

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas

“Estudio del efecto de las condiciones de los tratamientos
químicos en el proceso de obtención de andamios porosos para
aplicaciones biomédicas”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERO QUÍMICO

Presentado por:

Sandra Desiree Heredia Bowen

Directora de tesis:

Patricia Manzano Santana, Ph.D

Guayaquil – Ecuador

2015

AGRADECIMIENTO

A mi directora de tesis la Dra. Patricia Manzano por su confianza y apoyo para la ejecución del proyecto.

A mi co-tutor el Dr. José Alvarez por su aporte, disposición y ser el principal guía en este trabajo.

A las personas que laboran en el CIBE por su colaboración, en especial a la Ing. María Fernanda Quijano, la Ing. Ana Barragán y el Ing. Iván Chóez.

A las personas que forman parte del LEMAT, en especial al Ing. Carlos Parra y al Ing. Julio Cáceres por su ayuda en la utilización del microscopio electrónico de barrido.

A la empresa Fielquimec por facilitarnos el uso del espectrofotómetro de infrarrojo (FTIR), en especial al Dr. Tulio Orellana.

Sandra.

DEDICATORIA

A Dios por permitir que culmine esta etapa de mi vida.

A mis padres, hermanos y a mi abuelita por su amor, apoyo incondicional y por darme la oportunidad de cumplir esta meta.

A mi familia y amigos que me apoyaron en esta trayectoria.

Sandra.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Ing. Oswaldo Valle
DECANO DE LA FCNM
PRESIDENTE



Ph.D Patricia Manzano
DIRECTORA DE TESIS



MSc. Éma Moreno
VOCAL PRINCIPAL



Ph.D Pamela Caicedo
VOCAL ALTERNO

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”
(Reglamento de Graduación de la ESPOL)



Sandra Desiree Heredia Bowen

RESUMEN

El objetivo de este proyecto de investigación fue aplicar tratamientos químicos al mesocarpio de la mazorca del cacao para obtener andamios porosos biodegradables, que puedan ser utilizados en la industria biomédica como potencial soporte para la regeneración de tejidos.

Muestras del mesocarpio, en forma de discos de 6.6mm de diámetro, fueron extraídas de la mazorca de cacao de la variedad CCN-51, y posteriormente se les aplicaron tratamientos alcalino, ácido y con agua destilada, bajo diferentes condiciones, para la obtención de esponjas porosas.

Las muestras crudas y las expuestas a los distintos tratamientos fueron analizadas químicamente, obteniendo como resultado que todos los tratamientos aumentan en porcentaje de fibra, lignina, celulosa; disminuyen el contenido de cenizas y hemicelulosa con respecto a las muestras crudas; A través de la Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR), se identificaron los grupos funcionales característicos de las fibras, que son la celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina.

Se realizó la caracterización física y morfológica de las muestras midiendo el grado de hinchamiento y observando la porosidad con el microscopio

electrónico de barrido y el estereoscopio, dando como resultado que las esponjas con mayor porcentaje de celulosa eran las que tenían superior grado de hinchamiento y porosidad.

Basado en las características físico-químicas de las esponjas porosas obtenidas bajo tratamiento ácido y alcalino, se puede concluir que estas tienen potencial en la industria biomédica, y en la ingeniería de tejidos humanos más específicamente. Esta aplicación dependerá, claro está, de las evaluaciones biológicas *in vitro* e *in vivo* de las mismas.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	v
ÍNDICE GENERAL.....	vii
ABREVIATURAS	xi
SIMBOLOGÍA	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE TABLAS	xviii
INTRODUCCIÓN	xix
CAPÍTULO I. INFORMACIÓN GENERAL.....	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema	4
1.3. Justificación.....	7
1.4. Hipótesis.....	10
1.5. Objetivos	10
1.5.1. Objetivo General	10
1.5.2. Objetivo Específico.....	10
1.6. Metodología General.....	12
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	13

2.1.	Ingeniería de tejidos	13
2.2.	Biomateriales.....	17
2.3.	Cacao.....	23
2.3.1	Fruto.....	25
2.4.	Fibra	26
2.5.	Composición química de las fibras naturales	28
2.6.	Modificaciones químicas a la fibra.....	33
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS		35
3.1.	Elaboración de andamios a partir del mesocarpio del cacao	35
3.1.1	Obtención del mesocarpio.....	35
3.1.2	Tratamiento químico empleado al mesocarpio del cacao	36
3.1.3	Liofilización de las muestras.....	37
3.2.	Caracterización química del mesocarpio del cacao y de los andamios	38
3.2.1	Fibra Cruda	38
3.2.2	Contenido de celulosa.....	39
3.2.3	Contenido de lignina.....	40
3.2.4	Cenizas Totales.....	41
3.2.5	Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)....	42

3.3. Caracterización morfológica y física del mesocarpio del cacao y de los andamios	43
3.3.1 Grado de Hinchamiento	43
3.3.2 Microscopia Estereoscópica.....	44
3.3.3 Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	44
3.4. Análisis estadístico.....	45
CAPÍTULO IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN	46
4.1. Evaluación del rendimiento del proceso de elaboración de andamios porosos	47
4.2. Caracterización química.....	49
4.2.1 Contenido de fibra	50
4.2.2 Contenido de celulosa.....	51
4.2.3 Contenido de lignina.....	53
4.2.4 Contenido de cenizas	55
4.2.5 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)	57
4.3. Caracterización física.....	68
4.3.1 Grado de hinchamiento	68
4.3.2 Microscopía estereoscópica	72
4.3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	75

4.4. Discusión	82
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES.	89
5.1. Conclusiones.....	89
5.2. Recomendaciones.....	91
ANEXOS	92
BIBLIOGRAFÍA.....	101

ABREVIATURAS

FTIR	Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos (Food and Drugs Administration)
PLA	Ácido poliláctico
PGA	Ácido poliglicólico
PMMA	Ácido polimetil-metacrilato
PE	Polietileno
CCN-51	Colección Castro Naranjal Lote 51
SEM	Microscopio Electrónico de Barrido (Scanning Electron Microscope)
HAc	Ácido acético
TAPPI	Asociación Técnica de la Industria de Pulpa y Papel (Technical Association of the Pulp and Paper Industry)
cm	Centímetro
g	Gramo
mm	Milímetro
ml	Mililitros

SIMBOLOGÍA

°C	Grados centígrados
P	Valor P
R ²	Cociente de variabilidad
%	Porcentaje
H ₂ O	Agua
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
NaOH	Hidróxido de sodio
CH ₃ COOH	Ácido acético
NaCl	Cloruro de sodio
SDS	Dodecilsulfato sódico
HNO ₃	Ácido nítrico

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1 Metodología de la experimentación para la obtención de esponjas porosas a partir del mesocarpio de la mazorca de cacao	12
Figura 2. 1 Estructura de la celulosa	29
Figura 2. 2 Estructura de la hemicelulosa	30
Figura 2. 3 Estructura de la lignina.....	31
Figura 2. 4 Estructura de la pectina	32
Figura 4. 1. Diagrama y balance de materia del proceso de elaboración de andamios porosos.....	48
Figura 4. 2 Porcentaje de fibra de las muestras del mesocarpio de cacaos sometidos a diferentes tratamientos químicos	51
Figura 4. 3 Porcentaje de celulosa de las muestras del mesocarpio del cacao sin tratamiento y con tratamiento	53
Figura 4. 4 Porcentaje de lignina de las muestras del mesocarpio de cacao sin tratamiento y con tratamiento.....	55
Figura 4. 5 Porcentaje de cenizas de las muestras del mesocarpio de cacao sin tratamiento y con tratamiento.....	56
Figura 4. 6 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao sin tratamiento.....	59
Figura 4. 7 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratada con agua destilada.....	60

Figura 4. 8 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratada con agua destilada a reflujo.	60
Figura 4. 9 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratado con hidróxido de sodio 0.1 N	62
Figura 4. 10 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratado con hidróxido de sodio 1 N	62
Figura 4. 11 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratado con hidróxido de sodio 1 N a reflujo.....	63
Figura 4. 12 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratado con ácido acético 0.1 N.....	65
Figura 4. 13 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratado con ácido acético 1 N.....	65
Figura 4. 14 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratado con ácido acético 1 N a 37°C.....	66
Figura 4. 15 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratado con ácido acético 1 N a reflujo	66
Figura 4. 16 Grado de hinchamiento de las muestras sin tratamiento, tratadas con H ₂ O, HAc 0.1N, e NaOH 0.1N, en agitación	70
Figura 4. 17 Grado de hinchamiento de las muestras tratadas con HAc 1N, HAc 1N a 37°C e NaOH 1N, en agitación.....	71
Figura 4. 18 Grado de hinchamiento de las muestras tratadas con H ₂ O, HAc 1N, e NaOH 1N, a reflujo.	71

- Figura 4. 19** Micrografías estereoscópicas. A) Sin tratamiento, B) Tratada con agua destilada en agitación, C) Tratada con agua destilada a reflujo.....72
- Figura 4. 20** Micrografías estereoscópicas de las muestras tratadas con NaOH. A) 0.1N, B) 1N en agitación, C) 1N a reflujo 73
- Figura 4. 21** Micrografías estereoscópicas de las muestras tratadas con HAc. A) 0.1N, B) 1N en agitación, C) 1N en agitación a 37°C, D) 1N a reflujo..... 74
- Figura 4. 22** Micrografías electrónicas de las muestras sin tratamiento obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X..... 76
- Figura 4. 23** Micrografías electrónicas de las muestras tratadas con H₂O en agitación obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 300X..... 76
- Figura 4. 24** Micrografías electrónicas de las muestras tratadas con H₂O a reflujo obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X 77
- Figura 4. 25** Micrografías electrónicas de las muestras tratadas con NaOH 0.1N en agitación obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X 78
- Figura 4. 26** Micrografías electrónicas de las muestras tratadas con NaOH 1N en agitación obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X..... 78
- Figura 4. 27** Micrografías electrónicas de las muestras tratadas con NaOH 1N a reflujo obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X 79
- Figura 4. 28** Micrografías electrónicas de las muestras tratadas con HAc 0.1N en agitación obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X..... 80
- Figura 4. 29** Micrografías electrónicas de las muestras tratadas con HAc 1N en agitación obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X..... 81

Figura 4. 30 Micrografías electrónicas de las muestras tratadas con HAc 1N en agitación a 37°C obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X.....	81
Figura 4. 31 Micrografías electrónicas de las muestras tratadas con HAc 1N a reflujo obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X	82
Figura A.2. 1 Obtención de muestras del mesocarpio de la mazorca de cacao. Elaborado por: Autor, 2014	94
Figura A.3. 1 Tratamiento químico aplicado a las muestras del mesocarpio A) H ₂ O destilada B) NaOH 1N C) HAc 1N D) H ₂ O a reflujo E) NaOH 1N a reflujo F) HAc 1N a reflujo. Elaborado por: Autor, 2014.....	95
Figura A.4. 1 Desengrasar las muestras. Elaborado por: Autor, 2014	96
Figura A.4. 2 Contenido de Fibra A) muestra puesta a reflujo con H ₂ SO ₄ , B) muestra puesta a reflujo con NaOH. Elaborado por: Autor, 2014.....	96
Figura A.4. 3 Contenido de Fibra C) muestra seca D) muestra calcinada. Elaborado por: Autor, 2014	97
Figura A.4. 4 Contenido de celulosa A) muestra puesta a reflujo con HAc y HNO ₃ B) muestra filtrada C) muestra seca D) muestra incinerada. Elaborado por: Autor, 2014	97
Figura A.4. 5 Contenido de lignina A) muestra puesta a reflujo con H ₂ SO ₄ B) filtrar. Elaborado por: Autor, 2014	98

Figura A.4. 6 Contenido de ceniza A) muestra puesta en la mufla B) muestra incinerada. Elaborado por: Autor, 2014	98
Figura A.4. 1 Desengrasar las muestras. Elaborado por: Autor, 2014	96
Figura A.4. 2 Contenido de Fibra A) muestra puesta a reflujo con H ₂ SO ₄ , B) muestra puesta a reflujo con NaOH. Elaborado por: Autor, 2014	96
Figura A.4. 3 Contenido de Fibra C) muestra seca D) muestra calcinada. Elaborado por: Autor, 2014	97
Figura A.4. 4 Contenido de celulosa A) muestra puesta a reflujo con HAc y HNO ₃ B) muestra filtrada C) muestra seca D) muestra incinerada. Elaborado por: Autor, 2014	97
Figura A.4. 5 Contenido de lignina A) muestra puesta a reflujo con H ₂ SO ₄ B) filtrar. Elaborado por: Autor, 2014	98
Figura A.4. 6 Contenido de ceniza A) muestra puesta en la mufla B) muestra incinerada. Elaborado por: Autor, 2014	98
Figura A.5. 1 Equipos y metodología en la determinación del grado de hinchamiento A) Andamios sumergidos en NaCl B) Andamios colocados en la incubadora a 37°C C) pesar la muestra. Elaborado por: Autor, 2014	99
Figura A.5. 2 Muestra observada en el estereoscopio. Elaborado por: Autor, 2015.....	100
Figura A.5. 3 Muestra observada en el SEM. Elaborado por: Autor, 2015 ..	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2. 1 Composición proximal de los residuos del cacao	25
Tabla 3. 1 Tratamientos químicos aplicados a las muestras de mesocarpio de la mazorca de cacao.....	36
Tabla 4. 1 Rendimiento y porcentaje de masa extraída de las muestras tratadas.....	49
Tabla 4. 2 Absorción en IR para grupos funcionales presentes en la estructura química de las fibras.....	57
Tabla A.1. 1 Análisis de la varianza para el contenido de fibra	92
Tabla A.1. 2 Análisis de la varianza para el contenido de celulosa	92
Tabla A.1. 3 Análisis de la varianza para el contenido de lignina.....	92
Tabla A.1. 4 Análisis de la varianza para el contenido de ceniza.....	93
Tabla A.1. 5 Análisis de la varianza para el grado de hinchamiento	93
Tabla A.1. 6 Two-way ANOVA: gh versus Tratamientos. Tiempo	93

INTRODUCCIÓN

La industria biomédica se dedica a mejorar la calidad de vida de los ciudadanos, al lograr nuevos conocimientos y tecnologías para obtener mejores diagnósticos, tratamientos, prevención y control de problemas en el organismo, como deficiencias o daños de algún sistema u órgano del cuerpo [1].

La ingeniería tisular es una rama de la ingeniería biomédica que tiene como objetivo principal superar las limitaciones de los tratamientos convencionales basados en el trasplante de órganos o tejidos, dedicándose a la elaboración de implantes por medio del uso de biomateriales. Los mismos deben ser inmunológicamente tolerantes (biocompatibles) y cumplir con la función de ser sustitutos de tejidos, en la medida en que guían la regeneración de los mismos [2].

Las características principales de estos implantes es que permite la reparación permanente de órganos y tejidos que estén afectados, sin tener la necesidad de recurrir a terapias suplementarias. Elimina el tiempo de espera para trasplantes tales como el hígado y el riñón; reemplaza tejidos blandos, hueso, cartílago, entre otros [3].

La base de los implantes generados a través de la ingeniería tisular es el andamio. Este sirve como soporte mecánico y a menudo está compuesto de

varios materiales; además de esto el andamio tiene como función dirigir el crecimiento celular, para generar un tejido funcional. Por lo tanto este debe ser capaz de soportar la adhesión, proliferación y migración celular [3].

Entre las características básicas que debe tener el andamio están: ser porosos, tener gran área superficial, rigidez, ser biocompatibles y biodegradables, es decir que una vez que sea integrado en el tejido anfitrión pueda ser absorbido por el cuerpo del individuo en un tiempo determinado [1].

Existen diferentes materiales (naturales y sintéticos) utilizados en la fabricación de andamios celulares, dentro de los naturales se encuentran algunos polisacáridos, tales como el quitosano, celulosa, alginato, etc., que tienen la propiedad de ser antimicrobianos, biodegradables y biocompatibles [4].

La celulosa es uno de los componentes principales del mesocarpio de la mazorca de cacao, un desecho agroindustrial que se produce en grandes cantidades por ser Ecuador uno de los mayores productores de cacao a nivel mundial. Con la finalidad de darle un alto valor agregado a este desecho, se decidió generar andamios a partir del mismo, aplicando tratamientos químicos a muestras del mesocarpio para obtener un material poroso.

En el presente trabajo se caracterizó la composición química del mesocarpio y de las muestras tratadas por medio del FTIR; la cuantificación de fibra, celulosa, lignina y cenizas se hizo por medio de normas estandarizadas. También se realizó la caracterización física midiendo el grado de hinchamiento y observando la porosidad de las muestras a través de un estereoscopio y microscopio electrónico de barrido.

CAPÍTULO I. INFORMACIÓN GENERAL

1.1. Antecedentes

Los biomateriales aparecieron en los años 60 y 70, con el objetivo de conseguir materiales con propiedades físicas que se adapten a las del tejido a reemplazar. A partir de los años 80, surgen biomateriales que inducen a una reacción controlada por parte del tejido vivo, induciendo la regeneración; en este campo, aparece también la investigación en polímeros biodegradables en aplicaciones biomédicas [5].

Los materiales que más se utilizan para la elaboración de andamios para la ingeniería de tejidos son los polímeros sintéticos bioabsorbibles, por su capacidad de degradación dentro del cuerpo gracias a reacciones de hidrólisis en condiciones fisiológicas y se eliminan completamente por vías metabólicas [1]. Los primeros polímeros sintéticos degradables por hidrólisis y aprobados por la FDA (*Food and Drugs Administration*), son los obtenidos a partir del ácido poliláctico (PLA) y del ácido poliglicólico (PGA) [6].

Sin embargo, en los últimos años, los polímeros naturales se han vuelto una importante área de investigación debido a su mayor disponibilidad, y a que poseen, en muchos casos, características similares a los biopolímeros encontrados en el cuerpo. Los andamios a partir de estos, pueden ser fabricados en forma de discos, microesferas o films, y además también se pueden unir a fármacos covalentemente. Los polímeros que han sido estudiados son los de tipo proteínico: Colágeno, glicoproteína y gelatina, y los de tipo carbohidrato: almidón, dextrano, quitina, fibrina y ácido hialurónico [7].

El quitosano es el material de mayor uso para la regeneración de tejidos; es un polisacárido de origen natural obtenido de la desacetilación de la quitina, biopolímero que se encuentra en el citoesqueleto de crustáceos marinos y paredes celulares de hongos. Se han obtenido andamios a partir de quitosano extraído de desechos de camarón y colágeno porcino, presentando ambos las propiedades y características necesarias para ser utilizados en la industria biomédica [7].

En la actualidad, se están realizando investigaciones de la producción de materiales de nanocelulosa, por su alta resistencia y rigidez, baja densidad y biodegradabilidad. Se han elaborado andamios de celulosa obtenida de la fibra del algodón, utilizando tratamientos químicos para

la eliminación de la región amorfa y preservar la región cristalina. También se han realizado estudios de una membrana híbrida compuesta de quitosano, carboximetil celulosa de sodio y nano-hidroxiapatina, para generar un andamio con propiedades y estructuras que puedan ser utilizados en la regeneración ósea, para problemas como lesiones, malformaciones, osteoporosis y tumor. Este material ha demostrado un alto grado de biocompatibilidad y potencial de regeneración tisular [4].

Una de las mayores fuentes de biopolímeros naturales la representa los desechos agrícolas, los cuales presentan un alto contenido celulósico. Es por esta razón que se plantea la utilización del mesocarpio del cacao, que es un material compuesto de lignina y celulosa, para la elaboración de andamios, que puedan ser utilizados en la industria biomédica, dándole un valor agregado a este residuo agroindustrial [8].

Se han propuesto diversas aplicaciones para el uso de la cáscara de la mazorca de cacao, como elaboración de sales de potasio para jabón y alimento para animales de granja. Al efectuar estas aplicaciones se presentaron dificultades como poco porcentaje de potasio en la cáscara y baja digestibilidad en los animales [8].

Si bien los derivados del mesocarpio de la mazorca del cacao no se han utilizado en aplicaciones biomédicas, uno de sus mayores componentes, la celulosa, se han empleado en este campo. Recientemente, Martínez y Zhang fabricaron un andamio de doble capa a partir de celulosa y demostraron su potencial en la regeneración de cartílago tanto *in vitro* como *in vivo* [9,10]. Por otra parte, Lagos y Kim demostraron la eficacia de esponjas de celulosa en la regeneración de piel en lesiones de quemaduras en pacientes humanos. Otros estudios evaluaron el uso de celulosa en aplicaciones de regeneración de tejido óseo, obteniendo resultados similares [11,12].

1.2. Planteamiento del problema

Ecuador es uno de los principales productores de cacao; actualmente está ubicado en la sexta posición de los países productores de este fruto, considerando que tiene una elevada producción y comercialización a nivel mundial por sus características únicas de buen sabor y aroma; es ampliamente utilizado en la industria alimenticia y cosmética [13].

La producción nacional de cacao está alrededor de 200.000 toneladas métricas al año, y para la industria cacaotera ecuatoriana representa un problema deshacerse de los desechos generados en el proceso de

obtención del grano. La cantidad de desechos generados desde la recolección hasta el procesamiento es de 10 toneladas de desecho fresco por cada tonelada de semilla seca aproximadamente. En base a esto se puede decir que se produce un total de 2'000.000 toneladas métricas al año de desecho, una parte considerable la constituye la mazorca de cacao [8].

Es importante mencionar que la mazorca de cacao no tiene un uso específico; en la actualidad se la utiliza como abono, aunque presentan desventajas, tales como la propagación de problemas fitosanitarios debido al esparcimiento de microorganismos patógenos en el cultivo, lo cual afecta a las plantas; además, en época de lluvias debido a la forma cóncava de las mismas, se forman depósitos de agua que facilitan la multiplicación de insectos [8].

Como parte del residuo de la mazorca se encuentra el mesocarpio del cacao, que tiene un alto contenido de fibra cruda. Al ser este compuesto un biopolímero, esto convierte al mesocarpio en una fuente potencial de biomaterial adecuado para el uso en la elaboración de andamios para la regeneración de tejidos y órganos.

En Ecuador el número total de trasplantes de órganos y tejidos realizados en el año 2013 fue de 531. La lista de espera hasta el 23 de Mayo del 2014 es de 295 personas para trasplante renal, 20 personas para trasplante hepático y tres personas para trasplante cardíaco [14].

Esta información nos sirve para conocer la importancia de la ingeniería tisular, la cual tiene como meta superar las limitaciones de los trasplantes de órganos, implementando biomateriales los cuales permitan una reparación permanente de órganos y tejidos dañados, dando solución al problema de la limitación de trasplantes, por el número restringido de donadores. El tratamiento será más económico a largo plazo, debido que no habrá la necesidad de terapias suplementarias [15].

El desarrollo de aplicaciones biomédicas y biotecnológicas en la actualidad requiere de materiales que sean diseñados para reunir un conjunto de requerimientos funcionales, micro y macroestructurales, por lo cual el desarrollo de biomateriales con porosidad controlada ha adquirido un importante impulso [1].

Las estructuras con alta porosidad e interconectividad son necesarias para la evolución de diversos campos de la medicina regenerativa. Los

biomateriales porosos en forma de andamios en la ingeniería de tejidos se utilizan para replicar las funciones biológicas y mecánicas de la matriz extracelular nativa que se encuentra en el organismo humano para que sirva como matriz extracelular artificial temporal [1].

1.3. Justificación

Los tejidos humanos poseen ciertas capacidades regenerativas que se ven limitadas bajo ciertas condiciones tales como lesiones de gran tamaño, enfermedades auto degenerativas, baja actividad celular y presencia de cáncer. Es por esto que se hace necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas para el restablecimiento de la funcionalidad del tejido dañado o perdido. En este proceso los biomateriales juegan un papel preponderante como base para la creación de implantes basados en los principios de la ingeniería de tejidos [16].

La mayoría de los biomateriales utilizados actualmente, como por ejemplo el poliácido láctico y polimetil metacrilato, son producidos en el extranjero y deben ser importados en el Ecuador, elevando su costo de aplicación y creando una dependencia tecnológica. Este problema se podría superar a través del aprovechamiento de la biodiversidad nacional. Diversas fuentes vegetales, como el cacao, poseen estructuras fibrosas (el mesocarpio de la mazorca) aprovechables para

la producción de matrices porosas con potencial aplicación biomédica, en especial en la ingeniería de tejidos humanos.

Ecuador es uno de los principales países productores de cacao, representando uno de los principales rubros en el sector agropecuario, siendo una importante fuente de ingreso para el país, al ser un producto de exportación. La parte del cacao de mayor utilización es la semilla para la elaboración del chocolate, masa de cacao o licor de cacao. Por otra parte, la cáscara de la mazorca de cacao es considerada como desecho en la industria cacaotera, produciéndose aproximadamente 2'000.000 toneladas métricas de desecho anualmente [8].

Una parte considerable de la cáscara de la mazorca de cacao la constituye el mesocarpio, que está compuesto de fibra y es un material reabsorbible que se descompone con el tiempo. Por esta razón surge la presente investigación de desarrollar una metodología sencilla para la obtención y caracterización de andamios porosos a partir del mesocarpio del cacao, que posean las propiedades físicas y biológicas necesarias para ser utilizado en el cultivo de tejido.

Al utilizar el mesocarpio para la elaboración de andamios porosos se daría una aplicación al material considerado como desecho,

disminuyendo la contaminación que causa el mismo, creando una nueva fuente de ingreso al sector cacaoero, al conferirle un valor agregado. En la industria biomédica se tendría el beneficio de usar andamios biodegradables para poder ser empleado en el cultivo de tejidos, con el fin de encontrar alternativas terapéuticas que mejoren la calidad de vida de las personas [7].

Los andamios porosos al ser un soporte para la proliferación, adhesión y migración celular, permite la regeneración de tejidos, estos estudios de la ingeniería tisular nace como respuesta a los problemas que presentan las terapias de reparación y regeneración de tejidos que se utilizan en la actualidad, algunos de estos problemas son infecciones post-operatorias que disminuyen las posibilidades de éxito del proceso terapéutico [16, 17].

Cabe mencionar que en el país no se han realizado estudios sobre andamios porosos y con este proyecto se podría empezar a estudiar e investigar sobre andamios biodegradables para utilizarlos en la ingeniería biomédica como soporte para el crecimiento de tejidos.

1.4. Hipótesis

A partir del mesocarpio del cacao se pueden obtener esponjas porosas con potencial uso como andamios en aplicaciones biomédicas, como la ingeniería de tejidos humanos.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de las condiciones de los tratamientos químicos para la obtención de andamios porosos biodegradables a partir del mesocarpio del cacao.

1.5.2. Objetivo Específico

- Obtener y caracterizar muestras de mesocarpio de la cáscara de cacao a partir de mazorcas de producción local.
- Aplicar tratamientos químicos (ácido, básico y neutro) para obtener una estructura porosa a partir de las muestras de mesocarpio.
- Establecer diferentes condiciones de tratamientos químicos para determinar su efecto sobre la obtención de las esponjas.

- Caracterizar químicamente las empojas obtenidas, por espectrometría infraroja por transformada de Fourier (FTIR) y en cuanto a su contenido de fibras, ceniza, celulosa y lignina se utilizaron normas estandarizadas.
- Caracterizar morfológica y físicamente los andamios obtenidos a través de técnicas de microscopía y grado de hinchamiento.

1.6. Metodología General.

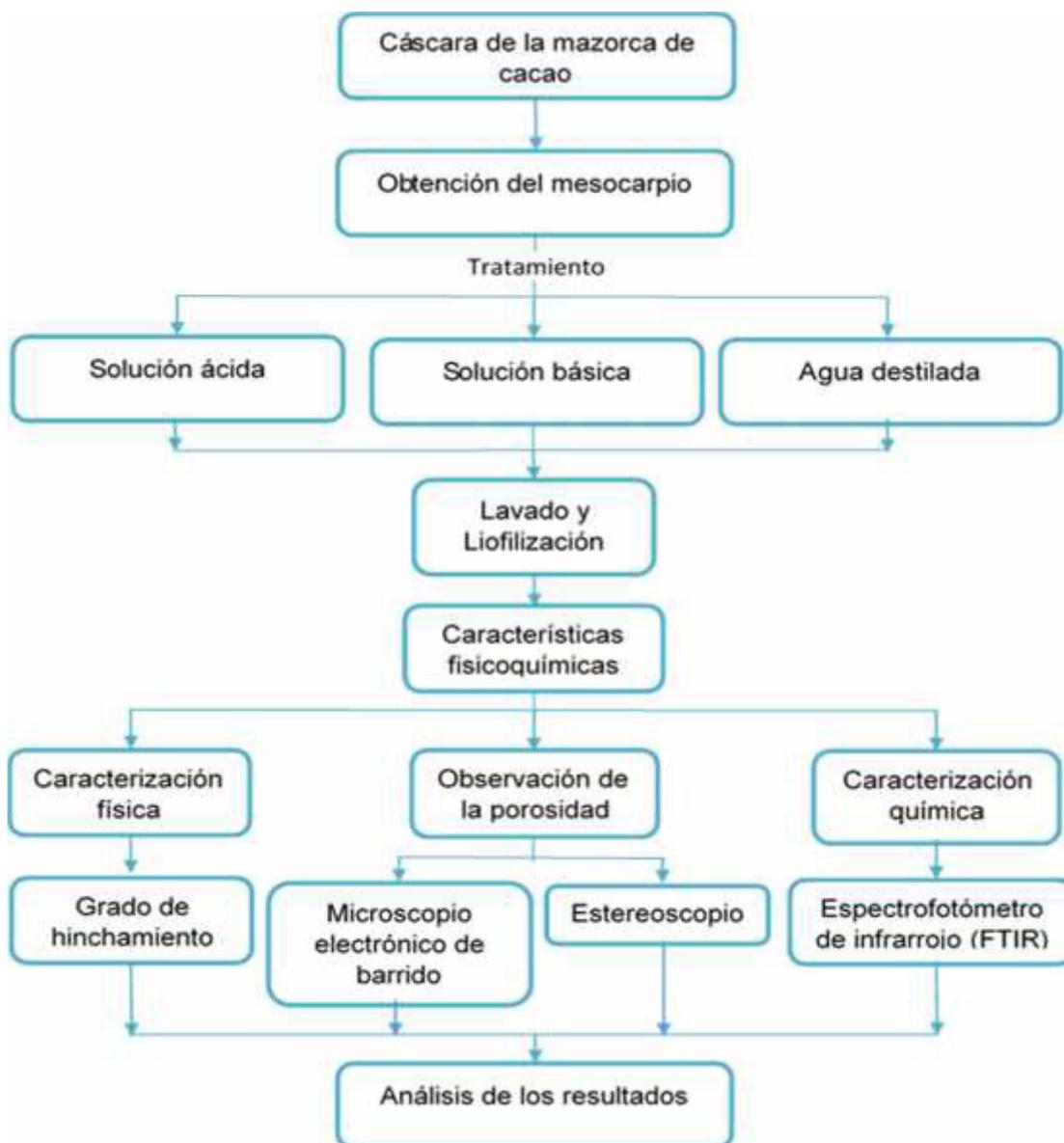


Figura 1. 1 Metodología de la experimentación para la obtención de esponjas porosas a partir del mesocarpio de la mazorca de cacao
Elaborado por: Autor, 2014

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos, también llamada ingeniería tisular, es una de las ramas de la ingeniería biomédica; combina el cultivo celular, la ingeniería de materiales y factores biomédicos para la elaboración de implantes con características de tejidos artificiales, con el propósito de regenerar, reparar y/o reemplazar, parcial o totalmente, órganos y tejidos dañados o enfermos [7].

Los implantes utilizados para la regeneración de tejidos son de diversa naturaleza; pueden emplearse tejidos de los mismos pacientes (implantes autógenos o autoinjerto), tejidos de otro donante humano (aloinjerto) o de otras especies (xenoinjerto). Estos injertos, aunque hasta cierto punto han tenido éxito en la reparación de tejidos, presentan ciertas limitaciones que van desde limitada cantidad de tejido y morbilidad de la zona donadora, en el caso de los autoinjertos, hasta rechazo inmunológico y transmisión de enfermedades, en el caso de los alo y xenoinjertos. La ingeniería de tejidos busca mitigar estas limitantes, utilizando células aisladas del mismo paciente, las cuales

pueden ser expandidas en el laboratorio (*in vitro*) y sembradas en matrices tridimensionales (andamios), para la creación de implantes bioactivos y biodegradables, capaces de inducir la regeneración tisular [18].

Los tres componentes principales para la creación de implantes degradables son: componente celular que comprende el uso de células diferenciadas o progenitoras como las células madre; moléculas bioactivas, que son proteínas propias del tejido, que estimulan el crecimiento de las células, y un andamiaje hecho de materiales biodegradables (biomateriales), que puede imitar la estructura de un órgano [7].

Células: Las células madre permite la reparación de tejidos dañados al tener la capacidad de producir células diferenciadas. Se pueden obtener estas células a partir de la sangre del cordón umbilical, médula ósea y tejido adiposo. Para la regeneración de tejidos mesenquimáticos (huesos, cartílagos, músculos, ligamento, tendón, tejido adiposo, etc.) se utiliza las células madre mesenquimales por su capacidad de proliferación y diferenciación; la fuente más abundantes de esta célula es la médula ósea [19].

Moléculas bioactivas: Organizan, dirigen y estimulan los procesos regenerativos de los tejidos. Dependiendo de su función pueden ser: quimiotácticos que son proteínas que regulan o atraen la migración celular hacia un sitio específico; morfógenos que incitan a la diferenciación celular, lo cual significa que la célula madre debe diferenciarse hacia un linaje específico; y mitogénicos los que estimulan a las células para que se multipliquen y regeneren la zona dañada [19].

Andamio: El andamio es una matriz tridimensional que sirve como plantilla para las interacciones celulares, permitiendo el crecimiento y regeneración de tejidos u órganos dañados. Su principal característica se basa en su porosidad (porcentaje de espacios vacíos en un sólido), permitiendo la formación de tejidos al admitir la migración, adhesión, proliferación y diferenciación celular. Estos andamios se fabrican a partir de biomateriales, que son materiales sintéticos o naturales modificados, y que están en contacto con fluidos y tejidos que forman parte del organismo, sin causar efectos adversos [20].

Las características que debe cumplir el andamio son [21]:

- Debe ser altamente poroso con una red de poros interconectados, para que las células puedan formar la matriz

extracelular y puedan ser transportados los nutrientes y los productos de desechos de la célula.

- Ser biodegradable, permitiendo el remplazo del andamio de manera gradual y ordenada, con una velocidad de degradación controlada, para que pueda ser absorbido por el cuerpo del individuo cuando las células sean capaces de secretar su propia matriz extracelular.
- Los productos de degradación del material deben ser biocompatibles, no deben ser dañinos para las células en crecimiento y los tejidos circundantes.
- Los andamios deben tener buenas propiedades mecánicas, parecidas a las del tejido en el sitio de la implantación y cierta plasticidad para formar un tejido funcional.
- Interacción adecuada entre las células y la superficie del andamio, para la adhesión, proliferación y la adecuada expresión del fenotipo celular.
- Fácil de esterilizar y de fabricación sencilla para que pueda ser escalable su producción.

2.2. Biomateriales

Son los materiales sintéticos o naturales, que se utilizan en la fabricación de dispositivos que se aplican a diversas ramas de la medicina, para que interactúen con sistemas biológicos. Las propiedades de estos materiales dependen de factores biológicos, mecánicos y cinéticos; tienen que ser biocompatibles y sus productos de degradación no deben ser citotóxicos [22].

Los biomateriales pueden ser usados para [5]:

- Sustituir una parte enferma, dañada o desgastada de la anatomía, como las sustituciones totales de articulaciones.
- Prótesis que simule una parte ausente de la anatomía, implantes faciales o mamarias.
- Placas para fracturas óseas que ayudan en el proceso de curación de un tejido, injertos temporales para el tratamiento de quemaduras y los adhesivos quirúrgicos.
- Corregir deformidad ya sea traumática, congénita o patológica como las placas espinales.
- Rectificar el modo de operación de un determinado órgano, como cristalinios oculares o marcapaso.

- Suministro de medicamentos de forma controlada, liberando el medicamento solo y con un nivel de fármaco variable.

Los biomateriales que pueden utilizarse para la elaboración de andamios, se clasifican según su estructura y propiedades en: metálicos, polímeros, cerámicos y materiales compuestos.

Los metales tienen pobre bioactividad y buenas propiedades mecánicas, la mayoría de los metales disponibles son de cinco a seis veces más rígidos que el hueso y pueden causar problemas por exceso de carga mecánica. La cerámica posee biocompatibilidad y bioactividad apropiada pero escasa resistencia a la fractura. Los polímeros son altamente biocompatibles y pueden modificarse para su bioactivación, pero sufren deformaciones que limitan el cumplimiento del requisito mecánico [23].

Dentro de los biomateriales más utilizados para la elaboración de implantes se encuentran los polímeros. Estos se presentan en: bloques, películas, polvos, fibras, etcétera. Pueden ser temporales o permanentes. Se utilizan polímeros biodegradables para aplicaciones temporales, siendo estos materiales que se degradan después de

realizar su función. Por otro lado, los polímeros permanentes no modifican sus propiedades durante la vida del implante [24].

Los biomateriales poliméricos se forman a partir de reacciones químicas entre dos o más moléculas que se combinan de la misma especie, para formar compuestos complejos. De acuerdo a su origen pueden ser: sintéticos o naturales [25].

Sintéticos: Se producen a partir de la síntesis química de sustancias de bajo peso molecular; actualmente se utilizan en el campo biomédico el polimetil-metacrilato (PMMA), el polietileno (PE), poli-ácido láctico, entre otros [7].

Según el tiempo que debe mantener su funcionalidad los biomateriales poliméricos se clasifican en dos grupos: El primer grupo se refiere a los implantes permanentes, los cuales son dispositivos o sistemas utilizados para sustituir tejidos u órganos de manera parcial o total. El segundo grupo comprende los biomateriales degradables de aplicación temporal, mantienen su funcionalidad durante un periodo de tiempo limitado, ya que el organismo desarrolla mecanismos de curación y regeneración tisular para reparar el tejido afectado [25].

Los polímeros biodegradables más comunes se los obtiene a partir del ácido poliláctico (PLA) y del ácido poliglicólico (PGA). También los polímeros polidioxanona, politrimetilen-carbonato en forma de copolímeros con poli(-caprolactona), han sido aceptados como materiales de uso biomédico [22].

Ácido poliláctico (PLA): Es un polímero sintético termoplástico, amorfo o semicristalino, de la familia de los poliésteres alifáticos basado en ácido láctico. Es un biopolímero que se obtiene en dos etapas, primero la síntesis del ácido láctico y luego la polimerización [22].

Se extrae el almidón de la biomasa, que proviene de la caña de azúcar, lactosa proveniente de lactosuero, y dextrosa se obtiene del almidón hidrolizado. La polimerización es por apertura de anillo del dímero cíclico del ácido láctico, se puede preparar polímeros con diferentes tacticidades por el monómero que tiene un carbono asimétrico.

El PLA es uno de los polímeros aprobados desde 1995 por la FDA (Food and Drug Administration). Se lo utiliza en una variedad de aplicaciones médicas y quirúrgicas como clavos para la unión de ligamentos y reparación de suturas, meniscos, fijación de fracturas y cirugía maxilofacial, liberación de stents y fármacos para cirugía

cardiovascular. La aplicación más reciente es en el campo de la ingeniería de tejidos, en defectos óseos y en cultivo de piel para quemaduras, generando tejidos a partir de células del mismo paciente. Se le dio esta utilización por tener propiedades como biodegradabilidad, biocompatibilidad y propiedades de barrera, que permiten el crecimiento del tejido biológico durante la degradación por hidrólisis [26].

Ácido poliglicólico (PLG): Es un poliéster lineal, puede ser producido químicamente y biológicamente; en la actualidad se obtiene por el proceso enzimático, el cual es menos costoso y el producto es de alta pureza. Por el método de polimerización se sintetiza el PLG, por apertura de anillo de glicólida empleando un catalizador, suele ser una sal metálica inorgánica [17].

El PLG está aprobado por la FDA por sus propiedades mecánicas y biológicas, las cuales tienen aplicaciones terapéuticas como materiales de sutura absorbible, en forma de tornillos y miniplacas para la osteosíntesis, se emplea en cirugía orbitaria en forma de materiales termoplásticos y como membrana se utiliza para la regeneración tisular [21].

Naturales: Son derivados de animales y plantas; están compuestos por proteínas o carbohidratos. Los más utilizados son: gelatina, colágeno, ácido hialurónico, glicosaminoglicanos, quitosano, celulosa y fibrina [7].

Quitosano: Es el derivado *N*-desacetilado de la quitina, el cual es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. Este polisacárido está constituido por residuos de *N*-acetil-D-glucosamina ó 2-acetamido-2desoxi-beta-D-glucosa, enlazadas por unión beta 1-4. Se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos, insectos, anélidos, artrópodos, celenterados, moluscos, camarón, cangrejo y componente de algunos hongos así como de las algas [7].

El quitosano se utiliza en tratamientos de aguas residuales, en el área de medicina en productos especiales, formulaciones para liberación de fármacos, se han elaborado andamios a partir del quitosano extraído del desecho del camarón para la utilización en el área de ingeniería de tejidos [7].

Celulosa: Es un polisacárido, consiste en una larga cadena lineal, las propiedades de las celulosa depende de la longitud de la cadena o grado de polimerización. Es utilizada tradicionalmente en la forma de fibras de madera y vegetales como fuente de energía, es la principal

materia prima de la industria de papel, se han elaborado andamios a partir de la celulosa del algodón. Las plantas que contienen una gran cantidad de este polisacárido son: lino, yute, ramio, algodón, etc., la cascara de las frutas esta compuestas por fibras las mismas que están constituidas básicamente de pectina y celulosa, por lo tanto la cascara de cacao es una fuente de celulosa [4].

2.3. Cacao

El cacao (*Theobroma cacao L.*), de la familia del Sterculiaceae, es una planta originaria de América tropical. El cacaotero es un árbol que mide entre cinco y diez metros de altura, es caulífloro (flores y frutos nacen directamente del tallo y ramas) [13].

Entre las principales variedades de cacao que se cultivan en el país están:

Cacao criollo: Corresponde a una planta de bajo rendimiento, destacándose su semilla por la alta calidad. El cacao tiene un olor dulce unido a un aroma delicado característico, posee un cotiledón de color entre marfil pardusco, castaño muy claro, produce 6 quintales por hectárea, representa aproximadamente el 10% de la producción mundial. La mazorca tiene la cáscara poca rugosa con 10 surcos, se

caracteriza por tener semillas grandes blancas o ligeramente pigmentadas [27].

Cacao forastero: Originario de la alta Amazonia, se caracteriza por tener mazorcas pequeñas, inicialmente son de color verde claro, luego se ponen amarillas, la cáscara de la mazorca es lisa o ligeramente rugosa, es resistente y poco aromático [27].

Cacao Trinitario: Está conformada por poblaciones híbridas, producto de una mezcla de criollo con forastero. Es posible encontrar mazorcas amarillas, rojas, anaranjadas, la cáscara es algo rugosa y gruesa. Dentro de este grupo se ubica el clon CCN-51 (Colección Castro Naranjal Lote 51) que es producto de investigaciones realizadas en el Ecuador, en la zona de Naranjal, por el Agrónomo Homero Castro. Este clon presenta características de tolerancia a las enfermedades y alta producción, no tiene el aroma que posee el Nacional. Inicia su producción a partir de los 24 meses de sembrado y es uno de los más productivos del mundo, además de ser tolerante a diversas enfermedades, produce aproximadamente 50 quintales por hectárea [13, 27].

Los sembríos de cacao en el Ecuador se encuentran ubicados principalmente en 4 zonas: 1) La zona de la cuenca baja del río Guayas, básicamente las actuales provincias de Los Ríos y Guayas; 2) la zona húmeda de la provincia de Manabí; 3) la zona de Naranjal, hacia el sur, corresponde una pequeña parte de la provincia del Guayas y la provincia de El Oro; 4) la zona de Esmeralda [28].

Tabla 2. 1 Composición proximal de los residuos del cacao

Producto	Variedad	Residuo	PARÁMETRO EN PORCENTAJE					
			Hm	P	G	Cz	FC	ELN
CACAO (<i>Teobroma caca L.</i>)	Trinitario	Cáscara	6.72	4.52	2.40	8.92	33.26	44.18
		Cascarilla	7.80	17.13	2.22	7.33	21.38	44.14
		Mucílago	9.27	6.13	2.11	8.46	0.41	73.62
	Nacional	Cáscara	6.53	4.50	2.50	9.01	33.78	43.68
		Cascarilla	7.31	17.10	2.18	7.93	21.41	44.07
		Mucílago	9.46	6.05	2.13	8.31	0.43	73.44

Hm: Humedad, P: Proteína, G: Grasa, CZ: Ceniza, FC: Fibra Cruda, ELN: Extracto libre de nitrógeno.

Fuente: Referencia [29]

2.3.1 Fruto

El fruto del cacao llamado comúnmente mazorca, es una drupa grande, sostenido por un péndulo fibroso, que procede del pedicelo floral. Al hacer un corte transversal del fruto aparecen las siguientes partes: el epicarpio, mesocarpio y endocarpio. El grosor y la lignificación de la

cáscara de la mazorca es variable, siendo mayor el cacao de la variedad CCN-51 [30].

Epicarpio: Es de color verde, rojo, amarillo o morado, esto depende de la variedad del cacao. Está formado por tejidos epidérmicos que contienen compuestos antociánicos [30].

Mesocarpio: Es de consistencia carnosa y de color amarillento, está compuesto por un tejido parenquimático, que está implicado en una variedad de funciones como la fotosíntesis, el almacenamiento, elaboración de sustancias y en la regeneración de tejidos vegetales. Las paredes celulares son flexibles y delgadas de celulosa, pueden presentar paredes secundarias lignificadas. El parénquima le da la posibilidad a las plantas de cicatrizar las heridas, formar nuevos vástagos y raíces adventicias [30].

Endocarpio: Es la capa interna está constituido por un tejido leñoso.

2.4. Fibra

Es un carbohidrato del tipo polisacárido, se divide para su análisis en dos partes: Fibra cruda es una mezcla heterogénea de hidratos de carbono (celulosa, hemicelulosa) y la lignina obtenidos por el tratamiento de los vegetales con ácidos y álcalis bajo determinadas

condiciones. La fibra no digerible es la parte del producto que queda sin digerir en el tubo digestivo, esta fibra se degrada durante la valoración de la fibra cruda [31].

La fibra derivada de frutas y vegetales tiene una importante proporción de fibra soluble compuesta de celulosa, hemicelulosa, holocelulosa y lignina, otros compuestos usualmente observados, son las pectinas y ceras [32].

Por la compleja organización física y composición química de la pared celular vegetal, que componen los tejidos vegetales es complicado la cuantificación de los constituyentes. La composición química ayuda a determinar las propiedades y el uso de las fibras [32].

Las fibras que nacen del interior de las paredes de la semilla y de la fruta están compuestas especialmente de celulosa y hemicelulosa por un 60 – 80 %, lignina de 5- 20 %, y un bajo porcentaje de pectina y cera [33].

Las microfibrillas de celulosa se encuentran fuertemente unidas por lignina y la presencia de pectina, por puentes de hidrogeno. Estas microfibrillas están formadas por regiones de celulosa cristalina y

amorfa, las mismas que son responsables de las propiedades mecánicas de las fibras naturales [32].

2.5. Composición química de las fibras naturales

2.5.1 Celulosa

La celulosa es un polímero lineal de alto peso molecular, su fórmula es $(C_6H_{10}O_5)_n$, está formada por unidades de β -glucosa unidas por enlaces β -1,4, forma parte de las paredes celulares de vegetales. La celulosa está unida a hemicelulosa, ligninas, sustancias pécticas, taninos y otras moléculas de carácter fenólico [33].

Cada anillo de glucosa contiene tres grupos hidroxilo (OH) que forman enlaces de hidrógeno intermoleculares, aumentando la resistencia de la fibra. A pesar del gran número de grupos hidroxilos que posee es insoluble en agua y en la mayoría de solventes orgánicos, sin embargo, puede convertirse en un polímero soluble introduciendo grupos funcionales en el esqueleto macromolecular [34].

La celulosa puede absorber agua de 6 al 20 %, produciendo un hinchamiento, que es el inicio de su despolimerización, produciendo cambios en las propiedades [32]. Tiene un gran uso potencial en las diferentes industrias, por este motivo la producción de celulosa a partir

de fibras naturales se ha vuelto significativa. Por medio de tratamientos químicos de diversos tipos como álcalis y/o bisulfitos se separa la lignina de la hemicelulosa.

Este polímero natural puede regenerarse mediante fotosíntesis y representa cerca de un tercio de los tejidos vegetales. Aproximadamente se producen en el mundo 1000 toneladas de celulosa anualmente por medios naturales [34].

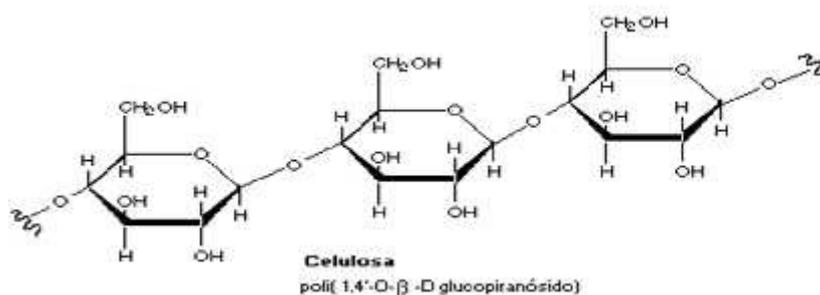


Figura 2. 1 Estructura de la celulosa

Fuente: <<http://www.biologia.edu.ar/macromoleculas/azucar.htm>>
(Consulta: 12 de Diciembre. 2014)

2.5.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa son heteropolisacáridos de alta masa molecular, se encuentra construido por unidades de monosacáridos unidos por enlaces $\beta(1-4)$ fundamentalmente xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa y ácido glucurónico. La hemicelulosa forma parte de la pared celular, es una cadena de glucosa más corta que la celulosa;

su función en las fibras es ser intermediaria entre la lignina y la celulosa [32].

No existe enlaces químicos entre la hemicelulosa y la celulosa, su adhesión mutua es fortalecida por los puentes de hidrogeno y las fuerzas de Van der Waals, la hemicelulosa tiene un alto grado de ramificación en sus cadenas [29].

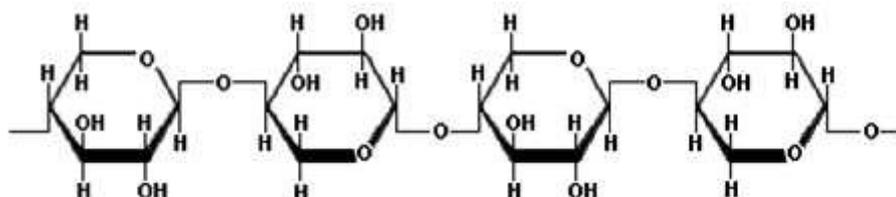


Figura 2. 2 Estructura de la hemicelulosa

Fuente: <<http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html>>
(Consulta: 12 de Diciembre. 2014)

2.5.3 Lignina

La lignina "*lignum*" es un polímero aromático tridimensional, ramificado con una gran variedad de grupos funcionales que proporcionan centros activos para interacciones químicas y biológicas. Después de la celulosa, es el principal componente de las fibras, donde sus propiedades mecánicas son menores [35].

La composición elemental de la lignina varía entre el 61-65 % de carbono, 5-6.2% de hidrógeno, y el resto oxígeno. La lignina se la obtiene a través de un proceso de extracción sólido/líquido de los residuos agroindustriales, está compuesto de un anillo bencénico con un átomo de oxígeno y la presencia de grupos cromofóricos, como carbonilos o enlaces dobles conjugados con el anillo bencénico [31].

La lignina es insoluble en ácido y soluble en álcalis fuerte como el hidróxido de sodio, está formada por la extracción irreversible del agua de los azúcares creando compuestos aromáticos. También se define como material polifenólico, amorfo por la copolimerización de tres monómeros fenil – propánicos denominados alcohol sinapíco, alcohol coniferílico y alcohol p-cumarílico [32].

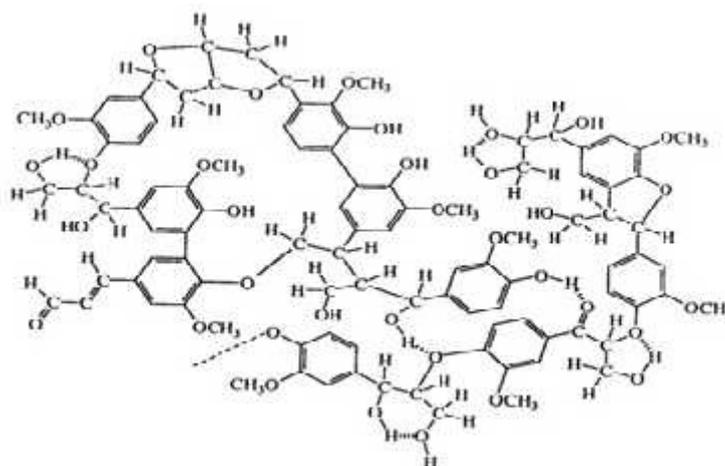


Figura 2. 3 Estructura de la lignina

Fuente: <<http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%207/6.html>> (Consulta: 12 de Diciembre. 2014)

2.5.4 Pectina

Es un constituyente importante de los tejidos vegetales, se encuentra en la pared celular primaria y en los tejidos mesenquimáticos y parenquimáticos de frutas y vegetales. Se considera como polímeros lineales de ácido D-galacturónico, unidos por uniones glicosídicas α -1,4. Los ácidos urónicos tienen grupos carboxílicos, algunos están presentes como ésteres metílicos.

La pectina es de elevado peso molecular, es una fibra soluble que se dispersa en agua. Están presentes azúcares neutros: Rhamnosa (Rha), arabinosa, galactosa y xilosa son componentes minoritarios que se encuentran en los extremos de la cadena de la pectina [33].

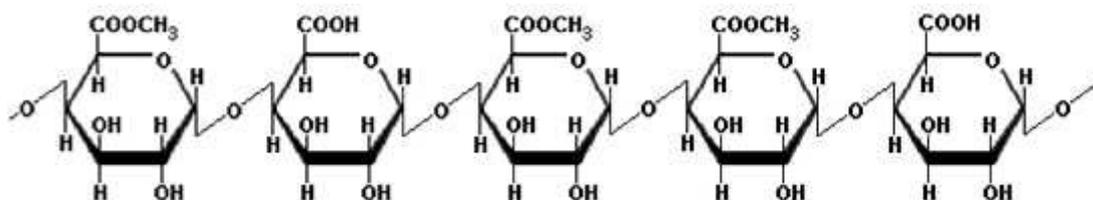


Figura 2. 4 Estructura de la pectina

Fuente: <<http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html>>
(Consulta: 12 de Diciembre. 1014)

2.6. Modificaciones químicas a la fibra

2.6.1 Tratamiento alcalino

Consiste en un tratamiento con soda caustica (hidróxido de sodio), al que se somete la fibra para realizar cambios en la base química, eliminando la lignina y la hemicelulosa. Estos cambios dependen de la concentración del álcali y la temperatura del proceso.

El ataque alcalino causa la modificación de la estructura química de la fibra, reacción basada en la desvinculación del hidrógeno, que produce la fragmentación de las moléculas de la lignina en segmentos fenólicos más pequeños. Al reaccionar el álcali con la hemicelulosa, se destruye la estructura de acoplamiento, produciendo la separación de las fibras en filamentos más finos y produciéndose una fibrilación que permite el acercamiento de las cadenas celulósicas.

A medida que aumenta la concentración de la dilución alcalina, la fibra mejora la resistencia, aumenta la cristalinidad; ayudando a la polimerización, hidrólisis e hinchamiento, aumentando el área superficial y disminuyendo el peso; luego del tratamiento llegan a ser visibles los microporos en la superficie de la estructura fibrosa [32].

2.6.2 Tratamiento con ácido

La aplicación de este tratamiento es variada, depende del ácido que se emplee, de su concentración y de la temperatura. En este, se produce un mayor hinchamiento, despolimerización e hidrólisis en los ácidos muy diluidos [24].

El ácido solubiliza la hemicelulosa y hace más accesible la celulosa. La principal reacción que ocurre en un pretratamiento ácido es la hidrólisis de la hemicelulosa, especialmente el xilano, ya que el glucomanano es relativamente estable en medio ácido. La precipitación de la lignina soluble y la solubilización de la hemicelulosa son más pronunciadas durante un pretratamiento con ácido concentrado que con ácido diluido [25].

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Bioproductos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Campus “Gustavo Galindo” de la Ciudad de Guayaquil, Ecuador.

3.1. Elaboración de andamios a partir del mesocarpio del cacao

3.1.1 Obtención del mesocarpio

Mazorcas de cultivos de CCN-51, con aproximadamente 16 semanas de maduración fueron obtenidas en salidas de campo a plantaciones en la provincia del Guayas. Manualmente, se desechó la cáscara de la mazorca de cacao, para posteriormente obtener con la ayuda de un sacabocados y un bisturí, muestras en forma de discos de 6.6 mm de diámetro y de 4 a 7 mm de espesor. Este proceso se realizó máximo dos días después de cortar la mazorca, debido a que la cáscara se descompone de manera rápida con la consecuente pérdida de humedad.

3.1.2 Tratamiento químico empleado al mesocarpio del cacao

Las muestras del mesocarpio del cacao se sometieron a los tratamientos químicos presentados en la Tabla 3.1. Se cambiaron cada 24 horas las soluciones de los tratamientos que se efectuaron en 48 y 72 horas, mientras que, en los tratamientos a reflujo que se realizaron por tres horas, las soluciones fueron cambiadas cada hora. Luego se procedió a lavar las muestras con abundante agua destilada, en tres ciclos de una hora.

Tabla 3. 1 Tratamientos químicos aplicados a las muestras de mesocarpio de la mazorca de cacao

Condición	Tratamiento	Concentración	Método	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
1	H ₂ O		Agitación	25	72
2	H ₂ O		Reflujo	100	3
3	NaOH	1N	Agitación	25	72
4	NaOH	1N	Agitación	25	24
5	NaOH	1N	Reflujo	100	3
6	NaOH	0.1N	Agitación	25	72
7	NaOH	0.1N	Agitación	25	24
8	HAc	1N	Agitación	25	72
9	HAc	1N	Agitación	37	72
10	HAc	1N	Reflujo	100	3
11	HAc	0.1N	Agitación	25	72

12	HAc 1N y luego con metanol	25%	Agitación	25	24
13	HAc 1N y luego con SDS	0.1 %	Agitación	25	24

Elaborado por: Autor, 2015

3.1.3 Liofilización de las muestras

La liofilización es un proceso de deshidratación al vacío por sublimación (cambio de estado de sólido a gaseoso). Este método de secado trabaja en condiciones de baja presión y baja temperatura. El proceso de liofilización comprende los siguientes elementos: El vacío permite vaporizar el solvente por sublimación; el calor acelera la sublimación; la baja temperatura permite quitar el solvente vaporizado del compartimiento del vacío [36].

Las muestras sin tratamiento y las tratadas químicamente fueron congeladas en una refrigeradora marca REVCO, modelo LEGACI, durante 24 horas a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; luego fueron secadas por 48 horas en el liofilizador (LABCONCO, modelo FREEZE DRY SYSTEM DRY SYSTEM / FREEZONE 4.5), que requiere una presión

de vacío menor a 133×10^{-3} mBar y una temperatura menor a -40°C para un funcionamiento óptimo, según las instrucciones del fabricante.

3.2. Caracterización química del mesocarpio del cacao y de los andamios

3.2.1 Fibra Cruda

La fibra cruda es el residuo obtenido tras el tratamiento de las muestras con ácido y álcalis. Son fundamentalmente los elementos fibrosos, que se componen de celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina [37].

Para la determinación del contenido de fibra de las muestras, primero se desengrasaron las muestras utilizando el Protocolo-CBE-PROT-BP 27; el cual consiste en colocar 5g de muestra sobre papel filtro, para ser depositado dentro de un cartucho de celulosa. Se armó el sistema de extracción Soxhlet adicionando 60 ml de hexano en el balón. Se realizó la extracción de la muestra con una velocidad de 5 a 6 gotas por segundos durante 4 horas. Se secó el residuo en una estufa a 105°C durante 1 hora y se enfrió en el desecador, obteniendo la muestra libre de grasa.

Para determinar la fibra cruda se empleó el Protocolo-CBE-PROT-BP 026; el cual consiste en pesar de 1 a 2 g de muestra libre de grasa; la muestra posteriormente se colocó a reflujo con ácido sulfúrico 1.25% e hidróxido de sodio 1.25%, luego se lavó con agua destilada, se secó a 105°C por espacio de 2 horas y se pesó. Se calcinó hasta que la muestra sea de color blanco, la pérdida de peso después de la calcinación representa el contenido de fibra cruda en la muestra.

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{PCRS - PCRC}{PM} \times 100$$

En donde,

PCRS: Peso del crisol con residuo seco

PCRC: Peso de crisol con residuo calcinado

PM: Peso de la muestra seca y desengrasada

3.2.2 Contenido de celulosa

Se pesó un gramo de muestra seca; a esta se le añadió 15 ml de ácido acético al 80 % v/v y 1.5 ml de ácido nítrico al 68% v/v, se llevó a reflujo por 20 minutos. Se filtró la muestra y se lavó con etanol, para luego ser secada en un horno a 105°C y ser pesada (material A). Finalmente, se

incineró a 540°C (material B), dejando que se enfriara en un desecador y después se pesó [38].

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{(\text{material A}) - (\text{material B})}{\text{Peso inicial de la muestra}} \times 100$$

3.2.3 Contenido de lignina

La determinación del contenido de lignina se realizó según la norma TAPPI T130s-54. Se pesó un gramo de muestra libre de grasa, se añadió 15 ml de H₂SO₄ al 72% y se agitó durante 2 horas. Se colocó la muestra a reflujo con agua destilada durante 4 horas, se filtró, se lavó el residuo con 500 ml de agua caliente y se secó la muestra a 105°C durante 3 horas.

$$\% \text{ de lignina} = \frac{Mf}{Mi} \times 100$$

En donde,

Mi: Masa inicial de la muestra sin grasa

Mf: Masa final de la muestra

H: Humedad

3.2.4 Cenizas Totales

Las cenizas totales son los residuos inorgánicos que se puede determinar por incineración del material. Fundamentalmente son los minerales como las sales inorgánicas de calcio, magnesio y potasio, que queda después de quemar la materia orgánica (proteínas, carbohidratos y lípidos) [39].

Se empleó el Protocolo-CBE-PROT-BP 023; que consiste en colocar 1g de muestra en crisoles previamente pesados, posteriormente se incinero la muestra en una mufla a una temperatura de 700 °C, durante 2 h.

$$C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

En donde,

C: Porcentaje de cenizas totales en base hidratada

M: Masa del crisol vacío (g)

M1: Masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M2: Masa del crisol con la ceniza (g)

3.2.5 Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

La FTIR es una técnica de análisis que permite la identificación de compuestos químicos a través de la determinación de la frecuencia a la que los distintos grupos funcionales presentan bandas de absorción en la región IR, estos grupos son detectados por los valores de absorbancia, la forma y ubicación de las bandas [40].

Las muestras fueron colocadas en el diamante del espectrómetro de infrarrojo marca Agilent Technologies, modelo Cary 630 FTIR, el sistema óptico del módulo de muestreo es ATR y el espectrofotómetro es de bromuro de potasio (KBr). Se realizaron los espectros correspondientes a un intervalo de longitud de onda desde 650 cm^{-1} hasta 4000 cm^{-1} . Este análisis se empleó para determinar los cambios que ocurren en la estructura química de la fibra luego del tratamiento al que fueron expuestas.

3.3. Caracterización morfológica y física del mesocarpio del cacao y de los andamios

3.3.1 Grado de Hinchamiento

El grado de hinchamiento es la capacidad que tiene el producto para aumentar su volumen en presencia de agua. En esta propiedad influyen la cantidad de los componentes polisacáridos, porosidad y tamaño de partículas de la fibra [41]. Al absorber las esponjas el agua hidratan los grupos polares hidrofílicos (hidrogeles) materiales con características blandas y porosas, permitiendo determinar la biocompatibilidad y las propiedades mecánicas que presentan los materiales [42, 43].

Para determinar el grado de hinchamiento se pesaron las muestras liofilizadas (P_s), posteriormente se colocó una esponja en cada pocillo de una microplaca de 6 pocillos y se añadió 6ml de NaCl al 1% p/v. Las placas de pocillos se incubaron a 37°C en una incubadora Thermo modelo B15, y se registró el peso de la muestra (P_h), quitando el exceso de agua, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48 y 72 horas. Los valores de hinchamiento reportados son los promedios de cuatro mediciones realizadas por cada tratamiento [7].

$$gh = \frac{P_h - P_s}{P_s}$$

En donde,

gh: Grado de hinchamiento

Ph: Peso de la muestra húmeda en el tiempo

Ps: Peso de la muestra seca

3.3.2 Microscopia Estereoscópica

El microscopio estereoscópico se utilizó para observar y comparar los cambios físicos de las muestras al aplicarle los distintos tratamientos.

El estereoscopio que se utilizó es de marca ZEISS, modelo estéreo luma v.12.

3.3.3 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La microscopia electrónica de barrido se utilizó para observar y caracterizar la estructura de los andamios, la morfología, el tamaño y la organización de sus poros.

Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido marca FEI y modelo INSPECT. Las muestras al no ser conductoras de corriente eléctricas fueron recubiertas con platino para ser visualizada correctamente en el SEM. Las mediciones que se realizaron fueron de: 100x y 500x.

El voltaje al cual opera el equipo, se encuentra entre 20 y 30 kV, y su resolución entre 50 y 20 Å. Cuando se coloca las muestras en el modo de bajo vacío, el equipo opera con presiones entre 0 y 5 torr.

3.4. Análisis estadístico

Los resultados del porcentaje de fibra, celulosa, lignina, cenizas y grado de hinchamiento fueron analizados mediante el análisis estadístico ANOVA y las múltiples comparaciones se realizaron por el método de Tukey con un nivel de confianza mayor del 90%. El porcentaje es el promedio del triplicado que se realizó a la muestra cruda y las tratadas.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La finalidad del presente trabajo consistió en establecer tratamientos que permitan obtener esponjas porosas que, a futuro, pudieran ser utilizadas en la industria biomédica, más específicamente, en el área de la Ingeniería de Tejidos Humanos. Para tal fin, se realizaron análisis químicos y físicos al mesocarpio sin tratar y los tratados con: agua destilada (H₂O) en agitación constante durante 72 horas a temperatura ambiente, agua destilada a reflujo (100°C) por 3 horas, ácido acético (HAc) 0.1N en agitación constante durante 72 horas a temperatura ambiente, ácido acético 1N en agitación constante durante 72 horas a temperatura ambiente, ácido acético 1N en agitación constante durante 72 horas a 37°C, ácido acético 1N a reflujo (100°C) por 3 horas, hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N en agitación constante durante 72 horas a temperatura ambiente, hidróxido de sodio 1N en agitación constante durante 72 horas a temperatura ambiente e hidróxido de sodio 1N a reflujo (100°C) por 3 horas.

En este capítulo se detallan, por medio de gráficos y figuras, los resultados que se obtuvieron de las pruebas realizadas al mesocarpio

de cacao, con el fin de comparar la composición química y características físicas de las muestras tratadas frente a la cruda.

4.1. Evaluación del rendimiento del proceso de elaboración de andamios porosos

En la Figura 4.1 se muestra el balance de materia del proceso que permite obtener andamios porosos. Se observa que el peso promedio de tres mazorcas de cacao es de 944.72g, la pulpa (semilla y mucilago) corresponde al 25.53% equivalente a 260.09g, y la cáscara de la mazorca que está compuesta del epicarpio, mesocarpio y endocarpio representa el 74.47% que es 684.63 g. El mesocarpio representa el 56.93% de la cáscara de la mazorca y el 41.26% de la mazorca de cacao, equivalente a 389.79 g. El rendimiento total del proceso de obtención de andamios porosos es de 2.06% (19.49 g), con un porcentaje de humedad del 95% (370.30).

En la Tabla 4.1 se muestra el rendimiento y el porcentaje de masa extraída de las muestras tratadas con respecto a la cruda. Se obtuvo como resultado que las muestras tratadas con hidróxido de sodio se tienen menor rendimiento y mayor porcentaje de masa extraída.

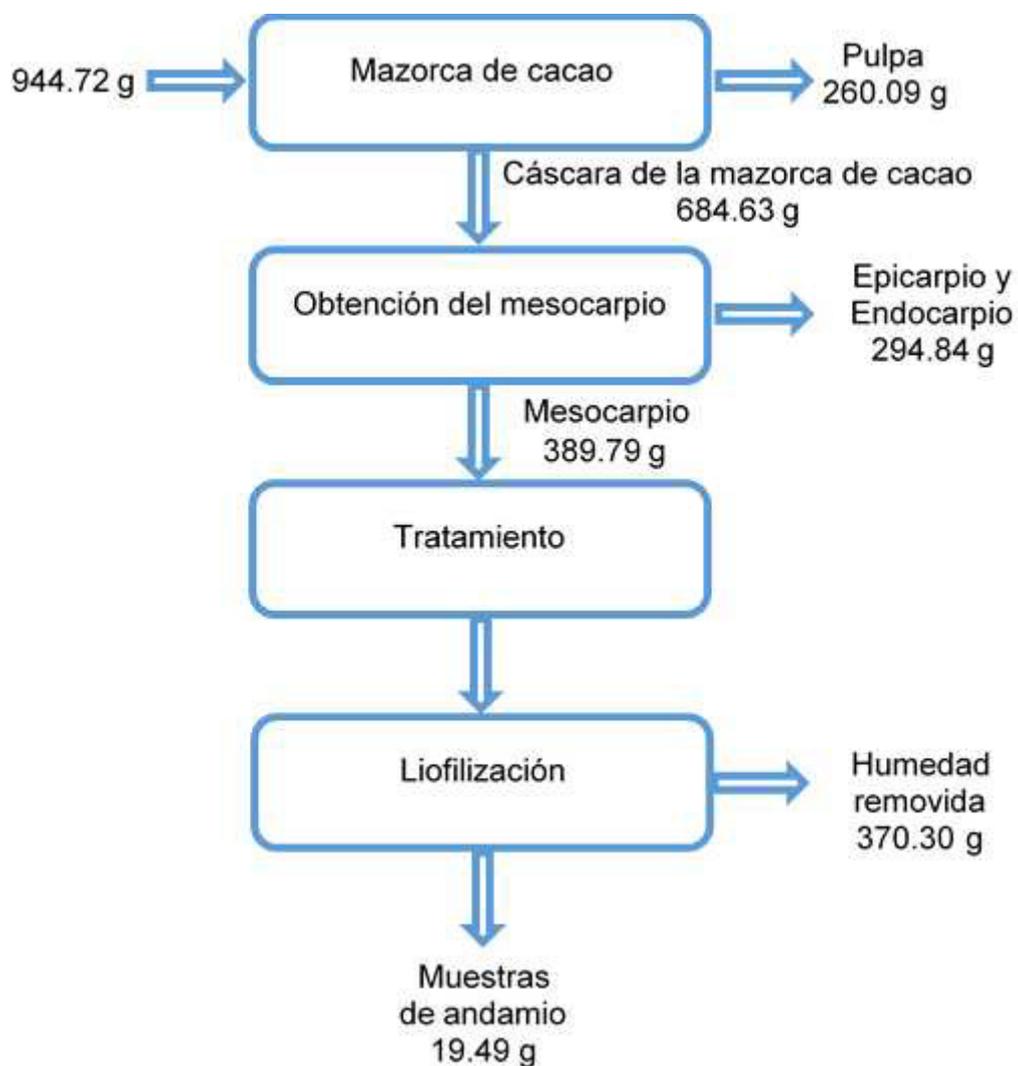


Figura 4. 1. Diagrama y balance de materia del proceso de elaboración de andamios porosos.
Elaborado por: Autor, 2015

Tabla 4. 1 Rendimiento y porcentaje de masa extraída de las muestras tratadas

Tratamiento	Rendimiento	% de masa extraída
Muestra del mesocarpio sin tratar	12.77	
Agua	9.22	27.74
Agua 100°C	6.02	52.81
Ácido acético 0.1N	5.4	57.71
Ácido acético 1N	4.48	64.85
Ácido acético 1N 37°C	4.91	61.50
Ácido acético 1N 100°C	4.56	64.28
Hidróxido de sodio 0.1N	3.35	73.70
Hidróxido de sodio 1N	3.64	71.47
Hidróxido de sodio 1N 100°C	2.26	82.27

Elaborado por: Autor, 2015

4.2. Caracterización química

En esta etapa, se determinó el contenido de fibra, celulosa, lignina y cenizas de la mazorca de cacao sin tratamiento y con tratamiento, por medio de normas que permiten calcular en forma de porcentaje en peso. Además de esto, se utilizó FTIR para confirmar la composición de las esponjas porosas. Los resultados cuantitativos mostrados en las gráficas es el promedio de tres muestras por cada tratamiento (n=3).

4.2.1 Contenido de fibra

En la Figura 4.2 se observa que al aplicarle tratamiento al mesocarpio de la mazorca de cacao, el contenido de fibra aumenta con respecto a la muestra cruda. El análisis de varianza mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la muestra sin tratar (21.95 ± 0.49) % y los distintos tratamientos. Obteniendo mayor porcentaje de fibra en las muestras tratadas con hidróxido de sodio 1N a reflujo, con un valor de (57.57 ± 0.37) %.

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de fibra si las muestras son tratadas con ácido acético 1N a temperatura ambiente y ácido acético 1N a 37°C. Tampoco existe diferencia significativa al tratar las muestras con agua a reflujo y ácido acético 1N a reflujo.

Existen diferencias significativas entre las muestras tratadas con la misma solución (ácido o base) y temperatura, a diferentes concentraciones, teniendo mayor porcentaje de fibra al aumentar la concentración del ácido acético y del hidróxido de sodio.

Hay diferencias entre el ácido acético e hidróxido de sodio a la misma concentración y temperatura, obteniendo mejores resultados al aplicarle a las muestras hidróxido de sodio.

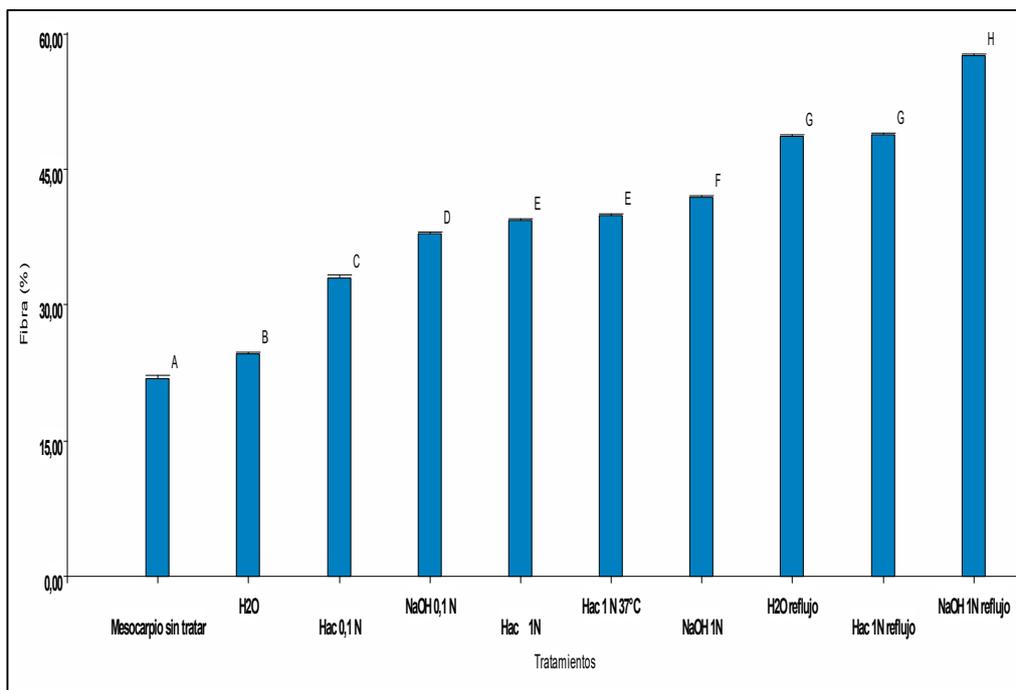


Figura 4. 2 Porcentaje de fibra de las muestras del mesocarpio de cacaos sometidos a diferentes tratamientos químicos

La letra mayúscula que tiene cada barra representa la comparación entre tratamientos. Las barras con la misma letra indican que no existe diferencia significativa entre estos tipos de tratamientos.

Elaborado por: Autor, 2015

4.2.2 Contenido de celulosa

En la Figura 4.3 se observa el porcentaje de celulosa de las muestras, que confirman el análisis de varianza, el cual indicó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la muestra sin tratar (28.50 ± 0.36 %) y las expuestas a los diferentes tratamientos. El contenido de celulosa aumenta al aplicarle tratamiento a las muestras, obteniendo mayor porcentaje al tratar las fibras con hidróxido de sodio 1N a reflujo, con un valor de (47.87 ± 0.16 %).

No existe diferencia significativa al utilizar como tratamiento agua a reflujo, ácido acético 1N a reflujo e hidróxido de sodio 0.1N a temperatura ambiente. El tratamiento con agua destilada a temperatura ambiente mostró resultados similares a los de la muestra cruda, lo que indica que este tratamiento no influye en el contenido de celulosa de las muestras.

Si existe diferencia significativa entre las muestras tratadas con la misma solución y temperatura, a diferentes concentraciones, teniendo mayor porcentaje de celulosa al aumentar la concentración del ácido acético, alcanzando valores hasta $(43.78 \pm 0.59) \%$; esto no ocurrió con el hidróxido de sodio, mediante el cual se obtuvo mayor porcentaje de celulosa a menor concentración de la solución. Existen diferencias significativas al aumentar la temperatura de los tratamientos; esto indica que, al aplicarle temperatura a los tratamientos, aumenta el porcentaje de celulosa.

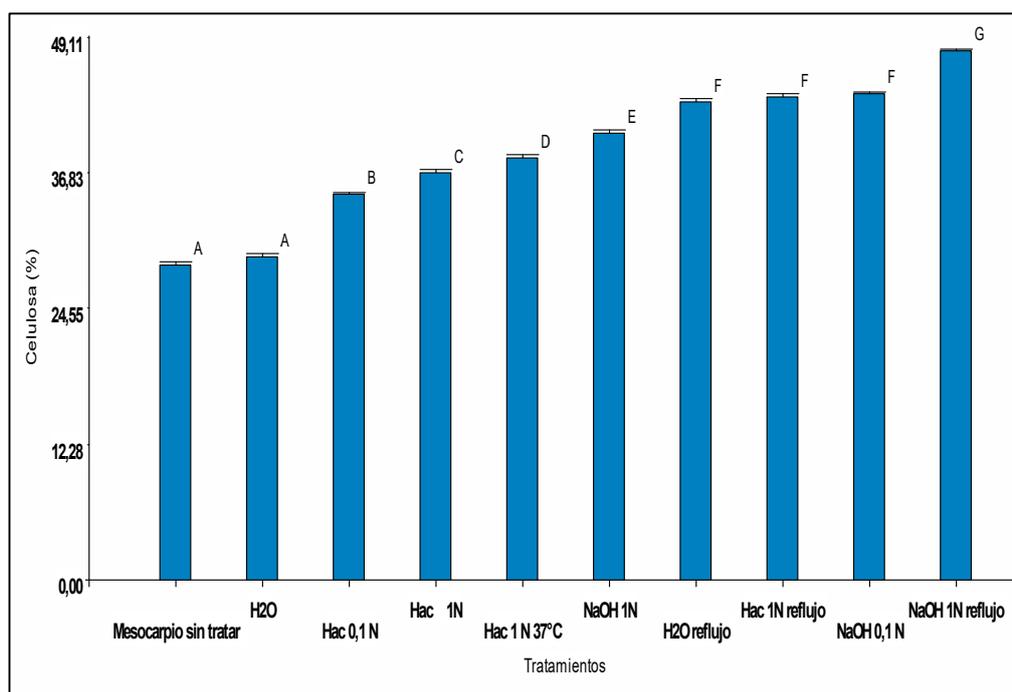


Figura 4. 3 Porcentaje de celulosa de las muestras del mesocarpio del cacao sin tratamiento y con tratamiento

La letra mayúscula que tiene cada barra representa la comparación entre tratamientos. Las barras con la misma letra indican que no existe diferencia significativa entre estos tipos de tratamientos.

Elaborado por: Autor, 2015

4.2.3 Contenido de lignina

En la Figura 4.4 se muestra el contenido de lignina resultado de los tratamientos aplicados. Se observa que al aplicarle tratamiento al mesocarpio de la mazorca de cacao, el contenido de lignina aumenta con respecto a la muestra cruda. El análisis de varianza mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la muestra sin tratar (13.22 ± 0.03 %) y los distintos tratamientos, obteniendo mayor porcentaje de lignina

las muestras tratadas con ácido acético 1N a temperatura ambiente
(50.09±0,02)

No existe diferencia significativa entre los tratamientos con ácido acético 1N a 37°C y ácido acético 0.1N. Existe diferencia significativa entre las muestras tratadas con la misma solución y temperatura, a diferentes concentraciones. Con ácido acético se obtiene mayor porcentaje de lignina al aumentar la concentración y con hidróxido de sodio se obtiene mayor porcentaje de lignina a menor concentración. Al aplicarle temperatura a los tratamientos con el ácido acético disminuye el porcentaje de lignina y con el tratamiento de hidróxido de sodio aumenta.

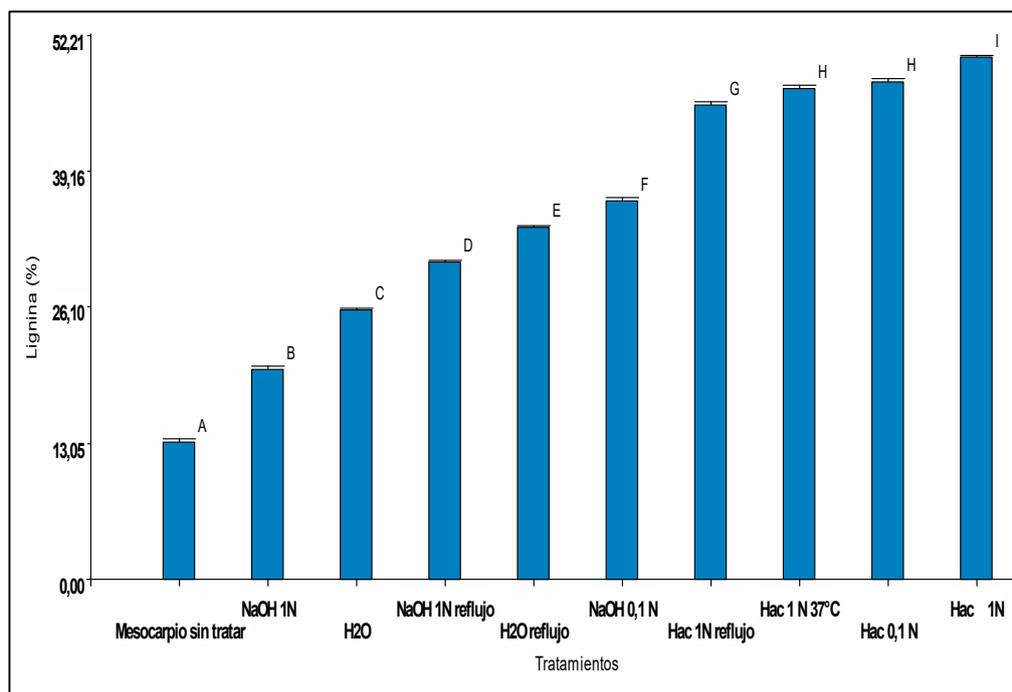


Figura 4. 4 Porcentaje de lignina de las muestras del mesocarpio de cacao sin tratamiento y con tratamiento.

La letra mayúscula que tiene cada barra representa la comparación entre tratamientos. Las barras con la misma letra indican que no existe diferencia significativa entre estos tipos de tratamientos.

Elaborado por: Autor, 2015

4.2.4 Contenido de cenizas

En la Figura 4.5 se observa que al aplicarle tratamiento a la mazorca de cacao, el contenido de ceniza de la muestra aumenta con hidróxido de sodio 1N a reflujo (12.08 ± 0.92) %, el cual resultó ser el más alto contenido de cenizas, y disminuye con ácido acético 0.1N (0.36 ± 0.01) %, con respecto a la muestra cruda (9.03 ± 0.12) %. El análisis de varianza mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la muestra sin tratar y los distintos tratamientos.

No existen diferencias significativas entre los tratamientos con ácido acético 0.1N a temperatura ambiente, ácido acético 1N a reflujo, ácido acético 1N a temperatura ambiente y ácido acético 1N a 37°C. Tampoco hay diferencias al tratar las muestras con agua a temperatura ambiente y agua a reflujo. Sin embargo, bajo tratamiento alcalino, el contenido de cenizas aumentó proporcionalmente con la concentración de hidróxido de sodio y temperatura.

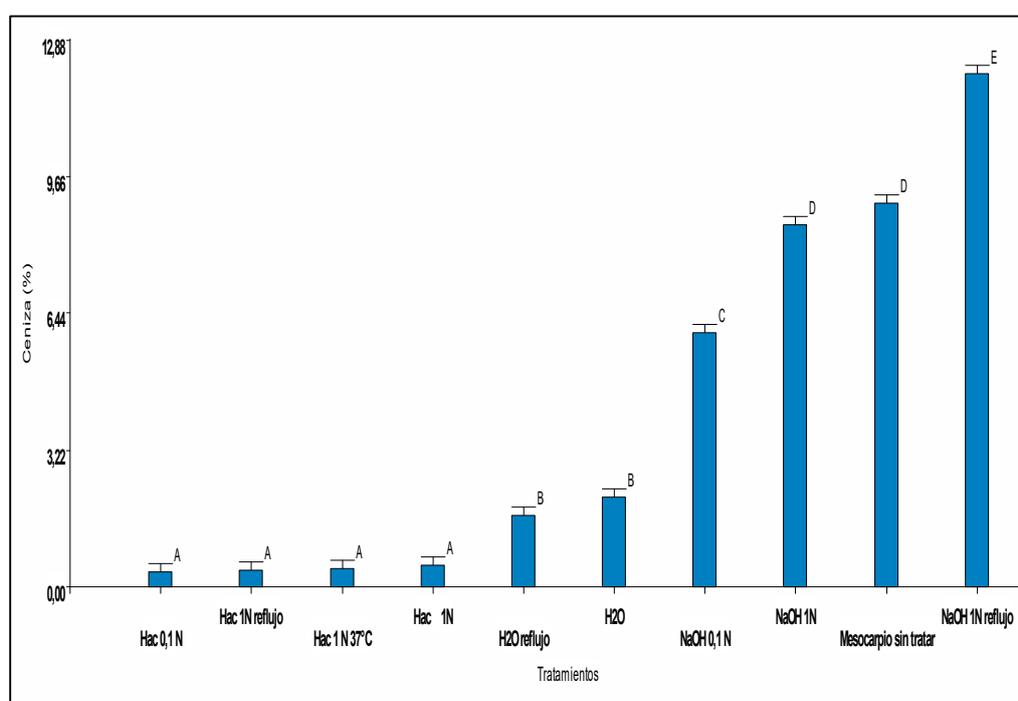


Figura 4. 5 Porcentaje de cenizas de las muestras del mesocarpio de cacao sin tratamiento y con tratamiento.

La letra mayúscula que tiene cada barra representa la comparación entre tratamientos. Las barras con la misma letra indican que no existe diferencia significativa entre estos tipos de tratamientos.

Elaborado por: Autor, 2015

4.2.5 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Se caracterizó las diferentes muestras mediante FTIR, comparando las bandas obtenidas para las muestras del mesocarpio antes y después de los tratamientos químicos. Se observaron las bandas correspondientes a los grupos funcionales de la celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina, las mismas que están compuestas principalmente por alcanos, cetonas, ésteres, alcoholes y anillos aromáticos (ver Tabla 4.2).

Tabla 4. 2 Absorción en IR para grupos funcionales presentes en la estructura química de las fibras

Fibra	Grupo funcional	Estiramiento	Posición de la absorción (cm ⁻¹)
Celulosa	Alcoholes	O - H	3452,0
	Alcanos	CH	2921,2
		CH ₂	1442,0
		CH ₃	1380,0
	Éteres	C-O-C	1111,0
Ácidos carboxílicos	O-H	3452,0	
	C=O	1717,0	

Hemicelulosa	Alcoholes	O-H	3415,7
	Ácidos carboxílicos	O-H	3452,7
		C-O	1102,8
	Alcanos	CH ₂	1442,0
	Éteres	C-O-C	1102,8
Grupo carboxílico y sus derivados	O-H	3415,7	
	C=O	1740,3	
Lignina	Alcoholes	O-H	1740,3
	Alcanos	CH	2917,1
	Aromáticos	C=C	1500 - 1600
	Éteres	C-O-C	1503,3
	Ácidos carboxílicos y sus derivados	O-H	1278,5
C-O		3411,6	
C=O		1715,8	

Fuente: Referencia [44]

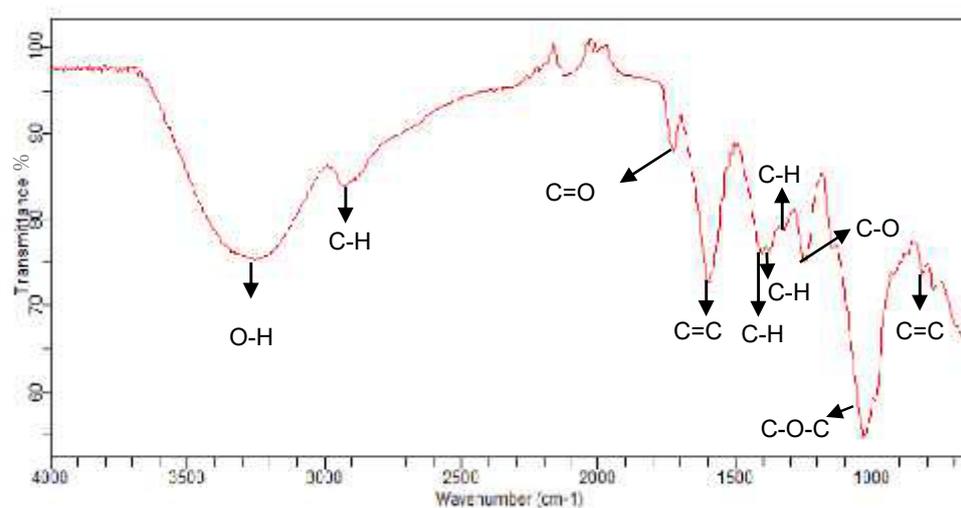


Figura 4. 6 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao sin tratamiento.
Elaborado por: Autor, 2014

En la Figura 4.6 se muestra el espectro de infrarrojo de la muestra del mesocarpio del cacao sin tratamiento. Se observaron bandas características de la celulosa y lignina en el rango 3300 cm^{-1} correspondiente al grupo OH y 2920 cm^{-1} que representa el alargamiento del enlace CH. La banda 1370 cm^{-1} se debe al grupo CH₃, el alargamiento 1020 cm^{-1} corresponden al grupo de los alcanos y éteres [45], la absorbancia en 820 cm^{-1} se tiene la vibración del grupo del carbón anomérico de carbohidratos, los tres espectros corresponden a la celulosa [46]. La banda 1250 cm^{-1} pertenece al enlace C-O de la lignina [47], el pico 1310 cm^{-1} corresponde a la flexión C-H de la lignina. La presencia de la banda 1720 cm^{-1} corresponde al estiramiento C=O de los grupos carbonilos de la fibra, provenientes de la hemicelulosa y la pectina [48]. La absorción 1600 cm^{-1} y 1400 cm^{-1}

surgen de las vibraciones de la estructura de los anillos aromáticos que es característico de la lignina [47].

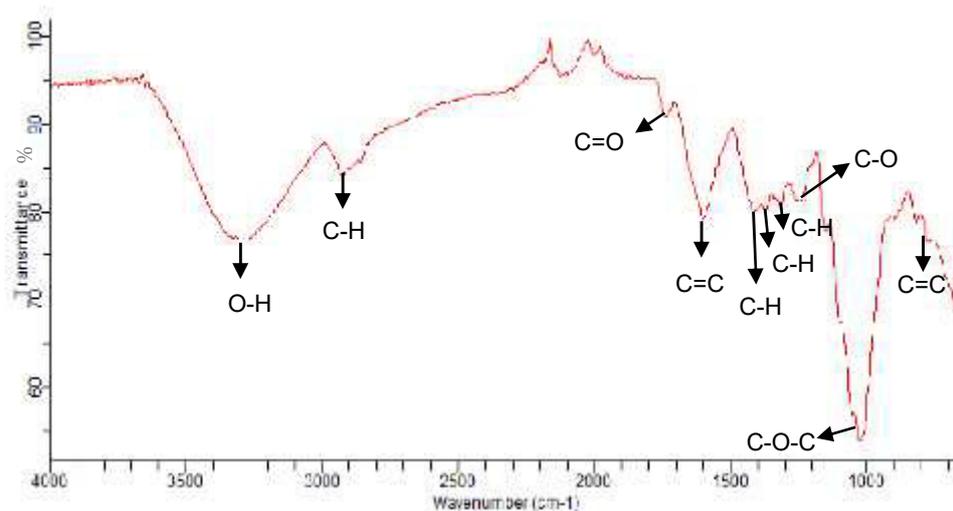


Figura 4. 7 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratada con agua destilada.
Elaborado por: Autor, 2014

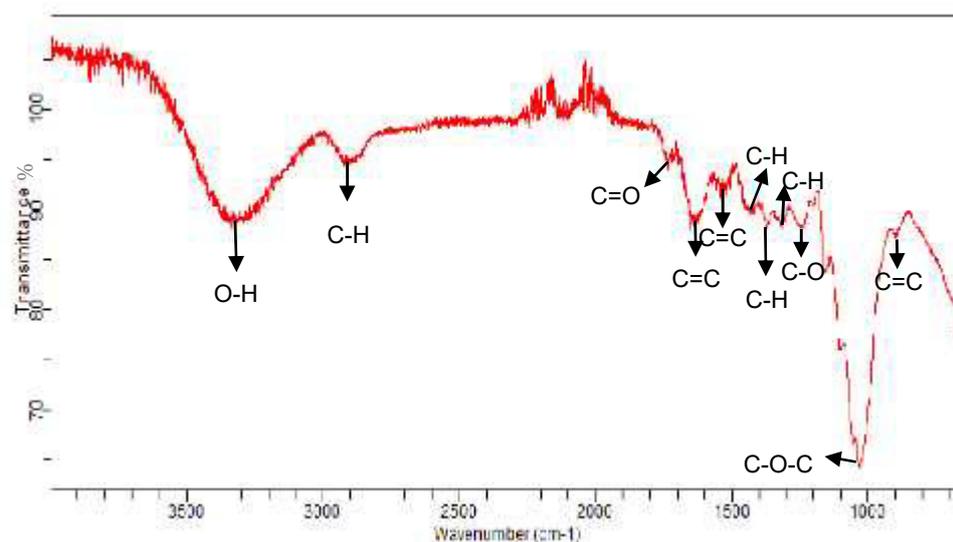


Figura 4. 8 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratada con agua destilada a reflujo.
Elaborado por: Autor, 2015

Los espectros de la muestra sin tratamiento es similar a la muestra tratada con agua destilada en agitación constante durante 72 horas, Figura 4.6 y Figura 4.7. Ambos espectros presentan un patrón similar, cambiando solo el desplazamiento y la longitud de picos correspondientes a ciertos grupos funcionales. La bandas que se desplazaron fueron la del grupo C=O, de 1720cm⁻¹ a 1730cm⁻¹, y de 1400cm⁻¹ a 1410cm⁻¹ que representa los anillos aromáticos característicos de la lignina. Se presentó reducción en las bandas de: 1730cm⁻¹ característica de la hemicelulosa y pectina, 1600cm⁻¹ característica de la lignina y 1250cm⁻¹ característica de la hemicelulosa.

En la Figura 4.8 se observa la muestra del mesocarpio tratada con agua destilada a reflujo, al comparar con los espectros de la Figura 4.6 y 4.7, se puede apreciar que la muestra tratada a reflujo, aparece una banda en 1550cm⁻¹ correspondiente al anillo aromático de la lignina, mientras que a 1200cm⁻¹ aparece un pico correspondiente al enlace C-O-C del anillo de glucosa de la celulosa. Al igual que en la Figura 4.7, se presentó reducción en la banda 1250cm⁻¹ característica de la hemicelulosa, 1600cm⁻¹ característica de la lignina y en 1705cm⁻¹ característica de la hemicelulosa y pectina.

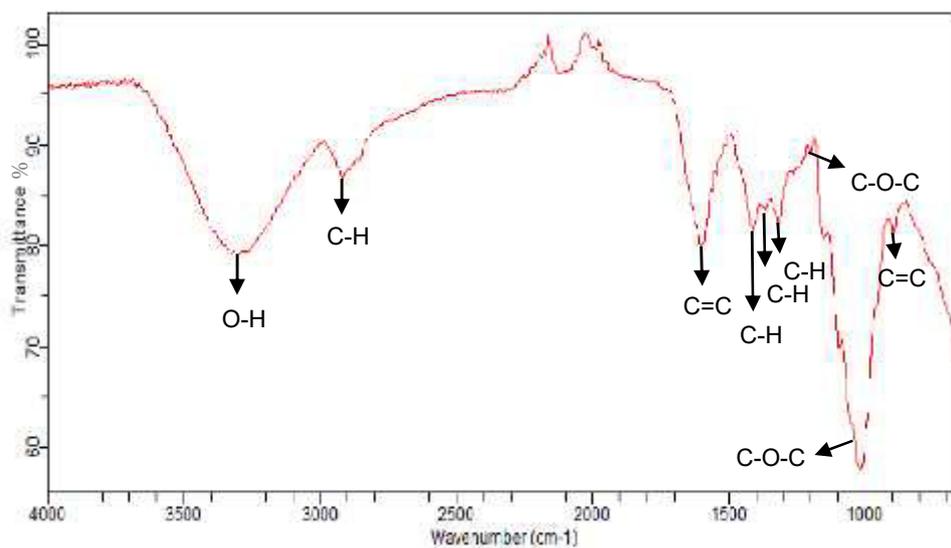


Figura 4. 9 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratado con hidróxido de sodio 0.1 N
Elaborado por: Autor, 2014

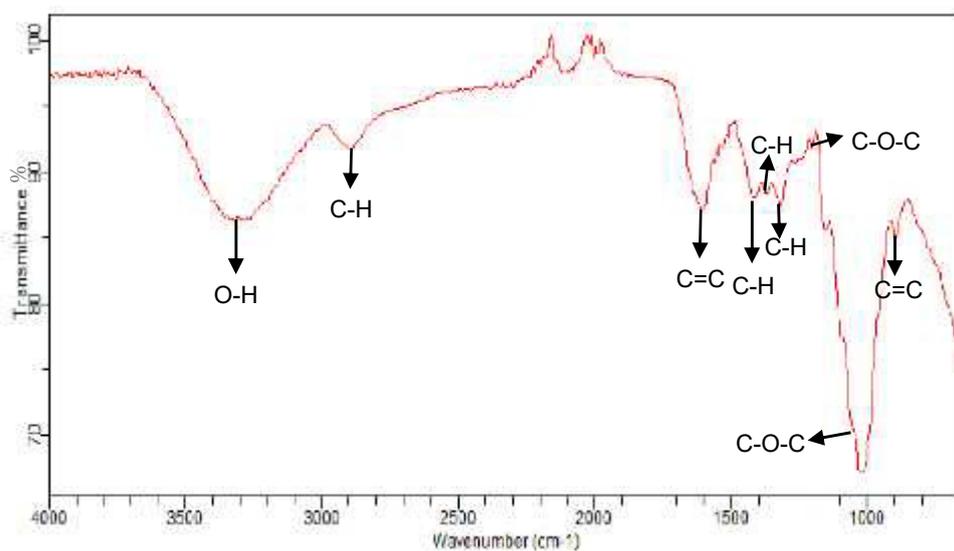


Figura 4. 10 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratado con hidróxido de sodio 1 N
Elaborado por: Autor, 2014

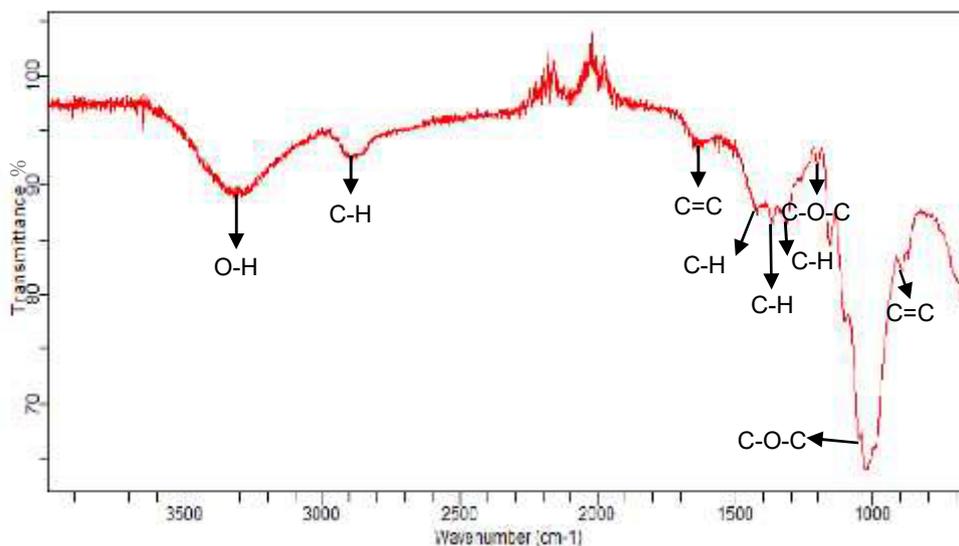


Figura 4. 11 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratado con hidróxido de sodio 1 N a reflujo
Elaborado por: Autor, 2014

Las Figuras 4.9 y 4.10 muestran los espectros de las muestras del mesocarpio del cacao tratadas con hidróxido de sodio 0.1 N y 1N, respectivamente. Al comparar los espectros no se aprecian cambios significativos; continúan presentes las mismas bandas. En ambos casos, se desplazaron las bandas de 2900cm⁻¹ a 2910cm⁻¹ y de 1595cm⁻¹ a 1600cm⁻¹. Por otra parte, la muestra tratada con hidróxido de sodio 1N presentó reducción en las bandas de 3300cm⁻¹ y 1600cm⁻¹ característica de la celulosa y lignina.

En la Figura 4.11 se observa la muestra tratada con hidróxido de sodio 1N a reflujo. Al compararla con las muestras tratadas con hidróxido de

sodio a 0.1 N y 1N, en agitación constante y a temperatura ambiente se puede apreciar que a reflujo disminuye considerablemente la banda 1650cm⁻¹ correspondiente al anillo aromático de la lignina.

Haciendo una comparación entre las muestras sin tratamiento y previamente tratadas con hidróxido de sodio, es posible observar algunos cambios. Al aplicar el tratamiento alcalino desaparece la banda 1720cm⁻¹ característica de la hemicelulosa y la pectina, aparece un pico en 1190cm⁻¹ correspondiente al enlace C-O-C del anillo de glucosa de la celulosa, se reducen las bandas 3300cm⁻¹ característica de la celulosa, 1600cm⁻¹ correspondiente al anillo aromático de la lignina y 1250cm⁻¹ es la banda correspondiente a la vibración del enlace C-O de la lignina. En el análisis del espectro se concluyó que no hay niveles apreciables de hemicelulosa, debido a la ausencia de la banda de absorción 1730 cm⁻¹ y 1230 cm⁻¹ relacionadas con la vibración del grupo C=O [48]. Esto indica que los tratamientos con hidróxido de sodio podrían eliminar la hemicelulosa.

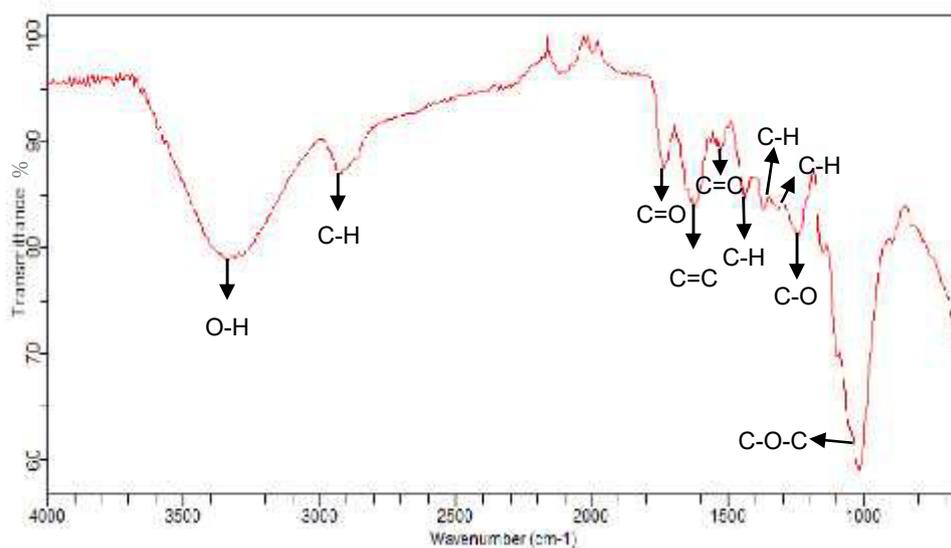


Figura 4. 12 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratado con ácido acético 0.1 N
Elaborado por: Autor

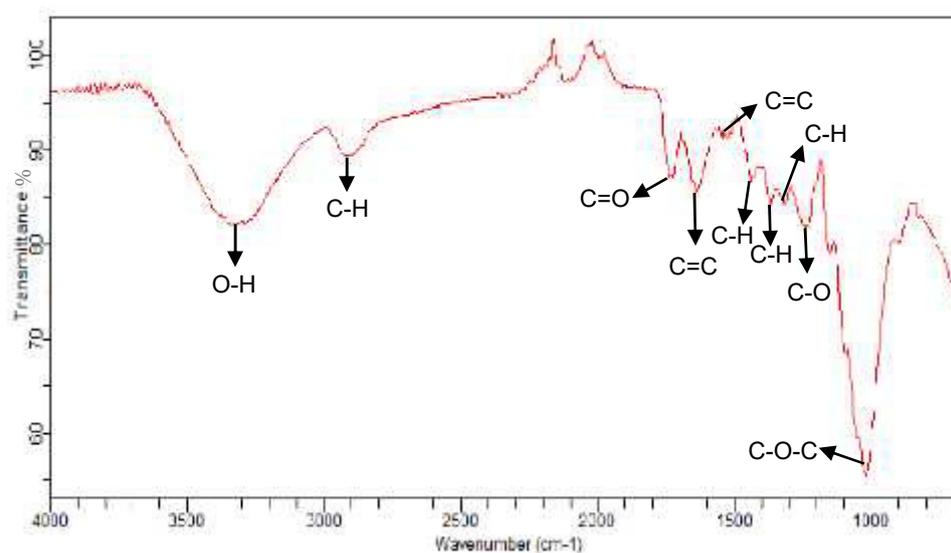


Figura 4. 13 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratado con ácido acético 1 N
Elaborado por: Autor

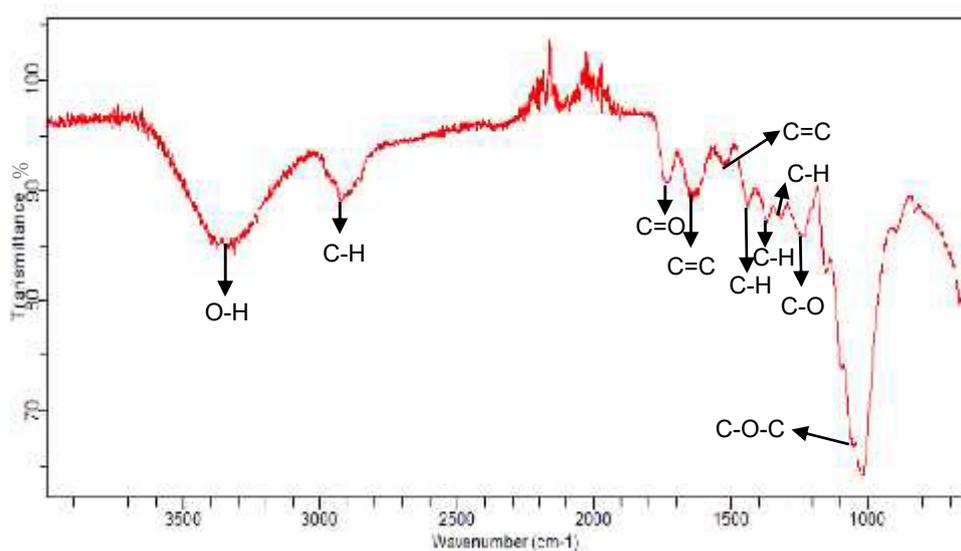


Figura 4. 14 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratado con ácido acético 1 N a 37°C
Elaborado por: Autor

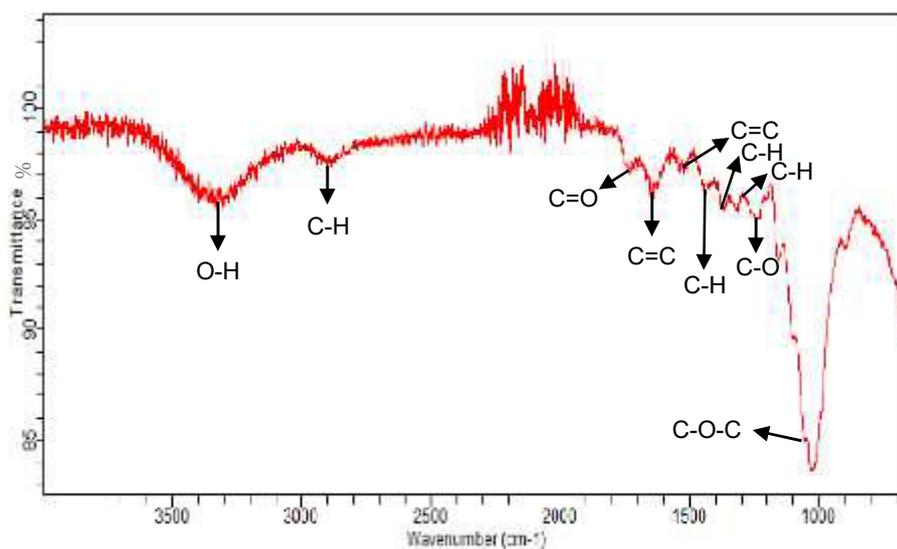


Figura 4. 15 Espectro FTIR de una muestra del mesocarpio del cacao tratado con ácido acético 1 N a reflujo
Elaborado por: Autor

En la Figura 4.12 y 4.13 se observan los espectros de infrarrojo de las muestras tratadas con ácido acético 0.1N y 1N. Los dos espectros son similares, continúan presentes las mismas bandas. Se observó un desplazamiento de las bandas de: 2920cm⁻¹ a 2930cm⁻¹ correspondiente a la celulosa, 1720cm⁻¹ a 1740cm⁻¹ correspondiente a la hemicelulosa, 1610cm⁻¹ a 1645cm⁻¹, y 1510cm⁻¹ a 1520cm⁻¹, correspondientes a la lignina. La muestra tratada con ácido acético 1N presentó una reducción en el pico 1645cm⁻¹ característica de la celulosa y hemicelulosa.

La muestra tratada con ácido acético 1N a 37°C, Figura 4.14, presenta las mismas bandas que la muestra tratada con ácido acético 1N a temperatura ambiente. Sin embargo, la muestra procesada con ácido acético 1N a reflujo, Figura 4.15, al compararla con las otras muestras tratadas con la misma sustancia, presenta reducción en las bandas 3300cm⁻¹ y 2900cm⁻¹ correspondientes a la celulosa, 1730cm⁻¹ característico de la hemicelulosa y 1670cm⁻¹ característico de la lignina.

Al comparar las bandas obtenidas de las muestras antes y después del tratamiento con ácido acético, es posible observar algunos cambios. Al aplicar el tratamiento aparece una banda en 1520cm⁻¹ correspondiente a la vibración de la estructura de anillos aromáticos de la lignina. Se

desplazaron las bandas de absorción de 2920cm⁻¹ a 2930cm⁻¹ correspondiente a la celulosa, 1720cm⁻¹ a 1740cm⁻¹ correspondiente a la hemicelulosa, 1600cm⁻¹ a 1645cm⁻¹ y 1400cm⁻¹ a 1450cm⁻¹, son características de la lignina. El tratamiento presentó reducción en las bandas 1645 cm⁻¹ característico de la lignina y 1450cm⁻¹ característico de la celulosa.

4.3. Caracterización física

4.3.1 Grado de hinchamiento

Las Figuras 4.16, 4.17 y 4.18, muestran las curvas de grado de hinchamiento del mesocarpio de la mazorca de cacao sin tratamiento y las procesadas con los diferentes tratamientos. En general existen diferencias significativas entre las curvas de hinchamiento de la muestra cruda y aquellas correspondientes a las tratadas ($p < 0.05$). Todas las muestras que fueron expuestas a tratamiento tuvieron mayor grado de hinchamiento que la muestra cruda, teniendo los mayores valores las muestras tratadas con hidróxido de sodio a reflujo, con un valor de (42.40 ± 0.60) % a las 72 horas.

Las curvas entre el tratamiento con hidróxido de sodio 0.1N y 1N, en agitación constante y a temperatura ambiente, fueron similares, por lo que se puede decir que la concentración del NaOH no influye en el

grado de hinchamiento. Un comportamiento similar se observa entre las muestras tratadas con ácido acético 1N a temperatura ambiente y a 37°C, sin diferencias significativas. Sin embargo, existe una proporcionalidad de este parámetro con la concentración de ácido acético y la temperatura, puesto que el grado de hinchamiento aumentó significativamente ($p < 0,05$) a mayores valores de estas variables. En este caso, el grado de hinchamiento, a las 72h, fue de (17.41 ± 0.49) % para ácido acético 0,1N, mientras que para el 1N fue de (20.15 ± 0.87) %. En cuanto a la temperatura, para la concentración de 1 N, este parámetro aumentó a (26.59 ± 0.45) %.

Se puede apreciar, en todas las gráficas que el grado de hinchamiento de las muestras tratadas con NaOH fue significativamente mayor al encontrado con los otros tratamientos., alcanzando los valores más altos en condiciones de reflujo, con (42.40 ± 0.60) % a las 72 h. Fue en estas condiciones de reflujo que se alcanzaron los valores más altos para el tratamiento ácido y neutro, en comparación con aquellos llevados a cabo a temperatura ambiente y a 37°C.

Es importante señalar que a concentraciones de 0,1N a temperatura ambiente y en reflujo se observó un equilibrio a las 72 h, evidenciado por una tendencia del grado de hinchamiento a mantenerse constante.

En el caso del tratamiento con soluciones 1N a temperatura ambiente y 37°C, el comportamiento fue diferente, mostrando aún una tendencia a aumentar. Esto quiere decir que no se alcanzó un equilibrio y que las muestras podrían haber seguido absorbiendo agua después del período estudiado.

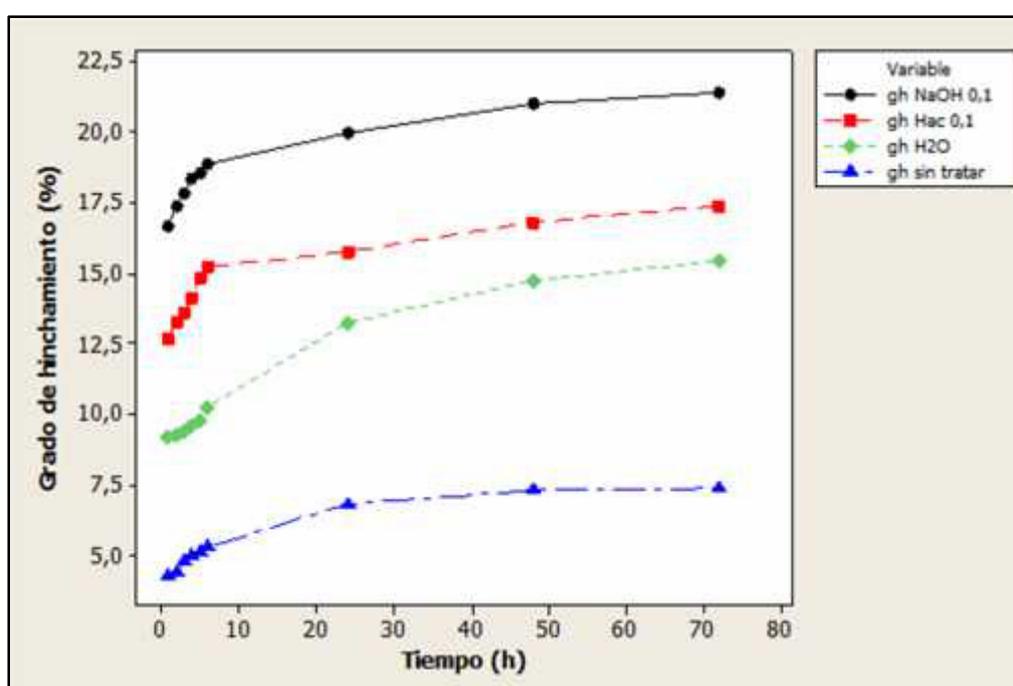


Figura 4. 16 Grado de hinchamiento de las muestras sin tratamiento, tratadas con H₂O, HAc 0.1N, e NaOH 0.1N, en agitación
Elaborado por: Autor, 2015

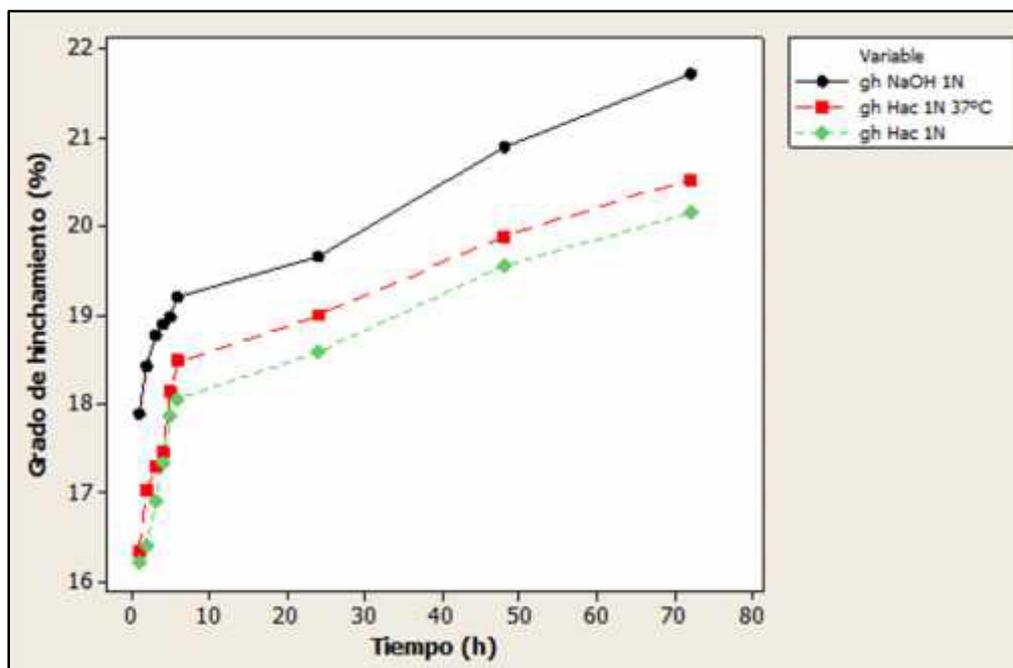


Figura 4. 17 Grado de hinchamiento de las muestras tratadas con HAc 1N, HAc 1N a 37°C e NaOH 1N, en agitación
Elaborado por: Autor, 2015

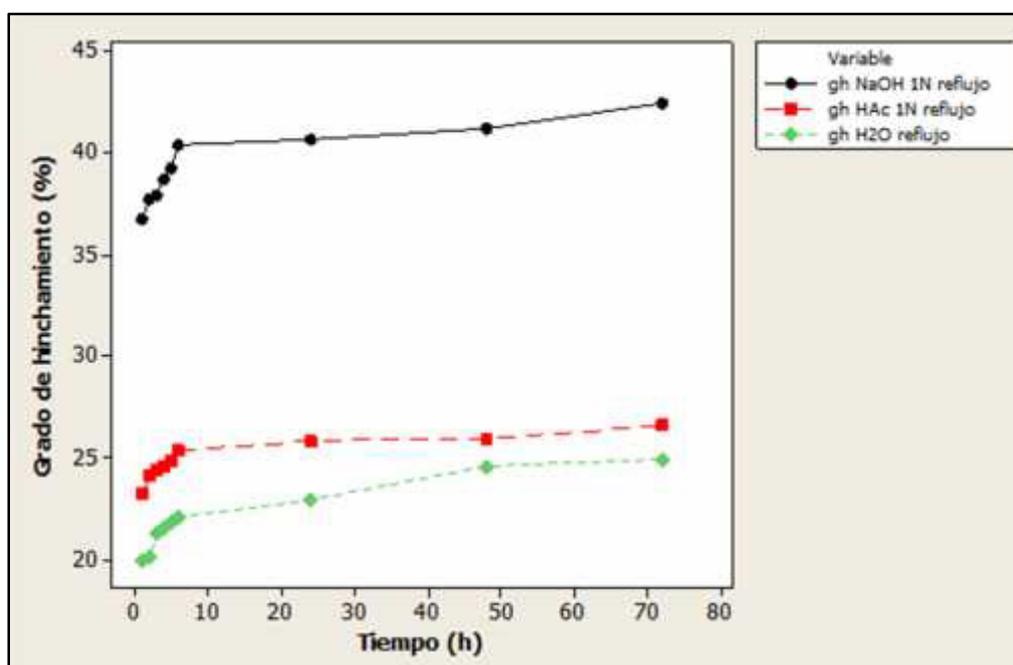


Figura 4. 18 Grado de hinchamiento de las muestras tratadas con H₂O, HAc 1N, e NaOH 1N, a refluxo.
Elaborado por: Autor, 2015

4.3.2 Microscopía estereoscópica

El microscopio estereoscópico se utilizó para observar la morfología general de las muestras. La Figura 4.19A corresponde al mesocarpio de cacao sin tratamiento, previamente liofilizado, la muestra es de color amarillo la superficie y café los bordes, con una ausencia aparente de poros.

La muestra tratada con agua destilada en agitación constante, Figura 4.19B, es de color crema; se puede observar una superficie irregular, aún con ausencia aparente de porosidad. La muestra tratada con agua destilada a reflujo, Figura 4.19C, es de color café con superficie irregular, y, a diferencia de las muestras anteriores, se pueden apreciar poros y canales.

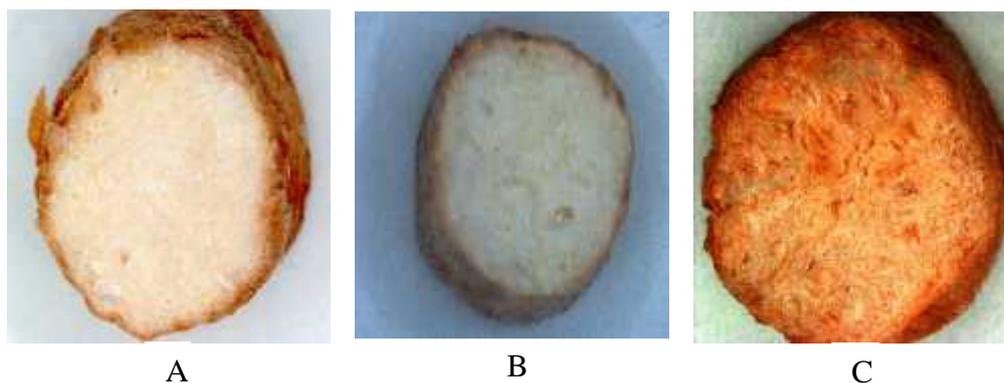


Figura 4. 19 Micrografías estereoscópicas. A) Sin tratamiento, B) Tratada con agua destilada en agitación, C) Tratada con agua destilada a reflujo
Elaborado por: Autor, 2015

En la Figura 4.20 se observan las muestras tratadas con hidróxido de sodio. La Figura 4.20A corresponde a la muestra tratada con NaOH 0.1 N, en la que se puede ver poros de diferentes tamaños y grietas. La Figura 4.20B corresponde a la muestra tratada con NaOH 1N, el color de la muestra es crema, se pueden apreciar algunos poros, grietas y canales. En la Figura 4.20 C (condiciones de reflujo) se puede notar una mayor porosidad, con un tamaño de poro variable. El tratamiento con NaOH a temperatura ambiente blanquea las muestras y a 100°C las aclara.

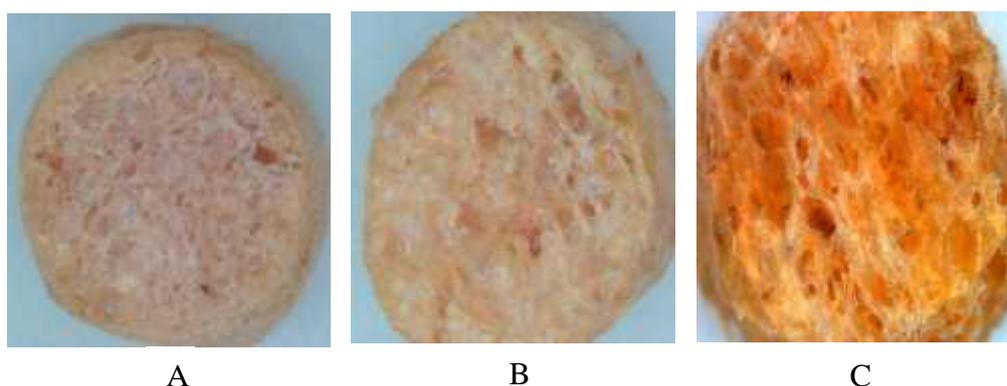


Figura 4. 20 Micrografías estereoscópicas de las muestras tratadas con NaOH. A) 0.1N, B) 1N en agitación, C) 1N a reflujo
Elaborado por: Autor, 2015

En la Figura 4.21 se puede observar las muestras tratadas con ácido acético. La Figura 4.21 A corresponde a la muestra tratada con HAc 0.1N, el color es café: se puede ver irregularidad en la superficie y presencia de poros de tamaño variado. La muestra tratada con HAc 1N a temperatura ambiente, Figura 4.21 B, no se puede notar los poros y

la superficie no es uniforme; el color es crema. La Figura 4.21 C corresponde a la muestra tratada con HAc 1N a temperatura de 37°C, en donde se pueden apreciar canales y poros de distintos tamaños. La Figura 4.21 D corresponde a la muestra tratada con HAc a reflujo, la superficie es irregular, con poros de distintos tamaños. La muestra tratada con ácido acético a bajas concentraciones se torna de color oscuro, las tratadas con mayor concentración blanquean y aclaran la muestra.

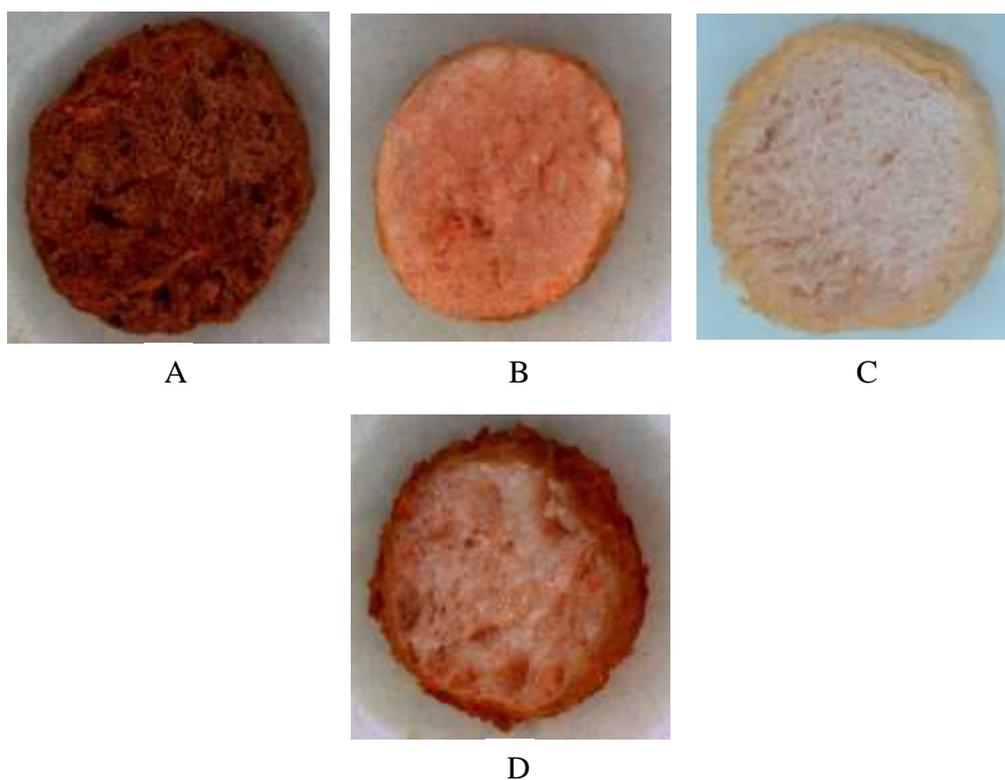


Figura 4. 21 Micrográficas estereoscópicas de las muestras tratadas con HAc. A) 0.1N, B) 1N en agitación, C) 1N en agitación a 37°C, D) 1N a reflujo

Elaborado por: Autor, 2015

4.3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La micro-morfología de la estructura porosa se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). De la Figura 4.22 a la 4.31 se observan las imágenes del SEM obtenidas de las muestras sin tratamiento y las procesadas bajo las diferentes condiciones.

La Figura 4.22 corresponde a la muestra sin tratamiento previamente liofilizada; en esta se observa una estructura porosa, presentando tamaño de poros menores a 50 micrómetros (Figura 4.22 A) y paredes rugosas. Las Figuras 4.23 y 4.24 representan las muestras que fueron tratadas con agua destilada en agitación a temperatura ambiente y a reflujo respectivamente. Se puede observar que en la Figura 4.23 se forma un canal, y la muestra presenta una gran variedad en el tamaño de los poros; sin embargo, la mayoría de estos está por debajo de 50 μm . En la Figura 4.24, por otra parte, los poros se presentan de mayor tamaño, con algunos llegando a alcanzar hasta 250 μm . Al comparar las muestras sin tratamiento y las tratadas con agua destilada, se observa mayor irregularidad y tamaño de poros en las muestras tratadas con agua destilada a reflujo.

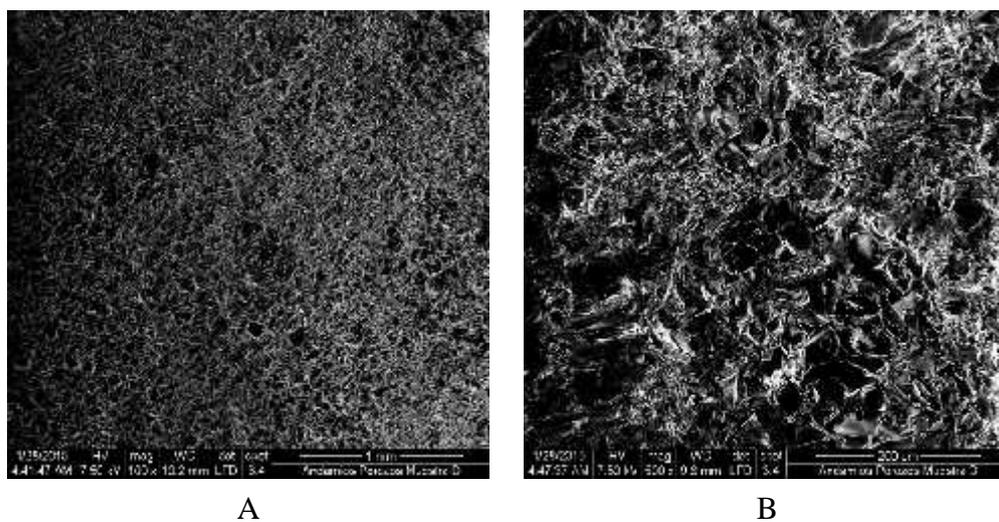


Figura 4. 22 Micrografías electrónicas de las muestras sin tratamiento obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X.
Elaborado por: Autor, 2015

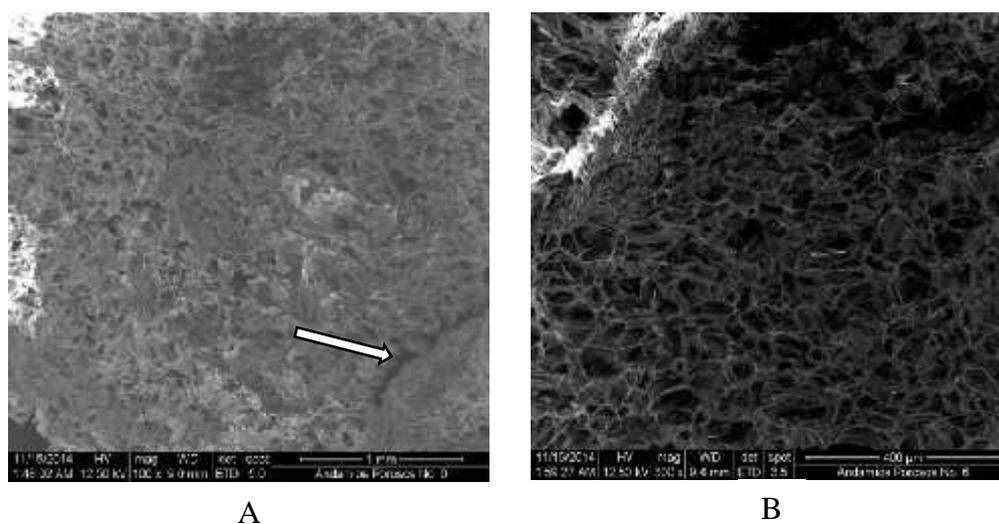


Figura 4. 23 Micrografías electrónicas de las muestras tratadas con H₂O en agitación obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 300X
Elaborado por: Autor, 2015

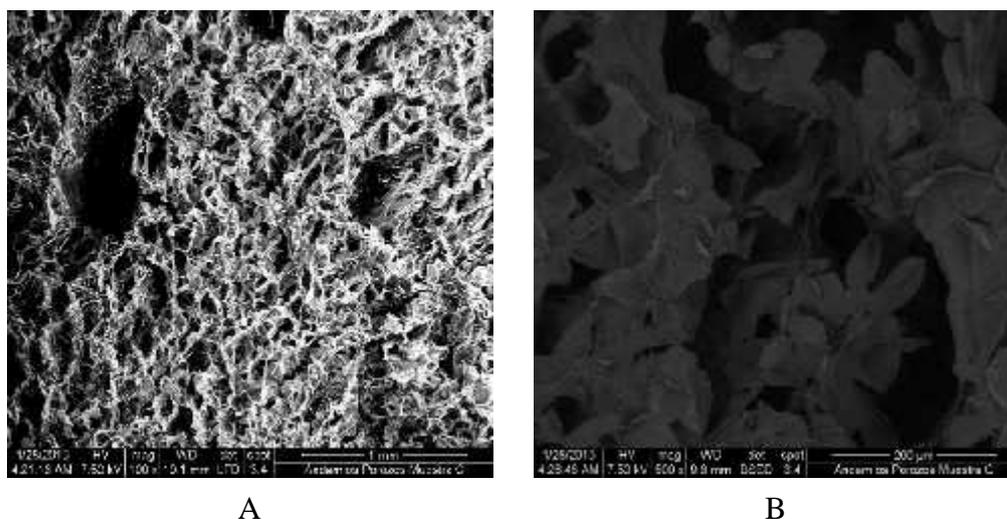


Figura 4. 24 Micrográficas electrónicas de las muestras tratadas con H₂O a reflujo obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X
Elaborado por: Autor, 2015

Las Figuras 4.25, 4.26 y 4.27, representan las muestras tratadas con hidróxido de sodio 0.1N, 1N, en agitación constante y 1N a reflujo, respectivamente. En la Figura 4.25 se pueden observar poros de distintos tamaños, menor a 100 micrómetros, aunque de mayor tamaño a los encontrados en el tratamiento con agua. La muestra tratada con NaOH 1N, presenta una morfología similar, aunque la cantidad de poros parece disminuir (análisis posteriores son necesarios para corroborar esta hipótesis). En la Figura 4.27 se puede observar que la aplicación del tratamiento de reflujo resultó una mayor cantidad de poros y tamaño, superior a 100 µm, alcanzando hasta 200 µm, con respecto a los tratamientos a temperatura ambiente. En este caso, los poros parecen

ser más profundos, los que indica que, probablemente haya una estructura porosa más interna.

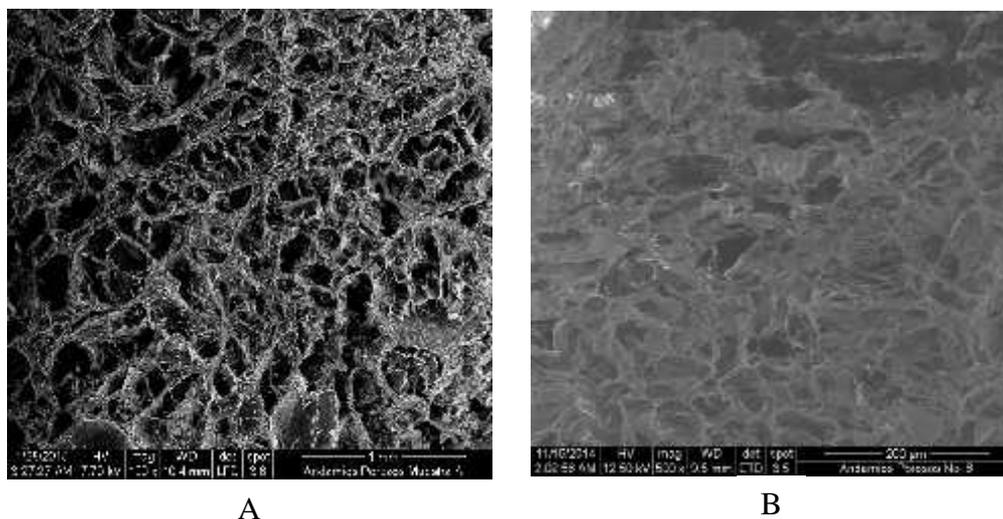


Figura 4. 25 Micrografías electrónicas de las muestras tratadas con NaOH 0.1N en agitación obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X
Elaborado por: Autor, 2015

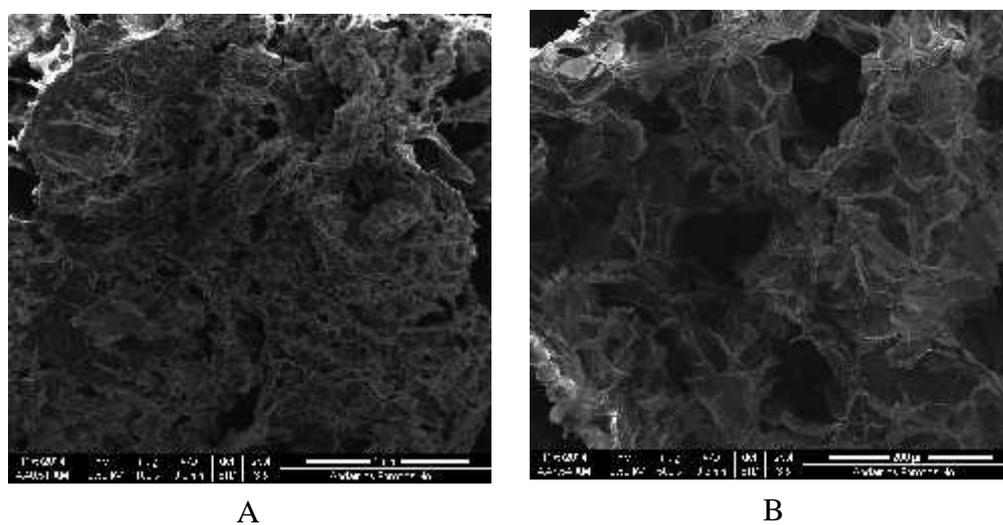


Figura 4. 26 Micrografías electrónicas de las muestras tratadas con NaOH 1N en agitación obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X
Elaborado por: Autor, 2015

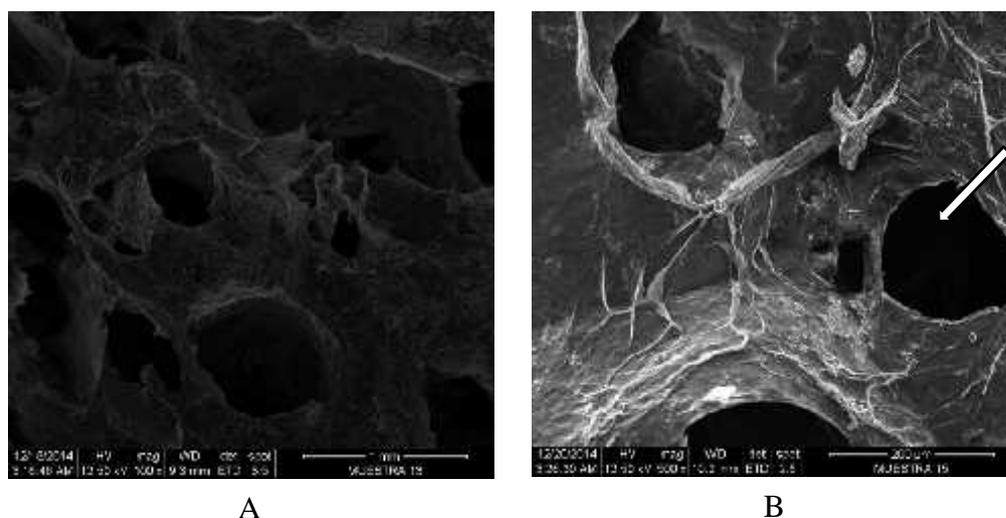


Figura 4. 27 Micrográficas electrónicas de las muestras tratadas con NaOH 1N a reflujo obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X
Elaborado por: Autor, 2015

Las Figuras 4.28, 4.29, 4.30 y 4.31, corresponden las muestras tratadas con ácido acético 0.1N, 1N a temperatura ambiente, 1N a 37°C y 1N a reflujo, respectivamente. La Figura 4.28 presenta diferentes tamaños de poros y una superficie poco uniforme. Adicionalmente, se puede observar que muchos de los poros más pequeños son superficiales (Figura 4.28 B), mientras que en los poros más grandes se aprecia cierta profundidad. En la Figura 4.29 se puede observar que la muestra (1N ácido acético, temperatura ambiente) presenta poros poco profundos, mientras que la superficie es irregular. La Figura 4.30 se observa una superficie rugosa y los poros tienen un diámetro menor a 100 micrómetros. Al aumentar la temperatura a 100°C y aplicar reflujo

(Figura 4.31), la muestra presenta poros de diferentes diámetros hasta de 150 micrómetros.

En general, las muestras tratadas con ácido acético presentan menos poros que aquellas tratadas con hidróxido de sodio. En la mayoría de los casos, los poros, resultado del ataque ácido, son superficiales, mientras que aquellos productos del tratamiento alcalino parecen tener una mayor profundidad.

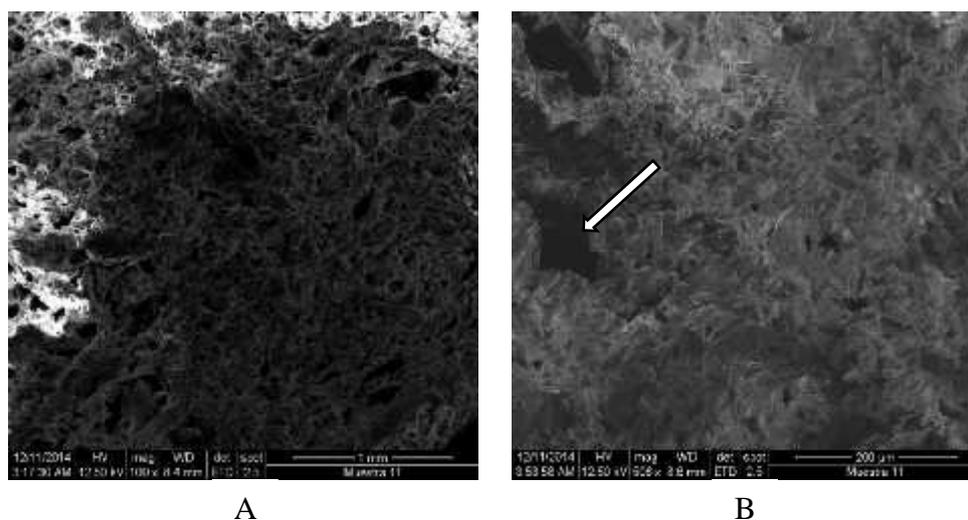


Figura 4. 28 Micrografías electrónicas de las muestras tratadas con HAc 0.1N en agitación obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X
Elaborado por: Autor, 2015

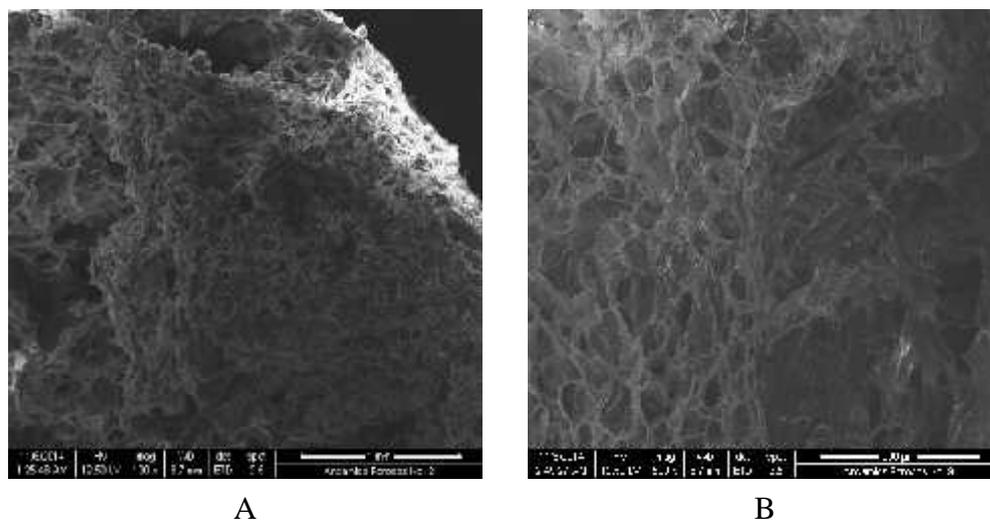


Figura 4. 29 Micrografías electrónicas de las muestras tratadas con HAc 1N en agitación obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X
Elaborado por: Autor, 2015

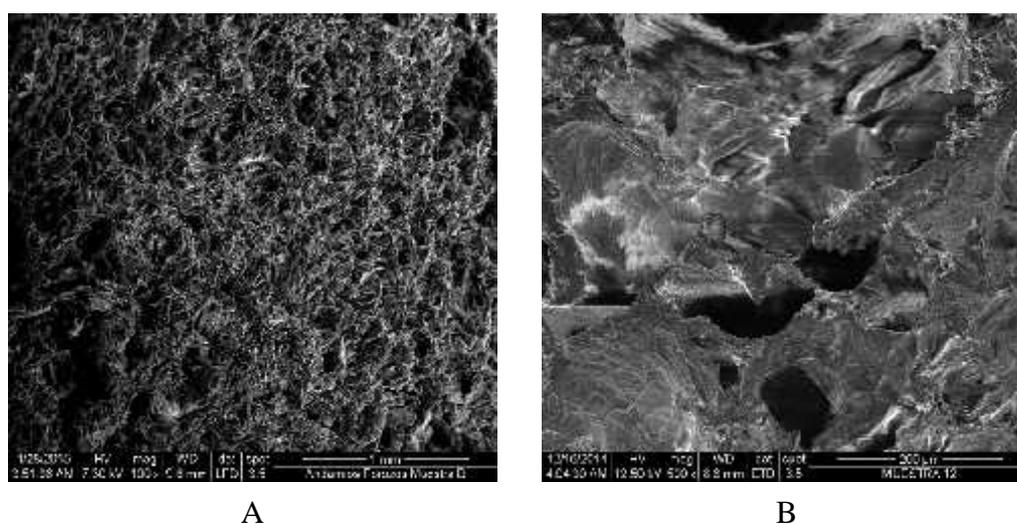


Figura 4. 30 Micrografías electrónicas de las muestras tratadas con HAc 1N en agitación a 37°C obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X
Elaborado por: Autor, 2015

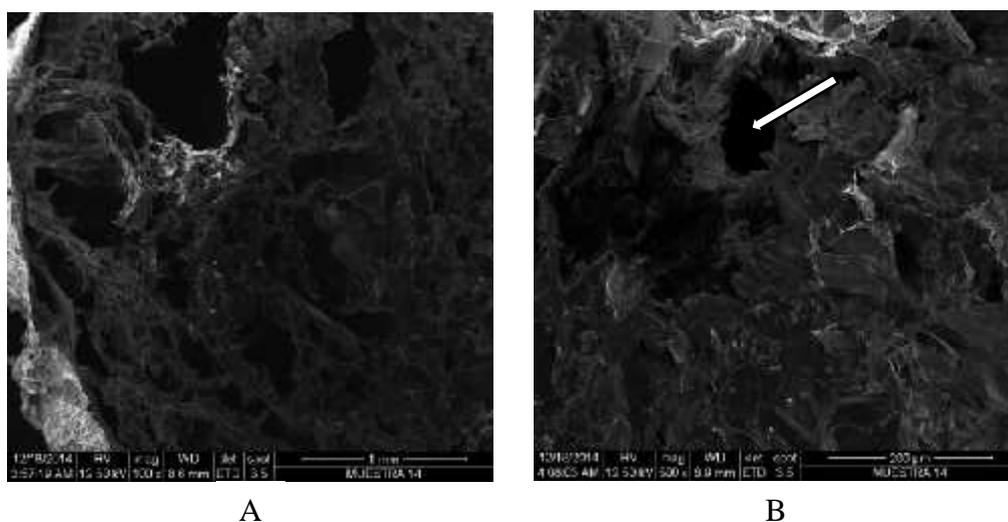


Figura 4. 31 Micrografías electrónicas de las muestras tratadas con HAc 1N a reflujo obtenidas por el SEM. A) 100X, B) 500X
Elaborado por: Autor, 2015

4.4. Discusión

La importancia de este trabajo resuena en la necesidad que plantea el Plan Nacional del Buen Vivir 2013-2017, en su objetivo 11, política 11.5, de dar valor agregado a desechos agroindustriales. De aquí que, al reconocer al cacao como uno de los rubros estratégicos y de mayor producción a nivel nacional, los desechos producto de su cosecha para su procesamiento en chocolate se hacen un problema medioambiental. Es poco el trabajo que se ha hecho en la búsqueda de soluciones viables para darle un alto valor agregado a este sub-producto, pero algunos esfuerzos se han conducido en el área de la ingeniería de alimentos. La proposición del mesocarpio de la cáscara de la mazorca

como un posible biomaterial es completamente novedosa. En especial, las matrices porosas que en este trabajo se proponen podrían ser empleadas en aplicaciones de regeneración de tejidos de un grosor limitado, tal es el caso del cartílago y hueso maxilofacial.

Esta investigación consistió en una aproximación inicial a lo que sería la producción de matrices o andamios porosos con potencial uso en la industria biomédica. De esta manera, se estudiaron procesos, escalables a futuro, basados en el tratamiento del mesocarpio de la mazorca del cacao bajo condiciones ácidas, alcalinas y neutras, logrando resultados diferentes para cada tratamiento en cuanto a las características físicas y químicas de las mismas.

Los resultados obtenidos del contenido de celulosa y lignina, por FTIR y por medio de normas que permiten calcular el porcentaje de estos carbohidratos, no presentan cambios significativos. Los dos métodos indican una clara evidencia de las modificaciones químicas que ocurren durante el tratamiento efectuado a las muestras.

El tratamiento alcalino (hidróxido de sodio) disminuyó la cantidad de hemicelulosa, evidenciado por la desaparición de bandas características en los espectros FTIR, y aumenta el porcentaje de

lignina y celulosa con respecto a la muestra cruda, esto coinciden con los resultados obtenidos por Elizondo (1998) y Hernao y col., (2009). Ya anteriormente se había publicado que, bajo condiciones alcalinas, la lignina es degradada en segmentos fenólicos, que son fácilmente eliminados a través de lavados. De igualmente, previamente se ha reportado el álcali destruye la estructura de acoplamiento de la hemicelulosa, produciendo una fibrilación que permite el acercamiento de las cadenas celulosa.

Las muestras tratadas con agua presentaron un menor contenido de ceniza y hemicelulosa, aumentó el contenido de celulosa y lignina, con respecto a la muestra cruda. Estos resultados son similares a lo observado por Rocha y col., (2008).

El contenido de cenizas totales aumentó con el tratamiento de hidróxido de sodio, observación similar a lo reportado por Elizondo (1998). Como bien se sabe, las cenizas no son más que sales inorgánicas de calcio, magnesio y potasio, entre otros. Mediante un ataque con ácido acético, podrían formarse acetatos con una mayor solubilidad que las formas naturalmente presentes en el tejido vegetal, y por lo tanto sería más fácilmente eliminadas durante el lavado. La disminución del contenido

de ceniza, debido al ataque ácido, afirma lo expuesto por Manoj y Narayanan (2013).

El tratamiento con ácido acético aumentó el contenido de celulosa y lignina, con respecto a las muestras crudas, y disminuyó de manera significativa el contenido de hemicelulosa (desaparición de pico característico en FTIR). Los resultados de lignina obtenidos con este tratamiento es diferente a los resultados de Guozhi y col., (2013), según sus observaciones el ácido acético elimina la lignina y hemicelulosa, y aumenta la celulosa. Sin embargo, con respecto al NaOH, el tratamiento ácido aumentó la proporción de lignina, la cual no es soluble en ácido. Por el contrario, el porcentaje de celulosa disminuyó con respecto al álcali, debido a la hidrólisis causada por el ácido acético.

Sin embargo, aún queda la incógnita de por qué las muestras sin tratar tuvieron menores porcentajes, en peso, de celulosa, lignina y otros componentes. Esto puede deberse a una mayor cantidad de masa sólida representada por pectinas que son extraídas durante los tratamientos ácido y alcalino, y en menor medida en lavados con agua.

De acuerdo a Barazarte y col., (2008), la extracción de pectinas a partir de la cáscara de cacao es mayor en soluciones alcalinas que en ácidas,

y la mayor cantidad de estas está presente en el mesocarpio. En el presente trabajo esto se vio reflejado en el porcentaje de masa extraída en cada tratamiento, siendo significativamente mayor en el tratamiento con NaOH (> 80%). Este resultado además provee una medida, aunque indirecta, de la porosidad de las esponjas. Dada las diferencias en la cantidad de materia extraída, la cual es proporcional al espacio vacío dentro de las esponjas, se puede decir que las muestras tratadas en medio alcalino son más solubles que aquellas procesadas con ácido acético, las cuales a su vez son más porosas que aquellas tratadas con agua.

Las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de barrido y el estereoscopio, nos indica que las muestras con mayor contenido de celulosa, presentan mayor diámetro en sus poros. Este último parámetro se correlaciona con la porosidad, y corrobora lo asumido de las micrografías de las muestras tratadas con NaOH en reflujo, a partir de las cuales se estableció la hipótesis de una red porosa subyacente. Estos resultados demuestran lo expuesto por Guozhi y col., (2013), quienes indican que la superficie de la fibra se vuelve más abierta y porosa al eliminar la hemicelulosa y lignina, y aumentan, consecuentemente, el porcentaje de celulosa. Castro y Palencia (2006)

de igual manera observaron mayor grado de hinchamiento en muestras con alto contenido de celulosa.

En base a los resultados obtenidos nos podemos dar cuenta que la concentración de la solución de tratamiento, y la temperatura son esenciales para el tratamiento de las fibras y por ende de las muestras del mesocarpio. Teniendo mejores resultados al aumentar la concentración y la temperatura de los tratamientos, esto coincide con lo expuesto por Castro y Palencia (2006).

Estos resultados están mejores representados en varios niveles. A nivel químico, el contenido de celulosa es importante, puesto que de los componentes presentes en fibra, este es el más utilizado como biomaterial en aplicaciones de ingeniería de tejidos humanos, demostrando bajo niveles de citotoxicidad (toxicidad a nivel celular) y una alta biocompatibilidad (Zhang y col., 2015 y Rajwade y col., 2015). A nivel físico, resaltan tres parámetros importantes: tamaño de poro, porosidad y el grado de hinchamiento, los cuales dependerán de la aplicación específica. El tamaño de poro será crítico en la regeneración del tejido óseo, en donde este no debe exceder los 200 μm , pero que a su vez sea mayor a los 20 μm para permitir la penetración de las células (Alvarez J., 2009). Además de esto, en el caso de tejido óseo, es

importante que la red porosa (con poros del tamaño mencionado) sea interconectada (Alvarez J., 2009). Esto será más probable en las esponjas con mayor porosidad, en este caso, las tratadas con NaOH.

Con respecto al grado de hinchamiento, es importante la absorción de agua, sobre todo en aplicaciones de ingeniería de tejido cartilaginoso. Esto se debe a que, en condiciones de presión cíclica bajo las cuales funciona el cartílago, el fluido intersticial se transporta desde y hacia la matriz, en un patrón que ejerce fuerzas hidrodinámicas debido al esfuerzo cortante del fluido. Estas fuerzas se traducen en señales celulares, a través de mecanismos denominados como mecanotransducción, promoviendo la formación y remodelación del tejido cartilaginoso (Alvarez y col., 2012).

CAPÍTULO V.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1. Conclusiones.

Se obtuvieron y caracterizaron muestras del mesocarpio del cacao a partir de mazorcas de la variedad CCN-51. La caracterización química de la fibra del mesocarpio evidencia alto contenido de fibra, traducida en celulosa y lignina.

Los tratamientos químicos a los cuales se sometieron las muestras (ácido y alcalino), causan rugosidad en la superficie de la fibra y dejan poros abiertos en su estructura. Se obtienen poros de mayor diámetro al aplicarle temperatura a los tratamientos.

Utilizando el microscopio electrónico de barrido y el estereoscopio, se observa que los tratamientos causan cambios en la estructura de las muestras, obteniendo mayor porosidad y grado de hinchamiento las muestras con mayor porcentaje de celulosa, las mismas que fueron tratadas con hidróxido de sodio.

Al evaluar los cambios que los tratamientos producen sobre la fibra del mesocarpio, se encontró que las condiciones óptimas para obtener andamios porosos es utilizando como solución el hidróxido de sodio, en especial debido al contenido de celulosa, tamaño de poro y, posiblemente, la porosidad. Las condiciones del tratamiento, sin embargo, dependerá de la aplicación que se le dé, a futuro, en el campo de la ingeniería de tejidos.

La caracterización química de los andamios obtenidos luego de cada uno de los tratamientos efectuados, se analizaron por normas estandarizadas que indican la cantidad en porcentaje de fibra, celulosa, lignina y cenizas, también se utilizó la espectroscopia infrarroja (FTIR), estos dos métodos brindan una clara evidencia de las modificaciones químicas que ocurren en la fibra durante el tratamiento de las muestras, confirmando la remoción de hemicelulosa y el aumento de celulosa.

Basado en las características físico-químicas de las esponjas porosas obtenidas bajo tratamiento ácido y alcalino, se puede concluir que estas tienen potencial en la industria biomédica, y en la ingeniería de tejidos humanos más específicamente. Esta

aplicación dependerá, claro está, de las evaluaciones biológicas *in vitro* e *in vivo* de las mismas.

5.2. Recomendaciones.

Se recomienda utilizar este estudio como soporte para realizar trabajos posteriores que estudien la adhesión, proliferación y migración de diferentes tipos de células en los andamios obtenidos, así como su posterior evaluación *in vivo*, utilizando modelos animales, para determinar su biocompatibilidad.

Realizar estudios de factibilidad económica de la obtención de andamios porosos a partir de la cáscara de la mazorca de cacao para su utilización como soporte celular en la industria biomédica. Esto además incluirá el escalado del proceso de obtención de las esponjas, con miras a una producción masiva, con resultados reproducibles.

Es recomendable que para futuros trabajos se determine el porcentaje de la cantidad de hemicelulosa y pectina, así como la porosidad de las esponjas, utilizando un porosímetro de mercurio u otro equipo apropiado para tal fin.

ANEXOS

ANEXO I- Análisis estadístico

Tabla A.1. 1 Análisis de la varianza para el contenido de fibra

Variable	N	R²	R² Aj	CV
Fibra	30	1	1	0,92

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3230,94	9	358,99	2720,56	<0,0001
Tratamientos	3230,94	9	358,99	2720,56	<0,0001
Error	2,64	20	0,13		
Total	3233,58	29			

Tabla A.1. 2 Análisis de la varianza para el contenido de celulosa

Variable	N	R²	R² Aj	CV
Celulosa	30	1	1	1,12

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1118,32	9	124,26	662,8	<0,0001
Tratamientos	1118,32	9	124,26	662,8	<0,0001
Error	3,75	20	0,19		
Total	1122,07	29			

Tabla A.1. 3 Análisis de la varianza para el contenido de lignina

Variable	N	R²	R² Aj	CV
Lignina	30	1	1	1,28

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4362,57	9	484,73	2419,55	<0,0001
Tratamientos	4362,57	9	484,73	2419,55	<0,0001
Error	4,01	20	0,2		
Total	4366,58	29			

Tabla A.1. 4 Análisis de la varianza para el contenido de ceniza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ceniza	30	1	0,99	8,27

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	525,81	9	58,42	505,54	<0,0001
Tratamientos	525,81	9	58,42	505,54	<0,0001
Error	2,31	20	0,12		
Total	528,12	29			

Tabla A.1. 5 Análisis de la varianza para el grado de hinchamiento

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
gh	36	0,98	0,97	6,64

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	943,6	4	235,9	334,35	<0,0001
tratamientos	860,87	3	286,96	406,72	<0,0001
Tiempo	82,73	1	82,73	117,26	<0,0001
Error	21,87	31	0,71		
Total	965,48	35			

Tabla A.1. 6 Two-way ANOVA: gh versus Tratamientos. Tiempo

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamientos	2	10,0191	5,00953	81,80	0,000
Tiempo	8	40,6991	5,08738	83,07	0,000
Error	16	0,9798	0,06124		
Total	26	51,6979			

S = 0,2475 R-Sq = 98,10% R-Sq(adj) = 96,92%

ANEXO II- Elaboración de andamios porosos a partir del mesocarpio de cacao



Figura A.2. 1 Obtención de muestras del mesocarpio de la mazorca de cacao. Elaborado por: Autor, 2014

ANEXO III – TRATAMIENTO QUÍMICO DEL MESOCARPIO DE CACAO

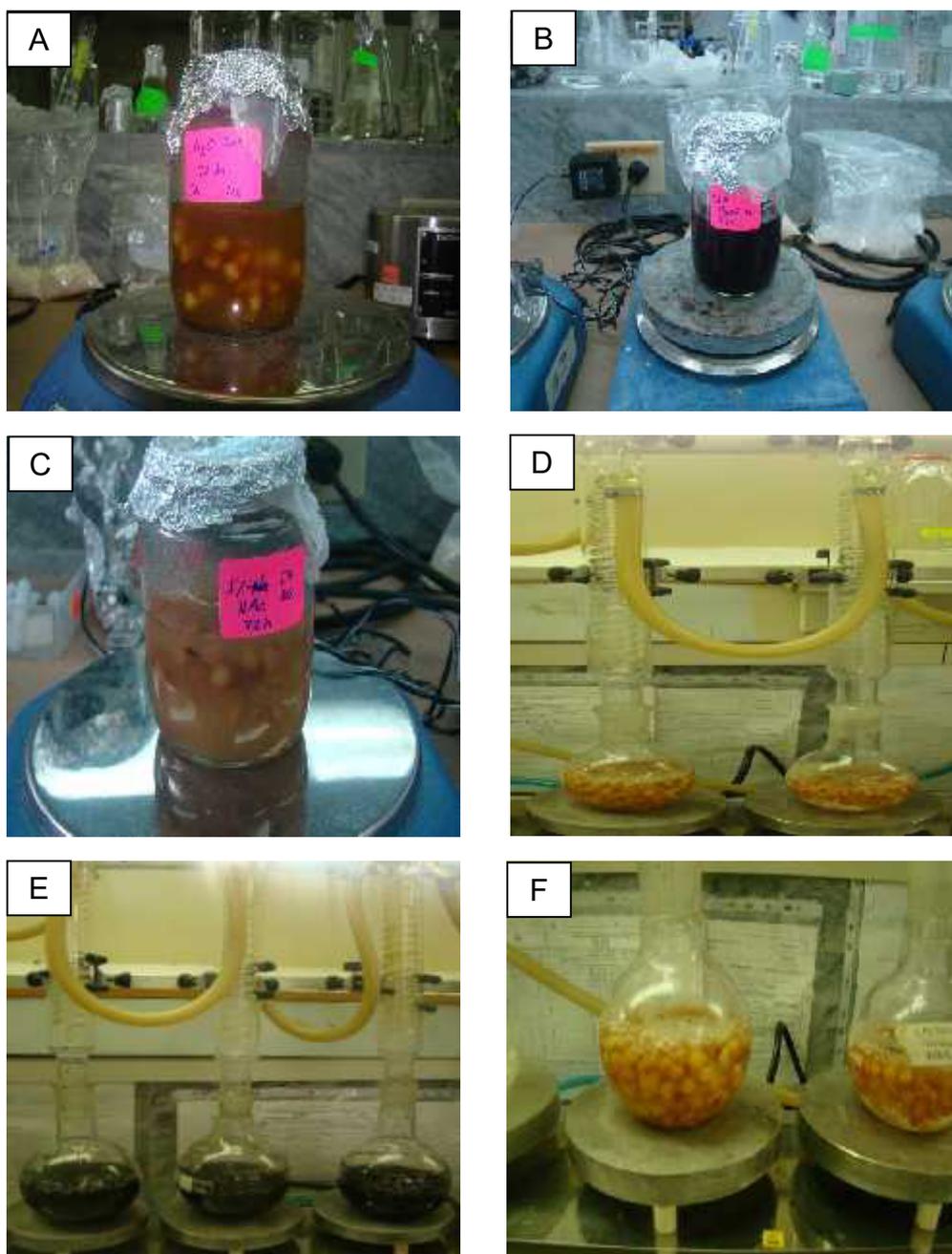


Figura A.3. 1 Tratamiento químico aplicado a las muestras del mesocarpio A) H₂O destilada B) NaOH 1N C) HAc 1N D) H₂O a reflujo E) NaOH 1N a reflujo F) HAc 1N a reflujo. Elaborado por: Autor, 2014

ANEXO IV – CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL MESOCARPIO DEL CACAO

Grasas totales por Soxhlet



Figura A.4. 1 Desengrasar las muestras. Elaborado por: Autor, 2014

Contenido de Fibra Cruda

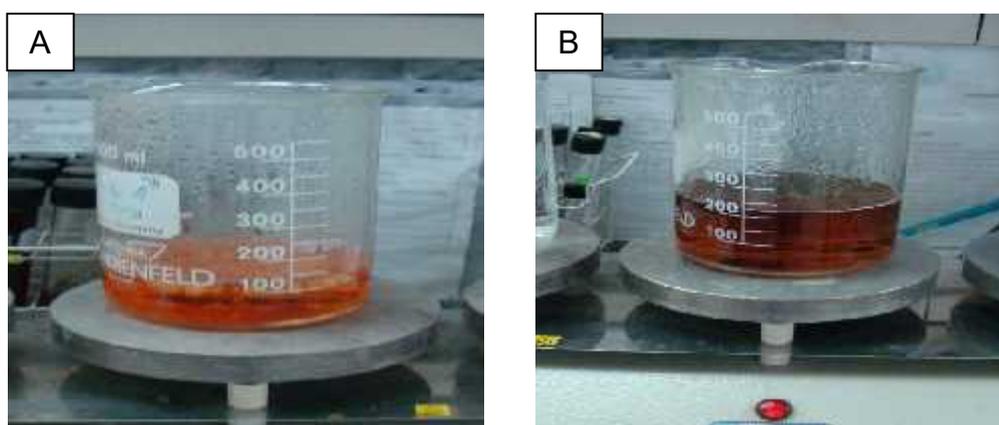


Figura A.4. 2 Contenido de Fibra A) muestra puesta a reflujo con H_2SO_4 , B) muestra puesta a reflujo con $NaOH$. Elaborado por: Autor, 2014

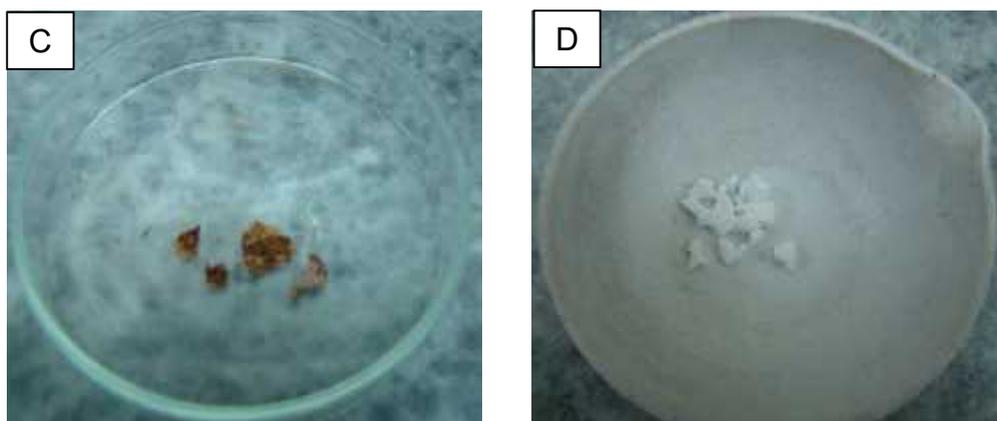


Figura A.4. 3 Contenido de Fibra C) muestra seca D) muestra calcinada.
Elaborado por: Autor, 2014

Contenido de celulosa



Figura A.4. 4 Contenido de celulosa A) muestra puesta a reflujo con HAc y HNO_3 B) muestra filtrada C) muestra seca D) muestra incinerada. Elaborado por: Autor, 2014

Contenido de lignina

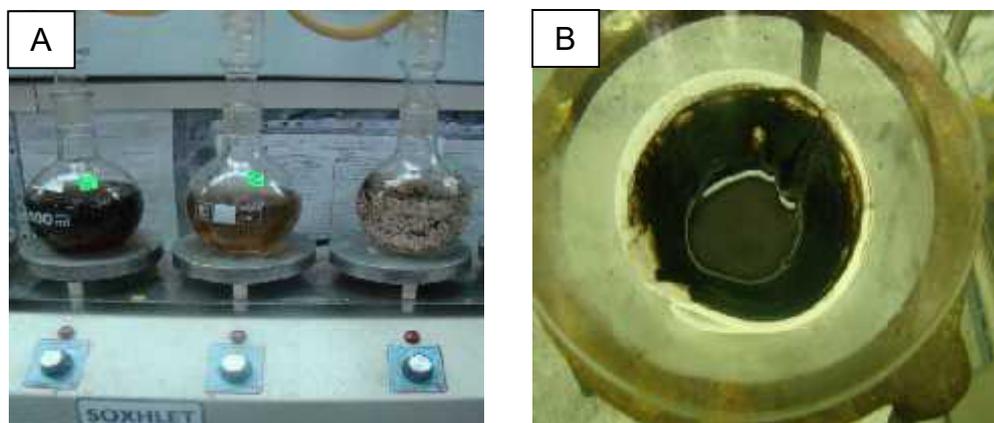


Figura A.4. 5 Contenido de lignina A) muestra puesta a reflujo con H_2SO_4 B) filtrar. Elaborado por: Autor, 2014

Contenido de ceniza

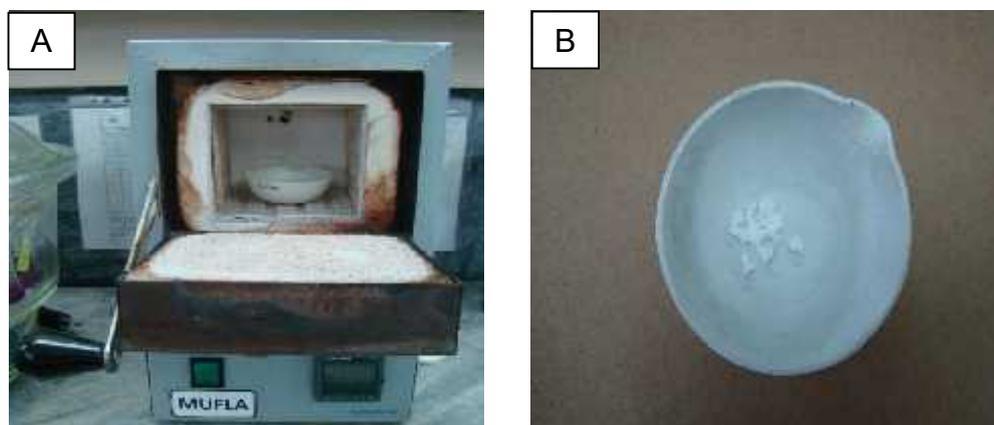


Figura A.4. 6 Contenido de ceniza A) muestra puesta en la mufla B) muestra incinerada. Elaborado por: Autor, 2014

ANEXO V – CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL MESOCARPIO DEL CACAO

Grado de Hinchamiento

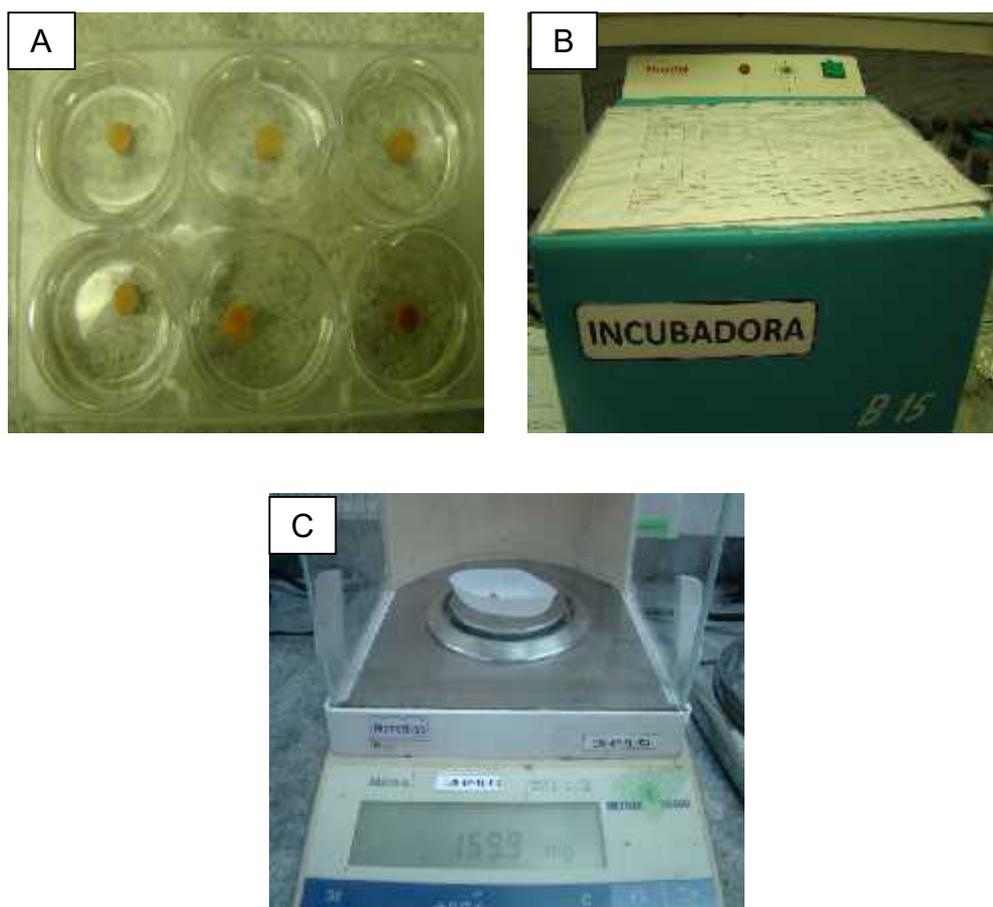


Figura A.5. 1 Equipos y metodología en la determinación del grado de hinchamiento A) Andamios sumergidos en NaCl B) Andamios colocados en la incubadora a 37°C C) pesar la muestra. Elaborado por: Autor, 2014

Microscopia Estereoscópica

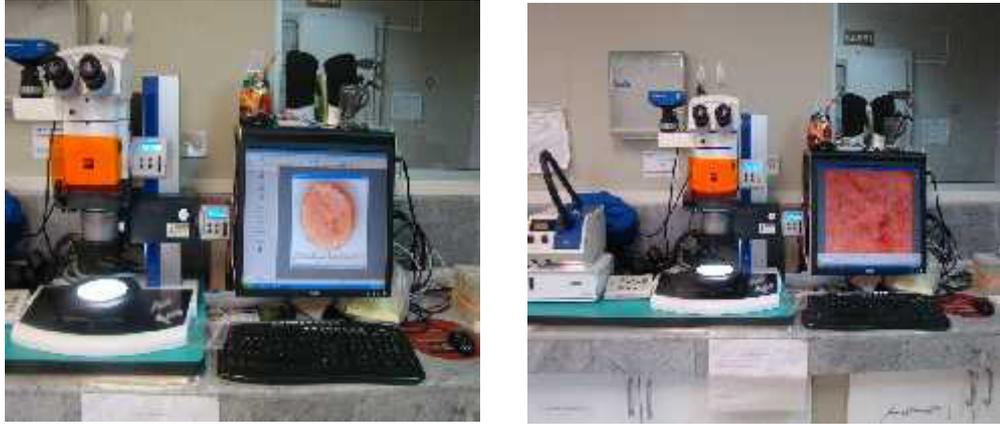


Figura A.5. 2 Muestra observada en el estereoscopio. Elaborado por: Autor, 2015

Microscopia electrónica de barrido



Figura A.5. 3 Muestra observada en el SEM. Elaborado por: Autor, 2015

BIBLIOGRAFÍA

1. Cortez P., Montini F., González M., Cuadrado T., y Albraham G. (2012) Obtención y Caracterización De Estructuras Porosas para Aplicaciones Biomédicas. Instituto De Investigaciones En Ciencia Y Tecnología De Materiales. Argentina.p.12.
2. Falke F. y Atala A. (2000). Reconstrucción De Tejidos y Órganos Utilizando Ingeniería Tisular. Arch. Argent. Pediatr; 98(2):103
3. Hoganson D., Pryor H. Y Vacanti P. (2012) Materials and Scaffolds for Tissue Engineering. Chapter 69. In: Loscalzo J y Jameson J. Harrison's principles of internal medicine. Vol. 1. No.18. United States of America.
4. Hong Jiang, Qin Zou, Huanan Wang, Jingjing Li, Xiaochao Yang. (2013). Biometric Spiral-Cylindrical Scaffold Based On Hydrib Chitosan/Cellulose/Nano-Hydroxyapatite Membrane for Bone Regeneration. Department Of Biomedical Materials Science, School Of Biomedical Engineering, Third Military Medical University, Chongqing 400038, P.R; 5(22):12036-44. China.

5. Miranda M. (2010). Materiales compuestos nanoestructurados biocompatibles con matriz de hidroxiapatito. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica.
6. Infante R., Cebrián A., y Vara A. Los polímeros en medicina. Recuperado: 12 de agosto 2014. <http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/principal.htm>
7. Corona I. (2013). Síntesis y caracterización fisicoquímica de un andamio celular a base de quitosano biológico – químico y colágeno tipo I. Tesis de maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, México.
8. Ardila C., y Carreño S. (2011). Aprovechamiento de la cáscara de la mazorca de cacao como adsorbente. Tesis. Universidad industrial de Santander. Bucaramanga.
9. Martínez A., Feldmann E., Pleumeekers M., Nimeskern L., Kuo W., Jong W., Schwarz S., Muller R., Hendriks J., Rotter N., Van G., Stok K., y Gatenholm P. (2015). Novel bilayer bacterial nanocellulose scaffold

- supports neocartilage formation in vitro and in vivo. *Biomaterials*; 44:122-33.
10. Zhang C., Salick M., Cordie T., Ellingham T., Dan Y., y Turng L. (2015). Incorporation of poly(ethylene glycol) grafted cellulose nanocrystals in poly(lactic acid) electrospun nanocomposite fibers as potential scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*;49:463-71
11. Lagus H., Sarlomo M., Böhling T., y Vuola J. (2013). Prospective study on burns treated with Integra, a cellulose sponge and split thickness skin graft: comparative clinical and histological study-randomized controller trial. *Burns*. 39(8):1577-87
12. Kim J., Kim M., Kang S., Kim G., y Choi S. (2014). Comparable bone healing capacity of different bone graft matrices in a rabbit segmental defect model. *J Vet Sci*;15(2):289-95.
13. Winkel T. (2013). Ecuador and cacao: An old alliance. A Peace Corps Masters International project. Tesis. Department of Horticulture and Landscape Architecture, Colorado State University.
14. Instituto Nacional de Donación y Trasplante. (2014). Datos estadísticos de la actividad de donación de órganos, tejidos y células. Ecuador.

15. Mikos A. McIntire, y Patrick L. (1998). Prospects of tissue engineering. ElsevierScienceLtd, Oxford, *Frontiers in Tissue Engineering*. 52:443-51.
16. Alvarez J. (2009). Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción. *Revista de Estudios Transdisciplinarios* vol.1.Nº2. pp. 98-109. Venezuela.
17. Mazarro R. (2009). Síntesis de materiales poliméricos biocompatibles para la liberación controlada de fármacos mediante tecnología supercrítica. Tesis, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Castilla – La Mancha, España.
18. Langer y Vacanti J. Aplicaciones biomédicas de los polímeros. Recuperado: 14 de septiembre 2014.
<http://www.eis.uva.es/~macromol/curso04-05/bio/index.htm>.
19. Palma R y Robles S. (2008). La Ingeniería de Tejidos Óseos. *Journal de Investigación de la Escuela de Graduados e Innovación Tecnológica de Monterrey Campus Puebla*.
20. Gallegos E., Medellín H., De Lange D. (2013). Análisis del desempeño estructural de andamios de hidroxipatita utilizados en ingeniería tisular.

Ingeniería mecánica, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México,
Vol.4 No. 5. pp. 185-194.

21. Marín M, San Hipolito L, Belarra C, Gómez F, y Martínez M. (2009).
Synthetic grafts materials. Polylactide and poliglycolide acid effects in bone
regeneration Injertos sustitutos no óseos, Madrid: Vol.21–No.1.
22. Kapanen A. (2002). Biocompatibility of orthopedic implants on bone forming
cells. Departamento de anatomía y biología celular. Universidad de Oulu.
Tesis. Facultad de medicina.
23. Kalpana K. (2004). Biomaterials in total joint replacement. Colloid. Surface.
39(3): pp. 133-42.
24. Langer y Vacanti J. (1986). Células hepáticas como transplante en
animales. Aplicaciones biomédicas de los polímeros. Argentina.
vol.109.no.2.
25. Ávila L. 2011. Construcción y evaluación de andamios modificados con
polipirrol por plasma para el crecimiento de células de cartílago. Proyecto
terminal de licenciatura en ingeniería biomédica.

26. López R, Galán C. (2010). Polímeros Polilácticos-Review. Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia. 57:401-413.
27. Plúa J. (2008). Diseño de una línea procesadora de pasta de cacao artesanal. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción. Tesis de grado previo a la obtención del título de Ingeniero de alimentos. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil.
28. Carrión J. (2012). Estudio de factibilidad para la producción y comercialización de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad CCN-51, Jama-Manabí. Tesis para la obtención del título de Ingeniero en Agroempresas. Quito.
29. Tuchan Omar. (2014). Evaluación del efecto de la pulpa de café (*coffea arábica*) en el incremento de la eficiencia biológica de la cepa inireb-8 de *pleurotus ostreatus* utilizando cascara de cacao (*theobroma cacao*) y bambu (*bambusa vulgaris* var. *striata*) como sustratos. Tesis, Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
30. Suárez C., Moreira M., y Vera J. (2012). Manual del cultivo de cacao. Instituto nacional autonomo de investigación agropecuaria.

31. Calvo C., Castro I., Sánchezarmas R., y Pérez F. (1995). Fibra cruda y quitina en el crustáceo langostilla (*Pleuroncodes planipes*, STIMSON): Similitudes y diferencias. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Ciencias Murlnas. 2 1(2): 179- 186. Mexico.
32. Catro Cristina, Palencia Ana. (2006). Evaluación de la influencia de diferentes condiciones de tratamientos superficiales sobre el comportamiento de fibra de fique. Universidad pontificia Bolivariana, Escuela de ingenierías facultad de ingeniería química Medellin.
33. Portugal, J. Fibra Vegetal. Journal electrónico de Medicina Intercultural. Recuperado 2012. <http://medicinaintercultural.org/contenido/2012-01-25-fibra-vegetal>.
34. León V., Rieumont J., Bordallo E., Dopico D., Peña E. y Menéndez I. (2013). Otención y caractrización de la celulosa hidrofóbicamente modificada. Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. vol. 47, no. pp. 51 – 56.
35. Chávez-Sifonetes, Marvin, Domine y Marcelo. (2013). Lignin, Structure and Applications: Depolymerization methods for obtaining aromatic derivatives

- of industrial interest. Red de revistas científicas de America Latina, el Caribe, España y Portugal. Vol. 4, num. 4, pp. 15 – 46. Chile.
36. Del Pilar A. (2011). Evaluación nutritiva y nutracéutica de la fruta (Fragaria vesca) deshidratada por el método de liofilización y comparación con la obtenida por deshidratación en microondas. Tesis de grado. Bioquímica Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba – Ecuador.
37. Contreras L. (2009). Caracterización de Harina de Maíz Instantánea Obtenida por calentamiento Óhmico”. Tesis para obtener el grado de maestro en tecnología avanzada. Instituto Politécnico Nacional.
38. Domínguez M., Álvarez A., Granados M., y Hernández F. (2012). Estudio de la cinética del pretratamiento e hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar. Revista Iberoamericana de Polimeros. Volumen 13(4).
39. Miranda M y Cuellar A. (2012). Farmacognosia y Productos Naturales. Editorial Félix Varela, La Habana, Cuba. p. 25-49, 74-79

40. Morán J. (2008). Extracción de celulosa y obtención de nanocelulosa a partir de fibra sisal – caracterización. Artículo. Universidad Nacional de Mar del Plata. Argentina. 4302:18
41. García D., Escobar J., Zaldívar D., Katime I., Casquero J. Influencia de la composición y el pH sobre el proceso de hidrogeles de Poli (Ácido itacónico-co-ácido metacrílico). Centro de Biomateriales, Univ. De La Habana, Cuba. 17,128.
42. Espinoza E. (2007). Propiedades físicas y biológicas de dos tipos de esponjas de quitosano, para su aplicación como biomaterial. Tesis para optar el título profesional de Cirujano Dentista. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
43. Escobar J., Aguero L., Zaldivar D., y Ramirez E. (2000). Estudio de hinchamiento “in vitro” y evaluación preliminar de biocompatibilidad de hidrogeles de poli(acrilaida-co-ácido metacrílico). Biomecanica, 8(1), pp.54-57, Universidad de la Habana, Cuba.
44. Arroyo Y. (2008). Obtención y caracterización fisicoquímica y funcional de las fibras dietéticas del Níspero. Trabajo de investigación. Vol.74 n.4 Perú.

45. Pinzón M. (2008). Caracterización de la cáscara de naranja para su uso como material bioadsorbente. *Revista Bistua*. ISSN 01204211. Universidad de Pamplona Colombia. Vol.6. no. 1. pp. 1-23.
46. Héctor J. (2010). Espectroscopia ATR-FTIR de celulosa: Aspecto instrumental y tratamiento matemático de espectros. Vol.8, Art.9.
47. Bodirlau R. (2007). Fourier transform infrared spectroscopy and thermal analysis of lignocellulose fillers treated with organic anhydrides. Institute of Macromolecular Chemistry. 41 A Grigore Ghica-Voda Alley, Iasi, 700487, Romania.
48. Fernández V. (2007). Materiales biodegradables a partir de poliésteres biodegradables reforzados con fibras naturales químicamente modificadas. Instituto Nacional de Tecnología Industrial. 4p. Buenos Aires, AR, INTI.
49. Elizondo I. (1998). Evaluación de tratamientos alcalino sobre la calidad nutricional de subproductos lignocelulosicos. Universidad de Colima. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Tesis para obtener el grado de Doctor en ciencias pecuarias. México.

50. Hernao L., Rojas I. y Giraldo G. (2009). Cuantificación de la celulosa proveniente de residuos de la industria del mueble. Red de revistas científicas de América, el Caribe, España y Portugal. Pp. 23-28. Universidad Del Valle Colombia.
51. Rocha Z., Shirai K., Arias L., y Vásquez H. (2008). Efecto de la calidad del agua y tamaño de partícula en la producción de quitosano a partir de β -quitina extraída de desperdicios de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Revista Mexicana de Ingeniería química. Vol.7, No. 3. 299-307.
52. Manoj B. y Narayanan P. (2013). Study of Changes to the Organic Functional Groups of a High Volatile Bituminous Coal during Organic Acid Treatment Process by FTIR Spectroscopy. Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering. 1,39-43.
53. Guozhi F., Min W., Chongjing L., Tao F., Jianfen L. y Ronghui Z. (2013). Isolation of cellulose from rice straw and its conversion into cellulose acetate catalyzed by phosphotungstic acid. Journal. Carbohydrate polymers 94. 71-76.
54. Barazarte H., Sangronis E., y Unai E. (2008). La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): Una posible fuente comercial de pectinas. ALAN. V.58 n.1 Caracas mar.

55. Catro Cristina, Palencia Ana. (2006). Evaluación de la influencia de diferentes condiciones de tratamientos superficiales sobre el comportamiento de fibra de fique. Universidad pontificia Bolivariana, Escuela de ingenierías facultad de ingeniería química Medellín.
56. Zhang C., Salick M., Cordier T., Ellingham T., Dam Y., y Turng L. (2015). Incorporation of poly(ethylene glycol) grafted cellulose nanocrystals in poly(lactic acid) electrospun nanocomposite fibers as potential scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*: 49:463-71.
57. Rajwade J., Paknikar K., y Kumbhar J. (2015). Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine: 99(6): 2491-511.
58. Alvarez J. (2009). Regeneración Ósea a través de la Ingeniería de Tejidos: Una Introducción. *Revista de Estudios Transdisciplinarios RET*. 1(2),98-107.
59. Alvarez J., VanGordon S., Engebretson B., y Sikavitsas V. (2012). Shear Force and Cell Mechanotransduction. To appear In: Fisher J. ed. *Tissue Engineering; Principles and Practice*, 23-1 – 23-20. Boca Raton, CRC Press. (Capítulo de libro).