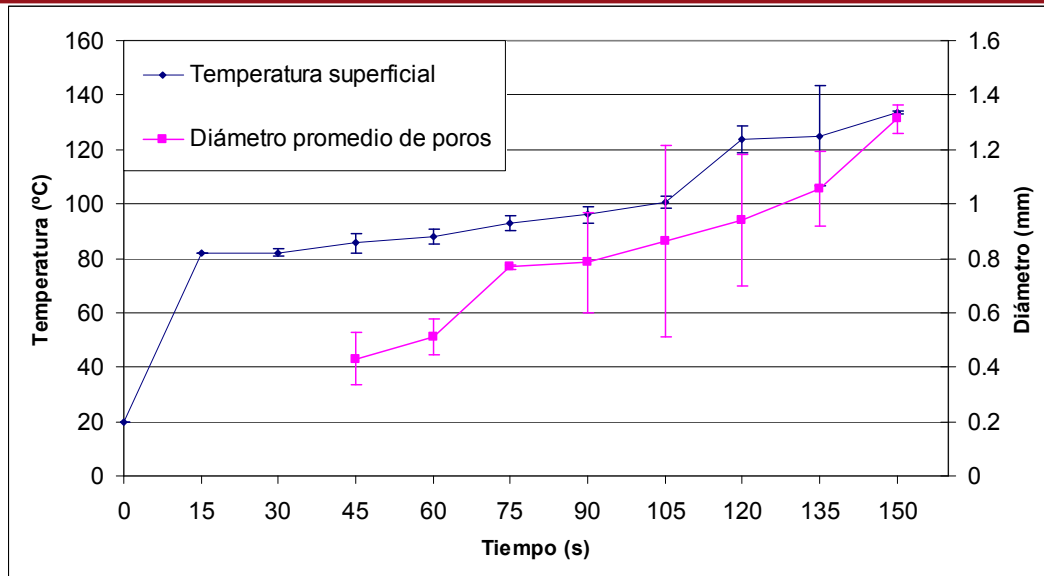


Fig. 2- 8 Variación de la temperatura superficial y del diámetro de los poros según el tiempo

Es de esperarse que la evolución de la temperatura no tenga un comportamiento estable durante todo el tiempo de calentamiento. En efecto, el calor absorbido por la muestra depende de las constantes dieléctricas de la misma (principalmente el factor de pérdida ϵ'' , véase el capítulo 1, sección 1.3.5).

En este caso, el factor de pérdida total de la muestra combinará los efectos de las características dieléctricas del agua y del almidón. Sabemos que el agua es el elemento de la muestra que contribuye más al calentamiento (su ϵ'' es más alto), por eso en los primeros segundos, cuando su contribución es más importante, la velocidad de calentamiento es mayor. Es decir que el sistema almidón-agua cuando está en forma de gel tiene una capacidad mayor de absorber la energía de las microondas ya que hay muchas moléculas libres de agua entre las cadenas de amilopectina. Cuando el sistema deja de ser gel y adquiere una consistencia sólida su capacidad de absorber las microondas se ve disminuida.

El incremento en la temperatura de la muestra se ve acompañado de un aumento en el tamaño de los poros de la misma. En la Fig.2- 8 se ve graficado el tamaño promedio de los poros con respecto al tiempo. Como era de esperarse el tamaño promedio de los poros crece al pasar el tiempo, es decir al aumentar la temperatura, a razón de un promedio de $7,5 \mu\text{m/s}$.

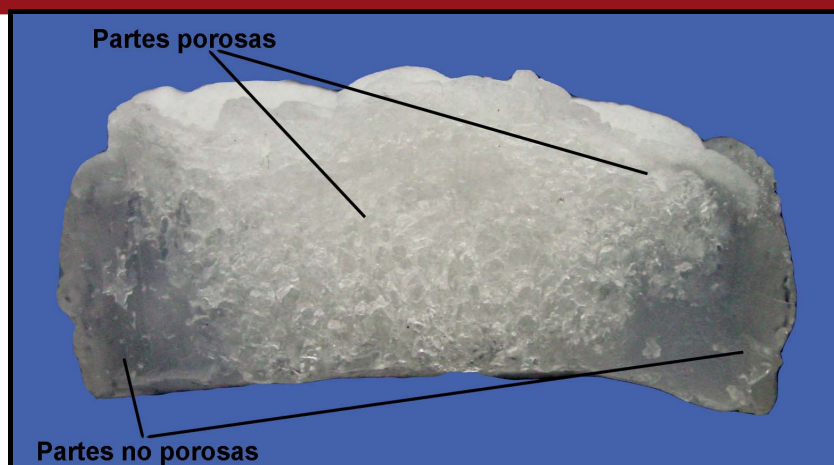


Fig. 2-9 Armazón procesado solamente durante 45 s.

A diferencia de la evolución de la temperatura, el crecimiento de los poros parece ser más uniforme y no se ve afectado por súbitos cambios, al menos desde los 45 segundos. El comportamiento anterior a los 45 segundos no fue analizado porque las estructuras obtenidas aún no presentaban una porosidad apreciable bajo el microscopio estereoscópico usado.

Como ya hemos visto en la sección anterior, la formación y crecimiento de los poros es un proceso térmicamente activado, por lo que el aumento de la temperatura genera el crecimiento de los poros.

El ensayo realizado en este capítulo también nos muestra que el crecimiento de los poros comienza en la parte interna de la muestra, desde el centro y luego los poros llegan a formarse en los extremos (véase la Fig.2- 9). En consecuencia, el tamaño de los poros no será uniforme debido a que los que se forman en el centro tienen más tiempo para crecer que los que se forman en la periferia.

En la Figura 2- 10 podemos observar el crecimiento de los poros en una manera secuencial. Se nota que durante los primeros 30 segundos no se puede hablar de una estructura porosa. A partir de los 45 segundos vemos cómo se transforma el gel de almidón en una estructura porosa y cómo al pasar el tiempo los poros crecen de manera continua.

2.6.3 Modelo cualitativo del crecimiento de los poros

Todo el proceso de manufactura de los poros tiene tres etapas marcadamente diferenciadas:

- Preparación de la suspensión agua-almidón.
- Gelatinización.

- Calentamiento por microondas.

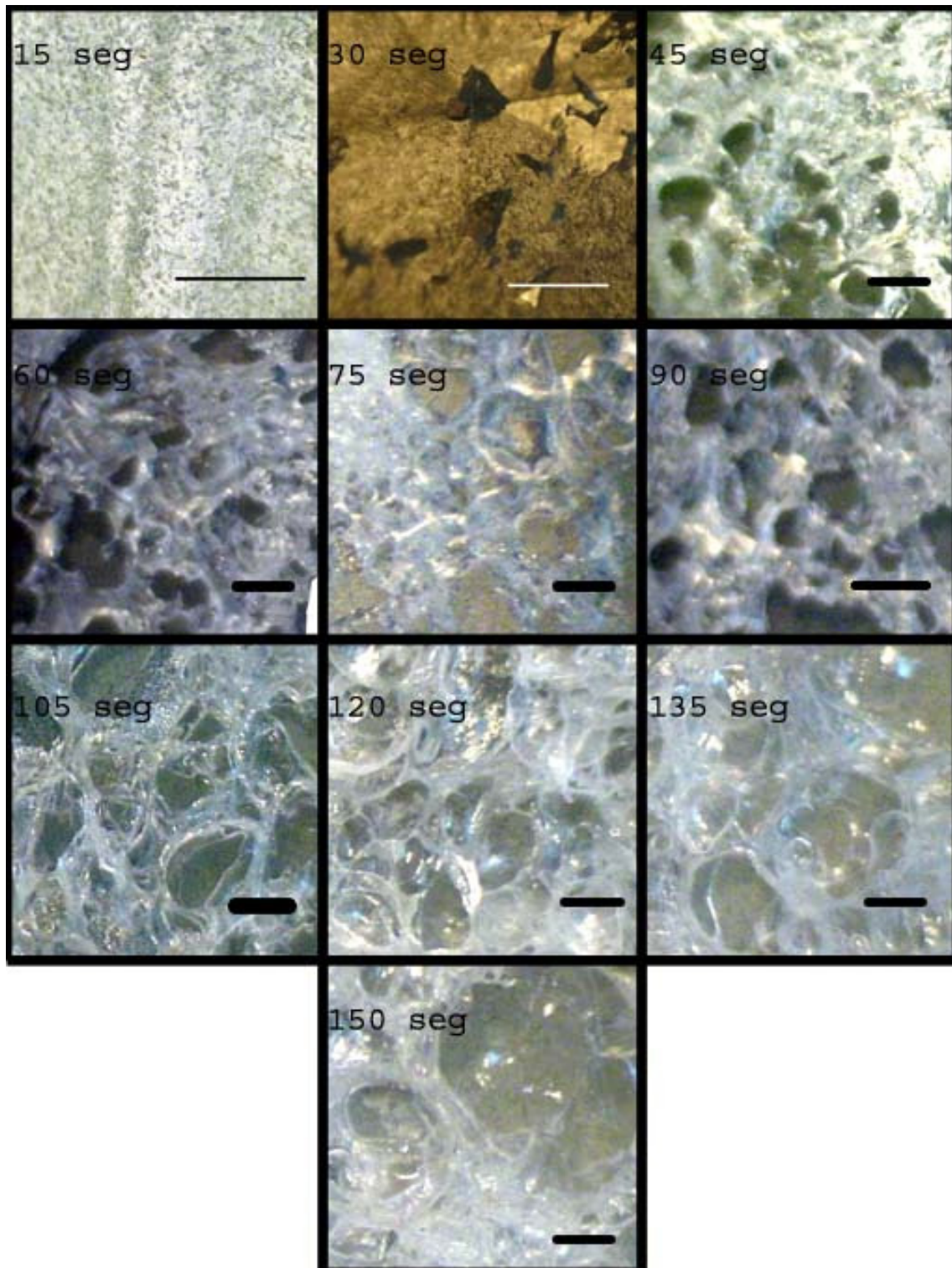


Fig. 2- 10 Fotografías del procesamiento de los armazones a distintos tiempos (las barras representan 1mm)

Preparación de la suspensión almidón agua

En la primera etapa simplemente se mezcla mecánicamente el almidón con el agua en las proporciones deseadas. Ningún cambio a nivel de la estructura de los componentes se produce. El almidón no es soluble en agua y, por lo tanto, no se obtiene una solución homogénea. En esta etapa no hay ninguna contribución a la formación de los poros.

Gelatinización

En esta etapa la suspensión es calentada lentamente hasta unos 70°C para obtener un sistema agua-almidón homogéneo.

Los granos de almidón se comienzan a hinchar y a liberar amilosa con lo que se aumenta la viscosidad de la mezcla hasta llegar a obtener una pasta muy espesa. Esta etapa influencia la formación de los poros porque, como ya se ha visto en la sección anterior, el crecimiento de los mismos depende fuertemente de las propiedades reológicas del material.

Calentamiento por microondas

Una vez que la muestra gelatinizada se enfría hasta la temperatura ambiente, la misma es llevada al microondas.

Pasados unos pocos segundos (menos de 15) el agua comienza a evaporarse y a formar la estructura porosa. Podemos decir que en esta etapa del procesamiento se da la nucleación y el crecimiento de los poros

Nucleación y crecimiento

De los datos recogidos en la literatura [42-44] podemos suponer que lo más probable es que en el hilum se formen las primeras burbujas de vapor que inician todo el proceso.

Al aumentar la temperatura por el calentamiento en el microondas, las propiedades reológicas cambian y la diferencia de presiones hace que comiencen a crecer los poros.

Según Gibson y Ashby [50], en un proceso de formación de poros, cuando los núcleos están distribuidos de manera aleatoria en el espacio pero crecen al mismo tiempo, la estructura que se obtiene es llamada “Espuma de Voronoi”⁵ cuya celda tiene la forma de un poliedro con su centro en el punto de nucleación.

⁵ Brevemente podemos decir que las celdas de las estructuras de Voronoi contienen los puntos que están más cercanos al centro de nucleación. Para más detalle véase el anexo 1.

Una típica estructura de Voronoi puede verse en la Fig.2- 11 donde se observa que el tamaño de los poros no es homogéneo sino que más bien hay una distribución de tamaños.

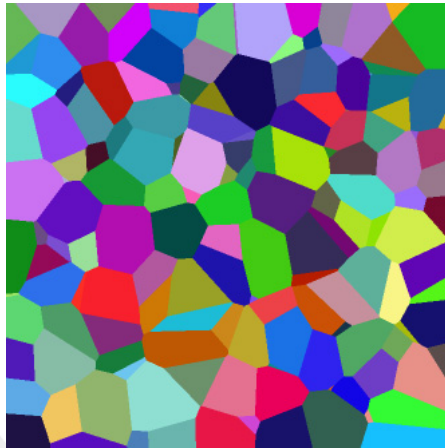


Fig. 2- 11 Modelo de Voronoi [11]

El agua, al evaporarse, se abre paso a través de toda la estructura en la que se combinan partes en la que los poros están creciendo y otras partes en la que los poros colapsan. A su vez, el proceso de difusión del vapor de agua permite que la concentración de la burbuja varíe y así comience a perder humedad.

Además, como el calentamiento es volumétrico y el perfil de temperaturas varía en diferentes puntos del sistema, propiedades como la viscosidad, tensión superficial, etc. tendrán diversos valores en los diferentes puntos de la muestra.

A medida que la muestra pierde humedad, cambia de ser una pasta espesa (15s) a ser una estructura que aumenta grandemente de volumen y, finalmente, a ser una estructura en parte porosa y en parte gel (45s) con un aumento de volumen mucho más moderado pero con un crecimiento constante en el tamaño de los poros [Fig.2- 12].

Como resultado tenemos una estructura porosa interconectada debido a que el vapor escapaba constantemente en el calentamiento y con poros de diversos tamaños a causa del continuo crecimiento y colapso de poros y por la distribución variable de la temperatura.

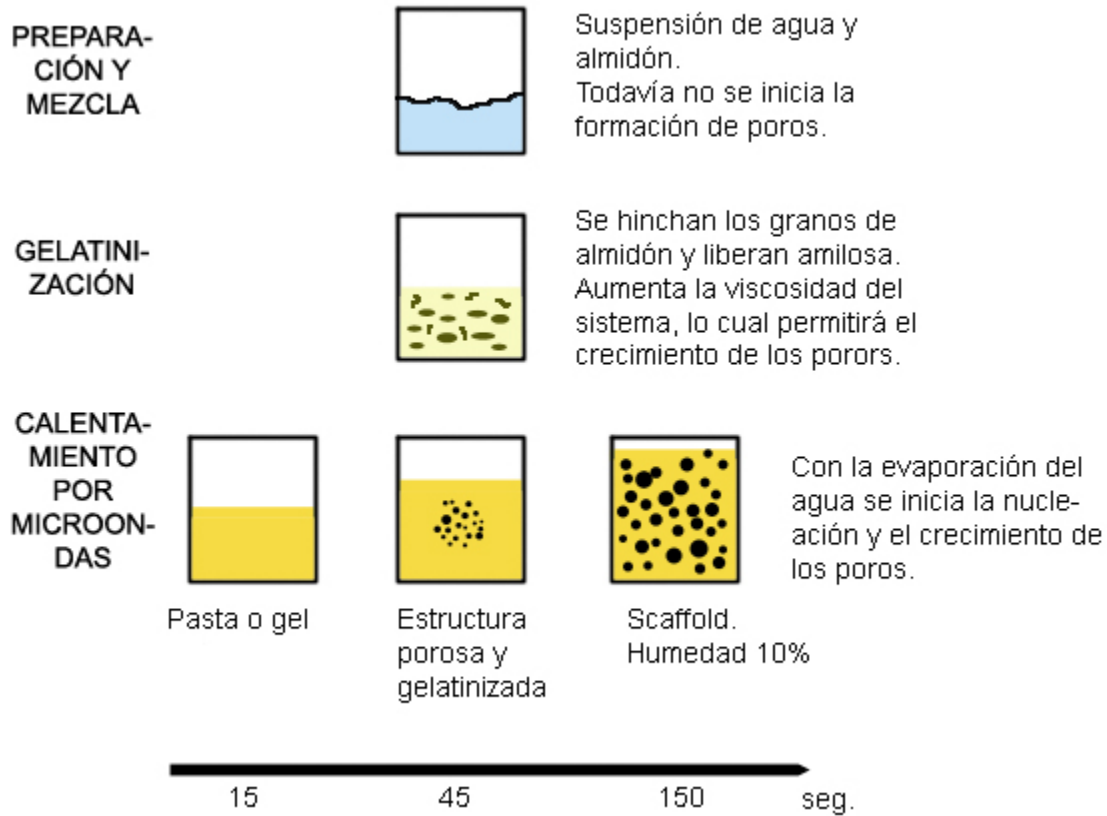


Fig. 2- 12 Modelo de la formación de armazones procesados por microondas

Referencias

- [1]. Lu, L.; Mikos, A.; The importance of new processing techniques in tissue engineering; *MRS Bulletin* **1996**, 21, pp 28
- [2]. Gomes, E.; Reis, R.; Tissue engineering: Key elements and some trends; *Macromolecular Bioscience* **2004**, 4, pp 737
- [3]. Reis, R.L.; Polymers in Tissue engineering: Basic principles and characterization requirements, ANTEC 2002, Plastics Virtual Gold, Soc. Plastics Eng., San Francisco, USA, May, (2002)
- [4]. Kostopoulos, L.; Karring, T.; Clin, T.; Augmentation of the rat mandible using guided tissue regeneration, *Oral Implants Res* **1994**, 5, pp 75
- [5]. Chen, L.J.; Wang, M.; Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer; *Biomaterials* **2002**, 23, pp 2631
- [6]. Hutmacher, D.W.; Schantz, J. T.; Zein, I.; Ng, K. W.; Teoh, S. H.; Tan, K. C.; Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modelling; *J Biomed Mater Res* **2001**, 55, pp 203
- [7]. Washburn, N.R.; Simon, C.G.; Tona, Jr.A.; Elgendy, H.M.; Karim, A.; Amis, E.J.; Co-extrusion of biocompatible polymers for scaffolds with co-continuous morphology; *J Biomed Mater Res* **2002**, 60, pp 20
- [8]. Shantz, J.T.; Hutmacher, D.W.; Ng, K.W.; Khor, H.L.; Lim, T.C.; Teoh, S.H.; Evaluation of a Tissue Engineered Membrane-Cell Construct for Guided Bone Regeneration; *Int J Oral Maxillof Implant* **2002**, 17, pp 161
- [9]. Shantz, J.T.; Hutmacher, D.W.; Chim, H.; Ng, K.W.; Lim, T.C.; Teoh, S.H.; Induction of ectopic bone formation by using human periosteal cells in combination with a novel scaffold technology; *Cell Transplant* **2002**, 11, pp 125

- [10]. Zein, I.; Hutmacher, D.W.; Tan, K.C.; Teoh, S.H.; Poly(ϵ -caprolactone) Scaffolds Designed and Fabricated by Fused Deposition Modelling; *Biomaterials* **2002**, *23*, pp 1169
- [11]. Kweon, H.; Yoo, M.K.; Park, I.K.; Lim, T.H.; Lee, H.C.; Lee, H.S.; Oh, J.S.; Akaike, T.; Chi, C.S.; A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering; *Biomaterials* **2003**, *24*, pp 801
- [12]. Ibim, S.E.; Uhrich, K.E.; Attawia, M.; Shastri, V.R.; El-Amin, S.F.; Bronson, R.; Langer, R.; Laurencin, C.T.; Preliminary in vivo report on the osteocompatibility of poly(anhydride-co-imides) evaluated in a tibial model; *J Biomed Mater Res* **1998**, *43*, pp 374
- [13]. K. E. Uhrich. S. E. Ibim, D. R. Larrier, R. Langer, C. T. Laurencin; Chemical changes during in vivo degradation of poly(anhydride-imide) matrices; *Biomaterials* **1998**, *19*, pp 2045
- [14]. Laurencin, C.T.; Norman, M.E.; Elgendy, H.M.; El-Amin, S.F.; Allcock, H.R.; Pucher, S.R.; Ambrosio, A.M.A.; Use of polyphosphazenes for skeletal tissue regeneration; *J Biomed Mater Res* **1993**, *27*, pp 963
- [15]. Ibim, S.E.; Ambrosio, A.M.A.; Kwon, M.S.; El-Amin, S.F.; Allcock, H.R.; Laurencin, C.T.; Topographical control of cells; *Biomaterials* **1997**, *18*, pp 1565
- [16]. Laurencin, C.T.; El-Amin, S.F.; Ibim, S.E.; Willoghby, D.A.; Attawia, M.; Allcock, H.R.; Ambrosio, A.M.A.; A highly porous 3-dimensional polyphosphazene polymer matrix for skeletal tissue regeneration; *J Biomed Mater Res* **1996**, *30*, pp 133
- [17]. Deporter, D.A.; Komori, N.; Howley, T.P.; Shiga, A.; Ghent, A.; Hensel, P.; Parisien, K.; Reconstituted bovine skin collagen enhances healing of bone wounds in the rat calvaria; *Calcif Tissue Int* **1988**, *42*, pp 321
- [18]. Murata, M.; Huang, B.Z.; Shibata, T.; Imai, S.; Nagai, N.; Arisue, M.; Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone; *Int J Oral Maxillofac Surg* **1999**, *28*, pp 232
- [19]. Ueda, H.; Hong, L.; Yamamoto, M.; Shigeno, K.; Inoue, M.; Toba, T.; Yoshitani, M.; Nakamura, T.; Tabata, Y.; Shimizu, Y.; Use of collagen sponge incorporating transforming growth factor- β 1 to promote bone repair in skull defects in rabbits; *Biomaterials* **2002**, *23*, pp 1003
- [20]. Sachlos, E.; Reis, N.; Ainsley, C.; Derby, B.; Czernuszka, J.T.; Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication; *Biomaterials* **2003**, *24*, pp 1487
- [21]. Salgado, A.J.; Gomes, M.E.; Chou, A.; Coutinho, O.P.; Reis, R.L.; Hutmacher, D.W.; Preliminary study on the adhesion and proliferation of human osteoblasts on starch-based scaffolds; *Mater Sci Eng C* **2002**, *20*, pp 27
- [22]. Endres, M.; Schantz, J.T.; Salgado, A.J.; Kaps, C.; Ringe, J.; Lim, T.C.; Reis, R.L.; Sittinger, M.; Hutmacher, D.W.; Osteogenic Induction of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells in Novel Synthetic Polymer-Hydrogel Matrices; *Tissue Eng* **2003**, *9*, pp 689
- [23]. Huang, Q.; Goh, J.C.; Hutmacher, D.W.; Lee, E.H.; *In Vivo* Mesenchymal Cell Recruitment by a Scaffold Loaded with Transforming Growth Factor β 1 and the Potential for *in Situ* Chondrogenesis; *Tissue Eng* **2002**, *8*, pp 469
- [24]. Zhang, M.; Haga, A.; Sekiguchi, H.; Hirano, S.; Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia; *Int J Bio Macromol* **2000**, *27*, pp 99
- [25]. Tolaimate, A.; Desbrieres, J.; Rhazi, M.; Alagui, A.; Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties; *Polymer* **2003**, *44*, pp 7939
- [26]. Zhao, F.; Yin, Y.; Lu, W.W.; Leong, J.C.; Zhang, W.; Zhang, J.; Zhang, M.; Yao, K.; Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds; *Biomaterials* **2002**, *23*, pp 3227
- [27]. Rezanian, A.; Healy, K.E.; The effect of peptide surface density on mineralization of a matrix deposited by osteogenic cells; *J Biomed Mater Res* **2000**, *52*, pp 595
- [28]. Park, Y.J.; Lee, Y.M.; Park, S.N.; Sheen, S.Y.; Chung, C.P.; Lee, S.J.; Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration; *Biomaterials* **2000**, *21*, pp 153
- [29]. Salgado, A.J.; Coutinho, O.P.; Reis, R.L.; Novel Starch-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Cytotoxicity, Cell Culture, and Protein Expression; *Tissue Eng* **2004**, *10*, pp 465

- [30]. Della Valle, G.; Bouche, Y.; Colonna, P.; Vergnes, B.; The extrusion behaviour of potato starch; *Carbohydrate Polymers* **1995**, 28, pp 255
- [31]. Shogren, R.L.; Lawton, J.W.; Doane, W.M.; Tiefenbacher, K.F.; Structure and morphology of baked starch foams; *Polymer* **1998**, 39, pp 6649
- [32]. Glenn, G.M.; Orts, W.J.; Properties of starch-based foam formed by compression /explosion processing; *Ind Crops and Products* **2001**, 13, pp 155
- [33]. Glenn, G.M.; Irving, D.W.; Starch-Based Microcellular Foams; *Cereal Chemistry* **1995**, 72, pp 255
- [34]. Torres, F.G.; Arroyo, O.H.; Grande, C.; Esparza, E.; Study of bio- and photo-degradation of Natural Fibre Reinforced Starch - Based Biocomposites, *Int J Polym Mat* **2006**, 55, pp 1115
- [35]. Gómez, C.; Torres, F.G.; Nakamatsu, J.; Arroyo, O.H.; Thermal and structural analysis of Natural Fibre Reinforced Starch - Based Biocomposites, *Int J Polym Mat* **2006**, 55, pp 893
- [36]. Donald, A.M.; Physics of Foodstuffs; *Rep Prog Phys* **1994**, 57, pp 1081
- [37]. Jenkins, P.J.; Donald, A.M.; Gelatinisation of starch: a combined SAXS/WAXS/DSC and SANS study; *Carbohydrate Res* **1998**, 308, pp 133
- [38]. Kokini, J.L.; Chang, C.N.; Lai, L.S.; The role of rheological properties on extrudate expansion; En: Kokini, J.L.; Ho, C.T.; Karwe, M.V.; Ed. Food extrusion science and technology. New York, N.Y.: Marcel Dekker Inc. p 631-53
- [39]. Della Valle, G.; Colonna, P.; Patria, A.; Vergnes, B.; Influence of amylose content on the viscous behavior of low hydrated molten starches. *J Rheology* **1996**, 40, pp 347
- [40]. Zobel, H.F.; Starch gelatinization and mechanical properties; En: Whstler, R.L.; BeMiller J.N.; Paschall, BeMiller J.N.; Paschall, E.F.; Ed. Starch: chemistry and technology. 2nd ed. Orlando, Fla.: Academic Press Inc. p 300-2
- [41]. Gallant, D.J.; Bouchet, B.; Baldwin, P.M.; Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydr Polym* **1997**, 32, pp 177
- [42]. Hosene, R.C.; The mixing phenomena; *Cereal Foods World* **1958**, 30, pp 453
- [43]. Hosene, R.C.; Mason, W.R.; Lai, C.S.; Guetzlaff, J.; Factors affecting the viscosity and structure of extrusion-cooked wheat starch; En: Kokini, J.L.; Ho, C-T.; Karwe, M.V.; Ed.; Food extrusion science and technology; New York, N.Y. Marcel Dekker 1994, Inc. p 277-305
- [44]. Schwartzberg, H.G.; Wu, J.P.; Nussinovitch, A.; Mugerwa, J.; Modelling deformation and flow during vapor-induced puffing; *J Food Eng* **1995**, 25, pp 329
- [45]. Kokini, J.L.; Chang, C.N.; Lai, L.S.; The role of rheological properties on extrudate expansion; En: Kokini, J.L.; Ho, C-T.; Karwe, M.V.; Ed.: Food extrusion science and technology. New York, N.Y.: Marcel Dekker Inc. 1992 p 631-53
- [46]. Amon, M.; Denson, C.D.; A study of the dynamics of foam growth: analysis of the growth of closely spaced spherical bubbles; *Polymer Eng Sci* **1986**, 26, pp 255
- [47]. Wang, L.; Ganjyal, G.M.; Jones, D.D.; Weller, C.L.; Hanna, M.A.; Modelling of bubble growth dynamics and nonisothermal expansion in starch-based foams during extrusion; *Adv Polym Tech* **2005**, 24, pp 29
- [48]. Alavi, S.H.; Rizvi, S.S.H.; Harriott, P.; Process dynamics of starch-based foams produced by supercritical fluid extrusion. I: model development; *Food Res Int* **2003**, 36, pp 309
- [49]. Alavi, S.H.; Rizvi, S.S.H.; Harriott, P.; Process dynamics of starch-based foams produced by supercritical fluid extrusion. II: Numerical simulation and experimental evaluation; *Food Res Int* **2003**, 36, pp 321
- [50]. Gibson, L.J.; Ashby, M.F.; Cellular solids: structure and properties; UK 1999; Cambridge University Press

CAPÍTULO 3

CARACTERIZACIÓN DE LOS ARMAZONES DE ALMIDÓN
PROCESADOS POR MICROONDAS

El desarrollo de los armazones para Ingeniería de Tejidos es una tecnología relativamente reciente por lo que no se encuentran a disposición normas específicas para la caracterización de todos los tipos de armazones y sus propiedades.

La microestructura, las características químicas, morfológicas y mecánicas juegan un papel muy importante en la Ingeniería de Tejidos porque permiten o, incluso, estimulan la adhesión, migración, crecimiento y proliferación de células [1].

En el presente capítulo presentaremos cuáles son las propiedades más importantes que deben tener los armazones para que cumplan con los requerimientos para su uso en Ingeniería de Tejidos.

Finalmente, se expondrá cuáles fueron los ensayos realizados para nuestro caso particular de estudio, su metodología y su alcance.

3.1. Propiedades que caracterizan las estructuras porosas

En general, una estructura porosa está formada por filamentos y planos sólidos que forman las aristas y las caras de las celdas que pueden estar en diferentes tipos de arreglos: bidimensionales o tridimensionales.

Un ejemplo de estructuras porosas bidimensionales que se encuentran en la naturaleza es el panel de abejas en donde de manera simple se colocan prismas hexagonales, todos orientados en la misma dirección [Fig.3- 1].

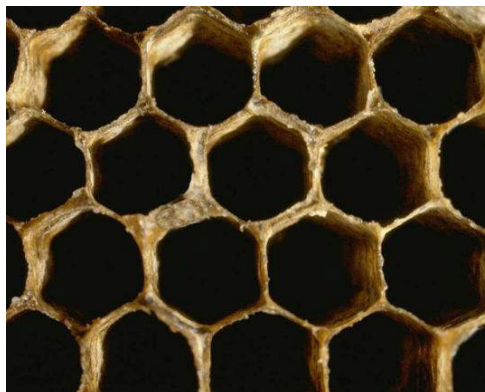


Fig. 3- 1 Un panal de abeja como ejemplo de una estructura porosa bidimensional [2]

De manera más común, se encuentran estructuras con celdas en forma de poliedros unidos en tres dimensiones. Estas estructuras son llamadas espumas (foams). Cuando el sólido que forma la espuma se encuentra sólo en las aristas de las celdas hablamos de una espuma con celdas abiertas. Si el sólido se encuentra también en las paredes, se conoce como espuma de celdas cerradas. Podemos ver la diferencia en la Fig.3- 2.

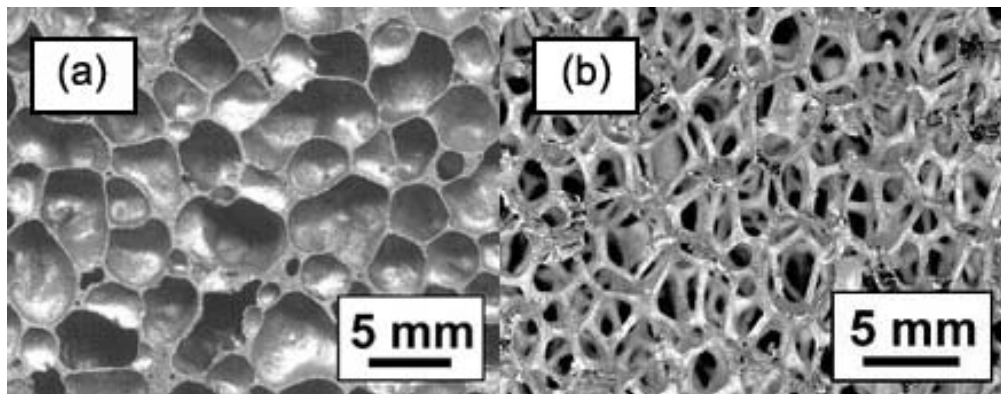


Fig. 3- 2 Espumas de (a) Celdas cerradas y (b) Celdas abiertas [2]

Una de las características más importantes de las espumas es la densidad relativa (ρ_{rel}) que se define como la densidad del material poroso (densidad aparente) entre la densidad del material sólido¹ del cual se hace la espuma. Las espumas de materiales poliméricos para diversos usos como embalaje y aislamiento tienen valores de densidad relativa que varían entre 0.05 y 0.2. A medida que la densidad relativa aumenta, las paredes de las celdas se van haciendo más gruesas y el tamaño de los poros disminuye. Más allá de una densidad relativa de 0.3, se dice que tenemos un sólido poroso más que una espuma.

Los principios básicos que explican todas las propiedades de las estructuras porosas son [3]:

- Las propiedades del sólido del cual está hecha la espuma.
- La topología y forma de las celdas.
- La densidad relativa de la espuma.

De esta forma, se afirma que la superposición de estos tres efectos antes mencionados da lugar a las propiedades de las estructuras porosas, tal como se muestra en el esquema de la Fig.3- 3.

¹ Densidad teórica cuando no hay poros del material del cual se hace la espuma.

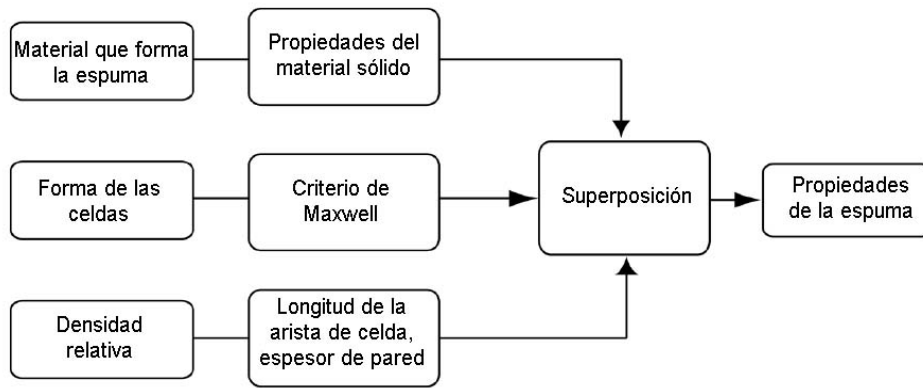


Fig. 3- 3 Esquema de superposición de las propiedades de una espuma [3]

Cuando se caracteriza una estructura porosa, estos tres grupos de parámetros deben estar presentes.

3.1.1 Propiedades del material sólido

Resulta claro que las propiedades del material del cual está hecha la espuma determinan cómo se comporta la misma, sus propiedades mecánicas, térmicas, eléctricas, etc.

3.1.2 Densidad relativa

La densidad relativa expresa cuánta masa sólida hay con respecto a la masa que el aire ocupa en la espuma. Experimentalmente se demuestra que hay una relación entre la densidad relativa de una espuma y sus propiedades mecánicas debido a que una densidad relativa más alta revela paredes más anchas que tienen mejores propiedades para dos espumas hechas por el mismo material.

3.1.3 Topología y forma de las celdas

Se puede pensar en las estructuras porosas como sólidos formados por mallas (Fig.3-4). Es decir, como armaduras pero en una escala mucho menor a las armaduras que se usan para construir estructuras. Debido a su escala tan pequeña, una celda puede ser vista como armadura (a nivel micro) y como material (a nivel macro).

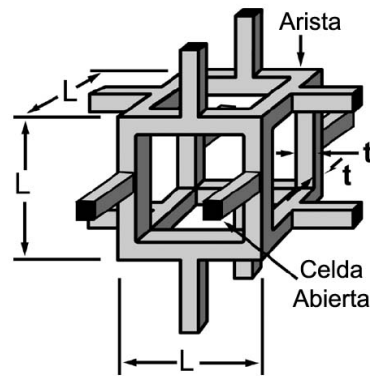


Fig. 3- 4 Esquema de una celda abierta [2]

Esta celda-armadura determina las propiedades mecánicas de la espuma. Dependiendo de cómo estén unidos los elementos que forman la celda-armadura, se obtendrán diferentes comportamientos. Es decir, si la celda es un mecanismo, si está estáticamente determinada o si es hiperestática.

El criterio de estabilidad de Maxwell [4] nos dice que para una armadura tridimensional:

$$M = b - 3j + 6 = 0 \quad \dots(3.1)$$

Donde:

- M: Rigidez.
- b: Número de elementos.
- j: Número de uniones.

Por lo tanto, como la forma de las celdas (tetraedro, prisma triangular, prisma rectangular, etc.) determina el grado de libertad de las mismas, determinará también sus propiedades mecánicas. Cuando M es negativo, la celda es un mecanismo y no tiene resistencia en la dirección en la que puede desplazarse por lo que ante una carga externa reaccionará doblándose (bending-dominated structure). En cambio, al satisfacerse el criterio de Maxwell ($M=0$), la celda es una estructura rígida que reaccionará deformándose elásticamente ante una carga externa (stretch dominated structure). La mayoría de las estructuras porosas tiene celdas cuya forma les da un grado de libertad pero ciertos arreglos (celdas en forma de tetraedros, octaedros e icosaedros) dan origen a armaduras rígidas y, por lo tanto, a espumas con mejores propiedades mecánicas.

3.2. Propiedades que caracterizan los armazones

A continuación, en la Tabla 3-1 se resumen las propiedades que caracterizan a una estructura porosa utilizada para Ingeniería de Tejidos.

Tabla 3- 1 Propiedades importantes de los armazones

Propiedad		Método	Norma ^a
Propiedad del sólido		-	-
Densidad aparente		Medición indirecta (m/V)	D1622
Morfología	Tamaño de poro	Microscopía y análisis de imágenes	-
	Porosidad	Cálculo indirecto	F2450
		Intrusión líquida	D4404, D2873.
		Porometría de gas	E128, E1294, F316.
	Permeabilidad neumática	D4001	
Tipo de celdas, forma y simetría	Microscopía y análisis de imágenes	-	
Temperatura de transición vítrea, de fusión y cristalinidad		Calorimetría de barrido diferencial (DSC)	D3417, D3418, E793, E794, E1356.
Propiedades mecánicas	Compresión	Ensayo de compresión	D695, D1621
	Tracción	Ensayo de tracción	D412, D638, D882, D1623, D1708, D3039.
	Flexión	Ensayo de flexión	D648, D671, D747, D790, D1388, D5732, D6125.
	Dureza	Ensayo de dureza	D2240.
Propiedades biológicas		Ensayo de propiedades biológicas	ISO 10993, USP-24.
Propiedades de degradación		Ensayo de propiedades de degradación	F1635, ISO 10993.

^a Las normas usadas son ASTM en caso que no se diga lo contrario.

3.2.1 Propiedades del material sólido

Las propiedades de las espumas dependen de las propiedades del material del cual están hechas. Es importante tomar en cuenta las características del material sólido como su densidad, resistencia a la tracción, elasticidad, conductividad térmica, etc.

3.2.2 Densidad de la espuma

La densidad de la espuma se define como la masa de la espuma dividida sobre su volumen. Se conoce también como densidad aparente porque lo que se mide es un promedio entre la densidad del material sólido y la densidad del aire. Para determinar la densidad aparente se usa la norma ASTM D1622 [5]

3.2.3 Microestructura

Las características microestructurales de los armazones son su porosidad, el tamaño medio del poro, la distribución de los tamaños y la interconectividad.

Tamaño medio del poro

El tamaño de los poros es una característica muy importante que debe ser evaluada para el uso del armazón. Los poros sirven como espacios por los cuales pasan el oxígeno, los nutrientes y las sustancias de desecho. Además, por los espacios dejados por los poros crecen los vasos sanguíneos necesarios para los tejidos.

Según las investigaciones, es claro que para cada tipo de tejido hay un tamaño adecuado de poro [1]. Según se trate de tejidos blandos o duros, epitelial, cardiovascular, óseo, etc. Para el caso del tejido óseo, el tamaño de los poros debe estar en el orden de 200 μ m a 400 μ m [6-8].

Las técnicas usadas para evaluar el tamaño de los poros y otras características de su morfología se refieren a los diferentes tipos de microscopía.

Microscopía electrónica

Tanto la microscopía de transmisión (TEM) como la de barrido (SEM, Fig.3-5) pueden ser usadas para tomar imágenes de secciones del armazón. Las imágenes pueden ser interpretadas usando un software de análisis de imágenes y encontrar el tamaño medio de los poros y su distribución. La microscopía SEM es la más adecuada por tener mayor profundidad de campo. Además no se necesitan altos aumentos.

Es posible que en el caso de armazones suaves o altamente hidratados haya una gran incertidumbre en los resultados debido a la deshidratación que sufren las muestras cuando son puestas en vacío. Estos problemas pueden ser superados usando la microscopía de barrido electrónico ambiental (ESEM).

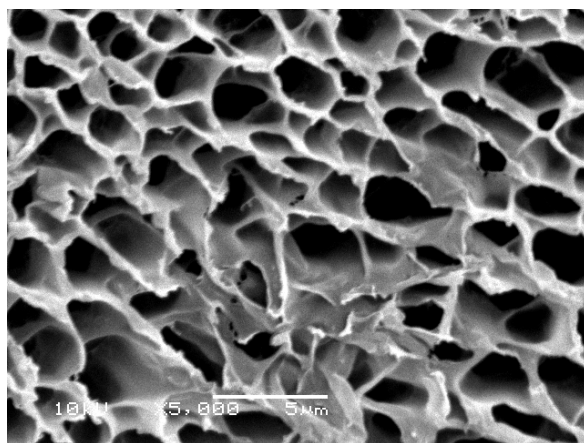


Fig. 3- 5 Fotografía SEM de un armazón de almidón de papa preparado por Separación de Fases Inducida Térmicamente (TIPS). [9]

Microscopía óptica

Se puede usar un microscopio óptico para obtener imágenes de la superficie de los armazones. Esta técnica permite estudiar las características de la superficie con un mínimo de preparación. Se simplifica aún más si la muestra es iluminada desde arriba. En el caso de muestras delgadas o de materiales que no son muy opacos, las imágenes resultantes pueden ser difíciles de interpretar debido a la falta de claridad.

Microscopía óptica confocal

La microscopía óptica confocal (OCM) puede capturar imágenes con alta resolución a diferentes profundidades debido a su profundidad de campo estrecha y la eliminación de partes borrosas fuera de foco. La microscopía confocal de barrido láser (LSCM) es muy usada en el campo de la medicina. En la literatura se encuentran ejemplos del uso de LSCM para la caracterización de armazones [10,11].

Microscopio estereoscópico

Se usa la estereomicroscopía para caracterizar propiedades a mesoescala como la morfología y dimensiones de los poros cuando ofrece una magnificación y profundidad de campo suficientes [12, 13].

Tomografía de coherencia óptica

La tomografía de coherencia óptica (OCT) usa una fuente de luz de baja coherencia con un ancho de banda entre los 30 y 200nm y un interferómetro (tipo Michelson).

La ventaja de la OCT es su alta sensibilidad (generalmente de 90dB). Esta técnica ha sido usada en la obtención de imágenes de la retina humana [14], piel y vasos sanguíneos [15]. En la ciencia de los materiales se ha usado la OCT para capturar imágenes de armazones de hidrogeles [16].

Microscopía de coherencia óptica

La microscopía de coherencia óptica es una combinación de la OCT y la OCM. Es adecuada para ser usada con materiales óptimamente opacos como los armazones de Ingeniería de Tejidos.

Microtomografía computarizada de rayos X

Esta técnica es usada para generar imágenes tridimensionales de armazones con las cuales se obtiene información sobre el tamaño y forma de poros, porosidad e interconectividad.

Se posiciona el armazón entre el emisor de rayos X y un detector. La muestra gira y se graban los datos a diferentes ángulos. Estos datos son analizados usando algoritmos para recrear una rebanada bidimensional. La imagen tridimensional completa se obtiene al analizar las rebanadas continuas bidimensionales (Fig.3- 6). La resolución típica de la imagen obtenida es de 10 μ m.

La microtomografía computarizada de rayos X se ha utilizado en estudios de investigación de la estructura de los huesos y otros materiales [18, 19], para validar el diseño de armazones para huesos [20] y para la investigación de armazones poliméricos [21, 22].



Fig. 3- 6 Microtomografía de rayos X de una espuma de aluminio [17]

Resonancia magnética

Muchos polímeros tienen núcleos que resuenan magnéticamente (por ejemplo, ^1H , ^{13}C) pero los tiempos de relajación de los núcleos en la cadena del polímero son muy cortos. Por esto, para estudiar la morfología tridimensional de los armazones poliméricos, los poros deben estar llenos con un fluido visible por resonancia magnética.

La resolución de esta técnica es cercana a las $10\mu\text{m}$ por lo que los armazones con poros mayores a $50\mu\text{m}$ son susceptibles de ser observados bajo por esta técnica

Porosidad

Ya hemos mencionado que la densidad relativa es la propiedad que define si estamos hablando de una estructura porosa o de un sólido con poros. Otra forma de definir la densidad relativa es mediante la porosidad. La porosidad representa el porcentaje del volumen ocupado por los poros con respecto al volumen total de la estructura (volumen aparente).

La naturaleza y extensión de los poros en la estructura afectarán el potencial para el crecimiento de las células y tejidos. La permeabilidad del armazón puede afectar el transporte y la distribución de células, de nutrientes y desechos. La respuesta de los tejidos como la microvascularización puede estar influenciada tanto por el tamaño de los poros como por su interconectividad.

Cálculo utilizando la densidad aparente del armazón

Se puede estimar el volumen de los poros en un armazón, usando la relación que existe entre el volumen, la densidad aparente y la densidad sólida del

material del cual está hecho el armazón. En efecto, El volumen ocupado por los poros es:

$$V_p = V_T - \frac{m}{\rho_s} \quad \dots(3.2)$$

Luego, la porosidad Φ es igual a:

$$\Phi = \frac{V_p}{V_T} = 1 - \rho_{rel} \quad \dots(3.3)$$

Donde:

V_p : Volumen ocupado por los poros.

V_T : Volumen total del armazón (Volumen aparente).

m : Masa del armazón.

ρ_s : Densidad sólida del material.

ρ_{rel} : Densidad relativa.

Φ : Porosidad.

Este método indirecto ha sido utilizado en Ingeniería de Tejidos por diversos autores [23-25].

Intrusión líquida

Se puede hallar el volumen de los poros del armazón midiendo el volumen de un fluido que no lo humedezca, generalmente mercurio (porosimetría de mercurio), y que llene el espacio que tenga contacto con una superficie expuesta. Se usan los estándares ASTM D4404 y D2873 [26, 27]. Para medir la porosidad por intrusión líquida se usa un porosímetro de mercurio pero sólo en el caso de armazones rígidos porque cuando el armazón es blando el mercurio cambia la geometría de las paredes de los poros.

Otra limitación de este método es que presenta valores de porosidad menores a los reales ya que el mercurio sólo puede llenar los poros que están conectados a la superficie expuesta.

Porometría de gas

Una presión creciente de gas es utilizada para forzar el paso de un líquido a través de los poros del armazón. El flujo de gas que pasa a través del armazón, primero seco y después húmedo, se mide como función de la

presión aplicada. La metodología se encuentra en las normas ASTM E128, E1294 y F316 [28-30].

Permeabilidad neumática

La porosidad es hallada mediante el paso de aire a través del armazón. Como referencia se usa la norma ASTM D4001 [31].

Tipo de celdas

Como ya hemos mencionado antes, las celdas (para nuestro caso los poros) pueden ser celdas cerradas (cuando no hay interconexión entre ellas) o celdas abiertas (cuando los poros están interconectados). La evaluación del tipo de celdas se hace generalmente por medio del análisis de imágenes de microscopía óptica o electrónica. Cabe mencionar que las estructuras pueden contener los dos tipos de poros.

Forma de las celdas

Las celdas pueden tener diversas formas. Los diferentes tipos de formas de poros en espumas pueden apreciarse en la Fig.3- 7. Como en el caso del tipo de celdas, la forma de las celdas se aprecia por medio de la microscopía.

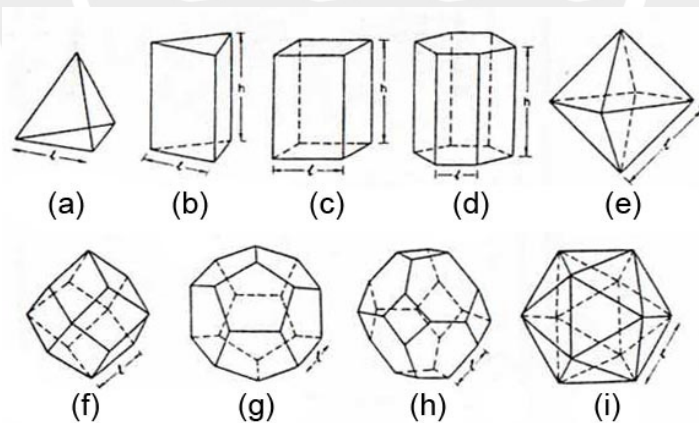


Fig. 3- 7 Diversos tipos de celdas. (a) tetraedro, (b) prisma triangular, (c) prisma rectangular, (d) prisma hexagonal, (e) octaedro, (f) dodecaedro rómbico, (g) dodecaedro pentagonal, (h) tetracaidecaedro, (i) icosaedro [2]

Simetría de la estructura

La simetría en la geometría de los poros tendrá repercusiones en las propiedades mecánicas de las espumas. Si las celdas están distribuidas al azar, esto se verá reflejado en propiedades isotrópicas de la estructura. Si las paredes de las celdas tienden a alinearse en una dirección preferencial, tienden a tener

paredes más anchas en una dirección preferencial o las celdas son alargadas con respecto a la dirección de un eje (Fig.3- 8), entonces las propiedades serán anisotrópicas.

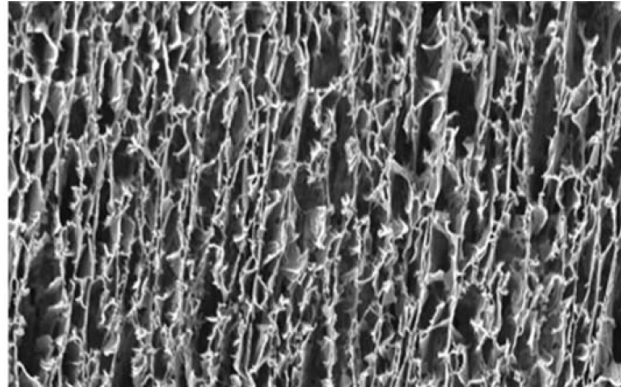


Fig. 3- 8 Armazones con poros alineados [1]

Otras propiedades microestructurales

Otras de las propiedades microestructurales que pueden ser medidas con el uso de microscopía y análisis de imágenes son:

- Distribución del tamaño de poro.
- Espesor de las paredes de los poros.
- Desviación estándar del tamaño de poros.
- Variaciones periódicas de la densidad, etc.

3.2.4 Temperatura de transición vítrea, temperatura de fusión y cristalinidad

Estas propiedades físicas pueden tener una influencia en las propiedades mecánicas de los armazones. La técnica usada para la medición es la calorimetría de barrido diferencial (DSC) con las normas ASTM D3417, D3418, E793, E794 y E1356 [32-36].

3.2.5 Propiedades mecánicas

A continuación se presenta una lista de las diferentes propiedades mecánicas y sus respectivas normas.

Propiedades de compresión

Dependiendo de las características geométricas de los armazones, sus propiedades de compresión pueden evaluarse usando los métodos descritos en ASTM D695 y D1621 [37, 38].

Propiedades de tracción

Dependiendo de las características físicas y las dimensiones del armazón se puede usar uno de los siguientes métodos: ASTM D412, D638, D882, D1623, D1708 y D3039 [39-44].

Propiedades de flexión

Los métodos de evaluación se presentan en las normas ASTM D648, D671, D747, D790, D1388, D5732 y D6125 [45-51].

Propiedades de dureza

La dureza en los armazones puede ser obtenida adaptando la norma ASTM D2240 [52].

3.2.6 Propiedades biológicas

Para muchos biomateriales la respuesta *in vivo* ha sido intensamente caracterizada por evaluaciones de uso clínico y evaluaciones en animales de laboratorio. Algunas de las normas que se pueden seguir son: ISO 10993 y USP²-24 [53-56].

Una prueba muy usada en los estudios *in vitro* de biocompatibilidad de los armazones es la descrita por Kokubo et al [57] conocida como prueba de inmersión en un fluido de simulación corporal (SBF). En este ensayo se prepara un fluido que tiene una concentración de iones inorgánicos similar a la del fluido extracelular humano con un pH ajustado al fisiológico (pH 7,25) para que en él se sumerjan los armazones a estudiar por un periodo determinado de días. Al terminar este periodo el armazón es pesado y su microestructura es observada, por ejemplo, en un microscopio de barrido electrónico (SEM) para ver si la estructura no ha tenido bioactividad o si ha formado algún compuesto como la hidroxiapatita que revela la bioactividad del armazón.

3.2.7 Propiedades de degradación

Muchas de las propiedades químicas, físicas, mecánicas y biológicas pueden cambiar a medida que se degrada el armazón tanto en cultivos *in vivo* como *in vitro*. Cuando la

² United State Pharmacopeia.

degradación de un material es principalmente hidrolítica, las condiciones fisiológicas pueden ser modeladas *in vitro* a 37°C bajo condiciones de pH controlado, según la norma ASTM F1635 [58]. Otras normas sobre la degradación de los productos son ISO 10993-9, ISO 10993-13, ISO 10993-14 e ISO 10993-15 [53-55].

3.3 Caracterización de los armazones producidos por microondas en el presente trabajo para su uso en Ingeniería de Tejidos

Presentamos a continuación las propiedades usadas para caracterizar los armazones producidos por microondas en este trabajo. Un resumen de las pruebas hechas lo encontramos en la Tabla 3-2.

Tabla 3- 2 Pruebas realizadas a los armazones procesados por microondas

Propiedad	Método	Norma
Densidad aparente	Directo (m/V)	ASTM D1622
Tamaño de poro	Microscopía óptica Análisis de imágenes	-
Porosidad	Cálculo indirecto	ASTM F2450
Porcentaje de agua después del calentamiento	Cálculo indirecto	-
Tipo de poros, forma, simetría, distribución	Microscopía óptica Análisis de imágenes	-
Presión de indentación ³	Ensayo de dureza	ASTM D2240

3.3.1 Tamaño promedio de poro y distribución del tamaño de poro

Método

Para evaluar el tamaño promedio de los poros existen varias técnicas disponibles. La mayor parte de ellas consiste en obtener una imagen de la estructura analizada y después utilizar un programa que analiza las imágenes y entrega los datos deseados.

³ Ver sección 3.3.6

En nuestro caso, se utilizó un microscopio estereoscópico BRUNEL BMZ con el que se tomaron las fotografías que después fueron analizadas.

Procedimiento

Se prepararon 3 muestras de cada tipo de armazones siguiendo el procedimiento explicado en el capítulo 2. Las concentraciones que se usaron fueron de 30%, 40% y 50% para el almidón de papa y de 40% y 50% para los almidones de maíz y de camote⁴.

Debido a que, como se vio en el capítulo 2, el crecimiento de los poros no se da de manera uniforme a lo largo del volumen de la muestra, se decidió analizar el tamaño promedio de los poros por secciones. Como los armazones obtenidos no tienen dimensiones exactamente iguales, sino que varían en un 10% aproximadamente, se definieron 3 secciones de corte: al 20% de la altura total, al 80% y al 100% como se ve en la Fig.3- 9.

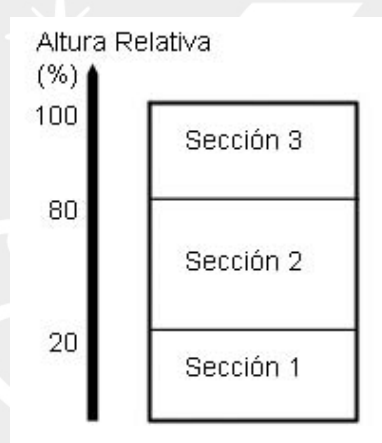


Fig. 3- 9 Secciones tomadas en los armazones producidos

Con ayuda de una hoja de afeitar, se cortaron rebanadas finas (1mm aprox.) en las 3 secciones definidas de las muestras. Estas rebanadas se observaron en el estereoscopio BRUNEL BMZ donde se tomaron las fotografías necesarias para el análisis de imágenes.

Una vez que se tienen las imágenes, se debe definir cuál es el parámetro que se utilizará para cuantificar el tamaño de los poros, ya que éstos no tienen una forma definida por lo cual son aproximados a una elipse. En la Fig.3- 10 se observan los diferentes tipos de poros que hay y su aproximación.

⁴ Sólo en caso de almidón de papa se obtuvo buenos resultados al 30%. Para los almidones de maíz y camote las estructuras hechas al 30% eran demasiado blandas.

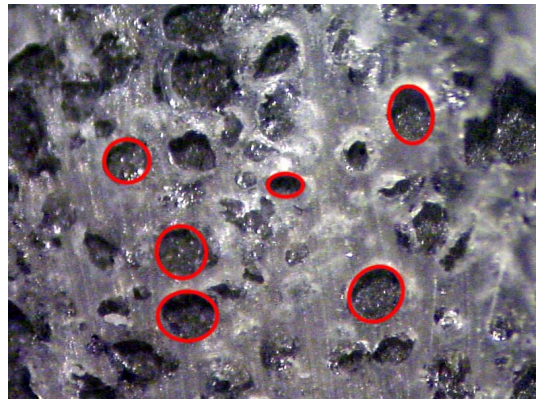


Fig. 3- 10 Poros aproximados a elipses en los armazones

Para buscar un criterio homogéneo con el fin de comparar los tamaños de poros de diferentes muestras, se define un diámetro promedio:

$$D_{prom} = \frac{a+b}{2} \quad (3.4)$$

Donde:

D_{prom} : Diámetro promedio definido.

a: Longitud del eje mayor de la elipse.

b: Longitud del eje menor de la elipse.

Otro aspecto que es importante analizar es la forma de los poros. Diferentes procesos de manufactura dan origen a diferentes tipos de poros. En la literatura se puede encontrar que por ejemplo, los poros producidos por Separación de Fases Térmicamente Inducida (TIPS) tienen forma alargada, orientados según la dirección del enfriamiento [1]. Por lo tanto, para estimar cuán regular es la forma de los poros de nuestras muestras, se define un índice de circularidad:

$$C = 4\pi \cdot \frac{A}{P^2} \quad (3.5)$$

Donde:

C: Índice de circularidad.

A: Área.

P: Perímetro.

Mientras más cercano a 1 sea el valor de C , más circular es el poro. En efecto, si reemplazamos en (5) los valores del área y el perímetro de un círculo de radio R , tendremos:

$$C = 4\pi \cdot \frac{\pi R^2}{(2\pi R)^2} = 1$$

Para el caso de una elipse, la expresión (5) toma la forma:

$$C = 4\pi \cdot \frac{\pi ab}{(2\pi \sqrt{\frac{1}{2}(a^2 + b^2)})^2} = \frac{2ab}{a^2 + b^2} \quad (3.6)$$

3.3.2 Densidad aparente

Método

La densidad aparente se evaluó de manera indirecta, calculando la masa sobre el volumen de la muestra como lo indica la norma ASTM D1622 [5].

Procedimiento

Se prepararon 3 muestras de cada tipo de armazón estudiado siguiendo el procedimiento explicado en el capítulo 2. Las concentraciones de almidón usadas fueron 30%, 40% y 50%.

Las probetas son preparadas como cubos de $5 \times 5 \times 5 \text{ mm}^3$ y luego son pesadas. La densidad aparente del armazón es calculada al dividir la masa entre el volumen.

3.3.3 Porosidad

Método

La porosidad de los armazones se halló de manera indirecta, usando la ecuación (3.2) dada en el presente capítulo. Los valores de la masa aparente (m_T) y el volumen aparente son calculados (V_T) y se obtiene la porosidad como lo indica la norma ASTM F2450 [25]. Los valores de la densidad de los almidones utilizados

(densidad del material sólido del cual se hace la estructura) han sido extraídos de la literatura y están registrados en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3 Densidad de los almidones utilizados^a

Almidón	Método	Densidad (kg/m ³)
Papa	Picnómetro	1470
Maíz	Estereopicnómetro	1450
Camote	Valor teórico	1500

^a Véase las referencias 59-61.

Procedimiento

Se prepararon 3 muestras de cada tipo de armazón estudiado siguiendo el procedimiento explicado en el capítulo 2. Las concentraciones de almidón usadas fueron 30%, 40% y 50%.

Las probetas son preparadas como cubos de 5x5x5 mm³ y luego son pesadas. La densidad aparente del armazón es calculada al dividir la masa entre el volumen.

Se divide la densidad aparente entre la densidad sólida de la Tabla 3-3 y se obtiene la densidad relativa. El valor de la porosidad es igual a uno menos la densidad relativa.

3.3.4 Porcentaje de agua después del calentamiento

Este índice nos indica cuánta agua no ha podido ser evaporada por el proceso de calentamiento por microondas.

Método

Si se considera que no hay pérdidas de almidón, el porcentaje en peso de agua que permanece en la muestra después del calentamiento, se halla mediante la siguiente expresión:

$$X_f (\%) = \frac{w_{final} - w_{mezcla} \cdot X_{alm}}{w_{final}} \dots (3.7)$$

Donde:

X_f: Porcentaje de agua después del calentamiento.

X_{alm} :	Porcentaje en peso inicial de almidón.
W_{final} :	Masa de la muestra después del calentamiento.
W_{mezcla} :	Masa inicial de la mezcla agua-almidón.

Procedimiento

Se prepararon 3 muestras de cada tipo de armazón estudiado siguiendo el procedimiento explicado en el capítulo 2. Las concentraciones de almidón usadas fueron 30%, 40% y 50%.

Antes de procesar las muestras en el microondas se pesan.

Se procesan las muestras en el microondas.

Se pesan los armazones procesados.

Finalmente, mediante la ecuación (3.7) se calcula el porcentaje de agua después del calentamiento.

3.3.5 Morfología

Método

Análisis de imágenes.

Procedimiento

Se preparan las muestras de armazones. A continuación se cortan rebanadas finas (espesor $\approx 1\text{mm}$) con una hoja de afeitar y se observa bajo el microscopio estereoscópico BRUNEL BMZ y se toman las imágenes con una cámara digital SONY DSC-S75. Finalmente, se analizan las imágenes para determinar ciertas características como:

- Los tipos de poros obtenidos: Se determina si con celdas abiertas o cerradas.
- Forma de los poros: Se determina si tienen forma alargada o irregular, o si tienen una dirección preferencial de crecimiento.
- Simetría: Se determina si hay uno o más ejes de simetría.

3.3.6 Indentación

Método

La presión de indentación de las muestras se halló utilizando la norma ASTM 2240 referida a la medición de dureza Shore de materiales termoplásticos elastómeros, vulcanizados, materiales elastoméricos, materiales celulares, etc. Los armazones pueden ser considerados como materiales celulares.

Procedimiento

Se prepararon 3 muestras de cada tipo de armazón estudiado siguiendo el procedimiento explicado en el capítulo 2. Las concentraciones de almidón usadas fueron 40% y 50%.

Se dividió el armazón en tres secciones como se ve en el acápite 3.3.1 del presente capítulo: al 20% de la altura total, al 80% y al 100% como se ve en la Fig.3- 9. Las secciones son preparadas para el ensayo, de tal manera que tengan dos caras paralelas para que se pueda hacer el ensayo.

Se usó un durómetro con un indentador de 2,38mm. La presión requerida para que el indentador penetre un milímetro fue registrada. A cada sección de cada muestra se le hizo por lo menos tres mediciones, obteniéndose un valor promedio de presión de indentación y un rango de variación de la misma.

Referencias

- [1]. Boccaccini, A. R.; Maquet, V.; Bioresorbable and bioactive polymer/Bioglass® composites with tailored pore structure for tissue engineering applications; *Comp Sci Tech* **2003**, 63, pp 2417
- [2]. Gibson, L.J.; Ashby, M.F.; Cellular solids: structure and properties; UK 1999; Cambridge University Press
- [3]. Ashby, M.F.; Cellular solids – Scaling of properties; En: Scheffler, M.; Colombo, P.; Ed.: Cellular Ceramics: Structure, Manufacturing, Properties and Applications; Weinheim, Wiley VCH 2005, pp. 2-17
- [4]. Maxwell, J.C.; On the calculation of the equilibrium and stiffness of frames; *Philos Mag* **1864**, 27, pp 294
- [5]. ASTM D1622-03 Standard Test Method for Apparent Density of Rigid Cellular Plastics
- [6]. Boyan, B.D.; Hummert, T.W.; Schwartz, Z.; Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response; *Biomaterials* **1996**, 17, pp 137
- [7]. Kim, H.; Smith, J.; Valenti, R.; Bone morphogenetic protein 2-coated porous poly-L-lactic acid scaffolds: release kinetics and introduction of pluripotent C₃H₁₀T1/2 cells; *Tissue Eng* **1998**, 4, pp 35
- [8]. Whang, K.; Healy, K.E.; Elenz, D.R.; Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture; *Tissue Eng* **1999**, 5, pp 35
- [9]. Nakamatsu, J.; Torres, F.G.; Troncoso, O.P.; Lin, Y.M.; Boccaccini, A.R.; Processing and Characterisation of Porous Structures from Chitosan and Starch for Tissue Engineering Scaffolds; *Biomacromolecules*, In press
- [10]. Tjia, J.; Moghe, P., Analysis of 3-D Microstructure of Porous Poly(lactide-glycolide) Matrices using Confocal Microscopy; *J Biomed Mat Res* **1998**, 43, pp 291

- [11]. Birla, R.; Matthew, H.W.T.; 3-Dimensional Imaging & Analysis of Smooth Muscle Colonization of Porous Chitosan Scaffolds; Proc. 1st Joint BMES/EMBS Conf., 1999, p. 119
- [12]. Torres, F.G.; Díaz, R.; Characterisation of natural fibre reinforced thermoplastics processed by extrusion, compression and rotational moulding; *Polym Polym Compos* **2004**, 12, pp 705
- [13]. Haritos, G.K.; Hager, J.W.; Amos, A.K.; Salkind, M.J.; Wang, A.S.D.; Mesomechanics: the microstructure–mechanics connection; *Int J Solids and Structures* **1988**, 24, pp 1081
- [14]. Hee, M.; Izatt, J.; Swanson, E.; Huang, D.; Schuman, J.; Lin, C.; Puliafito, C.; Fujimoto, J.G.; Optical Coherence Tomography of the Human Retina; *Arch Ophthalmol* **1995**, 113, pp 325
- [15]. Barton, J.; Milner, T.; Pfefer, T.; Nelson, J.; Welch, A.; Optical Low Coherence Reflectometry to Enhance Monte Carlo Modeling of Skin; *J Biomed Opt* **1997**, 2, pp 226
- [16]. McDonough, W.G.; Amis, E.J.; Kohn, J.; Critical Issues in the Characterization of Polymers for Medical Applications; NISTIR-6535 (NIST, Gaithersburg, MD, 2000)
- [17]. Olurin, O.B.; Arnold, M.; Körner, C.; Singer, R.F.; The investigation of morphometric parameters of aluminium foams using micro-computed tomography; *Mat Sci Eng* **2002**, A328, pp 334
- [18]. Müller, R.; Hahn, M.; Vogel, M.; Delling, G.; Rüeegsger P.; Morphometric Analysis of Noninvasively Assessed Bone Biopsies: Comparison of High-Resolution Computed Tomography and Histologic Sections; *Bone* **1996**, 18, pp 215
- [19]. Müller, R.; Matter, S.; Neuenschwander, P.; Suter, U.W.; Rüeegsger, P.; 3-D Micro-Tomographic Imaging and Quantitative Morphometry for the Nondestructive Evaluation of Porous Biomaterials; En Briber, R.M.; Pfeiffer, D.G.; Han, C.C.; Ed.; Morphological Control in Multiphase Polymer Mixtures; *Mat Res Soc* 1997, 461, pp 217
- [20]. Van Oosterwijck, H.; Duyck, J.; Vander Sloten, J.; Van Der Perre, G.; Jansen, J.; Wevers, M.; Naert, I.; The Use of Microfocus Computerized Tomography as a New Technique to Characterize Bone Tissue Around Oral Implants; *J Oral Implantology* **2000**, 26, pp 5
- [21]. Maspero, F.A.; Ruffieux, K.; Muller, B.; Wintermantel, E.; Resorbable Defect Analog PLGA Scaffolds using CO₂ as Solvent: Structural Characterization; *J Biomed Mater Res* **2002**, 62, pp 89
- [22]. Lin, A. S.; Barrows, T.H.; Cartmell, S. H.; Guldberg, R. E.; Microarchitectural and Mechanical Characterization of Oriented Porous Polymer Scaffolds; *Biomaterials* **2003**, 24, pp 481
- [23]. Malafaya, P. B.; Elvira, C.; Gallardo, A.; San Román, J.; Reis, R. L.; Porous starch-based drug delivery systems processed by a microwave route. *J Biomater Sci Polym* **2001**, 12, pp 1227
- [24]. Korhonen, O.; Pohja, S.; Peltonen, S.; Suihko, E.; Vidgren, M.; Paronen, P.; Ketolainen, J.; Effects of Physical Properties for Starch Acetate Powders on Tableting; *AAPS Pharm Sci Tech* **2002**, 3, pp 34
- [25]. ASTM F2450-04 Standard Guide for Assessing Microstructure of Polymeric Scaffolds for Use in Tissue Engineered Medical Products
- [26]. ASTM D 4404 Test Method for Determination of Pore Volume and Pore Volume Distribution of Soil and Rock by Mercury Intrusion Porosimetry
- [27]. ASTM D 2873 Test Method for Interior Porosity of Poly(Vinyl Chloride) (PVC) Resins by Mercury Intrusion Porosimetry
- [28]. ASTM E 128 Test Method for Maximum Pore Diameter and Permeability of Rigid Porous Filters for Laboratory Use
- [29]. ASTM E 1294 Test Method for Pore Size Characteristics of Membrane Filters Using Automated Liquid Porosimeter
- [30]. ASTM F 316 Test Method for Pore Size Characteristics of Membrane Filters by Bubble Point and Mean Flow Pore Test
- [31]. ASTM D 4001 Test Method for Determination of Weight-Average Molecular Weight of Polymers by Light Scattering
- [32]. ASTM D 3417 Test Method for Enthalpies of Fusion and Crystallization of Polymers by Differential Scanning Calorimetry (DSC)
- [33]. ASTM D 3418 Test Method for Transition Temperatures of Polymers by Differential Scanning Calorimetry
- [34]. ASTM E 793 Test Method for Enthalpies of Fusion and Crystallization by Differential Scanning Calorimetry
- [35]. ASTM E 794 Test Method for Melting and Crystallization Temperatures By Thermal Analysis

- [36]. ASTM E 1356 Test Method for Assignment of the Glass Transition Temperatures by Differential Scanning Calorimetry or Differential Thermal Analysis
- [37]. ASTM D 695 Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics
- [38]. ASTM D 1621 Test Method for Compressive Properties of Rigid Cellular Plastics
- [39]. ASTM D 412 Test Methods for Vulcanized Rubber and Thermoplastic Rubbers and Thermoplastic Elastomers—Tension
- [40]. ASTM D 638 Test Method for Tensile Properties of Plastics
- [41]. ASTM D 882 Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheet
- [42]. ASTM D 1623 Test Method for Tensile and Tensile Adhesion Properties of Rigid Cellular Plastics
- [43]. ASTM D 1708 Test Method for Tensile Properties of Plastics by Use of Microtensile Specimens
- [44]. ASTM D 3039/D 3039M Test Method for Tensile Properties of Polymer Matrix Composite Materials
- [45]. ASTM D 648 Test Method for Deflection Temperature of Plastics Under Flexural Load in the Edgewise Position
- [46]. ASTM D 671 Test Method for Flexural Fatigue of Plastics by Constant-Amplitude-of-Force
- [47]. ASTM D 747 Test Method for Apparent Bending Modulus of Plastics by Means of a Cantilever Beam
- [48]. ASTM D 790 Test Methods for Flexural Properties of Unreinforced and Reinforced Plastics and Electrical Insulating Materials
- [49]. ASTM D 1388 Test Method for Stiffness of Fabrics
- [50]. ASTM D 5732 Test Method for Stiffness of Nonwoven Fabrics Using the Cantilever Test
- [51]. ASTM D 6125 Test Method for Bending Resistance of Paper and Paperboard (Gurley Type Tester)
- [52]. ASTM D2240 Standard Test Method for Rubber Property—Durometer Hardness
- [53]. ISO 10993-13 Biological Evaluation of Medical Devices— Part 13: Identification and Quantification of Degradation Products from Polymers
- [54]. ISO 10993-14 Biological Evaluation of Medical Devices— Part 14: Identification and Quantification of Degradation Products from Ceramics
- [55]. ISO 10993-15 Biological Evaluation of Medical Devices— Part 15: Identification and Quantification of Degradation Products from Coated and Uncoated Metals and Alloys
- [56]. General Tests and Assays— USP24/NF19, Jan. 1, 2000
- [57]. Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T.; Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W; *J Biomed Mater Res* **1990**, 24, pp 721
- [58]. ASTM F 1634 Practice for In-Vitro Environmental Conditioning of Polymer Matrix Composite Materials and Implant Devices
- [59]. Nelson, S.O.; Lawrence, K.C.; Prakash, A.; Moisture and Temperature Dependence of the Permittivities of Some Hydrocolloids at 2.45 GHz; *J Microwave Power* **1991**, 26, pp 178
- [60]. Maroulis, Z.B.; Shah, K.; Saravacos, G.D.; Thermal Conductivity of Gelatinized Starches; *J Food Sci* **1991**, 56, pp 773
- [61]. Wang, L.J.; Ganjyal, G.M.; Jones, D.D.; Weller, C.L.; Hanna, M.A.; Modelling of bubble growth dynamics and non-isothermal expansion in starch-based foam during extrusion; *Adv Polym Tech* **2005**, 24, pp 29

CAPÍTULO 4

EVALUACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo presentamos los resultados obtenidos de las pruebas realizadas y descritas en el capítulo tres. Las pruebas realizadas caracterizan física y mecánicamente a las estructuras producidas y validan su posible utilización para ingeniería de tejidos, comparando los resultados obtenidos con los disponibles en la literatura.

La caracterización física determina propiedades a nivel microscópico como la morfología, el tamaño promedio de poro y la distribución de tamaños de poros. También determina propiedades a nivel macroscópico como la densidad, la porosidad y el contenido de agua. Con respecto a la caracterización mecánica, se realizaron pruebas de indentación, propiedad con la que se pueden estimar otras propiedades mecánicas¹.

4.1 Morfología

La Fig.4- 1 muestra cortes de armazones hechos de los tres materiales utilizados (almidón de papa, maíz y camote). Podemos apreciar que se han producido estructuras porosas con poros interconectados (celdas abiertas) para los tres materiales utilizados.

Los poros observados no tienen forma ni tamaño homogéneo ni tampoco una dirección de crecimiento específica para ninguno de los materiales. La forma de los poros de los armazones de todos los materiales es parecida y el valor del índice de circularidad (véase el capítulo tres) varía entre 0.8 y 0.9 para todos los tipos de armazones. Podemos afirmar que la principal diferencia entre los tres materiales es el tamaño de los poros. A simple vista resulta evidente que los armazones hechos con almidón de papa tienen poros mucho más grandes que los hechos con los otros dos materiales.

¹ Véase la sección 4.5.1, ecuaciones 4.1 y 4.2

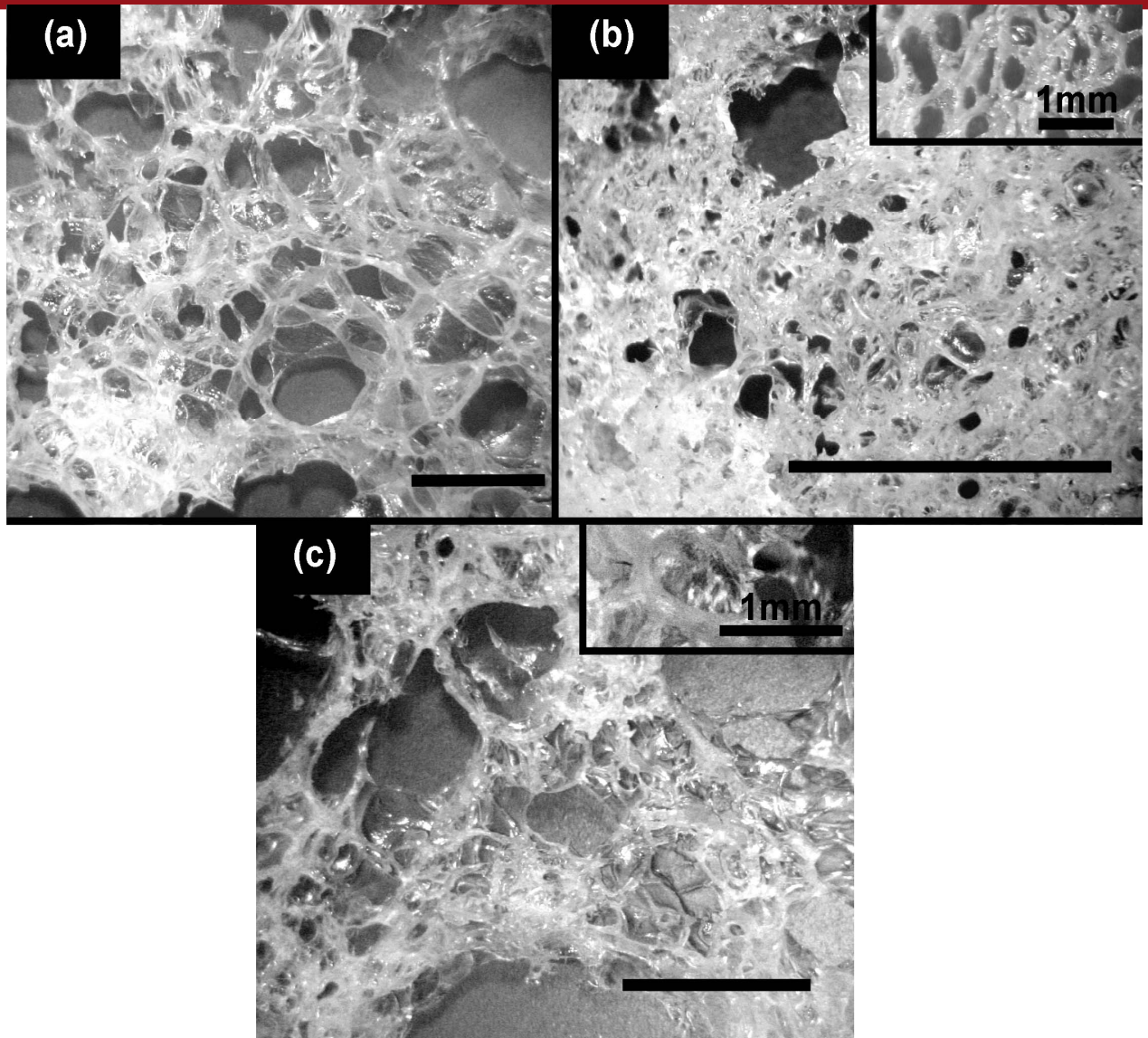


Fig. 4- 1 Fotografías tomadas en el microscopio estereoscópico de armazones de almidón de (a) Papa, (b) Camote y (c) Maíz. Las barras representan 5mm

4.2 Tamaño promedio de poro

En la Fig.4 -2 encontramos graficados los tamaños promedio de poros² de armazones hechos de los tres almidones usados a dos diferentes concentraciones iniciales (a 50% y 40% de porcentaje en peso de almidón). En este gráfico comprobamos que el tamaño de los poros de los armazones de almidón de papa es mucho mayor al de los otros dos almidones a cualquier concentración.

² Cabe recordar que en el capítulo 3 se definió el tamaño de poro como un diámetro promedio. Su valor es el promedio entre el eje mayor y el eje menor de la elipse a la que se aproxima un poro (Capítulo 3, ecuación 3.4).

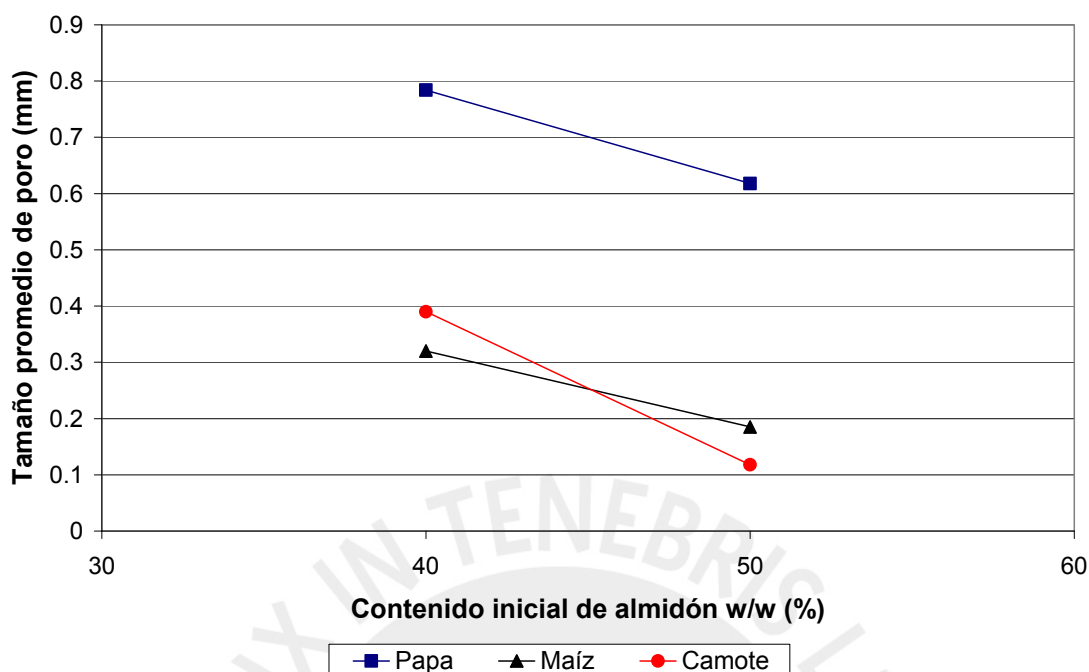


Fig. 4- 2 Variación del tamaño promedio de poro con respecto al contenido inicial de almidón

Mientras que para las estructuras de almidón de papa el tamaño promedio de poros está en el orden de 800 y 600 μ m, los armazones de los otros dos materiales tienen poros que están entre los 100 y 400 μ m. Al 50% en peso de almidón, los armazones de papa tienen un tamaño promedio de poro de 618 μ m \pm 303, los de maíz 185 μ m \pm 81.4 y los de camote 118 μ m \pm 52. Al 40% los tamaños promedios son 784 μ m \pm 352, 320 μ m \pm 160 y 390 μ m \pm 172 para armazones de almidones de papa, maíz y camote, respectivamente. Esta diferencia tan marcada se puede deber a las propiedades de los almidones.

Como hemos mencionado en el capítulo 2, el crecimiento de los poros es un proceso activado térmicamente y que depende de propiedades como la viscosidad, densidad, tensión superficial, concentración de almidón, etc. En la Tabla 4-1 [1, 2] podemos ver la viscosidad pico³, definida en el capítulo 1, de los tres tipos de almidón cuando éstos son sometidos a un proceso de gelatinización (a 50°C por 1 minuto, a 95°C por 3 minutos y finalmente a 50°C por 4 minutos) y comprobamos que la viscosidad del almidón de papa es mucho mayor (más de cinco veces) que la viscosidad del almidón

³ La viscosidad pico (PV) medida en el Analizador Rápido de Viscosidad (RVA) es la viscosidad que se mide cuando la muestra alcanza la temperatura máxima en el ciclo de calentamiento. Para el analizador rápido de viscosidad (RVA) se utilizan unidades arbitrarias llamadas Unidades del Analizador Rápido de Viscosidad (RVU). Véase el capítulo 1, sección 2.3.

de camote y de maíz. Estos dos últimos tipos de almidón tienen valores de viscosidad semejantes y, por lo tanto, sus armazones tienen poros de tamaño similar.

En efecto, al iniciarse el proceso de formación de poros, el vapor de agua que se forma ejerce presión, haciendo que crezca una burbuja (la que se convertirá en poro). En un medio con poca viscosidad la burbuja se romperá rápidamente y el vapor será evacuado de esa forma. En un medio con una viscosidad mayor, el vapor podrá hacer crecer burbujas más grandes y como resultado se obtendrán poros más grandes.

Tabla 4- 1 Valores de viscosidad para los diferentes tipos de almidón^a

Almidón	Viscosidad pico (RVU) ^b	Viscosidad final (RVU)
Papa	760	261
Maíz	141	140
Camote	108	149

^a Véase las referencias [1, 2].

^b Unidades de viscosidad: Rapid Viscosity Units (RVU). Véase el capítulo 1.

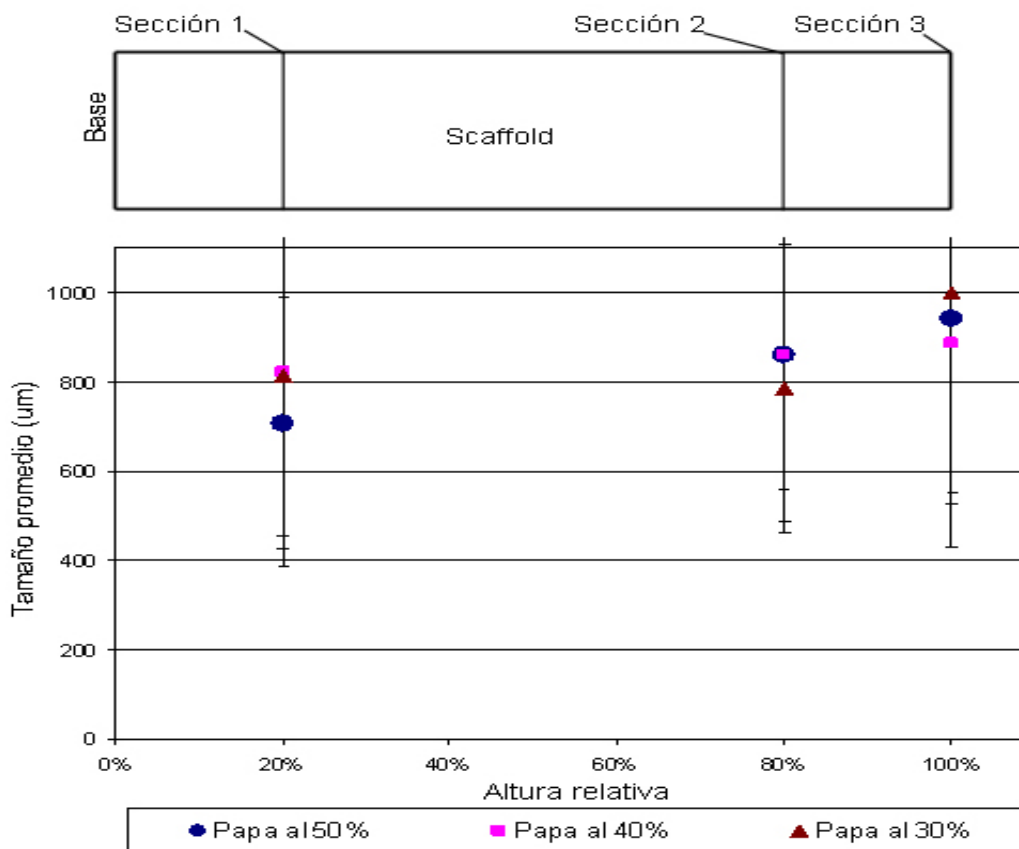


Fig. 4- 3 Variación del tamaño promedio de poro con respecto a la altura relativa para armazones producidos con almidón de papa

Además, es importante mencionar que para todos los materiales utilizados, el tamaño promedio de los poros disminuye al aumentar el contenido inicial de almidón pero no en la misma proporción. Para los armazones de almidón de papa se observa una disminución porcentual de sólo el 25%, mientras que para las estructuras de maíz la disminución es del 42% y llega a 70% para el caso del camote que resulta ser el material para el cual el contenido inicial de agua influye más en la morfología final.

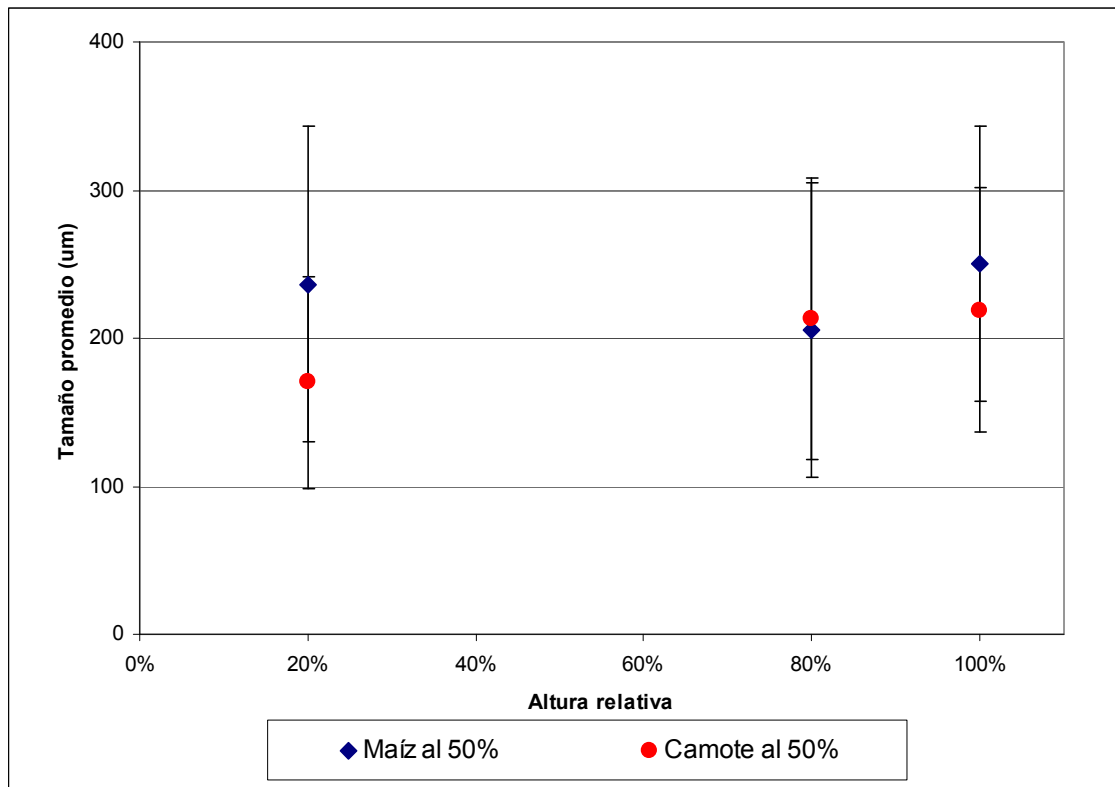


Fig. 4- 4 Variación del tamaño promedio de poro con respecto a la altura relativa para armazones producidos con almidón de maíz y de camote

Para ver cuán homogénea es la estructura con respecto a la posición que se analiza, se dividieron las muestras según la altura de las mismas como se definió en el capítulo 3. Luego, para el 20%, 80% y el 100% de la altura de la muestra se obtuvo el tamaño promedio de poro. En la Fig.4- 3 podemos apreciar la variación del tamaño promedio de poro con respecto a la altura relativa para los armazones preparados con 30%, 40% y 50% de almidón de papa. Para las concentraciones de 50% y 40% de almidón se puede apreciar una variación lineal del tamaño de poro con respecto a la altura relativa.

En general, para el almidón de papa el tamaño promedio de poro aumenta con la altura relativa. Es decir que hacia la parte superior del armazón los poros se van haciendo más grandes. Para la concentración de 50% los poros en la parte superior

(100% de altura) tienen un tamaño 30% mayor al tamaño promedio de los poros de la parte inferior (20% de la altura). Para el caso de las concentraciones de 40% y 30%, las variaciones de tamaño son menores, alcanzando valores de 8% y 23% respectivamente.

El comportamiento similar de los almidones de camote y de maíz permite que los resultados del tamaño promedio de poro con respecto a la altura sean puestos en un mismo gráfico pues los órdenes de magnitud son los mismos. En la Fig.4- 4 se observa la variación del tamaño de poro con respecto a la altura. Como en el caso de los armazones de almidón de papa, podemos afirmar que el tamaño promedio de poro es mayor en la parte superior de las muestras. Para este caso la variación con respecto a la parte inferior es de 30% para los armazones de almidón de camote y de 5,5% para los de almidón de maíz.

Tabla 4- 2 Tamaños de poro para diferentes armazones

Material	Proceso	Tamaño poro (μm)
Quitosano [6]	Intercambio de solventes	100-300
Almidón de papa [6]	Liofilizado	2,5
Almidón de camote [6]	Intercambio de solvente	430
PDLLA/Bioglass® [7]	Separación de fases inducida térmicamente	100
Almidón de maíz/Acetato de celulosa [8]	Moldeo por compresión y Extracción de partículas (particulate leaching)	10-500
	Vaciado con solvente y Extracción de partículas (particulate leaching)	30-300
	Extrusión con agente porógeno	10-500
PLGA [9]	Separación de fases inducida térmicamente	100-250
Capullos de seda [10]	Espumado por gas	155
	Extracción de partículas de sal (salt leaching)	202
	Liofilización a -20°C	50
	Liofilización a -80°C	15

Los armazones producidos por nosotros tienen tamaño promedio de poros entre 100-900 μm . Para validar el uso en Ingeniería de Tejidos de nuestros armazones,

presentamos la Tabla 4-2 donde se aprecian resultados de diferentes investigaciones realizadas. Notamos que el orden de magnitud del tamaño de poro obtenido es cercano a los valores encontrados de otras investigaciones. Más aún, si tenemos en cuenta que para los armazones para tejidos duros como lo huesos se buscan tamaños de poro en el rango de 100-500 μm [3-5], nuestros armazones de almidón de maíz y camote se encuentran en el rango de aplicación.

4.3 Distribución del tamaño de los poros

Como se aprecia en la Fig.4- 1, los poros no tienen un tamaño uniforme y, por lo tanto, es necesario saber, además del tamaño promedio, la distribución del tamaño de los poros. Ya hemos mencionado en el capítulo 2 que las estructuras porosas que se forman deben tener una cierta distribución del tamaño de los poros debido a la naturaleza del crecimiento aleatorio (estructuras de Voronoi⁴) de los poros y a las propiedades de los diferentes tipos de almidones usados.

En la Fig.4- 5 se observa la distribución de tamaños de poros de los armazones de almidón de papa a tres diferentes concentraciones (30%, 40% y 50%) a una altura del 80% (sección dos, véase la Fig. 4.3). Los poros obtenidos con este almidón tienen un tamaño que varía entre los 200 μm y los 1400 μm pero con una mayor incidencia (65%) de poros entre los 500 μm y 1100 μm . La medida del resto de los poros se distribuye casi uniformemente (más de 10%) entre los otros rangos presentados (200 μm -500 μm , 1100 μm -1400 μm y más de 1400 μm).

Pese a mostrarse tres composiciones diferentes, la distribución del tamaño de los poros no es muy diferente con lo que comprobamos lo expuesto en la sección anterior con respecto al tamaño promedio de los poros cuando se dijo que el tamaño promedio de los poros de los armazones de papa varía con la concentración pero en una medida mucho menor a la variación que se da con los otros dos materiales. Así en la Fig.4- 5 se ven distribuciones semejantes, en cambio en las Fig.4-6 y 4-7, se ven distribuciones que cambian más con respecto a la concentración de almidón.

⁴ Véase el anexo 1

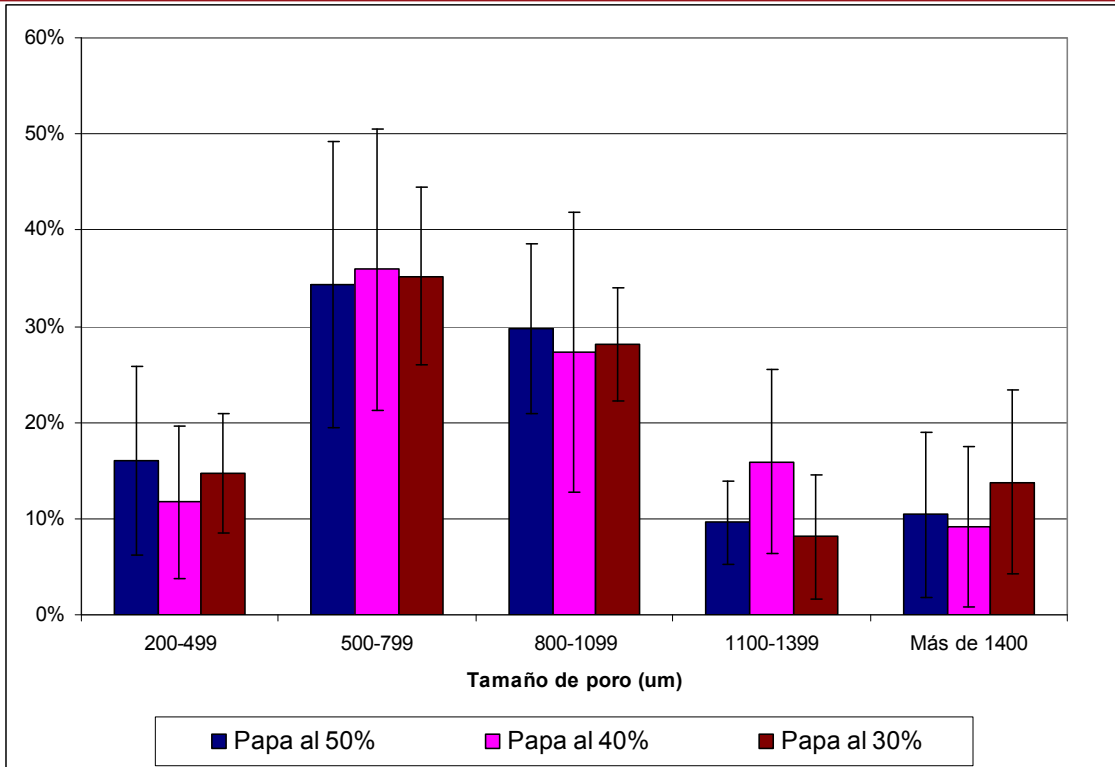


Fig. 4- 5 Distribución del tamaño de poro para diferentes concentraciones iniciales de almidón de papa

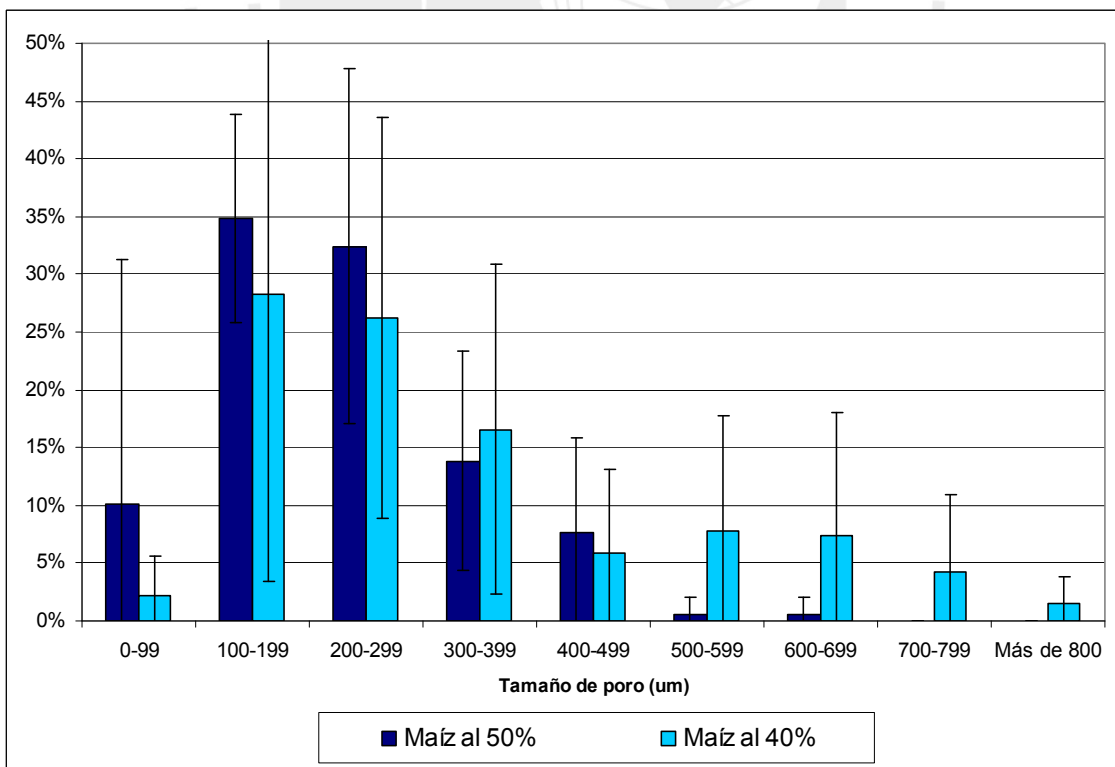


Fig. 4- 6 Distribución del tamaño de poro para diferentes concentraciones iniciales de almidón de maíz

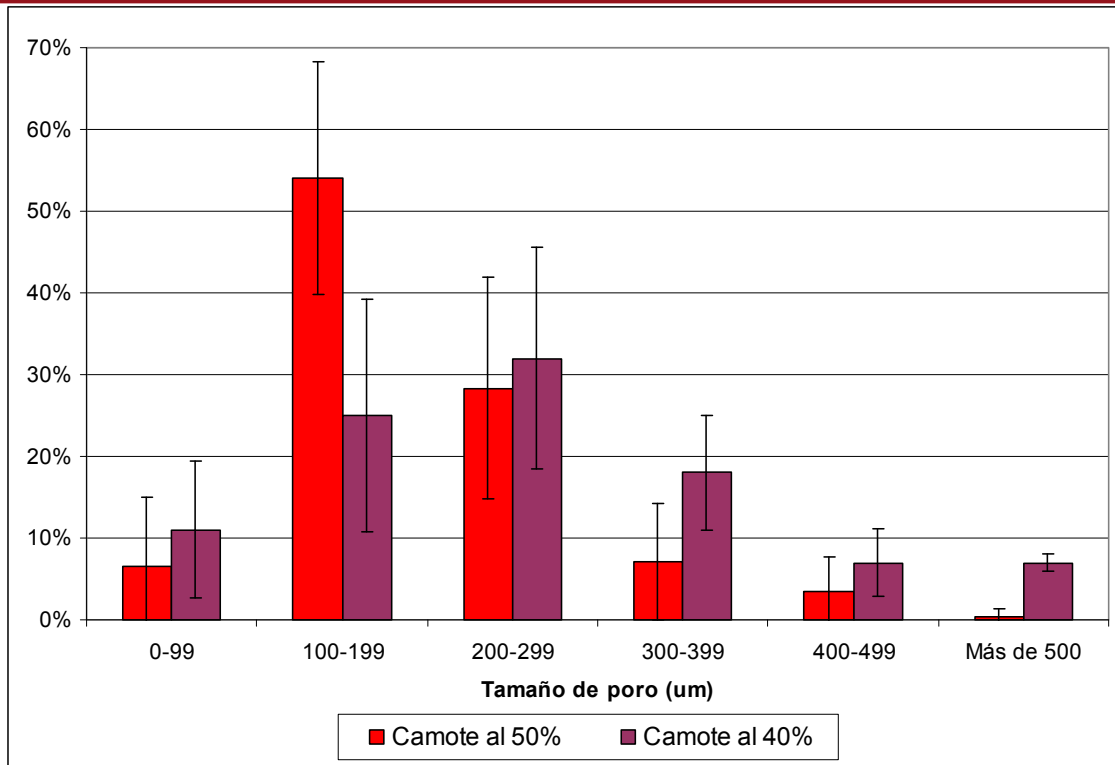


Fig. 4- 7 Distribución del tamaño de poro para diferentes concentraciones iniciales de almidón de camote

En la Fig.4- 6 se muestra la distribución de poros para los armazones de almidón de maíz. El rango de valores en este caso es más pequeño que en el de los armazones de papa ya que todos los poros tienen un tamaño menor a las 800μm. Las mayores frecuencias (≈25%-35%) se dan para los rangos de 100μm - 200μm y de 200μm - 300μm.

La distribución del tamaño de los poros de armazones de camote se observa en la Fig.4- 7. Este material es el que ofrece rangos más pequeños (de 0-500μm). Resulta claro que para este caso, la distribución ha variado mucho más al cambiar la concentración. Es decir, para las estructuras de almidón de papa el cambio en la distribución es mucho menos marcado que para el caso del almidón de camote. Esta observación está de acuerdo con lo ya comentado de la Fig.4- 2 pues como la distribución de tamaños de poro en los armazones de camote depende fuertemente de la concentración del almidón, así también el tamaño promedio de poros tendrá la misma marcada dependencia.

4.4 Densidad y porosidad

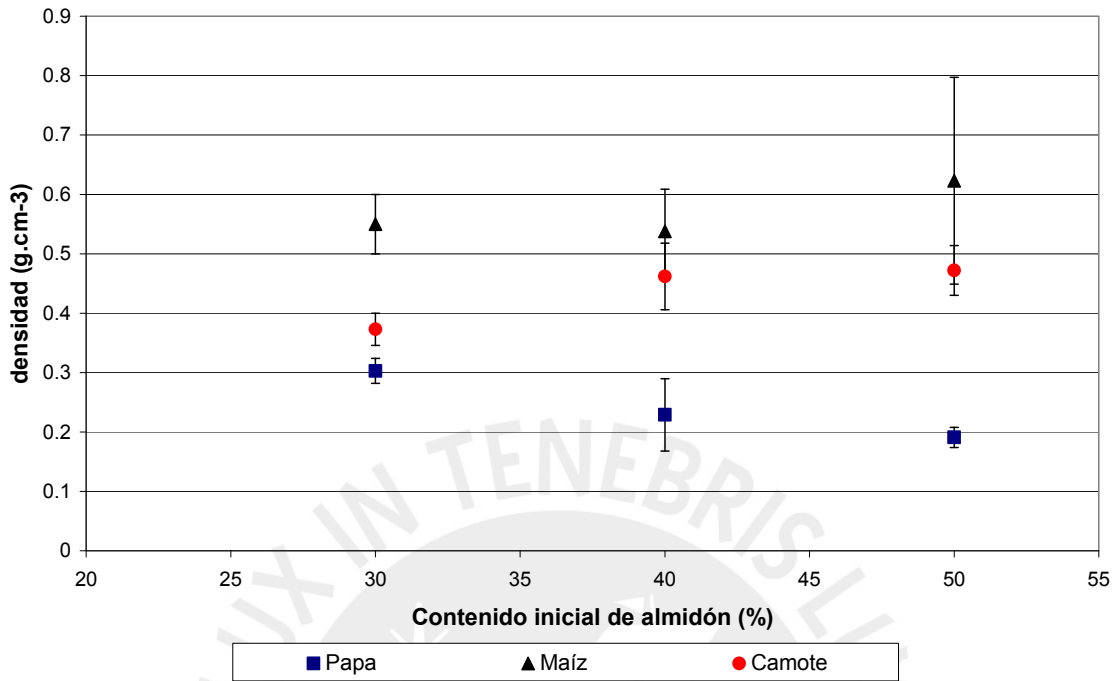


Fig. 4- 8 Variación de la densidad con respecto al contenido inicial de almidón

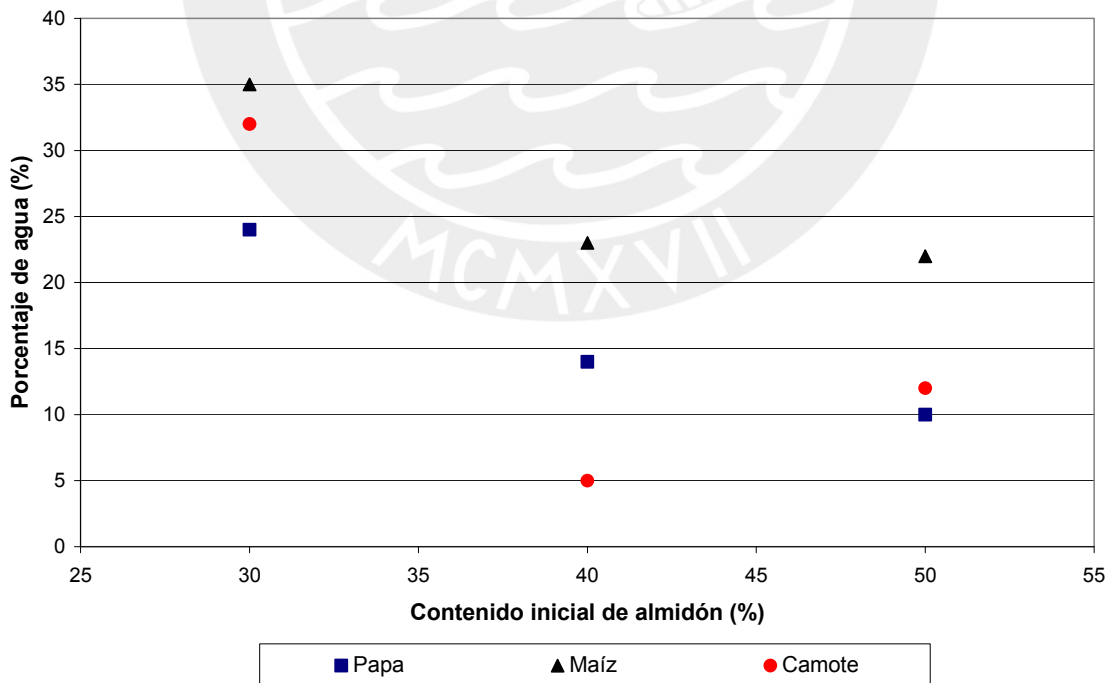


Fig. 4- 9 Variación del contenido final de agua con respecto al contenido inicial de almidón

En la Fig.4- 8 se muestra la densidad de las muestras según el tipo de almidón utilizado para diferentes porcentajes de concentración inicial. Se observa claramente que los armazones hechos de almidón de papa tienen una densidad menor (entre 0,2-0,3g/cm³) que la de los otros dos tipos de muestras (de maíz y camote). Además, las muestras con mayores densidades (entre 0,5-0,6g/cm³) fueron las de maíz, mientras que las estructuras de camote alcanzaron densidades entre 0,35 y 0,5g/cm³. Finalmente, no se observa una dependencia significativa entre la densidad y el contenido inicial de almidón para los armazones de maíz y camote. Por el contrario, en el caso de los armazones de papa podemos observar una tendencia: Los valores más altos de densidad (0,3g/cm³) se observaron a 30%, mientras que la densidad más baja (0,2g/cm³) se obtuvo al 50% de concentración.

Tabla 4- 3 Densidad y porosidad de todos los armazones producidos

Muestra	Densidad de los almidones (g.cm ⁻³) [11-13]	Densidad aparente (ρ) (g.cm ⁻³)	Porosidad calculada (%) ⁵
50%Papa/50%Agua	1,472	0,191±0,017	87,1%
40%Papa/60%Agua	1,472	0,229±0,061	84,5%
30%Papa/70%Agua	1,472	0,303±0,021	79,4%
50%Maíz/ 50%Agua	1,450	0,623±0,174	57,0%
40%Maíz/ 60%Agua	1,450	0,583±0,071	62,9%
30%Maíz/ 70%Agua	1,450	0,55±0,05	62,0%
50%Camote/50%Agua	1,5	0,472±0,042	68,5%
40%Camote/60%Agua	1,5	0,462±0,056	69,2%
30%Camote/70%Agua	1,5	0,373±0,027	75,2%

Otro indicador que se ha medido es el porcentaje de agua que queda después del calentamiento por microondas⁶ en función del contenido de almidón en la mezcla inicial [Fig.4- 9]. En la Fig.4- 9 se puede apreciar una tendencia lineal para las muestras hechas de almidón de papa. La pendiente negativa muestra que a medida que se incrementa el contenido inicial de almidón de papa (de 30% a 50%) el agua es

⁵ El cálculo de la porosidad se describe en el capítulo 3, secciones 3.3.2.1 y 4.3.2

⁶ El procedimiento del cálculo del porcentaje final de agua (porcentaje de agua después del calentamiento) se da en el capítulo 3, sección 4.4.1.

más fácilmente evaporada por el calentamiento por microondas y el contenido de agua final decrece de 25% a 10%. Esto también ocurre para los armazones de almidón de maíz y de camote pero sin la tendencia lineal.

Tabla 4- 4 Porosidades de diversos tipos de armazones

Material	Proceso	Densidad aparente (g.cm ⁻³)	Porosidad
Quitosano [6]	Intercambio de solventes	0,1-0,3	83%-92%
Almidón de papa [6]	Intercambio de solvente	0,4-0,7	55%-71%
	Liofilizado	0,2-0,25	83%-87%
Almidón de maíz [6]	Intercambio de solvente	0,2-0,4	70%-84%
	Liofilizado	0,2-0,8	43%-93%
Almidón de camote [6]	Intercambio de solvente	0,2-0,5	70%-88%
	Liofilizado	0,1	93%
Almidón de maíz/Acetato de celulosa [8]	Moldeo por compresión y Extracción de partículas (particulate leaching)	-	50%-60%
	Vaciado con solvente y Extracción de partículas (particulate leaching)	-	60%-70%
	Extrusión con agente porógeno	-	40%-50%
PLGA [9]	Separación de fases inducida térmicamente	0,073-0,13	90%-94%
Capullos de seda [10]	Espumado por gas	0,04-0,1	87%-97%
	Extracción de partículas de sal (salt leaching)	0,04-0,12	84%-98%
	Liofilización a -20°C	0,02-0,03	98%-99%
	Liofilización a -80°C	0,03-0,04	97%-99%
Almidón de maíz/alcohol [11]	Procesamiento por microondas	0,29-0,52	59%-78%

En la Tabla 4-3 se observa la densidad aparente de las muestras y sus respectivos valores de porosidad con respecto a la composición de las mismas.

Los armazones de almidón de maíz muestran los valores de porosidad más bajos ($\approx 62\%$) mientras que las muestras de almidón de papa obtienen la porosidad más alta (de 80% a 87%). Se puede concluir en que hay una relación inversa entre la porosidad

y la densidad aparente de los armazones debido a que un mayor volumen de los poros se ve reflejado en una menor densidad de las muestras. Además, la densidad también se relaciona con el contenido de agua que permanece en las estructuras después del procesamiento, ya que al tener más porcentaje de agua las muestras muestran una mayor porosidad.

En la Tabla 4-4 se muestran los valores de densidad aparente y de porosidad obtenidos en los armazones hechos en otros estudios [6, 8-9], con diversos materiales y procesos para los que se encuentran densidades aparentes que varían entre 0,02-0,8g/cm³ y porosidades de 50%-99%. Los valores alcanzados en el presente estudio están contenidos en los rangos anteriores (densidad entre 0,2-0,6g/cm³ y porosidad entre 62%-87%).

4.5 Propiedades mecánicas

4.5.1 Modelamiento teórico de la deformación en estructuras porosas

Tracción

Cuando la estructura es sometida a tracción, el gráfico esfuerzo-deformación [Fig.4- 10] muestra dos zonas bien definidas: Una zona de elasticidad lineal y una zona no lineal. El módulo de elasticidad de la zona lineal está determinado por el mecanismo de doblado de las celdas debido a que cuando la estructura es sometida a tracción las paredes de las celdas giran, cambiando la geometría de las mismas como se ve en la Fig.4- 11

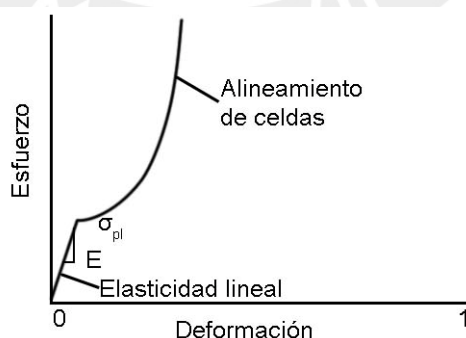


Fig. 4- 10 Curva esfuerzo-deformación para una estructura porosa sometida a tracción

Al pasar a la segunda zona del gráfico, las celdas de la estructura están alineadas con respecto al eje de la fuerza de tensión y el mecanismo que es dominante es el estiramiento mismo de las paredes de los poros.

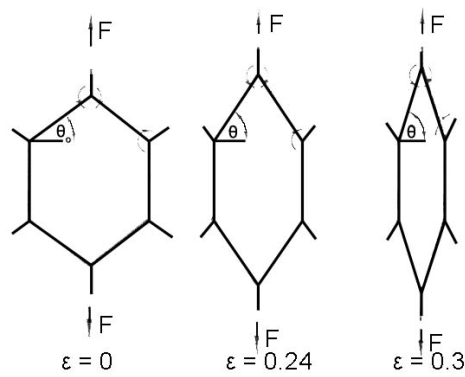


Fig. 4- 11 Celda de una estructura porosa sometida a tracción

Compresión

La gráfica de esfuerzo-deformación de una estructura porosa se observa en la Fig.4-12. En este caso el comportamiento es diferente a la tracción. En la primera zona la compresión se da de manera lineal, a continuación sigue una zona donde el esfuerzo es casi constante y, finalmente, el esfuerzo vuelve a ser creciente.

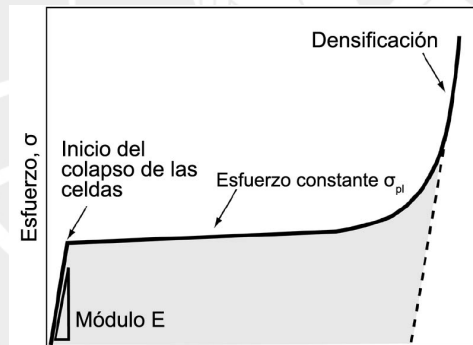


Fig. 4- 12 Curva esfuerzo-deformación de una estructura porosa sometida a compresión

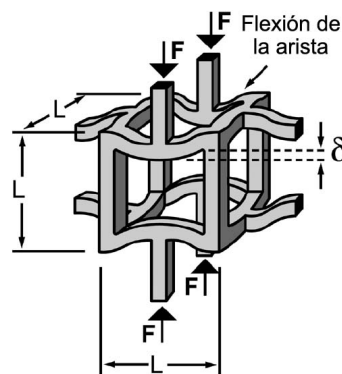


Fig. 4- 13 Celda de una estructura porosa sometida a compresión

En la Fig.4- 13 se muestra el caso ideal de una celda sometida a compresión. En un Principio la celda se deforma debido a la flexión con un módulo de elasticidad E , hasta que la misma comienza a colapsar y de manera similar las celdas vecinas. En ese momento el esfuerzo necesario para deformar la estructura se hace casi constante (σ_{pl} en la Fig.4- 12) hasta que, debido a que casi todas las celdas han colapsado, las paredes de comienzan a apretarse unas a otras (densificación) y el esfuerzo necesario crece rápidamente.

Según Gibson et al [15]:

$$\sigma_{pl} \approx 0,3 \cdot \sigma_{ys} \cdot \left(\frac{\rho_{ap}}{\rho_s} \right)^{3/2} \quad (4.1)$$

Donde

- σ_{pl} : Esfuerzo de colapso en compresión.
- σ_{ys} : Esfuerzo de fluencia del material sólido.
- ρ_{ap} : Densidad del armazón (densidad aparente)⁷.
- ρ_s : Densidad del material sólido.

Indentación

A diferencia de los sólidos densos, cuyo volumen permanece constante al ser deformados plásticamente, las estructuras porosas cambian de volumen al ser comprimidas. Cuando la estructura es comprimida las celdas comienzan a colapsar y casi no se produce esfuerzos en direcciones diferentes al eje en el que se da la compresión. Debido a esto, la presión de indentación que se encuentra en las espumas es menor que la de los sólidos con el mismo esfuerzo de fluencia (σ_{ys}).

En efecto, cuando una espuma es comprimida por un indentador sólo el grupo de celdas que está en contacto con él colapsan casi sin transmitir esfuerzos a las celdas laterales. En consecuencia, según Gibson et al [15] la presión de indentación (H , presión de indentación) para una estructura porosa es simplemente:

$$H = \sigma_{pl} \quad (4.2)$$

⁷ Véase el capítulo 3 para más información sobre la densidad aparente y la densidad del material sólido.

En conclusión, podemos decir que un ensayo de indentación va a tener, prácticamente los mismos resultados que un ensayo de compresión.

4.5.2 Ensayo de indentación

En las Figs.4-14, 4-15 y 4-16 se observan los resultados de las pruebas de indentación en los armazones hechos de almidón de papa, maíz y camote, a diferentes alturas. Los valores obtenidos dependen fuertemente del material con el que son hechas las estructuras. Así, para los armazones de almidón de papa la presión de indentación varía entre 3-6MPa mientras que para los de almidón de maíz entre 7 y 12MPa. Las espumas de camote fueron las de mayor presión de indentación, con valores que están entre 10-22MPa.

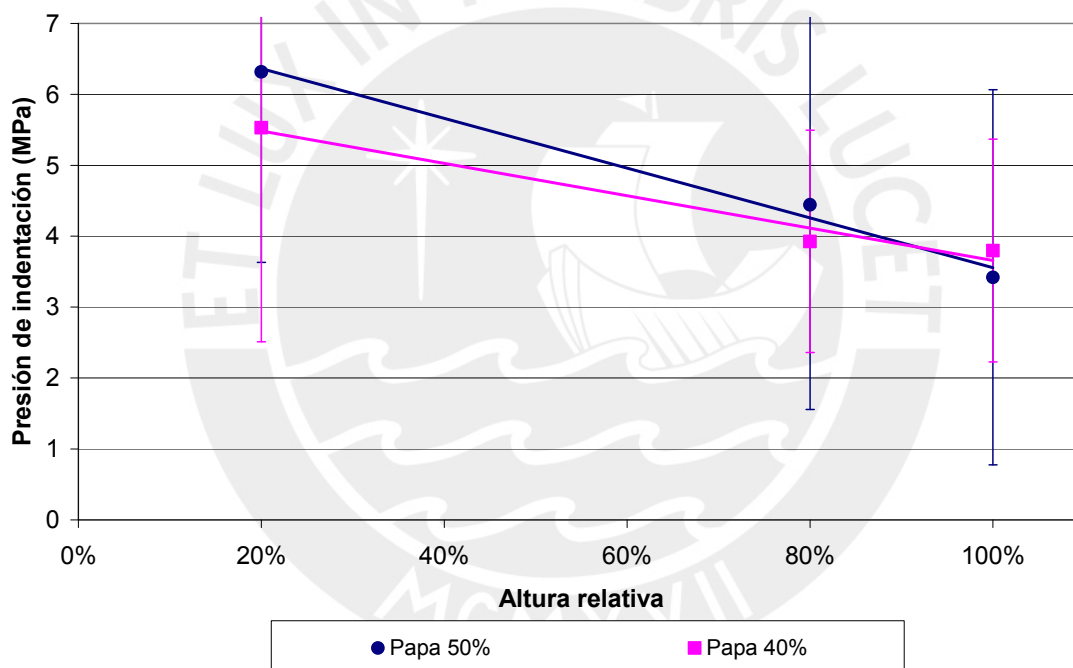


Fig. 4- 14 Variación de la presión de indentación con respecto a la altura relativa de la muestra para armazones de almidón de papa

En la Fig.4- 14 se aprecian los valores de presión de indentación de armazones de almidón de papa de dos concentraciones (50% y 40%) a diferentes alturas. No se observa una dependencia entre la presión de indentación y la concentración de almidón pero sí hay una variación con respecto a la altura relativa. Para los armazones de almidón de papa, la menor presión de indentación se obtiene en la parte superior de las muestras (altura relativa de 100%). Sin embargo, para los armazones de almidón de maíz [Fig.4- 15] no parece haber una relación entre la presión de indentación y la altura relativa. En cambio, se encuentra una dependencia lineal entre

la presión de indentación de las estructuras de almidón de camote y la altura relativa de la muestra [Fig.4- 16].

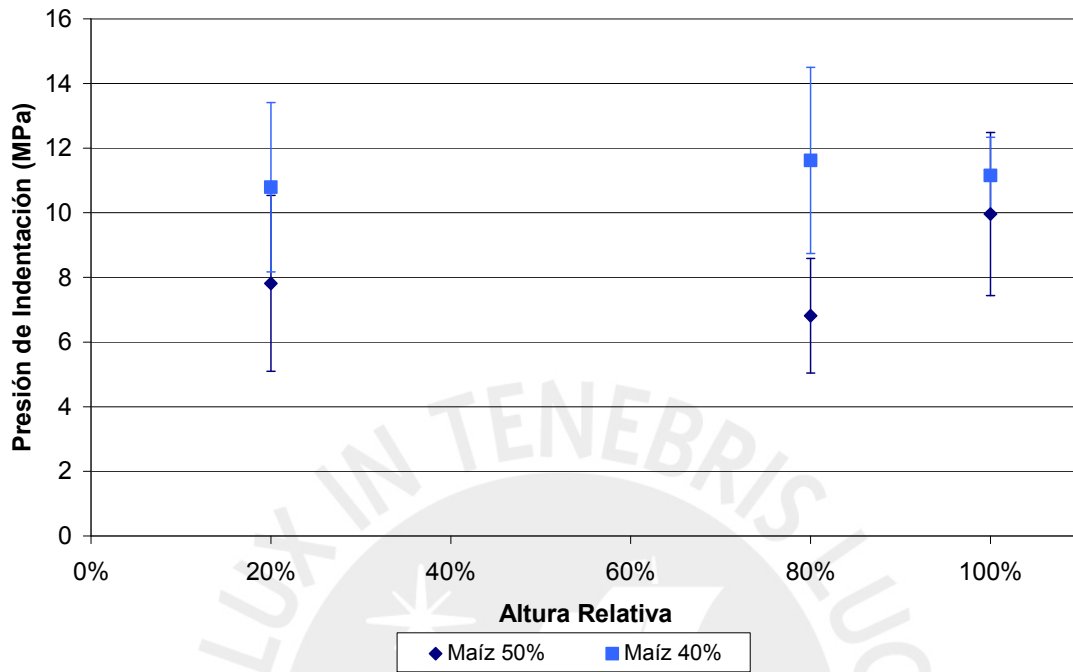


Fig. 4- 15 Variación de la presión de indentación con respecto a la altura relativa de la muestra para armazones de almidón de maíz

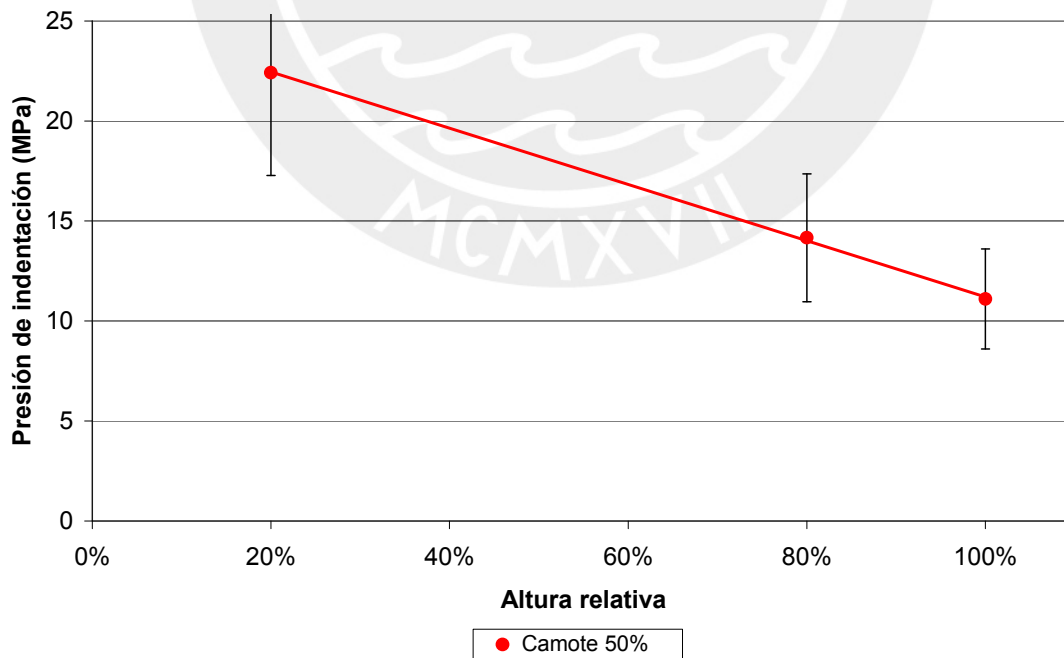


Fig. 4- 16 Variación de la presión de indentación con respecto a la altura relativa de la muestra para armazones de almidón de camote

La relación entre la presión de indentación y la altura relativa de la muestra es explicada por el tamaño de los poros. Como el tamaño promedio de los poros varía con respecto a la altura de la muestra, entonces la presión de indentación también variará con respecto a la altura. En efecto, al aumentar el tamaño de los poros en la parte superior de los armazones [Figs.4- 3 y 4-4], la densidad de esta zona disminuye y, en consecuencia, el esfuerzo de colapso σ_{pi} también (ecuación 4.1) por lo que el valor de presión de indentación también caerá (ecuación 4.2).

Este mismo razonamiento explica la marcada diferencia entre los valores de presión de indentación de los armazones de almidón de papa y los de los otros tipos de almidón. Las estructuras de almidón de papa tienen los poros más grandes (600-800 μm) y, por lo tanto, los valores de presión de indentación son más pequeños (3-6MPa) comparados con los poros de los armazones de almidón de maíz y de camote (100-400 μm) y sus valores de presión de indentación (7-22MPa).

La relación entre la presión de indentación y el tamaño promedio de poro es comprobada en los gráficos de las Figs.4-17 y 4-18, en los que se muestra la variación de la presión de indentación con respecto al tamaño promedio de poro de la muestra.

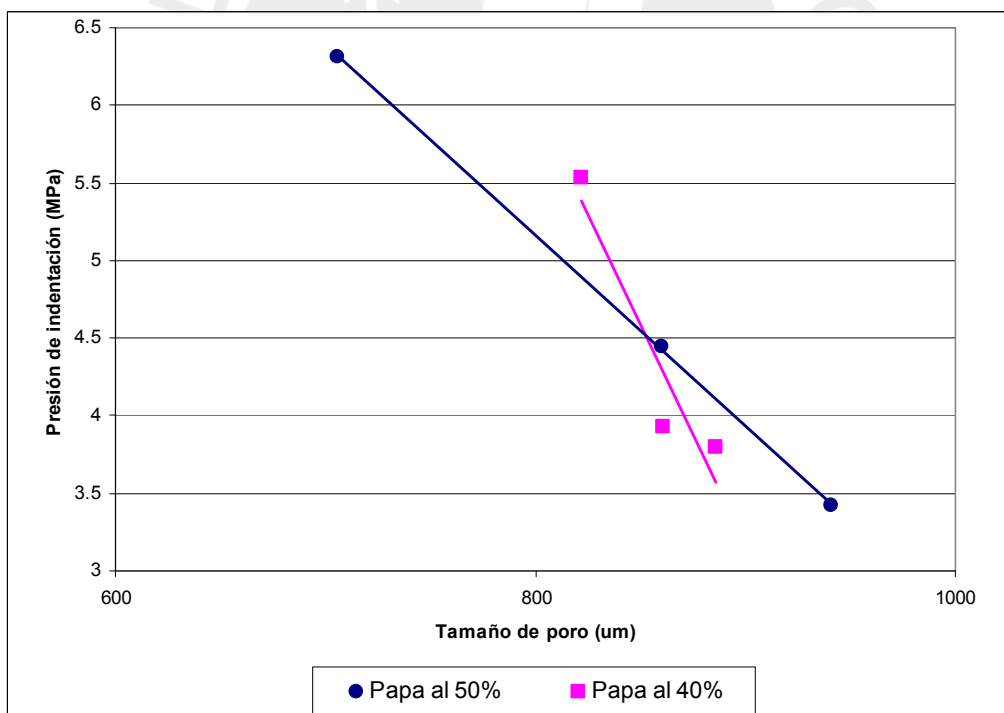


Fig. 4- 17 Variación de la presión de indentación con respecto al tamaño promedio de poro para armazones de almidón de papa

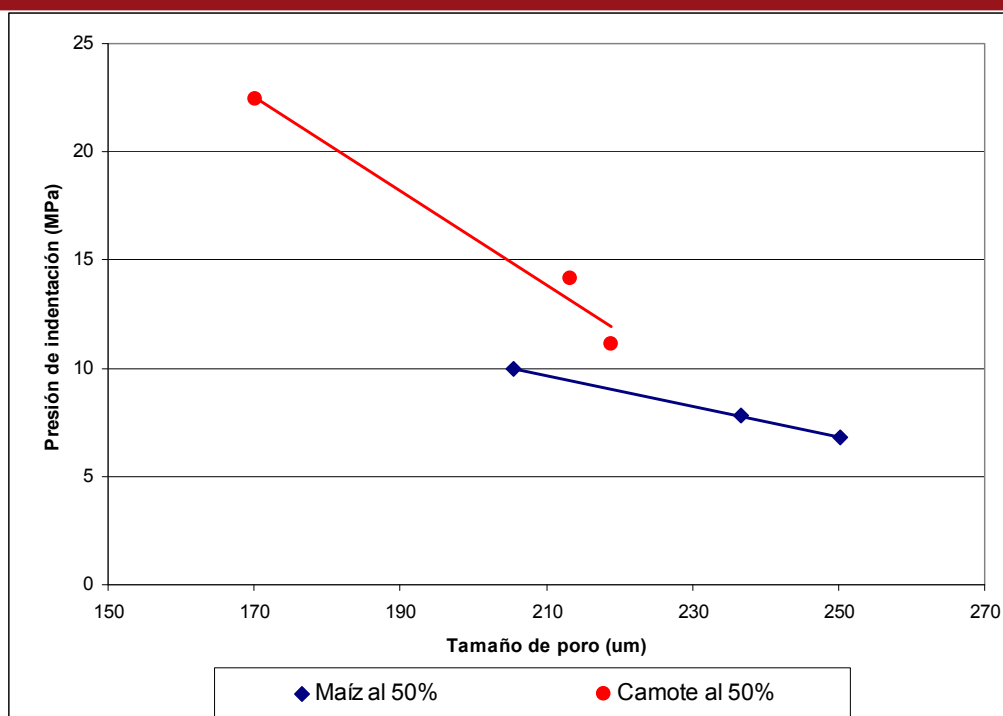


Fig. 4- 18 Variación de la presión de indentación con respecto al tamaño promedio de poro para armazones de almidón de maíz y de camote

Diferentes autores han usado diversas técnicas para evaluar las propiedades mecánicas de las estructuras porosas. Incluso se han hallado ecuaciones que relacionan la densidad de la espuma con la presión de indentación [16-17]. En el estudio de Nazarov et al [10], se muestran los valores del esfuerzo de compresión (5-100MPa) de armazones de biomateriales (capullo del gusano de seda) fabricados mediante liofilizado, extracción de partículas de sal (salt leaching) y espumado por. Otra investigación hecha con materiales similares (mezclas de almidón con alcohol) procesados por compresión, extrusión y vaciado de solvente y extracción de partículas (*solvent cast and particles leaching*) muestra valores similares a los de nuestro trabajo y aún mayores (68-12MPa). En la Tabla 4-5 se observan diferentes valores de esfuerzos de compresión hallados y que dependen del material y del proceso utilizado. Los armazones que se preparan en este estudio son destinados para usarse con tejidos duros como los huesos. Entonces, las propiedades físicas buscadas deben ser similares a la de la estructura a reemplazar. En el caso de los huesos, éstos tienen un esfuerzo máximo de compresión que varía entre 1-10MPa [18] por lo que podemos decir que los armazones preparados en esta tesis serían adecuados ya que su presión de indentación y, por lo tanto, su esfuerzo máximo de compresión, varía entre 3-22MPa.

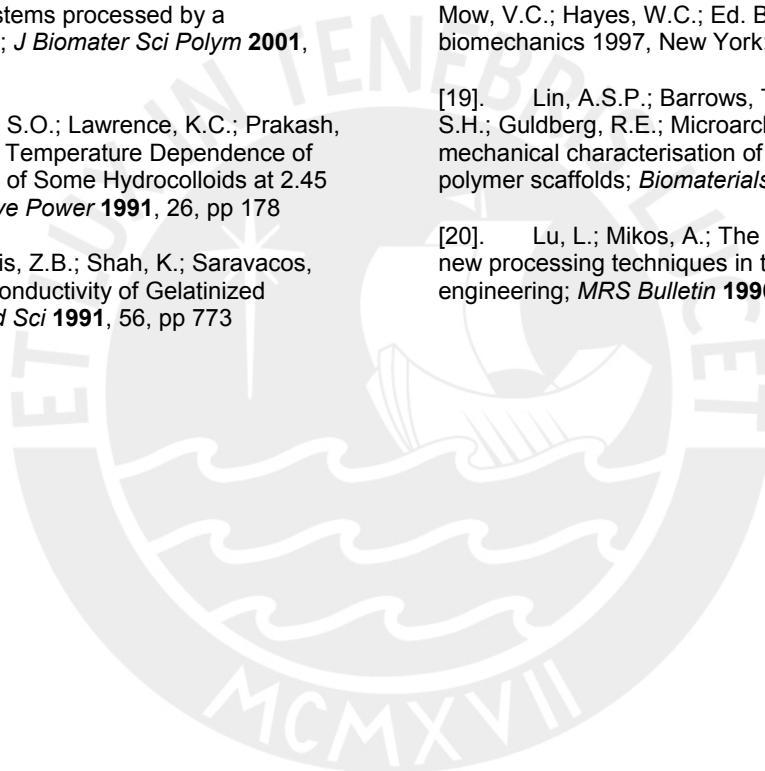
Tabla 4- 5 Esfuerzos de compresión para diferentes tipos de armazones

Material	Proceso	Esfuerzo de Compresión (MPa)
Quitosano [6]	Intercambio de solventes	0.4-2
Almidón de papa [6]	Liofilizado	1,65
Almidón de camote [6]	Intercambio de solvente	3
PLDL [19]	Descomposición por agente porógeno	2,7-11
Almidón de maíz/Acetato de celulosa [8]	Moldeo por compresión y Extracción de partículas (particulate leaching)	20-68
	Vaciado con solvente y Extracción de partículas (particulate leaching)	21,73
	Extrusión con agente porógeno	8-12
PLGA [20]	Vaciado con solvente y Extracción de partículas (particulate leaching)	1-3
Capullos de seda [10]	Espumado por gas	100-280
	Extracción de partículas de sal (salt leaching)	30-200
	Liofilización a -20°C	20-80
	Liofilización a -80°C	5-20

Referencias

- [1]. Deffenbaugh, L.B.; Walker, C.E.; Comparison of starch pasting properties in the Brabender Viscoamylograph and the Rapid Visco-Analyzer; *Cereal Chem* **1989**, 66, pp 493
- [2]. Collado, L.S.; Mabesa, R.C.; Corke, H; Genetic Variation in the Physical Properties of Sweet Potato Starch; *J Agric Food Chem* **1999**, 47, pp 4195
- [3]. Boyan, B.D.; Hummert, T.W.; Schwartz, Z.; Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response; *Biomaterials* **1996**, 17, pp 137
- [4]. Kim, H.; Smith, J.; Valenti, R.; Bone morphogenetic protein 2-coated porous poly-L-lactic acid scaffolds: release kinetics and introduction of pluripotent C₃H₁₀T1/2 cells; *Tissue Eng* **1998**, 4, pp 35
- [5]. Whang, K.; Healy, K.E.; Elenz, D.R.; Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture; *Tissue Eng* **1999**, 5, pp 35
- [6]. Nakamatsu, J.; Torres, F.G.; Troncoso, O.P.; Lin, Y.M.; Boccaccini, A.R.; Processing and Characterisation of Porous Structures from Chitosan and Starch for Tissue Engineering Scaffolds; *Biomacromolecules*, In Press
- [7]. Blaker, J.J.; Gough, J.E.; Maquet, V.; Notingher, I.; Boccaccini, A.R.; In vitro evaluation of novel bioactive composites based on Bioglass®-filled polylactide foams for bone tissue engineering scaffolds; *J Biomed Mater Res* **2003**, 67A, pp 1401

- [8]. Gomes, M.E.; Godinho, J.S.; Tchalamov, D.; Cunha, A.M.; Reis, R.L.; Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties; *Mat Sci Eng C* **2002**, 20, pp 19-26
- [9]. Boccaccini, A.R.; Maquet, V.; Bioresorbable and bioactive polymer/Bioglass® composites with tailored pore structure for tissue engineering applications; *Comp Sci Tech* **2003**, 63, pp 2417
- [10]. Nazarov, R.; Jin, H.; Kaplan, D.L.; Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin; *Biomacromolecules* 2004, 5, 718
- [11]. Malafaya, P.B.; Elvira, C.; Gallardo, A.; San Román, J.; Reis, R.L.; Porous starch-based drug delivery systems processed by a microwave route; *J Biomater Sci Polym* **2001**, 12, pp 1227
- [12]. Nelson, S.O.; Lawrence, K.C.; Prakash, A.; Moisture and Temperature Dependence of the Permittivities of Some Hydrocolloids at 2.45 GHz; *J Microwave Power* **1991**, 26, pp 178
- [13]. Maroulis, Z.B.; Shah, K.; Saravacos, G.D.; Thermal Conductivity of Gelatinized Starches; *J Food Sci* **1991**, 56, pp 773
- [14]. Wang, L.J.; Ganjyal, G.M.; Jones, D.D.; Weller, C.L.; Hanna, M.A.; Modelling of bubble growth dynamics and non-isothermal expansion in starch-based foam during extrusion; *Adv Polym Tech* **2005**, 24, pp 29
- [15]. Gibson, L.J.; Ashby, M.F.; Cellular solids: structure and properties; UK 1999; Cambridge University Press
- [16]. Hutchinson, R. J.; Siodlak, G. D. E.; Smith, A.C.; *J Mat Sci* **1987**, 22, pp 3956
- [17]. Willett, J. L.; Shongren, R. L.; *Polymer* **2002**, 43, pp 5935
- [18]. Hayes, W.C.; Bouxein, M.L.; Biomechanics of cortical and trabecular bone: Implications for assesment of fracture risk; En: Mow, V.C.; Hayes, W.C.; Ed. Basic orthopaedic biomechanics 1997, New York: Lippincott-Raven
- [19]. Lin, A.S.P.; Barrows, T.H.; Cartmell, S.H.; Guldberg, R.E.; Microarchitectural and mechanical characterisation of oriented porous polymer scaffolds; *Biomaterials* **2003**, 24, pp 481
- [20]. Lu, L.; Mikos, A.; The importance of new processing techniques in tissue engineering; *MRS Bulletin* **1996**, 21, pp 28



CONCLUSIONES

- Se ha utilizado un nuevo proceso de manufactura para producir estructuras porosas (armazones) para ingeniería de tejidos a partir de polímeros naturales como son los almidones de papa, maíz y camote. Este proceso es rápido y simple. Se basa en la utilización del calentamiento por microondas para la rápida ebullición del agente porógeno (agua destilada) que da como resultado una estructura de poros abiertos e interconectados. Para cada mezcla de agua-almidón se ha determinado el tiempo necesario para producir el armazón.
- Los armazones producidos por el proceso de calentamiento por microondas muestran estructuras que no tienen poros de tamaño homogéneo y que no crecen en una dirección específica.
- En todos los ensayos de caracterización que se han hecho, se puede apreciar que todos los tipos de almidón producen armazones con características similares. A pesar de ello, los valores de densidad, porosidad, tamaño promedio de poro y presión de indentación son más cercanos para los armazones de almidón de maíz y camote. Es decir que los armazones de almidón de maíz se “parecen más” a los de almidón de camote que a los de almidón de papa. Esto se debe a que el tamaño de los poros de los armazones de almidón de papa es mucho mayor (el doble) que el de los poros de los armazones de almidón de maíz y camote. Para las estructuras porosas, la geometría de los poros determina otras propiedades como densidad, porosidad, resistencia a la indentación, etc.
- Mediante este proceso de manufactura se pueden controlar parámetros importantes para la Ingeniería de Tejidos como el tamaño promedio de los poros. El tamaño de los mismos depende de la proporción almidón-agua que se utilice; a menor cantidad de agua, menor será el tamaño promedio de los poros obtenidos.
- Existe una distribución en el tamaño de los poros pero ésta no es constante en toda la muestra. Se ha determinado que el tamaño promedio de los poros depende de la altura a la cual se analice la muestra. En general, el tamaño promedio aumenta a medida que la sección se acerca a la parte superior de la muestra.
- La formación de poros es un proceso activado térmicamente en el cual intervienen las propiedades reológicas y dieléctricas del sistema almidón-agua.

La influencia de la viscosidad es reconocida al comparar las viscosidades del almidón de papa, de maíz y de camote. Las viscosidades similares del almidón de maíz y de camote hacen que los tamaños de poro obtenidos con estos materiales sean también similares. El almidón de papa, en cambio, tiene una viscosidad mucho mayor y un tamaño de poros mayor.

- El proceso de formación de poros utiliza la ebullición del agua que escapa del sistema agua-almidón en forma de vapor y deja a su paso los poros interconectados. Sin embargo, no toda el agua se logra evacuar del sistema. Pese a que el agua se convierte en vapor en poco tiempo (unos 15 s.), para ninguna proporción de agua-almidón se logra evacuar toda la humedad ya que antes de que se termine de extraer toda el agua, el almidón comienza a degradarse térmicamente. Por lo tanto, aunque el porcentaje de agua es un parámetro con el que se puede controlar el tamaño promedio de poro que se desea (poros más grandes con más agua) tiene un rango de aplicación que va del 40-80%. Es decir, que menos de 40% de agua no permite que gelatinice la muestra y el agua se evapora sin formar poros. A más de 80% se forman poros muy grandes que colapsan antes de que la muestra esté lista.
- Las propiedades mecánicas de los armazones dependen de la geometría de los poros. La presión de indentación, cuyo valor es, aproximadamente, el mismo que el esfuerzo de colapso a compresión, resulta estar en relación lineal inversa al tamaño de poros para los armazones de papa y camote. En consecuencia, los armazones de almidón de papa que tienen un tamaño promedio de poro más grande son los que tienen una presión de indentación menor. Además, debido a que los poros se hacen más grandes hacia la superficie de la muestra, en esta zona las presiones de indentación son menores.
- La utilidad de los presentes armazones para Ingeniería de Tejidos queda validada por los valores obtenidos durante la caracterización. El tamaño promedio de poros requeridos para tejidos duros está entre 100-500 μ m, valores cercanos a los obtenidos. El esfuerzo máximo de compresión (comparable con la presión de indentación) de los huesos es de 1-10MPa, lo cual también está dentro de los valores obtenidos (5-20MPa). Además, la porosidad obtenida (60-87%) es la requerida en estos casos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alavi, S.H.; Rizvi, S.S.H.; Harriott, P.; Process dynamics of starch-based foams produced by supercritical fluid extrusion. I: model development; *Food Res Int* **2003**, 36, pp 309
- Altieri, P.A.; Lacourse, N.L.; Starch-based protective loose-fill material. Proceedings of the third corn utilization conference; National Corn Growers Association St. Louis, MO, 1990; pp 159
- Amon, M.; Denson, C.D.; A study of the dynamics of foam growth: analysis of the growth of closely spaced spherical bubbles; *Polymer Eng Sci* **1986**, 26, pp 255
- Ashby, M.F.; Cellular solids – Scaling of properties; En: Scheffler, M.; Colombo, P.; Ed.: Cellular Ceramics: Structure, Manufacturing, Properties and Applications; Weinheim, Wiley VCH 2005, pp. 2-17
- ASTM F2450-04 Standard Guide for Assessing Microstructure of Polymeric Scaffolds for Use in Tissue Engineered Medical Products
- Barton, J.; Milner, T.; Pfefer, T.; Nelson, J.; Welch, A.; Optical Low Coherence Reflectometry to Enhance Monte Carlo Modeling of Skin; *J Biomed Opt* **1997**, 2, pp 226
- BeMiller J.N., Whistler R.L. 1996. Carbohydrates. En: Fennema OR, (Ed.) Food Chemistry. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc. P191-195.
- Bhatnagar, S.; Hanna, M. A.; Effect of talc on properties of cornstarch extrudates; *Starch* **1996**, 48, pp 94
- Birla, R.; Matthew, H.W.T.; 3-Dimensional Imaging & Analysis of Smooth Muscle Colonization of Porous Chitosan Scaffolds; Proc. 1st Joint BMES/EMBS Conf., 1999, p. 119
- Blaker, J.J.; Gough, J.E.; Maquet, V.; Notingher, I.; Boccaccini, A.R.; In vitro evaluation of novel bioactive composites based on Bioglass®-filled polylactide foams for bone tissue engineering scaffolds; *J Biomed Mater Res* **2003**, 67A, pp 1401
- Boccaccini, A.R.; Maquet, V.; Bioresorbable and bioactive polymer/Bioglass® composites with tailored pore structure for tissue engineering applications; *Comp Sci Tech* **2003**, 63, pp 2417
- Boyan, B.D.; Hummert, T.W.; Schwartz, Z.; Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response; *Biomaterials* **1996**, 17, pp 137
- Calay, R.K.; Newborough, M.; Probert, D.; Calay, P.S.; Predictive equations for the dielectric properties of foods; *Int J Food Sci Technol* **1995**, 29, pp 699
- Chen, L.J.; Wang, M.; Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB–PHV copolymer; *Biomaterials* **2002**, 23, pp 2631
- Chinnaswamy, R.; Hanna, M. A. Biodegradable polymers. U.S. Patent No. 5,496,895
- Clark, D.E.; Sutton, W.H.; Lewis, D.A.; Microwave processing of materials; In *Microwaves: Theory and Application in Materials Processing IV*, Ceramic Transactions, volumen 80, 1997. pp 61—98
- Collado, L.S.; Mabesa, R.C.; Corke, H; Genetic Variation in the Physical Properties of Sweet Potato Starch; *J Agric Food Chem* **1999**, 47, pp 4195
- Cooke, D.; Gidley, M.J.; Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate Res* **1992**, 227, pp 103
- Deffenbaugh, L.B.; Walker, C.E.; Comparison of starch pasting properties in the Brabender Viscoamylograph and the Rapid Visco-Analyzer; *Cereal Chem* **1989**, 66, pp 493
- Della Valle, G.; Bouche, Y.; Colonna, P.; Vergnes, B.; The extrusion behaviour of potato starch; *Carbohydrate Polymers* **1995**, 28, pp 255
- Della Valle, G.; Colonna, P.; Patria, A.; Vergnes, B.; Influence of amylose content on the viscous behavior of low hydrated molten starches. *J Rheology* **1996**, 40, pp 347

- Dengate, H. N. Swelling, pasting and gelling of wheat starch. En *Advances in Cereal Science and Technology*; Pomeranz, Y. (Ed.); American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN, 1984; Vol. VI; pp 49-82.
- Deporter, D.A.; Komori, N.; Howley, T.P.; Shiga, A.; Ghent, A.; Hensel, P.; Parisien, K.; Reconstituted bovine skin collagen enhances healing of bone wounds in the rat calvaria; *Calcif Tissue Int* **1988**, 42, pp 321
- Donald, A.M.; Physics of Foodstuffs; *Rep Prog Phys* **1994**, 57, pp 1081
- Endres, M.; Schantz, J.T.; Salgado, A.J.; Kaps, C.; Ringe, J.; Lim, T.C.; Reis, R.L.; Sittinger, M.; Hutmacher, D.W.; Osteogenic Induction of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells in Novel Synthetic Polymer-Hydrogel Matrices; *Tissue Eng* **2003**, 9, pp 689
- Gallant, D.J.; Bouchet, B.; Baldwin, P.M.; Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydr Polym* **1997**, 32, pp 177
- General Tests and Assays—USP24/NF19, Jan. 1, 2000
- Gibson, L.J.; Ashby, M.F.; Cellular solids: structure and properties; UK 1999; Cambridge University Press
- Glenn, G.M.; Irving, D.W.; Starch-Based Microcellular Foams; *Cereal Chemistry* **1995**, 72, pp 155
- Glenn, G.M.; Orts, W.J.; Properties of starch-based foam formed by compression /explosion processing; *Ind Crops and Products* **2001**, 13, pp 135
- Gomes, E.; Reis, R.; Tissue engineering: Key elements and some trends; *Macromolecular Bioscience* **2004**, 4, pp 737
- Gomes, M.E.; Godinho, J.S.; Tchalamov, D.; Cunha, A.M.; Reis, R.L.; Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties; *Mat Sci Eng C* **2002**, 20, pp 19-26
- Gómez, C.; Torres, F.G.; Nakamatsu, J.; Arroyo, O.H.; Thermal and structural analysis of Natural Fibre Reinforced Starch - Based Biocomposites, *Int J Polym Mat* **2006**, 55, pp 893
- Griffin, G.J.L.; U.S. patent No. 4.021.388.
- Gudmundsson, M.; Eliasson, A.C.; Retrogradation of amylopectin and the effects of amylose and added surfactants/emulsifiers; *Carboh Polym* **1990**, 13, pp 295
- Gudmundsson, M.; Retrogradation of starch and the role of its components, *Thermochem Acta* **1994**, 246, pp 329
- Haritos, G.K.; Hager, J.W.; Amos, A.K.; Salkind, M.J.; Wang, A.S.D.; Mesomechanics: the microstructure-mechanics connection; *Int J Solids and Structures* **1988**, 24, pp 1081
- Hasted, J. B.; Aqueous dielectric; Champan and Hall, London, 1973
- Hayes, W.C.; Bouxein, M.L.; Biomechanics of cortical and trabecular bone: Implications for assesment of fracture risk; En: Mow, V.C.; Hayes, W.C.; Ed. Basic orthopaedic biomechanics 1997, New York: Lippincott-Raven
- Hee, M.; Izatt, J.; Swanson, E.; Huang, D.; Schuman, J.; Lin, C.; Puliafito, C.; Fujimoto, J.G.; Optical Coherence Tomography of the Human Retina; *Arch Opthal* **1995**, 113, pp 325
- Hoseney, R.C.; Mason, W.R.; Lai, C.S.; Guetzlaff, J.; Factors affecting the viscosity and structure of extrusion-cooked wheat starch; En: Kokini, J.L.; Ho, C-T.; Karwe, M.V.; Ed.; Food extrusion science and technology; New York, N.Y. Marcel Dekker 1994, Inc. p 277-305
- Hoseney, R.C.; The mixing phenomena; *Cereal Foods World* **1958**, 30, pp 453
- Huang, Q.; Goh, J.C.; Hutmacher, D.W.; Lee, E.H.; *In Vivo* Mesenchymal Cell Recruitment by a scaffold Loaded with Transforming Growth Factor $\beta 1$ and the Potential for *in Situ* Chondrogenesis; *Tissue Eng* **2002**, 8, pp 469
- Hutchinson, R. J.; Siodlak, G. D. E.; Smith, A.C.; *J Mat Sci* **1987**, 22, pp 3956

- Hutmacher, D.W.; Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **2000**, 21, pp 2529
- Hutmacher, D.W.; Schantz, J. T.; Zein, I.; Ng, K. W.; Teoh, S. H.; Tan, K. C.; Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modelling; *J Biomed Mater Res* **2001**, 55, pp 203
- Ibim, S.E.; Ambrosio, A.M.A.; Kwon, M.S.; El-Amin, S.F.; Allcock, H.R.; Laurencin, C.T.; Topographical control of cells; *Biomaterials* **1997**, 18, pp 1565
- Ibim, S.E.; Uhrich, K.E.; Attawia, M.; Shastri, V.R.; El-Amin, S.F.; Bronson, R.; Langer, R.; Laurencin, C.T.; Preliminary in vivo report on the osteocompatibility of poly(anhydride-co-imides) evaluated in a tibial model; *J Biomed Mater Res* **1998**, 43, pp 374
- Jacobson, M.R.; Obanni, M.; Bemiller, J.N.; Retrogradation of starches from different botanical sources, *Carbohydrates* **1997**, 74, pp 511
- Jenkins, P.J.; Donald, A.M.; Gelatinisation of starch: a combined SAXS/WAXS/DSC and SANS study; *Carbohydrate Res* **1998**, 308, pp 133
- Jones, J.R.; Hench, L.L.; Biomedical materials for new millennium: perspective on the future; *Mater Sci Tech* **2001**, 17, pp 891
- K. E. Uhrich. S. E. Ibim, D. R. Larrier, R. Langer, C. T. Laurencin; Chemical changes during in vivo degradation of poly(anhydride-imide) matrices; *Biomaterials* **1998**, 19, pp 2045
- Kim, H.; Smith, J.; Valenti, R.; Bone morphogenetic protein 2-coated porous poly-L-lactic acid scaffolds: release kinetics and introduction of pluripotent C₃H₁₀T1/2 cells; *Tissue Eng* **1998**, 4, pp 35
- Kokini, J.L.; Chang, C.N.; Lai, L.S.; The role of rheological properties on extrudate expansion; En: Kokini, J.L.; Ho, C-T.; Karwe, M.V.; Ed.: Food extrusion science and technology. New York, N.Y.: Marcel Dekker Inc.1992 p 631-53
- Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T.; Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W; *J Biomed Mater Res* **1990**, 24, pp 721
- Korhonen, O.; Pohja, S.; Peltonen, S.; Suihko, E.; Vidgren, M.; Paronen, P.; Ketolainen, J.; Effects of Physical Properties for Starch Acetate Powders on Tableting; *AAPS Pharm Sci Tech* **2002**, 3, pp 34
- Kostopoulos, L.; Karring, T.; Clin, T.; Augmentation of the rat mandible using guided tissue regeneration, *Oral Implants Res* **1994**, 5, pp 75
- Kweon, H.; Yoo, M.K.; Park, I.K.; Lim, T.H.; Lee, H.C.; Lee, H.S.; Oh, J.S.; Akaike, T.; Chi, C.S.; A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering; *Biomaterials* **2003**, 24, pp 801
- Langer, R.; Vacanti, J.P.; Tissue Engineering; *Science* **1993**, 260, pp 920
- Laurencin, C.T.; El-Amin, S.F.; Ibim, S.E.; Willoghby, D.A.; Attawia, M.; Allcock, H.R.; Ambrosio, A.M.A.; A highly porous 3-dimensional polyphosphazene polymer matrix for skeletal tissue regeneration; *J Biomed Mater Res* **1996**, 30, pp 133
- Laurencin, C.T.; Norman, M.E.; Elgendy, H.M.; El-Amin, S.F.; Allcock, H.R.; Pucher, S.R.; Ambrosio, A.M.A.; Use of polyphosphazenes for skeletal tissue regeneration; *J Biomed Mater Res* **1993**, 27, pp 963
- Lin, A.S.P.; Barrows, T.H.; Cartmell, S.H.; Guldborg, R.E.; Microarchitectural and mechanical characterisation of oriented porous polymer scaffolds; *Biomaterials* **2003**, 24, pp 481
- Lu, L.; Mikos, A.; The importance of new processing techniques in tissue engineering; *MRS Bulletin* **1996**, 21, pp 28
- Malafaya, P.B.; Elvira, C.; Gallardo, A.; San Román, J.; Reis, R.L.; Porous starch-based drug delivery systems processed by a microwave route; *J Biomater Sci Polym* **2001**, 12, pp 1227
- Maroulis, Z.B.; Shah, K.; Saravacos, G.D.; Thermal Conductivity of Gelatinized Starches; *J Food Sci* **1991**, 56, pp 773

Maspero, F.A.; Ruffieux, K.; Müller, B.; Wintermantel, E.; Resorbable Defect Analog PLGA Scaffolds using CO₂ as Solvent: Structural Characterization; *J Biomed Mater Res* **2002**, 62, pp 89

Maxwell, J.C.; On the calculation of the equilibrium and stiffness of frames; *Philos Mag* **1864**, 27, pp 294

McDonough, W.G.; Amis, E.J.; Kohn, J.; Critical Issues in the Characterization of Polymers for Medical Applications; NISTIR- 6535 (NIST, Gaithersburg, MD, 2000)

Microwave processing of materials, Committee on Microwave Processing of Materials: An Emerging Industrial Technology, Commission on Engineering and Technical Systems, National Research Council, 1994

Müller, R.; Hahn, M.; Vogel, M.; Delling, G.; Rüeegser P.; Morphometric Analysis of Noninvasively Assessed Bone Biopsies: Comparison of High-Resolution Computed Tomography and Histologic Sections; *Bone* **1996**, 18, pp 215

Müller, R.; Matter, S.; Neuenschwander, P.; Suter, U.W.; Rüeegser, P.; 3-D Micro-Tomographic Imaging and Quantitative Morphometry for the Nondestructive Evaluation of Porous Biomaterials; En Briber, R.M.; Pfeiffer, D.G.; Han, C.C.; Ed.; Morphological Control in Multiphase Polymer Mixtures; *Mat Res Soc* 1997, 461, pp 217

Murata, M.; Huang, B.Z.; Shibata, T.; Imai, S.; Nagai, N.; Arisue, M.; Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone; *Int J Oral Maxillofac Surg* **1999**, 28, pp 232

Nakamatsu, J.; Torres, F.G.; Troncoso, O.P.; Lin, Y.M.; Boccaccini, A.R.; Processing and Characterisation of Porous Structures from Chitosan and Starch for Tissue Engineering Scaffolds; *Biomacromolecules*, In Press

Nazarov, R.; Jin, H.; Kaplan, D.L.; Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin; *Biomacromolecules* 2004, 5, 718

Ndife, M.K.; Sumnu, G.; Bayindirli, L.; Dielectric properties of six different species of starch at 2450MHz, *Food Res Int* **1998**, 31, pp 43

Nelson, S.O.; Lawrence, K.C.; Prakash, A.; Moisture and Temperature Dependence of the Permittivities of Some Hydrocolloids at 2.45 GHz; *J Microwave Power* **1991**, 26, pp 178

Olurin, O.B.; Arnold, M.; Körner, C.; Singer, R.F.; The investigation of morphometric parameters of aluminium foams using micro-computed tomography; *Mat Sci Eng* **2002**, A328, pp 334

Ostertag, C.F.; *World production and marketing of starch*. Mimeo. CIAT, Colombia, 1993.

Park, Y.J.; Lee, Y.M.; Park, S.N.; Sheen, S.Y.; Chung, C.P.; Lee, S.J.; Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration; *Biomaterials* **2000**, 21, pp 153

R.C. Metazas, R.J. Meredith; Industrial microwave heating; Peter Peregrinus Ltd.; London, 1988

Reis, R.L.; Polymers in Tissue engineering: Basic principles and characterization requirements, ANTEC 2002, Plastics Virtual Gold, Soc. Plastics Eng., San Francisco, USA, May, (2002)

Rezania, A.; Healy, K.E.; The effect of peptide surface density on mineralization of a matrix deposited by osteogenic cells; *J Biomed Mater Res* **2000**, 52, pp 595

Risman, P.O.; Hur fungerar mikrovägsugnen? *Vår Föda* **1989**, 41, pp 172

Ryynänen, S.; The electromagnetic properties of food materials: a review of the basic principles; *J Food Eng* **1995**, 26, pp 409

Sachlos, E.; Reis, N.; Ainsley, C.; Derby, B.; Czernuszka, J.T.; Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication; *Biomaterials* **2003**, 24, pp 1487

Salgado, A.J.; Coutinho, O.P.; Reis, R.L.; Novel Starch-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Cytotoxicity, Cell Culture, and Protein Expresión; *Tissue Eng* **2004**, 10, pp 465

Salgado, A.J.; Gomes, M.E.; Chou, A.; Coutinho, O.P.; Reis, R.L.; Hutmacher, D.W.; Preliminary study on the adhesion and proliferation of human osteoblasts on starch-based scaffolds; *Mater Sci Eng C* **2002**, 20, pp 27

- Saltiel, C; Datta, A.K.; Heat and mass transfer in microwave processing; *Advances in heat transfer* **1999**, 33, pp 1
- Schwartzberg, H.G.; Wu, J.P.; Nussinovitch, A.; Mugerwa, J.; Modelling deformation and flow during vapor-induced puffing; *J Food Eng* **1995**, 25, pp 329
- Shantz, J.T.; Hutmacher, D.W.; Chim, H.; Ng, K.W.; Lim, T.C.; Teoh, S.H.; Induction of ectopic bone formation by using human periosteal cells in combination with a novel scaffold technology; *Cell Transplant* **2002**, 11, pp 125
- Shantz, J.T.; Hutmacher, D.W.; Ng, K.W.; Khor, H.L.; Lim, T.C.; Teoh, S.H.; Evaluation of a Tissue Engineered Membrane-Cell Construct for Guided Bone Regeneration; *Int J Oral Maxillof Implant* **2002**, 17, pp 161
- Shi, Y.C.; Seib, P.A.; The structure of four waxy starches related to gelatinization and retrogradation; *Carboh Res* **1992**, 227, pp 131
- Shogren, R.L.; Lawton, J.W.; Doane, W.M.; Tiefenbacher, K.F.; Structure and morphology of baked starch foams; *Polymer* **1998**, 39, pp 6649
- Shogren, R.L.; Preparation, thermal properties, and extrusion of high-amylose starch acetates; *Carbohydrate Polymers* **1996**, 29, pp 57
- Skalak, R.; Fox, C.F.; (Eds) *Tissue Engineering*; Liss, New York, 1998
- Stepito, R.F.T.; The processing of starch as a thermoplastic; *Macromol. Symp* **2003**, 201, pp 203
- Stuchly, S.S.; Dielectric properties of some granular solids containing water; *J Microwave power* **1973**, 8, pp 3
- Swinkels, J.J.M.; Sources of starch, its chemistry and physics. En: *Starch Conversion Technology*. van Beynum, G.M.A. and Roels, J.A. (Eds.) Marcel Dekker. Inc., New York, 1985,15
- Tjia, J.; Moghe, P., Analysis of 3-D Microstructure of Porous Poly(lactide-glycolide) Matrices using Confocal Microscopy; *J Biomed Mat Res* **1998**, 43, pp 291
- Tolaimate, A.; Desbrieres, J.; Rhazi, M.; Alagui, A.; Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties; *Polymer* **2003**, 44, pp 7939
- Torres, F.G.; Arroyo, O.H.; Grande, C.; Esparza, E.; Study of bio- and photo-degradation of Natural Fibre Reinforced Starch - Based Biocomposites, *Int J Polym Mat* **2006**, 55, pp 1115
- Torres, F.G.; Boccaccini, A.R.; Troncoso, O.P.; Microwave Processing of Starch- and Protein-based Porous Structures for Tissue Engineering Scaffolds; *J Appl Polym Sci* , In press
- Torres, F.G.; Díaz, R.; Characterisation of natural fibre reinforced thermoplastics processed by extrusion, compression and rotational moulding; *Polym Polym Compos* **2004**, 12, pp 705
- Ueda, H.; Hong, L.; Yamamoto, M.; Shigeno, K.; Inoue, M.; Toba, T.; Yoshitani, M.; Nakamura, T.; Tabata, Y.; Shimizu, Y.; Use of collagen sponge incorporating transforming growth factor- β 1 to promote bone repair in skull defects in rabbits; *Biomaterials* **2002**, 23, pp 1003
- Van Oosterwijck, H.; Duyck, J.; Vander Sloten, J.; Van Der Perre, G.; Jansen, J.; Wevers, M.; Naert, I.; The Use of Microfocus Computerized Tomography as a New Technique to Characterize Bone Tissue Around Oral Implants; *J Oral Implantology* **2000**, 26, pp 5
- van Soest, J.J.G.; Borger, D.B.; Structure and properties of compression-molded thermoplastic starch materials from normal and high-amylose maize starches; *J Appl Polym Sci* **1997**, 64, pp 631
- Wang, L.J.; Ganjyal, G.M.; Jones, D.D.; Weller, C.L.; Hanna, M.A.; Modelling of bubble growth dynamics and non-isothermal expansion in starch-based foam during extrusion; *Adv Polym Tech* **2005**, 24, pp 29
- Wang, W.; Flores, R.A.; Huang, C.T.; Physical properties of two biological cushioning materials from wheat and corn starches. *Cereal Chem* **1995**, 72, pp 38

Washburn, N.R.; Simon, C.G.; Tona, Jr.A.; Elgendy, H.M.; Karim, A.; Amis, E.J.; Co-extrusion of biocompatible polymers for scaffolds with co-continuous morphology; *J Biomed Mater Res* **2002**, 60, pp 20

Whang, K.; Healy, K.E.; Elenz, D.R.; Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture; *Tissue Eng* **1999**, 5, pp 35

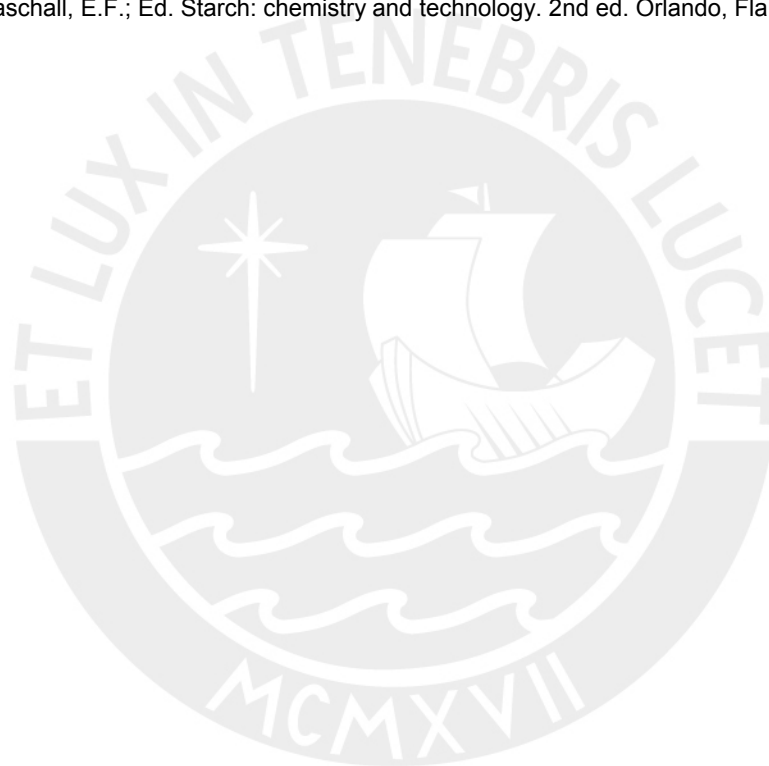
Willett, J. L.; Shongren, R. L.; *Polymer* **2002**, 43, pp 5935

Zein, I.; Hutmacher, D.W.; Tan, K.C.; Teoh, S.H.; Poly(e-caprolactone) Scaffolds Designed and Fabricated by Fused Deposition Modelling; *Biomaterials* **2002**, 23, pp 1169

Zhang, M.; Haga, A.; Sekiguchi, H.; Hirano, S.; Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia; *Int J Bio Macromol* **2000**, 27, pp 99

Zhao, F.; Yin, Y.; Lu, W.W.; Leong, J.C.; Zhang, W.; Zhang, J.; Zhang, M.; Yao, K.; Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds; *Biomaterials* **2002**, 23, pp 3227

Zobel, H.F.; Starch gelatinization and mechanical properties; En: Whstler, R.L.; BeMiller J.N.; Paschall, BeMiller J.N.; Paschall, E.F.; Ed. Starch: chemistry and technology. 2nd ed. Orlando, Fla.: Academic Press Inc. p 300-2



Diagramas de Voronoi

Los diagramas de Voronoi son una clase de descomposición del espacio en la que éste es dividido de acuerdo a las distancias a cierto grupo de puntos fijos. Cada celda de Voronoi contiene todos aquellos puntos del espacio que están más cercanos a un punto fijo llamado centro.

Diagramas de Voronoi en una dimensión

Si tomamos una línea y en ella fijamos los centros P , las celdas resultantes estarán limitadas por el punto medio entre los centros, como se observa en la Fig. A1-1. De esta forma los puntos que pertenecen a la celda cuyo centro es P , serán los puntos más cercanos al centro P .

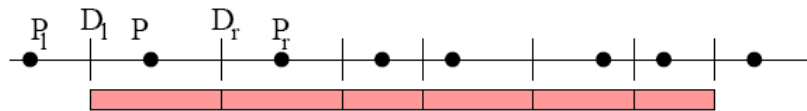


Fig. A1- 1 Construcción de las celdas de Voronoi en una dimensión

Diagramas de Voronoi en dos dimensiones

El espacio que se divide es un plano. Dados los centros del plano, podemos trazar los límites de las celdas trazando perpendiculares en los puntos medios de las líneas que unen los centros. Como se observa en la Fig. A1-2 el espacio queda dividido en celdas cuyos puntos son los que se encuentran más cercanos a los centros.

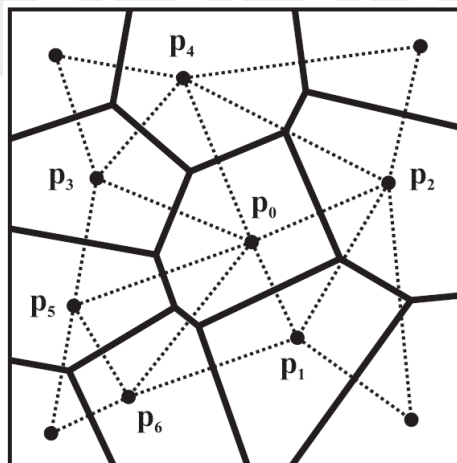


Fig. A1- 2 Construcción de las celdas de Voronoi en dos dimensiones

Espumas de Voronoi

Muchas veces en los procesos de espumado un gas se usa como agente porógeno en un medio líquido. Las burbujas de gas nuclean y crecen a través del líquido

inicialmente como esferas pero después como celdas poliédricas [Fig. A1-3]. Si las burbujas nuclean de manera aleatoria en el espacio pero al mismo tiempo con la misma tasa de crecimiento, la estructura resultante es llamada espuma de Voronoi. Las celdas poliédricas están centradas en los puntos de nucleación y contienen todos los puntos que están más cercas al punto de nucleación que a cualquier otro.

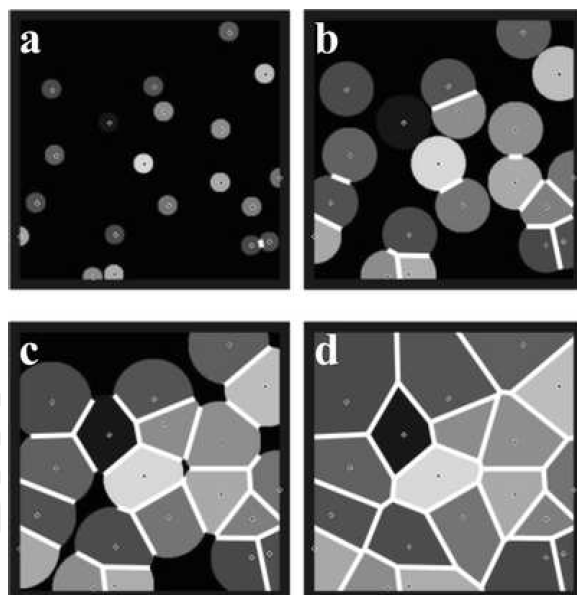


Fig. A1- 3 Crecimiento de las celdas en espumas de Voronoi [1]

De esta forma podemos concluir que cuando se forma una estructura de Voronoi las celdas tienen formas poliédricas y una determinada distribución de tamaños.

Referencias

- [1] Jári-Szabó, F.; Néda, Z.; On the size distribution of Poisson Voronoi cells; condmat/0406116.

Mediciones del Tamaño de Poros

Se presentan a continuación las tablas de las mediciones de los tamaños de poros con las cuales se elaboraron las desde la Fig. 4- 3 hasta la Fig. 4- 9; y las Fig. 4- 14, 15 y 16.

Papa 50% - Agua 50%			0.444	0.722	0.583
			0.556	1.278	0.917
Muestra 1			0.639	0.778	0.708
			0.444	1.500	0.972
			0.556	0.944	0.750
Mínimo (mm)	Máximo (mm)	Radio (mm)	0.222	0.278	0.250
0.278	0.500	0.389	0.306	0.444	0.375
0.333	0.444	0.389	0.139	0.222	0.181
0.944	1.500	1.222	0.111	0.250	0.181
0.833	1.111	0.972	0.222	0.361	0.292
0.222	0.444	0.333	0.139	0.389	0.264
0.417	0.417	0.417	0.389	0.528	0.458
0.222	0.444	0.333	0.639	0.667	0.653
0.139	0.389	0.264	0.278	0.361	0.319
0.694	0.750	0.722	0.278	0.722	0.500
0.194	0.361	0.278	0.194	0.611	0.403
0.833	1.222	1.028	0.528	0.722	0.625
0.222	0.306	0.264	0.111	0.333	0.222
0.722	0.861	0.792	0.500	0.944	0.722
0.389	0.528	0.458	0.833	1.278	1.056
0.333	0.444	0.389	0.389	0.611	0.500
0.306	0.722	0.514	0.833	1.111	0.972
0.222	0.278	0.250	0.222	0.389	0.306
1.667	2.611	2.139	0.528	0.889	0.708
0.278	0.556	0.417	0.167	0.167	0.167
0.222	0.333	0.278	0.194	0.667	0.431
0.444	0.556	0.500	0.389	1.000	0.694
0.167	0.222	0.194	0.278	0.278	0.278
0.222	0.389	0.306	1.444	1.444	1.444
0.194	0.278	0.236	0.944	2.611	1.778
0.333	0.611	0.472	0.278	0.444	0.361
0.167	0.389	0.278	1.167	1.556	1.361
0.111	0.139	0.125	1.167	1.611	1.389
0.333	0.528	0.431	0.222	0.444	0.333
0.056	0.194	0.125	0.167	0.556	0.361
0.389	0.611	0.500	0.222	0.611	0.417
0.278	0.444	0.361	0.333	0.639	0.486
0.389	0.861	0.625	0.278	0.444	0.361
0.111	0.167	0.139	0.500	1.111	0.806
0.194	0.222	0.208	0.167	0.222	0.194
1.333	1.944	1.639	0.611	1.611	1.111
0.389	0.472	0.431	0.389	1.000	0.694
0.778	1.111	0.944	1.111	2.056	1.583
0.222	0.444	0.333	0.500	0.750	0.625
0.111	0.194	0.153	1.111	2.222	1.667
0.389	0.556	0.472	0.139	0.222	0.181

0.833	1.444	1.139	0.556	0.556	0.556
0.639	0.861	0.750	0.167	0.944	0.556
0.278	0.611	0.444	0.611	1.056	0.833
0.278	0.472	0.375	0.667	1.389	1.028
0.278	0.444	0.361	1.389	1.778	1.583
0.556	0.722	0.639	0.167	0.278	0.222
0.556	0.722	0.639	0.278	0.722	0.500
1.000	1.444	1.222	0.167	0.389	0.278
0.889	1.000	0.944	0.333	0.389	0.361
0.250	0.278	0.264	0.278	0.500	0.389
0.722	1.667	1.194	0.222	0.250	0.236
1.111	1.111	1.111	0.111	0.278	0.194
0.389	0.667	0.528	0.444	0.500	0.472
0.667	1.556	1.111	0.167	0.500	0.333
0.222	0.333	0.278	0.167	0.444	0.306
0.500	0.944	0.722	0.278	0.611	0.444
2.444	3.778	3.111	0.389	0.667	0.528
0.278	0.611	0.444	1.167	2.389	1.778
0.278	0.444	0.361	0.111	0.333	0.222
0.333	0.389	0.361	0.139	0.278	0.208
0.444	1.056	0.750	0.167	0.222	0.194
1.000	1.333	1.167	0.333	0.389	0.361
0.278	0.333	0.306	0.333	1.056	0.694
0.167	0.278	0.222	0.556	0.833	0.694
0.333	0.944	0.639	0.167	0.222	0.194
0.889	1.667	1.278	0.167	0.222	0.194
0.361	0.417	0.389	0.667	0.944	0.806
0.639	0.944	0.792	0.333	0.556	0.444
0.139	0.389	0.264	0.361	0.472	0.417
0.278	0.556	0.417	0.333	0.556	0.444
0.222	0.222	0.222	0.333	1.278	0.806
0.444	1.056	0.750	0.556	1.611	1.083
0.222	0.778	0.500	0.167	0.389	0.278
0.167	0.556	0.361	0.111	1.000	0.556
0.278	0.444	0.361	0.278	0.278	0.278
0.444	0.667	0.556	0.167	0.167	0.167
2.389	2.889	2.639	0.083	0.222	0.153
2.000	2.889	2.444	0.111	0.167	0.139
0.556	0.889	0.722	0.333	1.167	0.750
0.222	0.278	0.250	0.833	1.444	1.139
0.278	0.667	0.472	0.222	0.389	0.306
0.278	0.833	0.556	0.222	0.389	0.306
0.333	0.778	0.556	0.333	0.917	0.625
0.222	0.556	0.389	0.333	0.444	0.389
0.389	0.472	0.431	0.111	0.444	0.278
0.556	0.833	0.694	1.000	1.500	1.250
0.194	0.333	0.264	0.278	1.167	0.722
0.278	0.389	0.333	0.833	1.389	1.111
0.194	0.389	0.292	0.167	0.278	0.222
0.278	0.556	0.417			
0.444	1.167	0.806			
0.278	0.444	0.361			
0.444	1.556	1.000			
2.500	3.889	3.194			

Muestra 2			1100	800	950
Máximo (um)	Mínimo (um)	Promedio (um)	2400	1600	2000
			1600	500	1050
500	500	500			
1100	700	900			
700	500	600			
900	400	650			
1100	500	800			
500	300	400			
400	300	350			
200	200	200			
700	700	700			
1400	1200	1300			
800	600	700			
600	400	500			
1900	1200	1550			
3000	2200	2600			
500	400	450			
1300	600	950			
1000	800	900			
1000	600	800			
1000	1000	1000			
1400	600	1000			
900	700	800			
1800	1200	1500			
1500	900	1200			
2600	2000	2300			
1900	1400	1650			
1400	1100	1250			
2200	1200	1700			
1400	700	1050			
600	300	450			
600	400	500			
1000	900	950			
500	300	400			
500	300	400			
1200	700	950			
700	300	500			
700	400	550			
1200	1100	1150			
1400	1200	1300			
1200	700	950			
1100	800	950			
1200	900	1050			
800	500	650			
500	400	450			
1600	1400	1500			
2200	1400	1800			
600	400	500			
1100	600	850			
1000	600	800			
800	400	600			
400	200	300			

Muestra 3		
Máximo (um)	Mínimo (um)	Promedio (um)
600	600	600
1000	900	950
600	500	550
600	400	500
600	400	500
800	600	700
400	300	350
800	600	700
1200	700	950
1100	900	1000
700	600	650
900	600	750
900	600	750
800	600	700
700	500	600
400	400	400
400	400	400
600	300	450
1200	400	800
1000	500	750
500	300	400
600	300	450
1200	800	1000
2000	900	1450
1600	1000	1300
778	444	611
778	389	583
1444	1111	1278
889	889	889
778	556	667
1278	667	972
1222	1111	1167
778	389	583
1278	889	1083
1056	722	889
778	556	667
2389	1556	1972
556	444	500
1111	778	944
1278	667	972
1000	444	722
1333	778	1056
1333	722	1028
778	444	611
833	500	667
1556	1000	1278

556	389	472	400	400	400
778	444	611	800	800	800
222	222	222	1000	600	800
222	167	194	400	200	300
2000	889	1444	400	400	400
444	222	333	600	400	500
667	444	556	700	400	550
444	222	333	900	400	650
667	667	667	700	300	500
1556	1111	1333	1500	600	1050
1667	1222	1444	800	700	750
333	278	306	900	600	750
444	222	333	500	400	450
889	333	611	1600	600	1100
1333	444	889	1000	600	800
889	278	583	1100	1400	1250
1111	889	1000	600	300	450
1000	389	694	800	400	600
778	444	611	700	400	550
444	222	333	400	200	300
444	222	333	2800	1300	2050
1222	278	750	800	500	650
667	444	556	800	600	700
778	556	667	1400	1000	1200
1111	889	1000	800	400	600
1000	889	944	1400	600	1000
667	333	500	800	400	600
778	444	611	600	200	400
1111	778	944	1500	1000	1250
333	333	333	1400	1200	1300
2000	1000	1500	1700	800	1250
1222	667	944	600	400	500
778	778	778	1000	800	900
278	278	278	1600	600	1100
556	333	444	600	300	450
1111	556	833	800	400	600
1111	444	778	400	400	400
			800	700	750
			2100	1200	1650
			1600	500	1050
			600	600	600
			800	400	600
			1100	400	750
			1000	600	800
			800	500	650
			600	500	550
			1400	600	1000
			2200	1000	1600
			1000	600	800
			1100	400	750
			900	400	650
			1200	400	800
			1500	600	1050
			400	400	400
Muestra 2					
Máximo (um)	Mínimo (um)	Promedio (um)			
1000	800	900			
500	400	450			
600	400	500			
1200	1000	1100			
800	500	650			
900	400	650			
800	700	750			
2200	1800	2000			
600	400	500			
800	400	600			
1400	800	1100			
1200	900	1050			

400	400	400	1000	1000	1000
1200	400	800	1200	700	950
800	600	700	1100	800	950
500	400	450	1600	1200	1400
700	600	650	1300	1200	1250
700	400	550	1000	700	850
800	400	600	1000	400	700
1100	500	800	800	600	700
600	400	500	1400	600	1000
1000	400	700	1600	500	1050
600	400	500	1000	800	900
			1400	1200	1300
			900	900	900
Muestra 3			1400	800	1100
			1400	600	1000
Máximo (um)	Mínimo (um)	Promedio (um)	800	400	600
			1400	1100	1250
2000	600	1300	600	400	500
600	400	500	500	300	400
800	600	700	600	400	500
600	500	550	500	400	450
600	500	550	400	400	400
2500	1800	2150	1000	600	800
1200	700	950	1200	800	1000
800	400	600	1200	400	800
1200	600	900			
2000	1000	1500			
1600	700	1150			
1500	700	1100			
2400	1900	2150			
1000	400	700			
800	400	600			
1800	1000	1400			
600	600	600			
400	400	400			
1000	800	900			
1800	1000	1400			
1300	1300	1300			
1100	800	950			
800	300	550			
1400	1200	1300			
800	400	600			
1600	600	1100			
1400	600	1000			
1300	800	1050			
1100	800	950			
1000	600	800			
500	500	500			
1600	800	1200			
2200	1400	1800			
1400	600	1000			
2000	1400	1700			
1200	1200	1200			
1000	600	800			

Papa 30% - Agua 70%			600	400	500
			1600	700	1150
Muestra 1			2200	800	1500
			600	500	550
			1600	1400	1500
Máximo (um)	Mínimo (um)	Promedio (um)			
800	300	550			
1000	800	900			
1100	700	900			
1200	400	800			
1600	400	1000			
800	600	700			
900	400	650			
1400	500	950			
1200	600	900			
1100	500	800			
1000	500	750			
400	400	400			
500	400	450			
600	300	450			
600	400	500			
700	500	600			
600	200	400			
900	400	650			
400	400	400			
700	400	550			
1600	1400	1500			
600	200	400			
1000	400	700			
1200	400	800			
1400	500	950			
1400	600	1000			
1500	1300	1400			
800	400	600			
500	400	450			
1100	800	950			
900	500	700			
900	300	600			
700	400	550			
1000	400	700			
800	400	600			
600	500	550			
2400	1200	1800			
2500	1200	1850			
600	400	500			
1300	900	1100			
600	400	500			
1600	600	1100			
400	300	350			
1600	1200	1400			
1000	600	800			
1100	800	950			
1400	1000	1200			
1000	600	800			

Muestra 2			Máximo (um)	Mínimo (um)	Promedio (um)
			600	400	500
			600	400	500
			800	400	600
			1400	800	1100
			700	400	550
			400	200	300
			800	300	550
			500	400	450
			900	600	750
			700	600	650
			1000	600	800
			600	400	500
			400	200	300
			1200	900	1050
			1100	900	1000
			1600	1400	1500
			1200	1000	1100
			700	400	550
			1400	1300	1350
			800	400	600
			1000	800	900
			1400	400	900
			1000	600	800
			800	400	600
			1000	800	900
			1200	700	950
			1000	700	850
			1800	1200	1500
			600	600	600
			600	400	500
			1100	700	900
			1800	800	1300
			500	200	350
			1200	1200	1200
			1900	1100	1500
			1000	700	850
			900	400	650
			800	600	700
			800	400	600
			800	400	600
			400	400	400
			500	400	450
			1800	1400	1600
			2000	1000	1500

2000	1400	1700	1200	600	900
500	300	400	600	400	500
400	400	400	1600	300	950
1800	1000	1400	1100	400	750
1000	600	800	500	400	450
800	600	700	500	300	400
1000	300	650	700	300	500
1100	700	900	1300	500	900
900	600	750	900	600	750
1200	800	1000	1300	800	1050
1000	800	900	600	500	550
1000	400	700	700	300	500
1600	1200	1400	1000	400	700
1500	600	1050	1200	600	900
1000	500	750	500	400	450
1200	800	1000	1100	400	750
700	400	550	800	400	600
1000	700	850	500	400	450
800	400	600	1100	300	700
1100	900	1000	700	400	550
800	400	600	1200	900	1050
1200	1200	1200	600	300	450
2200	1800	2000	2200	500	1350
			2000	1000	1500

Muestra 3

Máximo (um)	Mínimo (um)	Promedio (um)
2000	2000	2000
600	600	600
500	400	450
700	400	550
1200	500	850
1200	1000	1100
1200	800	1000
1800	1300	1550
900	700	800
500	400	450
1800	1200	1500
1000	600	800
1800	900	1350
1100	900	1000
3000	1000	2000
1100	1000	1050
2200	1800	2000
1900	1500	1700
1600	400	1000
2000	1000	1500
1400	1200	1300
800	600	700
1000	400	700
400	200	300
1200	700	950

Maíz 50% - Agua 50%			225	150	187.5
Muestra 1			75	50	62.5
Máximo (um)	Mínimo (um)	Promedio (um)	400	300	350
			300	200	250
			225	75	150
			575	250	412.5
150	150	150	112.5	50	81.25
175	100	137.5	37.5	37.5	37.5
225	75	150	62.5	50	56.25
300	200	250	75	25	50
100	50	75	175	50	112.5
112.5	50	81.25	200	50	125
375	150	262.5	200	50	125
375	100	237.5	500	125	312.5
200	87.5	143.75	75	25	50
375	125	250	250	100	175
525	100	312.5	300	125	212.5
175	100	137.5	225	125	175
187.5	100	143.75	125	100	112.5
475	200	337.5	175	100	137.5
150	50	100	375	225	300
150	50	100	175	87.5	131.25
125	75	100	225	50	137.5
150	87.5	118.75	150	50	100
250	150	200	425	275	350
475	275	375	200	125	162.5
75	25	50	187.5	137.5	162.5
200	100	150	250	225	237.5
450	375	412.5	200	175	187.5
62.5	37.5	50	450	125	287.5
175	62.5	118.75	275	275	275
100	62.5	81.25	200	50	125
325	200	262.5	450	200	325
50	50	50	300	125	212.5
50	37.5	43.75	750	550	650
250	200	225	275	150	212.5
87.5	50	68.75	100	50	75
87.5	62.5	75	125	50	87.5
275	125	200	200	75	137.5
225	200	212.5	200	150	175
450	125	287.5	150	100	125
225	100	162.5	175	150	162.5
200	150	175	200	50	125
225	100	162.5	250	50	150
150	75	112.5	100	50	75
125	75	100	100	62.5	81.25
250	125	187.5	325	75	200
375	200	287.5	300	275	287.5
250	75	162.5	100	100	100
475	175	325	275	150	212.5
325	125	225	175	150	162.5
525	300	412.5	250	200	225
75	75	75	325	200	262.5
50	37.5	43.75	225	150	187.5

350	200	275	159	91	125
87.5	50	68.75	227	91	159
275	75	175	250	114	182
187.5	75	131.25	386	341	364
125	100	112.5	386	136	261
500	350	425	886	182	534
450	325	387.5	182	114	148
300	100	200	409	114	261
175	100	137.5	386	227	307
175	100	137.5	659	205	432
200	150	175	1068	273	670
275	175	225	205	136	170
325	100	212.5	159	91	125
225	100	162.5	205	136	170
275	200	237.5	227	159	193
125	100	112.5	409	227	318
375	175	275	273	114	193
175	100	137.5	409	182	295
225	75	150	250	227	239
400	100	250	364	205	284
175	100	137.5	318	136	227
300	150	225	205	136	170
150	100	125	318	159	239
200	50	125	227	136	182
250	175	212.5	432	159	295
475	200	337.5	477	136	307
550	375	462.5	364	159	261
			227	159	193
			682	136	409
Muestra 2			205	91	148
			432	159	295
Máximo (um)	Mínimo (um)	Promedio (um)	182	114	148
			318	159	239
217	133	175	227	114	170
267	117	192	227	114	170
267	150	208	318	273	295
400	117	258	409	182	295
267	133	200	295	182	239
400	133	267	273	159	216
450	167	308	545	318	432
400	183	292	500	318	409
333	233	283	295	250	273
433	217	325	227	114	170
367	250	308	614	182	398
367	300	333	227	182	205
267	167	217	364	114	239
300	117	208	295	159	227
150	100	125	341	91	216
227	114	170	250	136	193
432	182	307	273	182	227
318	136	227	432	205	318
455	250	352	182	159	170
432	318	375			
182	91	136			

Muestra 3						
Máximo (um)	Mínimo (um)	Promedio (um)				
			167	133	150	
			167	83	125	
			167	100	133	
			250	133	192	
	250	115	183	117	150	
	308	192	250	22	65	
	423	192	308	43	98	
	500	327	413	43	82	
	192	96	144	283	65	174
	442	192	317	326	141	234
	654	173	413	98	65	82
	308	96	202	152	65	109
	173	135	154	65	43	54
	269	96	183	65	33	49
	654	154	404	141	87	114
	96	38	67	196	98	147
	231	135	183	65	33	49
	250	135	192	217	152	185
	231	115	173	283	250	266
	385	135	260	120	87	103
	231	115	173	152	43	98
	250	77	163			
	212	192	202			
	731	212	471			
	288	173	231			
	385	135	260			
	577	346	462			
	308	192	250			
	167	133	150			
	183	83	133			
	200	100	150			
	200	117	158			
	233	83	158			
	233	117	175			
	233	167	200			
	217	100	158			
	167	100	133			
	250	133	192			
	133	133	133			
	333	117	225			
	567	150	358			
	417	167	292			
	467	133	300			
	467	267	367			
	233	83	158			
	367	200	283			
	383	267	325			
	100	50	75			
	333	200	267			
	300	167	233			
	450	200	325			
	267	233	250			
	417	150	283			
	500	150	325			

Maíz 40% - Agua 60%			1071	464	768
			179	71	125
Muestra 1			179	107	143
			107	107	107
			1214	714	964
Máximo (um)	Mínimo (um)	Promedio (um)	250	107	179
433	333	383	321	107	214
267	233	250	286	107	196
500	133	317	143	71	107
400	333	367	250	71	161
167	167	167	179	71	125
83	67	75	643	143	393
267	100	183	464	143	304
233	133	183	714	714	714
233	100	167	179	54	116
267	133	200	179	89	134
400	100	250	893	821	857
200	167	183	286	89	188
400	333	367	571	286	429
367	400	383	357	179	268
333	167	250	357	107	232
600	133	367	179	107	143
167	67	117	536	357	446
500	267	383	357	179	268
667	333	500	286	179	232
433	333	383	250	179	214
367	167	267	429	357	393
433	167	300	179	143	161
300	133	217	107	71	89
500	133	317	393	286	339
333	200	267	250	179	214
500	167	333	714	357	536
333	167	250	167	104	135
500	267	383	1250	625	938
267	267	267	1042	917	979
233	200	217	833	417	625
167	117	142	208	167	188
933	500	717	333	208	271
267	67	167	417	208	313
200	167	183	542	417	479
367	133	250	542	208	375
300	167	233	104	63	83
367	200	283	250	83	167
733	167	450	125	83	104
533	233	383	625	583	604
400	367	383	208	83	146
667	567	617	333	167	250
400	267	333	250	83	167
433	300	367	292	167	229
367	133	250	167	83	125
357	71	214	250	83	167
143	71	107	417	333	375
107	71	89	375	250	313
143	71	107	333	208	271

958	500	729	156	125	141
958	500	729	250	156	203
833	83	458	188	125	156
417	208	313	156	94	125
333	250	292	172	125	148
208	125	167	313	109	211
833	625	729	313	188	250
917	625	771	344	188	266
625	208	417	357	179	268
417	208	313	714	214	464
792	417	604	357	179	268
375	208	292	714	321	518
			357	143	250
			214	107	161
			250	107	179
Muestra 2			214	71	143
			500	179	339
Máximo (um)	Mínimo (um)	Promedio (um)	143	71	107
			250	71	161
135	58	96	786	357	571
115	96	106	321	286	304
250	154	202	250	143	196
250	154	202	286	143	214
212	154	183	429	214	321
327	115	221	429	429	429
192	135	163	1071	571	821
269	77	173	571	286	429
308	77	192	429	214	321
308	154	231	214	143	179
365	77	221	464	250	357
250	192	221	821	321	571
269	154	212	893	357	625
135	77	106	607	286	446
115	96	106	500	214	357
192	115	154	393	107	250
231	135	183	286	143	214
318	91	205	769	269	519
205	159	182	385	231	308
159	114	136	538	154	346
386	136	261	808	654	731
295	159	227	423	231	327
205	136	170	731	385	558
159	182	170	423	346	385
182	91	136	231	231	231
114	68	91	769	654	712
205	136	170	385	231	308
182	136	159	538	231	385
364	136	250	538	346	442
500	136	318	538	192	365
114	136	125	462	192	327
313	203	258	346	231	288
469	313	391	731	538	635
406	188	297	846	385	615
500	156	328	1077	577	827

750	625	688	300	140	220
500	125	313	160	80	120
469	313	391	100	80	90
625	406	516	80	40	60
625	563	594	120	50	85
875	500	688	30	30	30
625	563	594	60	40	50
750	469	609	20	40	30
844	656	750	100	40	70
969	625	797	320	120	220
500	438	469	420	360	390
313	188	250	120	80	100
469	438	453	240	100	170
875	688	781	100	50	75
719	375	547	180	60	120
844	500	672	300	200	250
406	281	344	140	60	100
719	500	609	100	40	70
625	469	547	300	160	230
750	188	469	120	80	100
			240	140	190
			160	100	130
			150	60	105
			80	40	60
			70	50	60
Camote 50% - Agua 50%			440	300	370
			240	180	210
Muestra 1			120	80	100
			160	100	130
			220	160	190
Máximo (um)	Mínimo (um)	Promedio (um)	80	70	75
100	80	90	380	120	250
100	80	90	140	120	130
380	160	270	120	80	100
50	30	40	50	40	45
80	40	60	140	60	100
140	40	90	90	40	65
120	40	80	180	140	160
60	30	45	60	40	50
80	30	55	200	80	140
70	50	60	120	80	100
140	40	90	160	80	120
240	60	150	260	180	220
50	40	45	360	100	230
70	40	55	260	80	170
70	40	55	100	80	90
80	50	65	100	60	80
140	80	110	80	40	60
180	140	160	80	40	60
260	180	220	440	100	270
80	60	70	240	180	210
140	80	110	380	260	320
320	160	240	120	80	100
160	120	140	50	40	45

365	231	298	257	157	207
327	231	279	200	114	157
231	154	192	286	129	207
235	176	206	71	57	64
176	59	118	143	129	136
471	353	412	171	186	179
206	147	176	229	143	186
471	382	426	186	114	150
324	235	279	243	143	193
265	235	250	314	229	271
118	88	103	543	257	400
118	88	103	143	129	136
147	118	132	86	71	79
147	118	132	157	86	121
206	147	176	229	129	179
500	500	500	186	143	164
500	382	441	186	129	157
206	118	162	129	100	114
235	176	206	214	86	150
353	176	265	86	57	71
235	118	176	243	86	164
382	294	338	157	86	121
206	147	176	100	57	79
265	206	235	86	43	64
235	176	206	86	43	64
206	176	191	229	86	157
294	265	279	229	143	186
235	118	176	100	100	100
235	206	221	157	114	136
235	147	191	86	71	79
412	235	324	143	129	136
412	412	412	257	100	179
382	324	353	171	143	157
235	147	191	329	186	257
382	324	353	286	114	200
235	176	206	414	200	307
176	118	147	129	71	100
382	235	309	186	129	157
176	118	147	143	86	114
353	265	309	129	71	100
147	118	132	114	57	86
147	118	132	157	86	121
324	147	235	100	57	79
			129	86	107
			429	129	279
			171	86	129
Muestra 3			271	129	200
			171	86	129
Máximo (um)	Mínimo (um)	Promedio (um)	188	109	148
			188	94	141
200	71	136	109	109	109
200	143	171	313	250	281
214	143	179	281	203	242
257	143	200	156	94	125

219	94	156	500	313	406
313	109	211	375	250	313
125	78	102	375	250	313
156	78	117	375	188	281
313	125	219	563	313	438
109	78	94	500	156	328
250	109	180	438	250	344
156	156	156	438	313	375
141	125	133	188	94	141
281	188	234	156	94	125
281	109	195	500	188	344
156	109	133	313	188	250
250	141	195	500	313	406
219	172	195	375	313	344
172	109	141	875	375	625
563	172	367	563	188	375
156	109	133	625	313	469
141	78	109	438	313	375
			250	188	219
			250	188	219
			594	219	406
Camote 40% - Agua 60%			438	125	281
			313	156	234
Máximo (um)	Mínimo (um)	Promedio (um)	313	219	266
			313	250	281
313	250	281	375	188	281
500	188	344	750	375	563
625	500	563	625	375	500
500	313	406	313	250	281
813	313	563	438	313	375
813	563	688	750	375	563
563	563	563	375	219	297
625	563	594	688	375	531
313	188	250	1429	1286	1357
500	313	406	464	214	339
219	188	203	1143	714	929
250	188	219	1357	786	1071
375	188	281	714	714	714
1188	250	719	429	143	286
500	250	375	500	214	357
250	188	219	500	214	357
1000	1000	1000	1000	714	857
563	313	438	500	214	357
500	250	375	1143	714	929
313	313	313	2000	2000	2000
250	188	219	1286	357	821
313	125	219	643	429	536
938	375	656	571	357	464
188	188	188	1214	429	821
250	125	188	464	286	375
375	188	281	357	143	250
313	188	250	393	250	321
500	375	438	321	143	232
375	219	297	786	786	786

286	143	214	438	125	281
429	286	357	438	125	281
643	214	429	750	625	688
286	143	214	188	125	156
286	143	214	219	125	172
429	250	339			
250	179	214			
214	143	179			
214	143	179			
357	214	286			
214	214	214			
1143	429	786			
429	143	286			
429	286	357			
643	357	500			
500	429	464			
643	571	607			
286	286	286			
469	219	344			
438	219	328			
500	250	375			
875	500	688			
94	94	94			
156	125	141			
219	188	203			
313	125	219			
281	156	219			
1875	1750	1813			
156	63	109			
125	63	94			
156	125	141			
250	250	250			
250	125	188			
125	63	94			
125	125	125			
156	125	141			
219	156	188			
125	125	125			
500	156	328			
188	125	156			
188	188	188			
625	500	563			
438	250	344			
500	406	453			
313	313	313			
500	188	344			
313	156	234			
188	125	156			
188	94	141			
125	94	109			
125	63	94			
438	313	375			
750	375	563			
375	125	250			