

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

CARACTERIZACIÓN Y PREPARACIÓN DE PARAFINAS PARA INCLUSIÓN DE TEJIDOS

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por el Br. Sinic B. Damastes
Para optar al Título
de Ingeniero Químico

Caracas, 2012.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

CARACTERIZACIÓN Y PREPARACIÓN DE PARAFINAS PARA INCLUSIÓN DE TEJIDOS

TUTOR ACADÉMICO: Prof^a Carolina Pfaff

TUTOR INDUSTRIAL: Dr. Ing. Arnaldo Millán

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por el Br. Sinic B. Damastes
Para optar al Título
de Ingeniero Químico

Caracas, 2012.

Dedicatoria

*A Los **Dioses***

*A mis **Padres y hermanos,***

Gracias por ser mi Familia

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Central de Venezuela, por permitirme formarme como Ingeniero, poder realizar una de mis metas establecidas y por permitirme conocer a amistades que ahora tengo y tendré.

A mi tutor Dr. Ing. Arnaldo Millán por darme la oportunidad de realizar esta investigación, por enseñarme todo lo aprendido durante esta faena, por su ayuda siempre que la necesitaba y por ser más que un profesor/tutor para mí.

A mi tutora Carolina Pfaff por ayudarme y apoyarme en la realización de este trabajo de investigación, sin usted no lo hubiese logrado, muchísimas gracias.

Al Ing. Orlando Luis por el apoyo y soporte durante el tiempo de la investigación y por ofrecerme las oportunidades presentadas.

A la profesora Lola De Lima de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la U.C.V. por su ayuda y colaboración con los análisis infrarrojos.

Al Dr. Alexander Briceño del Centro de Química del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas por su invaluable ayuda y colaboración con los análisis mediante DSC/ATG.

Al histotecnólogo Eduardo Szurba por su ayuda y colaboración en las pruebas realizadas del producto elaborado y su interés en el desarrollo del mismo.

A mis amigos y futuros colegas Carlos Castro y Ana Karina por su ayuda en el esquema eléctrico del sistema concebido.

A mis amig@s, compañer@s, colegas y futuros colegas de nuestra Escuela, por formar parte de mi vida dentro y fuera de nuestra segunda casa, la U.C.V., Carla, José Antonio, Lisbeth, Manuel, Franklin, Housam, Ingemar, Yimmi, Cheng, Betty, y todos los que me faltan dentro y fuera de ella.

Y por supuesto, a mi querida y amada novia, amiga y futura esposa Jhoxa, por estar siempre ahí en las buenas, en las malas y en las venideras. Luv U!

Este trabajo fue realizado bajo el auspicio de Comercializadora United Group O.L. C.A.

Sinic B., Damastes

CARACTERIZACIÓN Y PREPARACIÓN DE PARAFINAS PARA INCLUSIÓN DE TEJIDOS

Tutor Académico: Prof^a Carolina Pfaff*. Tutor Industrial: Dr. Arnaldo Millán**

Tesis. Caracas, U.C.V. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química.

Año 2012, 126 pág.

***U.C.V., **I.U.T.R.C.**

Palabras claves: Histología, parafinas, medio de inclusión.

Resumen.

La cera parafínica es un material sólido compuesto de hidrocarburos saturados que puede ser empleado en una amplia variedad de aplicaciones. Esta cera puede ser de tipo macro o microcristalina dependiendo su forma de cristalización. En Venezuela, actualmente se produce únicamente parafina de tipo macrocristalina, por tanto, los diferentes sectores que requieren parafina microcristalina tienen la necesidad de importar dicho insumo, o bien, importan el producto directamente, siendo éste el caso de la parafina empleada como medio de inclusión de tejidos para análisis histológicos. Así, la presente investigación tiene como finalidad elaborar una mezcla parafínica a partir de parafinas bases importadas para ser empleada como medio de inclusión y evaluar la posibilidad de obtener pellets de la misma, ya que este tipo de presentación es la de mayor aceptación en el mercado. Para lograr este objetivo, y con el fin de determinar los parámetros requeridos para la elaboración de un medio con propiedades similares a la parafina importada, y estudiar, diseñar y evaluar los diferentes parámetros que permitan la elaboración de pellets de parafina, fue necesaria la caracterización de parafinas de procedencia extranjera, las cuales se analizaron mediante técnicas alternativas a las tradicionales propuestas en las normas ASTM, como lo son: los análisis reológicos, por calorimetría diferencial de barrido, termogravimétricos y por espectroscopia infrarroja. De esta manera, se obtuvo que la parafina importada y comercializada actualmente como medio de inclusión posee una viscosidad de 2,7 Pa·s a la temperatura de fusión de 56,6 °C, y de 0,0050 Pa·s a una temperatura máxima de 64 °C, así como una viscosidad máxima de 120.000 Pa·s a una temperatura de 50,2 °C. Se logró un producto similar al de referencia mediante una mezcla de parafina macrocristalina base de procedencia alemana, parafina microcristalina, histowax y dos aditivos poliméricos comerciales. El producto elaborado presentó una viscosidad de 2,8 Pa·s a la temperatura de fusión de 55,8 °C, y de 0,0042 Pa·s a una temperatura máxima de 64 °C, así como una viscosidad máxima de 140.000 Pa·s a una temperatura de 47,9 °C. La elaboración y obtención de pellets se logró mediante un sistema electromecánico que permitió definir los parámetros de trabajo. Finalmente, el producto elaborado fue evaluado por histotecnólogos de reconocida trayectoria en laboratorios especializados a nivel capital, donde los resultados obtenidos fueron tan similares como la parafina importada.

ÍNDICE GENERAL

| | Pág. |
|--|------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | xii |
| ÍNDICE DE TABLAS | xv |
| CAPÍTULO I | 16 |
| INTRODUCCIÓN | 16 |
| CAPÍTULO II | 17 |
| FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN | 17 |
| II.1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 17 |
| II.2.- ANTECEDENTES | 18 |
| II.3.- OBJETIVOS | 19 |
| II.3.1.- Objetivo principal..... | 19 |
| II.3.2.- Objetivos específicos | 19 |
| CAPÍTULO III | 21 |
| MARCO TEÓRICO | 21 |
| III.1.- INCLUSIÓN EN PARAFINA | 21 |
| III.1.1.- Fijación | 23 |
| III.1.2.- Deshidratación | 23 |
| III.1.3.- Inclusión, Incrustación o Embutición | 23 |
| III.1.4.- Corte o Seccionamiento..... | 26 |
| III.2.- LA PARAFINA | 27 |
| III.2.1.- Parafinas macrocristalinas | 27 |
| III.2.2.- Parafinas microcristalinas | 28 |

| | |
|---|-----------|
| III.2.3.- Propiedades químicas de las parafinas..... | 29 |
| III.2.4.- Estructuras cristalinas de las parafinas | 30 |
| III.2.5.- Parafinas para inclusión o embutición de tejidos..... | 31 |
| CAPÍTULO IV | 34 |
| MARCO METODOLÓGICO..... | 34 |
| IV.1.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 35 |
| IV.2.- MATERIA PRIMA | 35 |
| IV.3.- PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA | 36 |
| IV.4.- CARACTERIZACIÓN..... | 36 |
| IV.4.1.- Análisis reológicos (AR) | 36 |
| IV.4.2.- Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC)..... | 38 |
| IV.4.3.- Análisis termogravimétricos (ATG) | 38 |
| IV.4.4.- Análisis por espectroscopia infrarroja (IR) | 39 |
| IV.5.- ELABORACIÓN DEL PRODUCTO FINAL Y OBTENCIÓN DE PELLETS | 41 |
| IV.5.1.- Preparación de mezclas y obtención del producto final | 41 |
| IV.5.2.- Obtención de pellets | 42 |
| CAPÍTULO V..... | 46 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 46 |
| V.1.- PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA | 46 |
| V.2.- CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA MATERIA PRIMA..... | 48 |
| V.2.1.- Análisis reológicos (AR)..... | 48 |
| V.2.1.1.- <i>Parafina Paraplast</i> | 49 |

| | |
|--|-----------|
| V.2.1.2.- <i>Parafina Base alemana</i> | 52 |
| V.2.1.3.- <i>Parafina Parabiotest</i> | 54 |
| V.2.1.4.- <i>Parafina HPS</i> | 55 |
| V.2.1.5.- <i>Parafina D-2395</i> | 57 |
| V.2.1.6.- <i>Parafina para velas</i> | 58 |
| V.2.1.7.- <i>Parafina Microristalina</i> | 60 |
| V.2.1.8.- <i>Parafina GLP-5</i> | 61 |
| V.2.1.9.- <i>Parafina Histowax</i> | 62 |
| V.2.2.- Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) | 66 |
| V.2.2.1.- <i>Parafina Paraplast</i> | 66 |
| V.2.2.2.- <i>Parafina Base alemana</i> | 69 |
| V.2.2.3.- <i>Parafina Parabiotest</i> | 71 |
| V.2.2.4.- <i>Parafina HPS</i> | 72 |
| V.2.2.5.- <i>Parafina D-2395</i> | 73 |
| V.2.2.6.- <i>Parafina para velas</i> | 74 |
| V.2.2.7.- <i>Parafina Microcristalina</i> | 75 |
| V.2.2.8.- <i>Parafina GLP-5</i> | 76 |
| V.2.2.9.- <i>Parafina Histowax</i> | 77 |
| V.2.3.- Análisis termogravimétricos (ATG) | 81 |
| V.2.4.- Análisis por espectroscopia infrarroja (IR)..... | 82 |
| V.3.- PRODUCTO FINAL Y OBTENCIÓN DE PELLETS | 85 |
| V.3.1.- Obtención del producto final | 85 |
| V.3.2.- Caracterización del producto final | 86 |

| | |
|--|------------|
| V.3.3.- Elaboración y Obtención de pellets | 95 |
| V.3.4.- Pruebas clínicas con el producto elaborado | 96 |
| CAPÍTULO VI | 97 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 97 |
| VI.1.- CONCLUSIONES | 97 |
| VI.2.- RECOMENDACIONES | 99 |
| BIBLIOGRAFÍA | 101 |
| APÉNDICES | 102 |
| ANEXOS | 104 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1.- Esquema del proceso histológico | 22 |
| Figura 2.- Esquema del proceso de inclusión en parafina de una muestra de tejido previamente fijada. | 25 |
| Figura 3.- Microtomo rotativo manual..... | 26 |
| Figura 4.- Estructura hexagonal de cristales de ceras parafrínicas..... | 31 |
| Figura 5.- Estructura ortorrómbica de cristales de ceras parafrínicas..... | 31 |
| Figura 6.- Esquema del marco metodológico y actividades experimentales | 34 |
| Figura 7.- Esquema del sistema para obtención de pellets..... | 43 |
| Figura 8.- Esquema eléctrico de control | 44 |
| Figura 9.- Esquema del sistema de carga, descarga y mantenimiento de la parafina | 45 |
| Figura 10.- Formas de presentación de parafinas en el mercado | 46 |
| Figura 11.-Partículas de parafina obtenidas mediante un proceso manual de cortado..... | 47 |
| Figura 12.- Partículas de parafina obtenidas mediante un proceso manual de rayado..... | 47 |
| Figura 13.- Esquema del sistema de medida y montaje de un ensayo reológico | 48 |
| Figura 14.- Curva de η vs. T correspondiente a la parafina Paraplast..... | 49 |
| Figura 15.- Fases que experimenta la parafina a medida que se incrementa la temperatura durante un ensayo reológico | 51 |

| | |
|--|----|
| Figura 16.- Curva de η vs. T correspondiente a la parafina Base alemana | 53 |
| Figura 17.- Curva de η vs. T correspondiente a la parafina Parabiotest | 55 |
| Figura 18.- Curva de η vs. T correspondiente a la parafina HPS..... | 56 |
| Figura 19.- Curva de η vs. T correspondiente a la parafina D-2395 | 57 |
| Figura 20.- Curva de η vs. T correspondiente a la parafina para velas | 59 |
| Figura 21.- Curva de η vs. T correspondiente a la parafina Microcristalina..... | 60 |
| Figura 22.- Curva de η vs. T correspondiente a la parafina GLP-5 | 62 |
| Figura 23.- Curva de η vs. T correspondiente a la parafina Histowax..... | 63 |
| Figura 24.- Curvas de η vs. T de todas las parafinas estudiadas..... | 64 |
| Figura 25.- DSC de la parafina Paraplast..... | 66 |
| Figura 26.- Crisol/portamuestra de un ensayo de DSC/ATG con carga de parafina sólida compactada | 67 |
| Figura 27.- Crisol/portamuestra de un ensayo de DSC/ATG con carga de parafina sin espacios vacíos | 68 |
| Figura 28.- DSC de la parafina Base alemana | 70 |
| Figura 29.- DSC de la parafina Parabiotest..... | 71 |
| Figura 30.- DSC de la parafina HPS | 72 |
| Figura 31.- DSC de la parafina D-2395 | 73 |
| Figura 32.- DSC de la parafina para velas | 74 |

| | |
|---|----|
| Figura 33.- DSC de la parafina Microcristalina | 75 |
| Figura 34.- DSC de la parafina GLP-5..... | 77 |
| Figura 35.- DSC de la parafina Histowax | 78 |
| Figura 36.- ATGs de las parafinas analizadas..... | 81 |
| Figura 37.- Espectros FTIR de las parafinas estudiadas | 83 |
| Figura 38.- Espectro FTIR de la parafina para velas | 84 |
| Figura 39.- Curva de η vs. T del Producto elaborado y de las parafinas de uso histológico | 87 |
| Figura 40.- Ampliación de las curvas de enfriamiento de un ensayo de η vs. T del Producto elaborado y de las parafinas de uso histológico | 88 |
| Figura 41.- Efecto de la agitación en la preparación de mezclas parafinas | 89 |
| Figura 42.- Curvas de η vs. T del Producto elaborado..... | 90 |
| Figura 43.- DSC del Producto elaborado | 91 |
| Figura 44.- DSC del producto elaborado y de la parafina Paraplast..... | 92 |
| Figura 45.- ATG del Producto elaborado..... | 93 |
| Figura 46.- Espectros FTIR del Poliisobutileno (PIB) y del Producto Final elaborado (PF)..... | 94 |
| Figura 47.- Tipos de presentación de parafinas empleadas como medio de inclusión..... | 96 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla 1.- Puntos de fusión de alcanos comprendidos entre C ₂₀ y C ₃₀ | 28 |
| Tabla 2.- Clasificación de parafinas macrocristalinas, intermedias y microcristalinas según sus características..... | 29 |
| Tabla 3.- Características de ceras comerciales para embutición de tejidos. | 33 |
| Tabla 4.- Procedencia, proveedores y algunas propiedades de las parafinas estudiadas..... | 35 |
| Tabla 5.- Temperaturas de fusión, solidificación y máximas de ensayo de las parafinas estudiadas por medio de AR | 65 |
| Tabla 6.- Viscosidades a diferentes temperaturas de las parafinas estudiadas | 65 |
| Tabla 7.- Temperaturas de fusión, solidificación y máxima de ensayo de las parafinas estudiadas por medio de DSC..... | 79 |
| Tabla 8.- Calores específicos de las parafinas estudiadas obtenidos mediante ensayos de DSC | 79 |
| Tabla 9.- Desviación entre las temperaturas de fusión y solidificación de las parafinas estudiadas mediante análisis reológicos y calorimetría diferencial de barrido | 80 |
| Tabla 10.- Cuadro comparativo para selección de materia prima..... | 86 |
| Tabla 11.- Valores de diferentes parámetros de las parafinas Paraplast y la elaborada como Producto Final según técnicas de AR y DSC | 93 |

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La cera parafínica o cera de parafina es una mezcla sólida de cadenas lineales o ramificadas de hidrocarburos saturados, la cual es obtenida a partir del petróleo. La cera de parafina tiene una gran variedad de aplicaciones, lo cual a su vez depende del tipo de parafina y de las respectivas características que éstas presenten. Según el tipo de cristalización, esta cera parafínica puede ser de tipo macrocristalina o microcristalina.

En nuestro país la única refinería que produce cera de parafina es la refinería San Roque, ubicada en la zona centro del estado Anzoátegui en el municipio Santa Ana, a 30 kilómetros de la población de Anaco y unos 421 kilómetros al noreste de Caracas. Esta refinería inicia sus operaciones el 23 de Septiembre de 1952, y en la actualidad produce 52,7 toneladas diarias de parafina (AVN, 2011). Sin embargo, se produce únicamente cera parafínica de tipo macrocristalina, en una cantidad inferior a la demanda nacional. Al no producirse cera de tipo microcristalina, los diferentes nichos del mercado nacional que la requieren como materia prima y/o aplicaciones, se encuentran en la necesidad de tener que importar dicho insumo. Un caso particular de aplicación de la parafina microcristalina es en el campo de la medicina, específicamente en Histología, donde se emplea una formulación de parafina como medio principal de inclusión de tejidos orgánicos. Este material es totalmente importado, tiene un mercado cautivo, alta demanda y un alto valor agregado.

A partir de las consideraciones anteriores surge la posibilidad de desarrollar este proyecto, en el cual se ha planteado como objetivo elaborar un medio de inclusión a partir de parafinas bases importadas, con las propiedades de la parafina comercial actualmente empleada en el proceso de inclusión o embutición de tejidos, y que permita la sustitución parcial o total de la parafina importada. Para ello se debe caracterizar cada una de las parafinas a estudiar, con el objetivo de determinar sus propiedades y poder seleccionar la(s) más adecuada(s) para dicho fin, y evaluar la posibilidad de producir pellets de la misma.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN

II.1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La cera parafínica tiene un amplio campo de aplicaciones, entre los cuales se puede mencionar: la fabricación de velas, fósforos, productos químicos del hogar, en la industria del papel, cosmética, alimenticia, del caucho, eléctrica, entre otros, como por ejemplo en el campo de la medicina, en la especialidad de histología donde se emplea como medio de inclusión o embutición de tejidos, lo cual constituye el eje de la presente investigación.

En Venezuela, existe una incipiente producción de parafina para inclusión de tejidos, pero las propiedades son poco adecuadas y presentan frecuentes variaciones de calidad. Es por ello que esta parafina empleada en aplicaciones patológicas es importada de países como los Estados Unidos de América, México, Alemania y China, por mencionar algunos. En nuestro país estas ceras son comercializadas en dos presentaciones, trozos de 40x15x15 mm de origen nacional y en diversas formas de pellets de procedencia extranjera. Independientemente de la geometría, dichas parafinas deben poseer ciertas características particulares para esta aplicación, entre las cuales se pueden mencionar: la resistencia a cambios bruscos de temperatura (calentamiento/enfriamiento), facilidad de corte, permitir cortes limpios de hasta 2 μm o menos de espesor sin causar deformaciones, resistencia al agrietamiento, fundir a una temperatura máxima de 58 °C para proteger los tejidos de calor excesivo, y deben poseer una alta pureza de manera que no contaminen la muestra y no se produzcan precipitados, entre otros.

Durante la aplicación de ambas formas de presentación se han observado diferencias significativas en los resultados obtenidos, probablemente relacionados con la composición y geometría de la parafina, parámetros que inciden de manera directa en el tiempo de fusión y éste a su vez puede influir en la separación de componentes

volátiles que podrían afectar sus propiedades. De esta manera la presentación en forma de pellets es la más aceptada pero a su vez la más costosa.

Para la embutición de muestras de tejidos orgánicos que han de observarse mediante microscopía óptica, se utiliza como medio principal de inclusión mezclas de parafinas, y en menor medida resinas y celoidina. Por ende, resulta de interés caracterizar las parafinas para uso histológico y preparar una mezcla con características similares a la parafina importada, evaluar los parámetros y mecanismos que permitan la obtención de pellets y definir las propiedades que permitan su posterior uso en el campo histológico.

II.2.- ANTECEDENTES

Como se mencionó en los apartados precedentes, el presente trabajo tiene como objetivo desarrollar y/u obtener una composición parafínica que pueda ser empleada en estudios patológicos a partir de parafinas refinadas provenientes de mercados internacionales y disponibles en el mercado local.

En el año 2005 Rosales M. Ennayaileth A., desarrolló un trabajo relacionado con el tema tratado, titulado “Evaluación del proceso de refinación de la parafina cristalina nacional con el fin de incrementar su valor agregado en aplicaciones patológicas”. Dicho trabajo consistió en el proceso de refinación de la parafina cristalina nacional para incrementar su valor agregado en aplicaciones patológicas. Para ello, primero realizó ensayos de disolución por 24 horas a las parafinas nacionales e importadas para seleccionar los solventes de trabajo a temperaturas de 27 °C y 40 °C, luego analizó dichas muestras mediante análisis termogravimétricos, calorimetrías diferenciales de barrido, infrarrojos y espectrometría de masas y posteriormente sometió la parafina nacional a pruebas experimentales de adsorción con carbón activado y bauxita, filtración (utilizando extracción Soxhlet), y cristalización mediante evaporación del solvente. Culminado el proceso de refinación, caracterizó nuevamente la parafina nacional mediante calorimetría diferencial de barrido y espectrometría de masas con el fin de observar el nivel de pureza alcanzado de la

muestra durante la secuencia experimental. Como resultado, obtuvo que el proceso de refinación de la parafina cristalina nacional utilizando carbón fue favorable, ya que logró observar cambios físicos en la parafina y cambios en las proporciones de los componentes presentes mayoritariamente al compararla antes y después del proceso de refinación mediante espectrometría de masas.

Cabe destacar que la parafina obtenida no fue utilizada en análisis histológicos, por lo que se desconoce si es factible o no emplearla para esta aplicación. Por ello, conseguir el objetivo planteado resulta de gran importancia tanto a nivel médico o patológico, como a nivel técnico y económico, ya que de lograr obtener una parafina con propiedades semejantes o iguales a la parafina importada, también se lograría un ahorro de divisas, debido a que en principio el producto final resultaría de un menor costo que el de la parafina importada.

II.3.- OBJETIVOS

II.3.1.- Objetivo general

Desarrollar y/u obtener una parafina o mezcla de parafinas, a partir de parafinas refinadas de procedencia extranjera con la finalidad de ser empleada para inclusión de tejidos orgánicos.

II.3.2.- Objetivos específicos

- Caracterizar parafinas comerciales provenientes del mercado internacional y disponibles en el mercado local, mediante la determinación de propiedades como punto de fusión, punto de solidificación y viscosidad, utilizando técnicas reológicas como una alternativa a los procesos y técnicas tradicionales.
- Evaluar las parafinas de origen comercial en base a sus características, con la finalidad de seleccionar las de posible uso para el desarrollo de una mezcla aceptable para la embutición de tejidos.

- Desarrollar formulaciones de mezclas basadas en las parafinas seleccionadas y caracterizarlas en base a su punto de fusión y solidificación, densidad y viscosidad.
- Seleccionar la parafina o mezcla de parafinas con características similares a la cera comercial de referencia empleada para la inclusión de tejidos y someterla a ensayos de corte y adherencia.
- Desarrollar el proceso o procedimiento para obtener la cera en forma de lágrimas o pellets similares a la parafina que actualmente se comercializa en el país con fines histológicos.

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO

III.1.- INCLUSIÓN EN PARAFINA

La Histología, también conocida como *anatomía microscópica*, es la ciencia que estudia la forma de las estructuras de los tejidos orgánicos vistas bajo el microscopio. Así, el *proceso histológico* consiste en una serie de métodos y técnicas empleadas para poder estudiar las características morfológicas y moleculares de los tejidos, el cual se utiliza como medio de diagnóstico (Univ. de Vigo, 2011).

Los análisis microscópicos son una manera de observar detalles que no son perceptibles para el ojo humano a simple vista, tales como microorganismos, células, entre otros, sin embargo, la técnica es efectiva cuando la observación se realiza en un solo plano. El fundamento radica en que para poder examinar un espécimen usando un microscopio se requiere que el mismo sea lo suficientemente delgado para permitir el paso de luz a través de éste. Así, la mayoría de las técnicas histológicas tienen como objetivo preparar el tejido para su observación con el microscopio, bien sea óptico o electrónico. Ello es debido a que la estructura de los tejidos está basada en la organización de los distintos tipos de células que los componen y, salvo contadas ocasiones, las características morfológicas de las células sólo se pueden observar con estos equipos (Univ. de Vigo, 2011).

De esta manera, la *inclusión en parafina* es una técnica empleada para preparar el tejido del espécimen de manera que no se deforme cuando es seccionado en láminas ultrafinas. Así, dicho tejido es infundido con cera parafínica que luego de ser colocado en un molde se le añade más parafina fundida, obteniendo como resultado un pequeño cubo de cera con el tejido incrustado dentro del mismo. Esta técnica de inclusión es rutinariamente empleada para preparar tejidos que serán sometidos a biopsias y posteriores análisis. Este proceso de embutición incluye varias etapas o

procesos secuenciales involucrados, como la fijación, deshidratación, inclusión y seccionamiento (Barzilla, 2005).

En la Figura 1 se muestran los métodos y técnicas comúnmente empleados para el procesamiento de los tejidos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen muchas variantes a estos procedimientos y su elección dependerá del resultado final que se desee obtener.

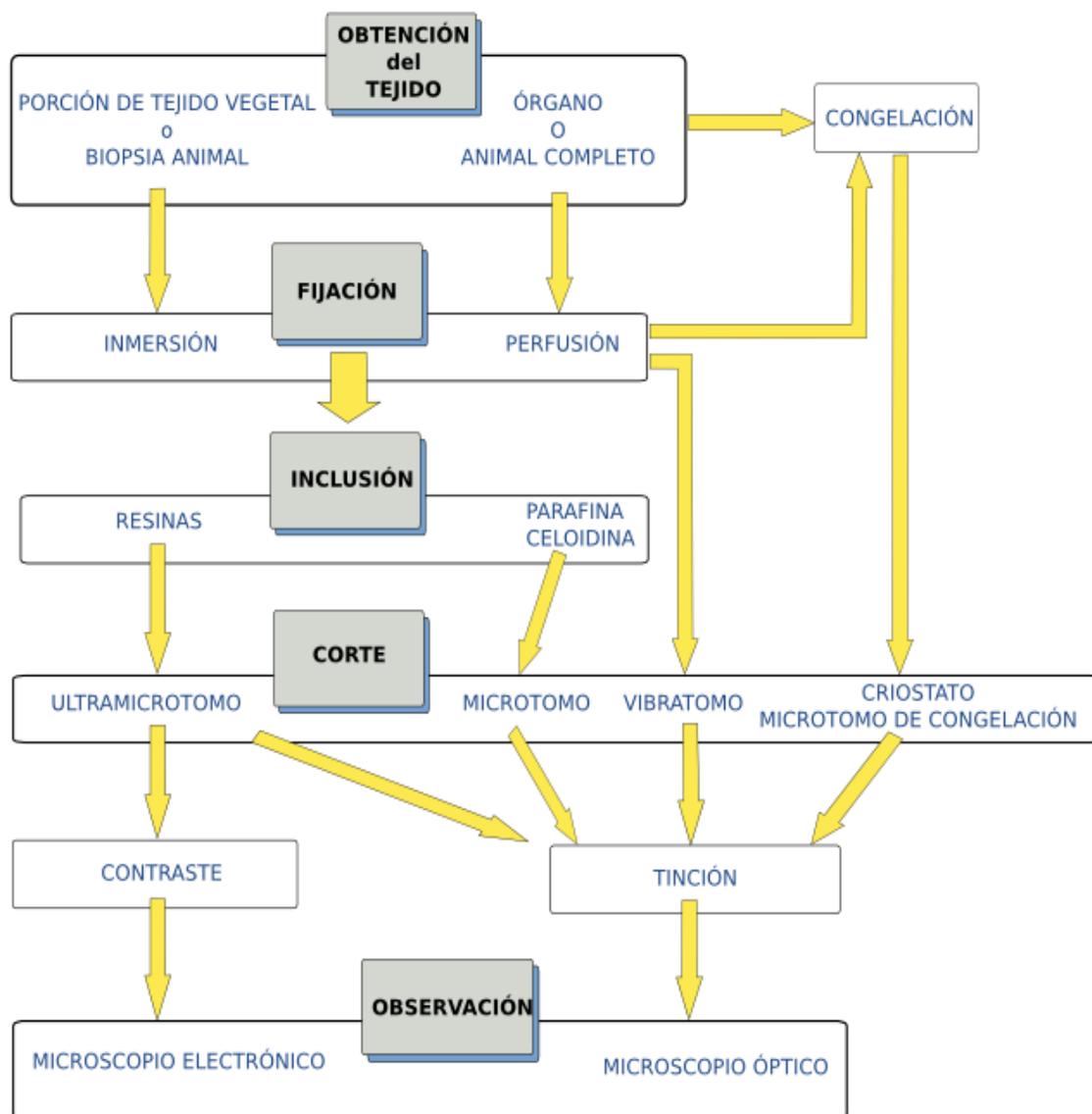


Fig. 1.- Esquema del proceso histológico, (Univ. de Vigo, 2011).

III.1.1.- Fijación

Cuando un segmento o fragmento de tejido es removido del cuerpo del cual formaba parte inmediatamente comienza a morir, es decir, las células de las cuales está compuesto comienzan a deteriorarse haciendo que la evaluación microscópica exacta sea imposible. Por lo tanto, la fijación es un método para preservar las células, proteger el tejido frente a ataques bacterianos, evitar autólisis, insolubilizar elementos solubles que se quieren estudiar, evitar distorsiones y retracciones tisulares, penetrar y modificar el tejido para poder llevar a cabo tinciones específicas posteriores, etc., esto se logra colocando el espécimen en un líquido fijador, usualmente formaldehído, sin embargo no existe un fijador universal ni un método de fijación único (Univ. de Vigo, 2011). La fijación actúa de manera tal que destruye los químicos responsables de la descomposición de las células. Así, la muestra de tejido puede permanecer “fijo” hasta por cuatro horas (Heidcamp, 1995).

III.1.2.- Deshidratación

Seguido de la fijación, el segmento del tejido es lavado con agua para remover cualquier resto del agente fijador que haya quedado. El agua y la parafina no son miscibles, por ende, todas las trazas de agua necesitan ser removidas del tejido lavado, este proceso es denominado deshidratación. Esta etapa se lleva a cabo colocando el tejido en una serie de baños de alcoholes de fuerza gradual, es decir, desde el más débil hasta el más fuerte. No debe confundirse la deshidratación con el secado. En la deshidratación se reemplaza el agua con otro líquido que a diferencia del agua es miscible con la parafina. Este proceso se lleva a cabo en 15 horas aproximadamente (Heidcamp, 1995).

III.1.3.- Inclusión, Incrustación o Embutición

La inclusión es el método más común de endurecer el tejido y consiste en infiltrar la muestra con sustancias líquidas que tras un proceso de polimerización o enfriamiento se solidifican, sin afectar las características del tejido. Con ello se consigue obtener cortes delgados (desde decenas de micrómetros a nanómetros según el medio de

inclusión) sin que el tejido se rompa o se deteriore. Además, son un buen método de preservar las muestras durante largos periodos de tiempo. Existen diferentes sustancias o medios de inclusión dependiendo del espesor del corte y de la técnica que se vaya a realizar. Cuando se quieren hacer secciones para su observación con el microscopio óptico los medios de inclusión más frecuentemente usados son la parafina o la celoidina, mientras que si se desea realizar observaciones con el microscopio electrónico la inclusión se realiza con resinas, principalmente de tipo acrílicas o epoxy (Univ. de Vigo, 2011).

Una vez que el tejido ha sido deshidratado es sumergido en parafina pura fundida por tres o cuatro horas, de manera que el espécimen se encuentre totalmente infiltrado por la cera. En otras palabras, la parafina debe ocupar todos los espacios vacíos dentro del tejido que originalmente se encontraban llenos con agua. El tejido infiltrado es colocado dentro de un molde en forma de bloque, se añade la parafina fundida dentro del mismo para luego dejar enfriar el conjunto. El proceso resulta en un bloque de cera con un fragmento de tejido incrustado. Luego, el espécimen se encuentra listo para proceder a seccionarlo en láminas delgadas (Klatt, 2011).

La Figura 2 muestra un protocolo común empleado para la inclusión en parafina. El esquema representa la inclusión de una muestra de tejido previamente fijada. Los tiempos de incubación en cada sustancia pueden variar en función del tamaño de la muestra, tipo de tejido, o por ejemplo el líquido intermediario. Sin embargo, los pasos son comunes a cualquier inclusión en parafina.

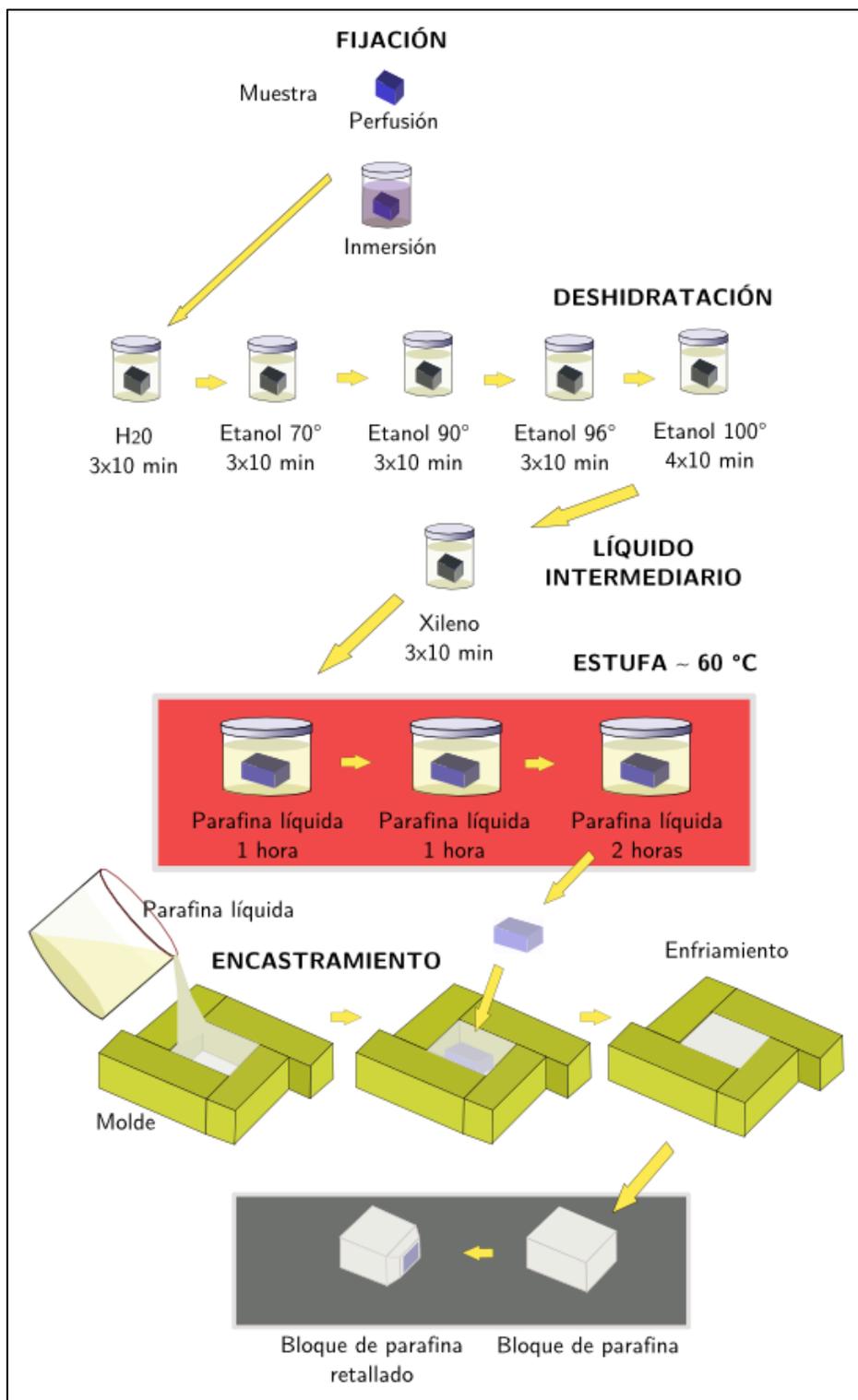


Fig. 2.- Esquema del proceso de inclusión en parafina de una muestra de tejido previamente fijada, (Univ. de Vigo, 2011).

III.1.4.- Corte o Seccionamiento

El seccionamiento es un término empleado para el rebanado o corte de tejidos que permite obtener finas láminas del tejido embutido. Las secciones son colocadas sobre portamuestras de vidrio para su posterior coloración y análisis. El corte requiere de gran habilidad, ya que las secciones del espécimen son tan delgadas que incluso dificultan su traslado a los respectivos portamuestras sin desgarrarlas, plegarlas o doblarlas. De esta manera, un examen certero es posible sólo si el espécimen ha sido apropiadamente preparado, embutido y seccionado (Klatt, 2011).

El seccionamiento de la muestra se realiza manualmente mediante equipos que operan de manera mecánica. Estos equipos utilizados para seccionar la muestra con espesores en el orden de micrómetros se denominan *microtomos*; una imagen del mismo puede observarse en la Figura 3. Existen diferentes tipos según el grosor que se quiera conseguir en las secciones, el medio de inclusión en el que se encuentre el tejido o si se ha endurecido por congelación o por inclusión (Univ. de Vigo, 2011).



Fig. 3.- Microtomo rotativo manual.

III.2.- LA PARAFINA

Las parafinas o hidrocarburos parafínicos son cadenas lineales o ramificadas de compuestos orgánicos saturados con una composición C_nH_{2n+2} (con $n \in \mathbb{N}$). El término *ceras de parafina* es usado para mezclas de varios grupos de hidrocarburos, especialmente parafinas y cicloalcanos, los cuales son sólidos a temperatura ambiente (Freund, 1982). Para objetivos del presente trabajo se tratará únicamente de parafinas sólidas a temperatura ambiente y se empleará el término *cera* o *parafina* de manera indistinta.

Debido a la diversidad de parafinas, éstas se categorizan esencialmente en dos grupos según su tipo de estructura:

III.2.1.- Parafinas macrocristalinas

Las ceras parafínicas que presentan estructuras de tipo macrocristalina pueden ser clasificadas respecto a sus puntos de fusión o a lo extenso que haya sido su refinado. En base al punto de fusión, se pueden distinguir entre parafinas suaves con temperaturas de fusión por debajo de los 45 °C, y parafinas duras con puntos de fusión entre los 45 y 60 °C con penetración de aguja inferior a 20 dmm a 25 °C. Consecuentemente las parafinas más duras a temperatura ambiente tienen un punto de fusión mayor, mientras que las más blandas uno menor. Dependiendo de la etapa de refinado, se pueden clasificar como semi-refinadas o refinadas de calidad técnica. Las ceras parafínicas de calidad técnica generalmente contienen menos del 6 % m/m de aceite. Las parafinas semi-refinadas pueden contener hasta un máximo de 3 % m/m de aceite, de color amarillo pálido o blanco. Las parafinas refinadas contienen de 0,4 a 0,8 % m/m de aceite, son completamente incoloras e inodoras y no contienen sustancias perjudiciales a la salud.

Químicamente son mezclas que consisten principalmente en hidrocarburos saturados C_{18} - C_{30} , con pequeñas cantidades de *i*-alcanos y cicloalcanos. El peso molecular de éstas varía entre 250 y 450 Da, y sus puntos de fusión entre 28 y 66 °C. Sus cristales tienen forma de placas o agujas y pueden ser observados visualmente. Las

temperaturas de fusión de algunos de estos alcanos se pueden observar en la Tabla 1 (Dean, 1999).

Tabla 1.- Puntos de fusión de alcanos comprendidos entre C₂₀ y C₃₀ (Dean, 1999).

| Fórmula molecular | Temperatura de fusión (°C) |
|---------------------------------|----------------------------|
| C ₂₀ H ₄₂ | 36,7 |
| C ₂₁ H ₄₄ | 40,4 |
| C ₂₂ H ₄₆ | 44,2 |
| C ₂₃ H ₄₈ | 47,4 |
| C ₂₄ H ₅₀ | 51,1 |
| C ₂₅ H ₅₂ | 53,3 |
| C ₂₆ H ₅₄ | 57,0 |
| C ₂₇ H ₅₆ | 60,0 |
| C ₂₈ H ₅₈ | 61,6 |
| C ₂₉ H ₆₀ | 64,0 |
| C ₃₀ H ₆₂ | 66,0 |

III.2.2.- Parafinas microcristalinas

Las ceras parafínicas que presentan estructuras de tipo microcristalina tienen mayores pesos moleculares, densidades e índices refractivos. Desde el punto de vista de proceso y aplicación, es muy importante la capacidad que tienen éstas de retener mayor cantidad de aceite que las macrocristalinas. La diferencia estructural también se confirma observando cómo mezclando parafina macrocristalina con sólo unas pocas décimas en porcentaje de microcristalina cambia la facilidad de exudación y prensado de la misma. Este tipo de parafina es obtenida a partir de petrolato, al cual se le debe las propiedades frágiles y dúctiles. Las parafinas microcristalinas frágiles reciben el nombre de cerasinas y las dúctiles se dividen en dos subgrupos llamados plásticas y elásticas (Freund, 1982).

La mayor parte de estas ceras microcristalinas contienen grandes cantidades de *i*-alcanos y naftenos con largas cadenas de alquilo ramificadas, siendo los *i*-alcanos los

responsables de la formación de los microcristales. Estas parafinas consisten de componentes que van desde C₄₀ hasta C₅₅ con puntos de fusión entre 80 y 95 °C.

Cabe destacar, que las diferencias entre las características de las ceras macrocristalinas y microcristalinas no están sujetas al nivel de purificación de las mismas. Sus clasificaciones se realizan en base a puntos de fusión, viscosidad cinemática a 100 °C, penetración a 25°C (ASTM D1321), punto de ruptura (Fraass) y contenido de aceite (ASTM D721). En la Tabla 2 se pueden observar las diferencias entre las características de las parafinas macrocristalinas, intermedias y microcristalinas (Freund, 1982).

Tabla 2.- Clasificación de parafinas macrocristalinas, intermedias y microcristalinas según sus características (Freund, 1982).

| Características | Macrocristalinas | Intermedias | Microcristalinas | | |
|---|------------------|-------------|------------------|-----------|-----------|
| | | | Frágiles | Dúctiles | |
| | | | | Elásticas | Plásticas |
| Punto de fusión (°C) | 40 - 60 | 58 - 70 | 74 - 85 | 50 - 60 | 50 - 70 |
| Viscosidad a 100°C (mm ² /s) | < 5,5 | 5,5 - 10 | > 10 | > 10 | > 10 |
| Penetración a 25 °C (dmm) | 12 - 20 | > 15 | < 10 | 20 - 35 | 20 - 50 |
| Pto. de ruptura Fraass* (°C) | > 25 | > 15 | > 25 | -20 - 0 | -30 - 10 |
| Contenido de aceite (%p) | < 0,8 | < 0,5 | < 2,0 | 0,5 - 3,0 | 3,0 - 7,0 |

* El punto de ruptura de Fraass es esencialmente un método que permite determinar la temperatura a la cual el bitumen alcanza su rigidez crítica y cede o se agrieta (Read, 2003).

III.2.3.- Propiedades químicas de las parafinas

Por estudios espectroscópicos se ha demostrado que las ceras parafínicas consisten principalmente en hidrocarburos saturados. El número de componentes de anillos aromáticos, particularmente en el caso de las parafinas macrocristalinas formadas por componentes de bajo peso molecular, es tan pequeño que prácticamente no ejercen efecto alguno en las propiedades de la parafina, de hecho, la mayoría de estos anillos

están presentes como derivados alquilbencenos y en forma condensada (Freund, 1982). Aparte de *n*-alcanos e *i*-alcanos, las ceras parafínicas macro y microcristalinas contienen naftenos, especialmente derivados alquil-sustituidos de ciclopentanos y ciclohexanos. Dependiendo de la fuente del crudo y de lo extenso del refinado, mayores o menores cantidades de sulfuros cíclicos y compuestos nitrogenados pueden estar también presentes.

III.2.4.- Estructuras cristalinas de las parafinas

Como se mencionó anteriormente, los hidrocarburos parafínicos ya sean componentes individuales o mezclas de ellos, son siempre cristalinos a temperaturas por debajo de sus puntos de fusión o rangos de fusión.

En la práctica, la cristalización y estructura cristalina son de gran importancia, en especial en el caso de las ceras parafínicas sólidas a temperatura ambiente. En el transcurso de la manufactura y aplicación de las ceras parafínicas, la cristalización toma lugar a partir del fundido. Durante el enfriamiento del líquido comienza la formación de núcleos, los cuales dan origen a los cristales. La habilidad de cristalización, tanto en tamaño como en forma de los cristales que se producen a partir de un fundido, es usualmente caracterizada numéricamente por el número de núcleos formados por unidad de volumen del fundido por unidad de tiempo, donde la formación de núcleos siempre comienza por debajo del punto de fusión (Freund, 1982).

A temperatura ambiente, los alcanos entre C_{19} y C_{29} conteniendo un número impar de átomos de carbono presentan una estructura ortorrómbica, mientras que los que contienen números pares, entre C_{18} y C_{26} , poseen una estructura triclínica, y aquellos entre C_{28} y C_{36} presentan una estructura monoclínica. A mayores temperaturas, las estructuras más estables son las que presentan sistemas cristalinos de mayor simetría, como es el caso particular de las estructuras hexagonales y ortorrómbicas. En las estructuras hexagonales las largas moléculas son capaces de rotar libremente alrededor de su eje longitudinal, así, tales parafinas son relativamente suaves. En

crisales con sistemas ortorrómbicos no es posible esta libre rotación, por ende, estas parafinas poseen una mayor rigidez (Freund, 1982). La representación de las estructuras hexagonales y ortorrómbicas de los crisales se pueden observar en las Figuras 4 y 5 respectivamente.

Según estudios de Maze, Schaerer, Baylé, Smith y otros, los hidrocarburos parafínicos lineales comprendidos entre C_{21} y C_{36} muestran un punto de transición bien definido cuando se encuentra a pocos grados centígrados por debajo de sus puntos de fusión. La llamada fase α , estable por debajo del punto de fusión, es convertida en fase β , donde la transición está acompañada por el desprendimiento de una relativa gran cantidad de calor. Las parafinas comerciales macrocristalinas a temperatura ambiente consisten principalmente en duros crisales ortorrómbicos, sin embargo la estructura hexagonal siempre está presente, aun si se encuentra en pequeñas cantidades.

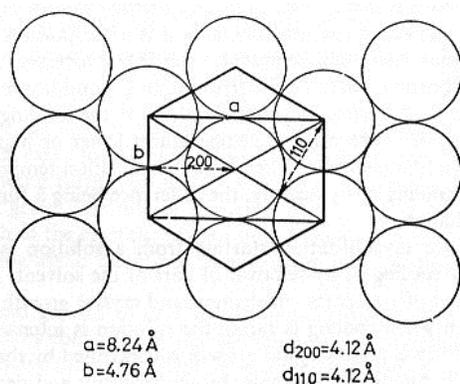


Fig. 4 - Estructura hexagonal de crisales de ceras parafínicas

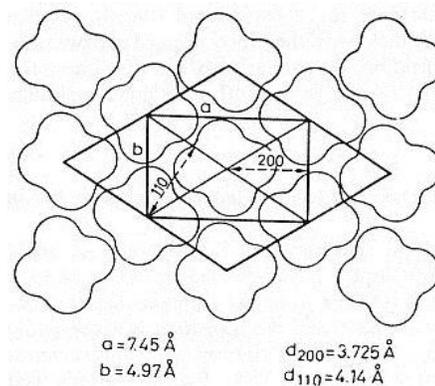


Fig. 5 - Estructura ortorrómbica de crisales de ceras parafínicas

III.2.5.- Parafinas para inclusión o embutición de tejidos

Existen distintos tipos de parafinas y cada una de ellas se emplean según las necesidades, así, las propiedades y especificaciones de las ceras parafínicas dependen del campo de aplicación, estas especificaciones pueden involucrar mezclas de

distintos tipos de parafinas con incorporación de parafinas microcristalinas, polímeros u otros aditivos con el objetivo de modificar propiedades como la fragilidad, la fuerza tensil, facilidad de pulverización, propiedades de adherencia, entre otros. De esta manera, ciertas propiedades importantes para una aplicación determinada pueden ser mejoradas, mientras que otras pueden ser suprimidas total o parcialmente (Freund, 1982).

Normalmente las ceras son mezclas de parafinas macrocristalinas con presencia de aditivos. Los principales aditivos empleados en mezclas con parafinas macrocristalinas se pueden dividir en dos grupos:

- Parafinas microcristalinas (petrolatos, cerasinas, ozoqueritas, etc.), y
- Polímeros (polietileno, poliisobutileno, copolímeros de etilvinilacetato, etileno etilacrilato, etileno isobutilacrilato, amidas de ácidos grasos, resinas naturales y sintéticas, entre otros.)

El efecto de los aditivos puede ser intensificado si las propiedades que se requieren potenciar ya se encuentran presentes en la materia prima. En el caso de las ceras parafínicas empleadas para embutición de tejidos, generalmente están formuladas en base a mezclas de parafinas macro y microcristalinas que en principio poseen diferentes puntos de fusión. De esta manera, las proporciones en la mezcla de cada uno de los componentes dependerá del grado deseado en el producto final y las propiedades de los aditivos a ser empleados (Freund, 1982).

Los petrolatos microcristalinos poseen alta flexibilidad a bajas temperaturas y baja permeabilidad al vapor de agua. Cerasinas microcristalinas con altos puntos de fusión y bajo contenido de aceite promueven el brillo y la alta resistencia a impactos mecánicos. Así, para la elección de un polímero como aditivo debe considerarse la capacidad suavizante y los intervalos de fusión del mismo, como también la variación de la viscosidad en función de la temperatura. Para los polímeros, la viscosidad es función de sus pesos moleculares promedio, consecuentemente polímeros con bajos grados de polimerización son empleados comúnmente para mezclas, siendo

mayormente empleados el polietileno y el poliisobutileno, éstos incrementan los puntos de fusión, la dureza y en menor grado, la flexibilidad (Freund, 1982).

En el caso de las parafinas empleadas para embutición de tejidos es recomendable una dureza mayor para incluir muestras más duras, y poder de esta manera realizar cortes más finos (Univ. de Vigo, 2011).

Las parafinas más empleadas tienen un punto de fusión en torno a los 60 °C y son típicamente parafinas microcristalinas, ya que el pequeño tamaño de sus cristales permite una mayor infiltración entre el tejido a embutir obteniendo como resultado una mejor inclusión. Estas características de las parafinas se pueden modificar añadiendo sustancias para variar su dureza, viscosidad y fragilidad, entre otros (Univ. de Vigo, 2011).

De esta manera, en la Tabla 3 se presentan ciertas características técnicas que suministran algunos fabricantes de ceras comerciales para embutición de tejidos.

Tabla 3 - Características de ceras comerciales para embutición de tejidos.

| Características | Malaga (D-2395) | Multiceras (Histowax) | United Group (Parabiotest) | McCormick™ (Paraplast) |
|---------------------------|----------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Punto de fusión (°C) | 56 - 58 | 55-60 | 54-56 | 56 |
| Penetración a 25 °C (dmm) | 8 - 12 | 0-10 | - | - |
| Contenido de aceite (% p) | ≤ 1 | < 0,5 | ≤ 0,5 | - |

Adicionalmente, las parafinas para embutición deben poder infiltrarse en el tejido profundamente, tener rigidez y a su vez poseer cierta flexibilidad para poder lograr cortes limpios y rápidos sin agrietarse, de lo contrario la muestra de tejido puede dañarse o deteriorarse dificultando de esta manera su respectivo diagnóstico.

CAPÍTULO IV

MARCO METODOLÓGICO

La metodología empleada para llevar a cabo el presente Trabajo Especial de Grado se puede observar gráficamente en la Figura 6.

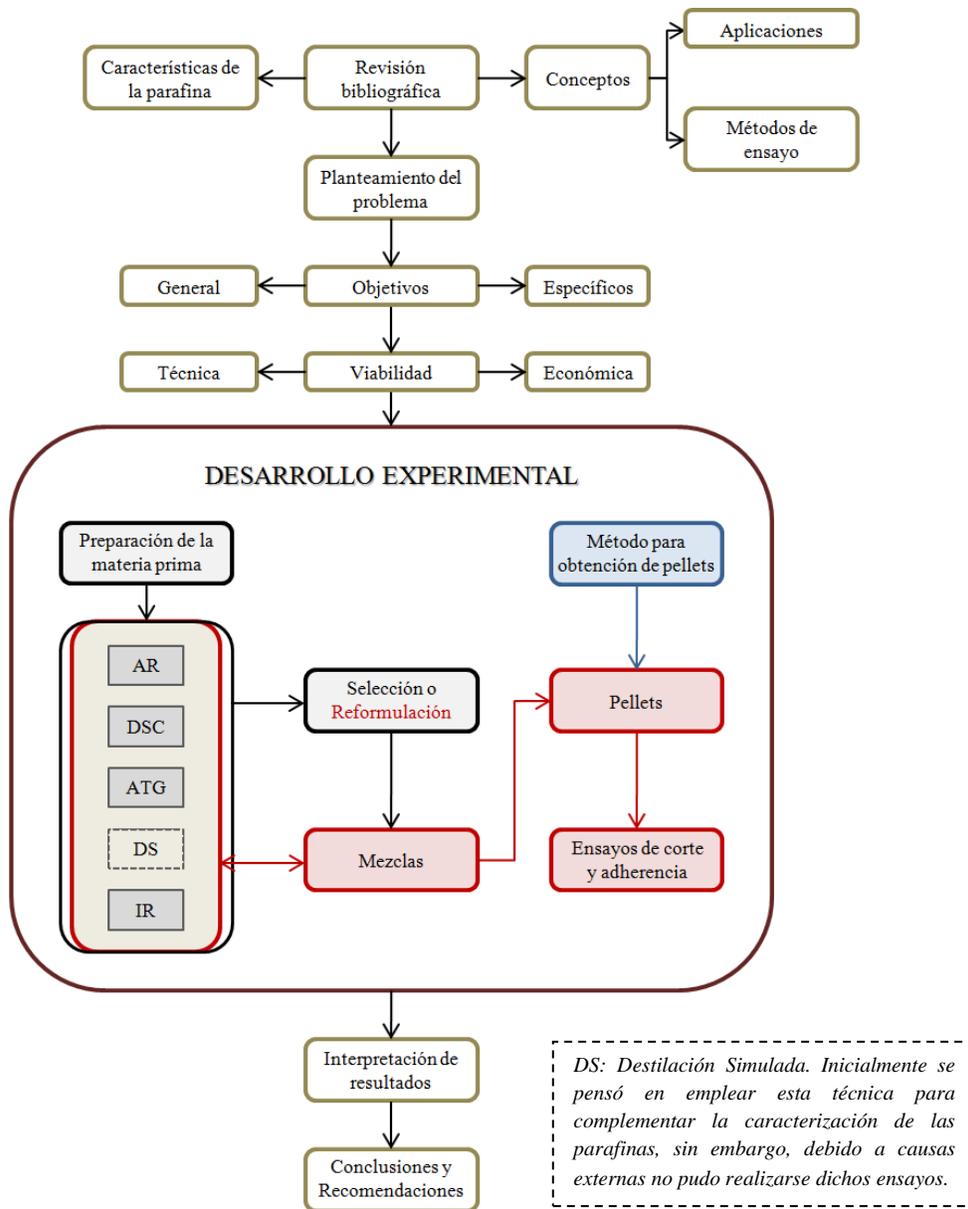


Fig. 6 - Esquema del marco metodológico y actividades experimentales.

IV.1.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En esta etapa se realiza una revisión bibliográfica que contempla los tópicos relacionados con el presente trabajo. Dicha revisión consiste en la búsqueda, compilación y análisis de información disponible, con el fin de obtener los conocimientos básicos necesarios para comprender y desarrollar el tema planteado. En principio, se considera lo referente a los aspectos básicos de la materia prima, como lo son las propiedades y características de las parafinas, seguidamente las técnicas empleadas para las caracterizaciones de las mismas, y por último el procedimiento a realizar para la obtención de las mezclas y los pellets.

IV.2.- MATERIA PRIMA

Las parafinas a emplear son de distintas procedencias, Estados Unidos, Alemania, China y México. En la Tabla 4 se presenta el origen y la denominación comercial, así como algunas propiedades y el fabricante de las parafinas que se utilizaron en esta investigación. Éstas a su vez vienen en diferentes presentaciones: panelas, hojuelas, pellets y trozos de geometría irregular. Por lo tanto, para los ensayos previstos es necesario adecuar dichas parafinas de acuerdo a los respectivos análisis a los cuales deben ser sometidas.

Tabla 4 - Procedencia, proveedores y algunas propiedades de las parafinas estudiadas.

| Procedencia | Fabricante | Denominación | Punto de fusión (°C) | Penetración a 25 °C (dmm) |
|--------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| <i>Alemania</i> | Sasol Wax GmbH | Base alemana | 54-56 | 16-20 |
| <i>China</i> | - | HPS | 56 mín. | 12 |
| <i>México</i> | Malaga S.A. de C.V. | D-2395 | 56-58 | 8-12 |
| | | GLP-5 | 58-60 | 8-12 |
| | Multiceras S.A. de C.V. | Histowax | 55-60 | 0-10 |
| | | Microcristalina | 70-75 | 15-28 |
| <i>Nacional</i> | United Group O.L. C.A. | Parabiotest | 54-56 | 16-20 |
| | Santa Teresa C.A. | Vela común | - | - |
| <i>U.S.A.</i> | McCormick™ Scientific LLC | Paraplast | 56 | - |

IV.3.- PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Para la mayoría de los análisis es necesario que la parafina se encuentre en forma de partículas con un tamaño $\leq 1 \text{ mm}^3$, esto debido a que generalmente se requieren pequeñas cantidades de masa para los mismos o bien ocupan un espacio bastante reducido en los respectivos portamuestras. Por lo tanto, dichas parafinas deben ser sometidas a procedimientos de reducción.

IV.4.- CARACTERIZACIÓN

La caracterización de las parafinas mediante los métodos tradicionales generalmente se basan en normas internacionales como las ASTM, entre las cuales se tienen principalmente:

- Color: ASTM 1500.
- Contenido de aceite: ASTM D-721.
- Penetración a 25 °C: ASTM D-1321.
- Punto de fusión: ASTM D127-87.
- Viscosidad (SUS) a 99 °C: ASTM D-2161.

Sin embargo, dichas normas están orientadas a precisar la calidad o evaluar parámetros específicos, y no generan información de significativa utilidad para el tema planteado, por ello, se ha considerado realizar la caracterización mediante técnicas como lo son: los análisis reológicos, la calorimetría diferencial de barrido (DSC), los análisis termogravimétricos (ATG) y los análisis mediante espectroscopia infrarroja (IR).

IV.4.1.- Análisis reológicos

La *reología* es definida según la IUPAC como el estudio del flujo y deformación de la materia cuando se encuentra bajo la influencia de una fuerza mecánica. Se refiere especialmente al comportamiento del material que no puede describirse por modelos lineales simples de la hidrodinámica y elasticidad, donde alguna de estas desviaciones

es debida a la presencia de partículas coloidales, a la influencia de superficies o bien a la estructura del fluido. Por ende, la determinación experimental de las propiedades reológicas es definida como *reometría* (Moreno, 2005).

Dentro de las propiedades reológicas más importantes tenemos: el esfuerzo y la deformación, la elasticidad y la viscosidad. Mediante esta técnica se pueden obtener valores precisos de estas variables mencionadas, los cuales son característicos del material, e incluso últimamente también es posible determinar la temperatura de fusión y solidificación de ciertos materiales, entre los cuales se encuentra la parafina. Así, los datos obtenidos permiten establecer diferencias entre los distintos tipos de parafinas, otorgando de esta manera la tipificación de las mismas.

Los ensayos se realizaron con un reómetro HAAKE MARS II, marca Thermo Scientific de procedencia alemana. Se empleó una geometría de medición de tipo placa-placa constituida de un plato modelo MP60/DC, un sensor modelo PP60H de 60 mm de diámetro con eje cerámico y una cámara de calentamiento superior modelo UTCE/E con el objetivo de evitar pérdidas de calor. El ensayo se realizó en modo combinado a CS-CR-CS (*Controlled Stress*: esfuerzo controlado, *Controlled Rate*: velocidad controlada), iniciando a una temperatura de 40 °C con el fin de estar lo más próximo al punto de cedencia del material, evitar así la sobrecarga del torque y facilitar de esta manera la lectura de datos, hasta alcanzar una temperatura máxima de 65 °C, ya que en la práctica de los ensayos histológicos la parafina no debe superar ésta temperatura, por lo que el estudio del comportamiento de estas parafinas a temperaturas mayores no es considerada en esta investigación. Las dos etapas operando en modo CS se realizaron con un esfuerzo (τ) de 10 Pa durante un período de 900 s, en la etapa operando en modo CR se seleccionó la opción "tomar de la anterior", es decir, el equipo adopta como valor de velocidad de cizalla ($\dot{\gamma}$) el valor final de dicho parámetro correspondiente al ciclo anterior, el cual se encuentra en un valor promedio de 1400 s⁻¹ por un tiempo aproximado de 600 s.

IV.4.2.- Análisis por calorimetría diferencial de barrido

Comúnmente llamados DSC, debido a su procedencia inglesa *Differential Scanning Calorimetry*, es una técnica empleada para identificar y evaluar eventos térmicos tales como transiciones físicas (transiciones vítreas, cristalización, fusión, vaporización de componentes volátiles) y reacciones químicas. La información obtenida caracteriza la muestra respecto a su comportamiento térmico y composición. Por otra parte, con esta técnica también es posible medir propiedades cuantitativas como capacidad calorífica, temperatura de transición vítrea, temperatura de fusión y grado de cristalinidad. Las transiciones y reacciones producidas por tratamientos sucesivos, pueden ser distinguidas analizando la misma muestra una segunda vez después que esta haya sido enfriada, considerando que los materiales cristalinos funden y luego cristalizan nuevamente durante el enfriamiento (Schawe, 2002).

Por medio de este análisis, no sólo es posible obtener valores de las variables mencionadas, sino que también permite verificar si ocurre algún cambio significativo en la estructura de la materia (parafina) cuando es sometida a ciclos continuos de calentamiento y enfriamiento. De esta manera, este ensayo permite evaluar si se produce algún cambio en la parafina empleada para inclusión durante la práctica diaria de ensayos histológicos, ya que las mismas son sometidas a ciclos inter-diarios de calentamiento y enfriamiento.

Estos ensayos se realizaron mediante un analizador modelo TGA/DSC 1, marca Mettler Toledo de fabricación suiza-norteamericana. Los análisis térmicos constaron de dos ciclos continuos de calentamiento y enfriamiento, desde 30 °C hasta 65 °C respectivamente a una tasa de 3 °C/min empleando como portamuestras crisoles de alúmina.

IV.4.3.- Análisis termogravimétricos

Los análisis termogravimétricos "ATG" (o TGA por su origen inglés *Thermogravimetric Analysis*), aportan información sobre las propiedades de la muestra y su composición cuando estas son sometidas a un ciclo continuo de

calentamiento y enfriamiento, lo cual permite su identificación. Cuando una muestra es calentada a menudo pierde masa, esta pérdida de masa puede ser causada por vaporización o por reacción química envuelta en la formación de productos gaseosos. Si el gas de purga de la atmósfera empleado no es inerte la muestra también puede reaccionar con el gas. En algunos casos la muestra puede incrementar su masa, por ejemplo, si en una oxidación el producto formado es sólido. Si la muestra se descompone como resultado de una reacción química, la masa de la muestra a menudo cambia de manera gradual. La temperatura a la cual ocurre provee información de la estabilidad del material en la atmósfera empleada (Schawe, 2002).

El empleo de esta técnica resulta de gran utilidad, debido a que la información obtenida permite verificar si la parafina a analizar pierde algún componente volátil que afecte la estructura durante el calentamiento, provocando cambios en las características que debe poseer para ser empleada en patología.

Los resultados de este ensayo se obtienen simultáneamente con los DSC, ya que el equipo disponible permite realizar ambos análisis a la vez.

IV.4.4.- Análisis por espectroscopia infrarroja

La espectroscopia infrarroja, es la rama de la espectroscopia que estudia la región infrarroja del espectro electromagnético, la cual es una técnica analítica instrumental que permite conocer los principales grupos funcionales de la estructura molecular de un compuesto. Esta técnica también es conocida con el nombre de *Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR*, por su origen inglés), debido al aporte del matemático francés en el desarrollo de la técnica (Derrick, 1999).

La espectroscopia en el infrarrojo (IR) es una de las técnicas más usadas por los químicos orgánicos e inorgánicos. De manera resumida, consiste en la medición de diferentes frecuencias infrarrojas absorbidas por una muestra posicionada en el trayecto de un haz infrarrojo con el objetivo principal de determinar los grupos químicos funcionales que constituyen la muestra. Diferentes grupos funcionales absorben frecuencias características de radiación IR, por lo tanto, usando varios

accesorios de muestreo los espectrómetros pueden aceptar un amplio rango de tipos de muestras, tales como gases, líquidos y sólidos (Settle, 1997).

Un espectro IR generalmente muestra la respuesta del detector del equipo que usualmente es representada mediante una gráfica que describe el % transmitancia o absorbancia en función de la frecuencia infrarroja (en números de onda [cm^{-1}]). Una frecuencia de radiación que interactúa con la muestra produce una banda de absorción que es característica de la energía requerida para una transición particular de un grupo molecular (usualmente una moción vibracional). El patrón y la posición colectiva de estas bandas designan la combinación de los grupos moleculares encontrados de cualquier compuesto específico (Derrick, 1999). Las bandas de absorción exhiben tres parámetros importantes, como lo son: la frecuencia, forma e intensidad. Estos atributos de las bandas son únicos para cada molécula o material individual. Las posiciones de las bandas, o *frecuencias*, indican la presencia de ciertos grupos funcionales en un material. La *forma* de la banda aporta información acerca de la funcionalidad del grupo así como también de la pureza del material, y la relativa *intensidad* de la banda, en comparación con las otras en el espectro, aportan información de la cantidad y del tipo de un grupo funcional específico presente en una molécula.

Las dos áreas importantes de un examen preliminar de un espectro son: la región de alta frecuencia, entre $4000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$, la cual representa las frecuencias de alargamiento de grupos funcionales principales (O–H, N–H, C=O, etc.), y la región de baja frecuencia, entre $900\text{-}650\text{ cm}^{-1}$, donde la ausencia de fuertes bandas de absorción generalmente indican la presencia de estructuras no aromáticas. La zona intermedia del espectro, entre $1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, es usualmente referida como la región *huella dactilar*, donde el patrón de absorción es frecuentemente complejo, originando bandas en modos de interacción vibracional (Silverstein, 2005).

Así, conociendo los grupos funcionales se puede entender mejor el comportamiento químico de los materiales, y en este caso el de las parafinas, que junto a los resultados

de los análisis mencionados anteriormente se puede establecer un sistema comparativo que permite su categorización y por ende caracterización.

Los ensayos fueron realizados en dos grupos, con equipos y métodos diferentes. Un primer grupo de muestras se analizaron en forma de película sobre celdas de bromuro de potasio (KBr), en un instrumento marca Nicolet, modelo 380, operando en un intervalo espectral de 4000-400 cm^{-1} y una resolución de 4 cm^{-1} . El segundo grupo se realizó empleando la técnica de disco prensado, utilizando pastillas de bromuro de potasio (KBr), en un espectrómetro marca Nicolet, modelo Magna IR560 Spectrometer E.S.P., en un intervalo espectral de 4000-400 cm^{-1} . Ambos equipos operados en modo de transformada de Fourier.

IV.5.- ELABORACIÓN DEL PRODUCTO FINAL Y OBTENCIÓN DE PELLETS

Una vez categorizada y caracterizada cada una de las parafinas, se procede a seleccionar las más adecuadas para establecer mezclas entre ellas y someterlas a posteriores ensayos, con el objetivo de obtener un material con características similares a la referencia. Para ello, se toman en cuenta como parámetros principales de selección las temperaturas de fusión, así como también las viscosidades que éstas presenten e impurezas que puedan presentar las cuales se podrán observar en los resultados obtenidos.

Para la obtención de pellets es necesario estudiar, analizar y establecer los parámetros que permitan obtener la parafina en esta forma de presentación, entre estos se pueden mencionar la temperatura a la cual debe encontrarse la parafina así como también la temperatura del ambiente, entre otros.

IV.5.1.- Preparación de mezclas y obtención del producto final

En esta etapa se seleccionan las parafinas que resulten como posibles materias primas para la elaboración de mezclas, es decir, aquellas que posean características similares a la parafina de referencia. Una vez seleccionada la(s) parafina(s) que presente(n)

menores valores de punto de fusión y viscosidad, así como menor cantidad de impurezas, se procede a la realización de diferentes mezclas, para finalmente evaluar los resultados obtenidos. Adicionalmente, dependiendo de los resultados que se obtengan se decidirá si es necesaria la adición de algún aditivo que modifique las propiedades de la parafina o mezcla de parafinas, de manera que permita obtener mejores resultados.

IV.5.2.- Obtención de pellets

En esta etapa se evalúan las posibles variables involucradas en el proceso de obtención de parafina sólida en forma de pellets. Se ha considerado que el sistema a diseñar debe permitir obtener gotas de parafina que luego solidifiquen rápidamente. Como sistema de obtención de gotas se consideró el diseño de un dispositivo que mediante una serie de accesorios electromecánicos permite la descarga de la parafina fundida de manera intermitente sobre una cinta transportadora, la cual se desplaza dentro de un túnel por el cual circula un flujo de aire frío a contracorriente como medio de enfriamiento, logrando así transferir la máxima cantidad de calor entre el material y el medio refrigerante, lo que permite un proceso de solidificación más rápido, efectivo y sin defectos.

El esquema del montaje experimental del sistema diseñado que permite obtener la parafina en forma de pellets se puede observar en la Figura 7. El mismo se encuentra constituido por seis partes principales: la fuente de aire frío, la fuente de parafina fundida, la cinta transportadora de gotas del fundido, el conducto/túnel por el cual circula el aire frío, el control electromecánico y por último, el recipiente en el cual se recolectan los pellets.

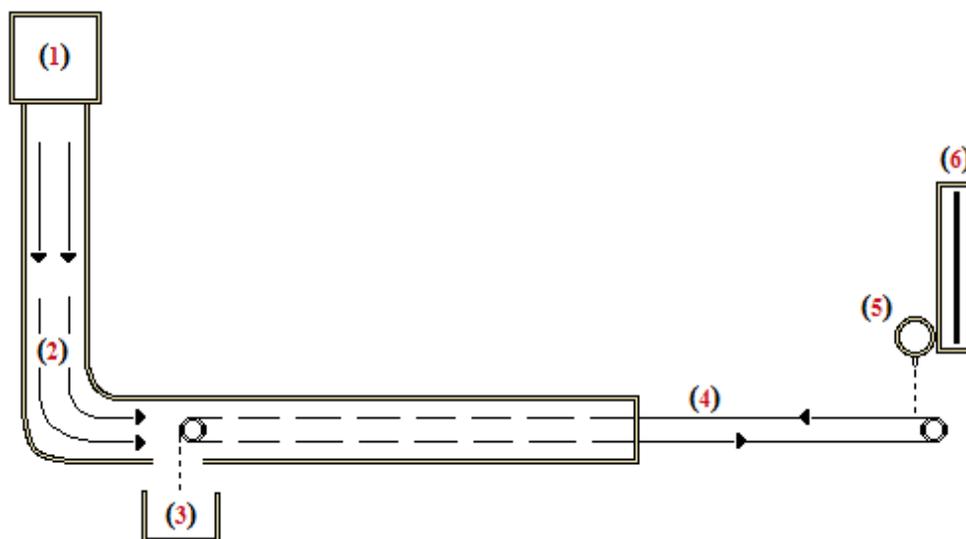


Fig. 7 - Esquema del sistema para obtención de pellets: (1) Fuente de aire frío, (2) Ducto de circulación de aire refrigerante, (3) Recipiente de recolección de pellets, (4) Cinta transportadora, (5) Fuente de parafina fundida, (6) Control electromecánico.

Entre las variables a manipular y/o controlar para lograr los pellets se pueden mencionar: la temperatura, dirección y caudal de aire frío, velocidad de la cinta transportadora y longitud de la misma, temperatura de la parafina, altura entre las boquillas de descarga y la cinta, la frecuencia de descarga y diámetro de las boquillas de descarga, entre otros. En vista de la posible interdependencia entre muchas de estas variables, se debe establecer un sistema que permita manipularlas para obtener dichos pellets.

El esquema eléctrico del sistema concebido para el control y calentamiento que mantiene la parafina fundida, y permite la obtención de gotas de la misma se puede apreciar en la Figura 8.

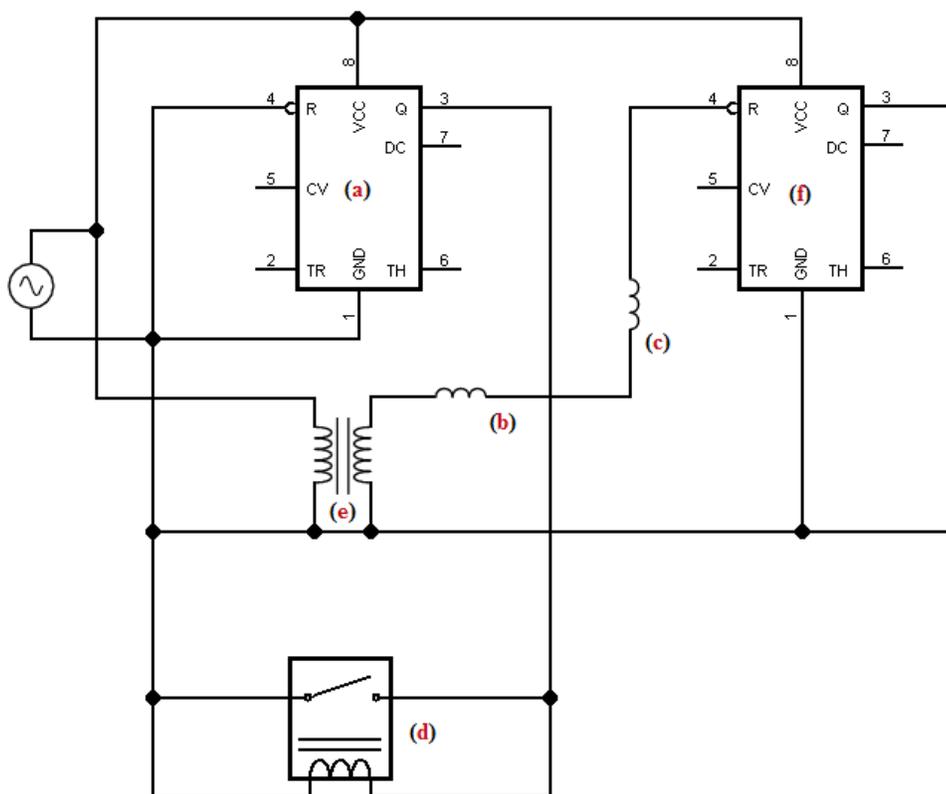
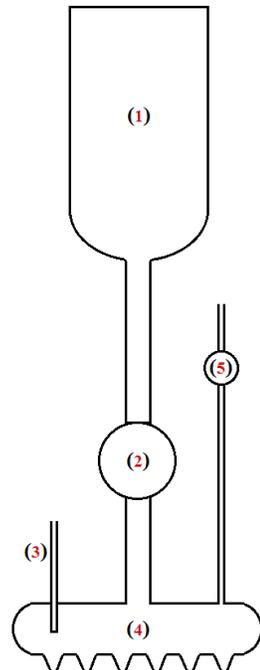


Fig. 8 - Esquema eléctrico de control: (a) Controlador PID de temperatura, (b, c) Válvulas solenoides, (d) Braker, (e) Transformador y (f) Temporizador.

Básicamente, el sistema consta de un compartimiento en el cual se encuentra la parafina, que por medio de una resistencia eléctrica se funde y se mantiene en estado líquido a una temperatura establecida en el controlador. De esta manera se garantiza que la parafina siempre se encuentre en estado líquido y no se solidifique, lo cual puede obstruir los conductos por donde fluye y se descarga la misma. Este sistema donde se encuentra la parafina se puede observar de manera esquemática en la Fig. 9.

En este sistema, la válvula solenoide (2) que comunica al tanque de almacenamiento (1) con el tanque de descarga (4) permite el llenado del mismo una vez que se haya vaciado. El termopozo (3) es una vaina hermética donde se ubica la termocupla que permite medir la temperatura a la cual se encuentra la parafina fundida, y envía una señal al controlador de temperatura al cual se encuentra acoplada permitiendo regular

la temperatura en el intervalo deseado. La segunda válvula solenoide (5) es la que controla el flujo de aire que permite llenar y descargar el respectivo compartimiento de descarga, así como también obtener las gotas de parafina de manera intermitente y continua por medio de un temporizador.



- (1) Tanque de almacenamiento
- (2, 5) Válvulas solenoides
- (3) Termopozo / termopar
- (4) Tanque de descarga

Fig. 9 - Esquema del sistema de carga, descarga y mantenimiento de la parafina.

A medida que transcurre el tiempo en el cual se descarga la parafina en forma de gotas, éstas caen en una cinta transportadora que circula por el ducto por el cual fluye aire frío en contracorriente. Éste acelera el proceso de solidificación de la parafina de manera que al llegar al otro extremo del ducto se encuentre lo suficientemente sólida para poder ser desprendida con facilidad, cayendo así a un recipiente donde se recolectan los pellets de la misma.

CAPÍTULO V**RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

En este capítulo se analizan y discuten todos los resultados obtenidos de los ensayos y objetivos planteados que se llevaron a cabo para la realización de la presente investigación.

V.1.- PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Las parafinas estudiadas poseen distintos tipos de formas de presentación, algunas de las cuales pueden ser observadas en la Figura 10.

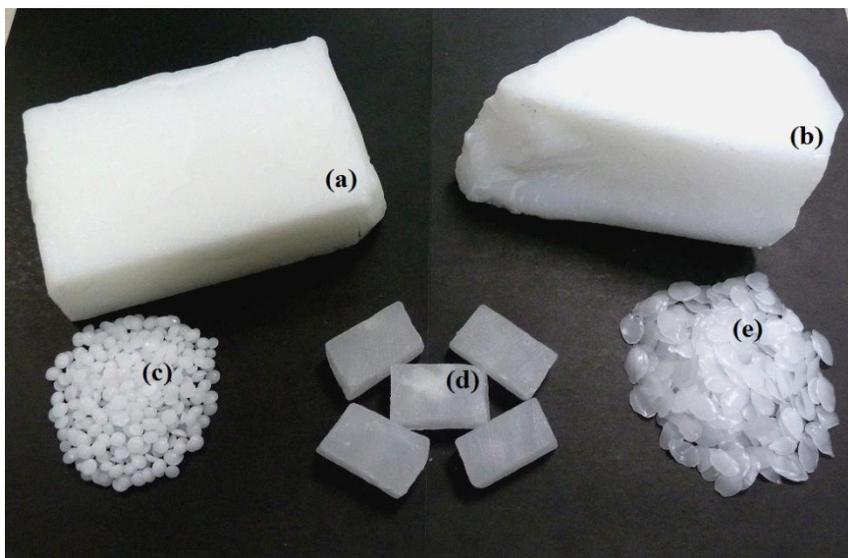


Fig. 10 - Formas de presentación en el mercado: (a) Microcristalina, (b) GLP-5, (c) Histowax, (d) Parabiotest, (e) Paraplast.

Para obtener un adecuado tamaño de partícula se empleó un proceso de cortado y/o rayado, ya que debido al comportamiento elastoplástico de la parafina no se pueden emplear procesos de reducción de tamaño tradicionales como la trituration o molienda. En la fotografía de la Figura 11, se puede observar el aspecto del material

cortado, mientras que en la fotografía de la Figura 12 se puede observar el aspecto del material rayado.



Fig. 11 - Partículas de parafina obtenidas mediante un proceso de cortado manual.



Fig. 12 - Partículas de parafina obtenidas mediante un proceso de rayado manual.

La técnica de cortado manual afecta negativamente el resultado de los análisis reológicos, ya que aparentemente el mayor tamaño y los bordes puntiagudos que ésta deja en las pequeñas partículas de parafina producen una considerable resistencia cuando el sensor del reómetro ejerce el esfuerzo de rotación en las primeras etapas del ensayo.

En la Figura 13 se representa de manera esquemática un corte longitudinal del sistema de medida con la muestra para los ensayos reológicos. El esquema ilustra la forma en que se encuentran distribuidas las partículas de parafina entre la base y el sensor. Si las partículas presentan geometrías que afecten su arreglo y la rotación del sensor a medida que se encuentra ejerciendo fuerza sobre las mismas, la inestabilidad del sistema se incrementa, dificultando con ello la lectura de datos y obteniendo de esta manera curvas irregulares. Por esta razón, y aunado a la dificultad de reducción de tamaño por corte manual, se substituyó esta técnica por un proceso de rayado.

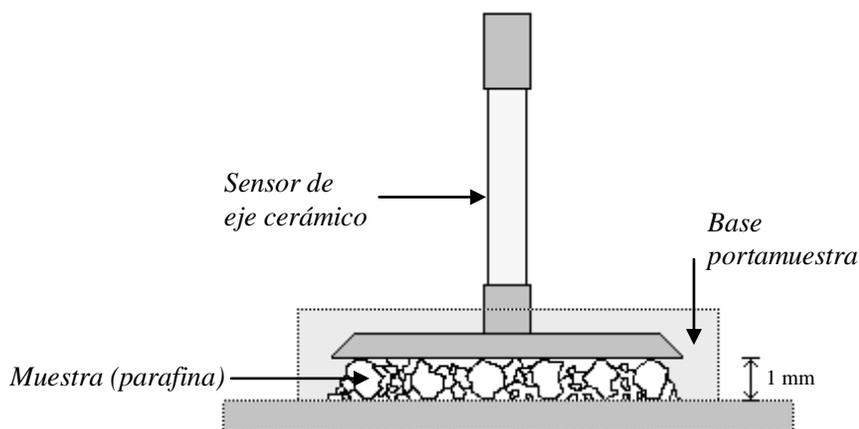


Fig. 13 - Esquema del sistema de medida y montaje de un ensayo reológico.

Mediante éste último proceso se obtienen las partículas de parafina en forma de pequeñas "virutas", disminuyendo de manera significativa los bordes puntiagudos que origina la técnica de cortado y obteniendo un tamaño de partícula aún menor, con una distribución de tamaño aparentemente más regular. Esto facilita el arreglo de las partículas de la muestra de parafina y la rotación del sensor, y aunque no impide la fluctuación de valores antes de la temperatura a la cual el material adquiere el comportamiento de un líquido, se evita la sobrecarga del torque del equipo facilitando con ello los análisis reológicos de dichas parafinas y la obtención de curvas más definidas, obteniendo de esta manera mejores resultados.

V.2.- CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA MATERIA PRIMA

V.2.1.- Análisis reológicos

En esta sección se muestran los resultados obtenidos de los ensayos reológicos de viscosidad (η) en función de la temperatura (T) practicados a cada muestra de parafina según las condiciones indicadas en la metodología experimental. Con fines prácticos y con el objeto de evaluar el comportamiento de cada material, se clasificarán los resultados de las parafinas estudiadas en dos grupos según las diferentes escalas, así, el primer grupo estará constituido por las parafinas que

presentaron viscosidades máximas inferiores a 300.000 Pa·s y el segundo grupo estará comprendido por aquellas que presentaron valores máximos de viscosidad superiores a los 500.000 Pa·s.

V.2.1.1.- Parafina Paraplast

La gráfica de la Figura 14 corresponde al resultado del análisis de viscosidad en función de la temperatura que se le realizó a la parafina Paraplast, la cual es utilizada como el material de referencia. La gráfica muestra el comportamiento de la viscosidad de la parafina en función de la temperatura. En la curva correspondiente al calentamiento se pueden observar cinco segmentos o zonas que describen diferentes etapas que experimenta el material al ser calentado.

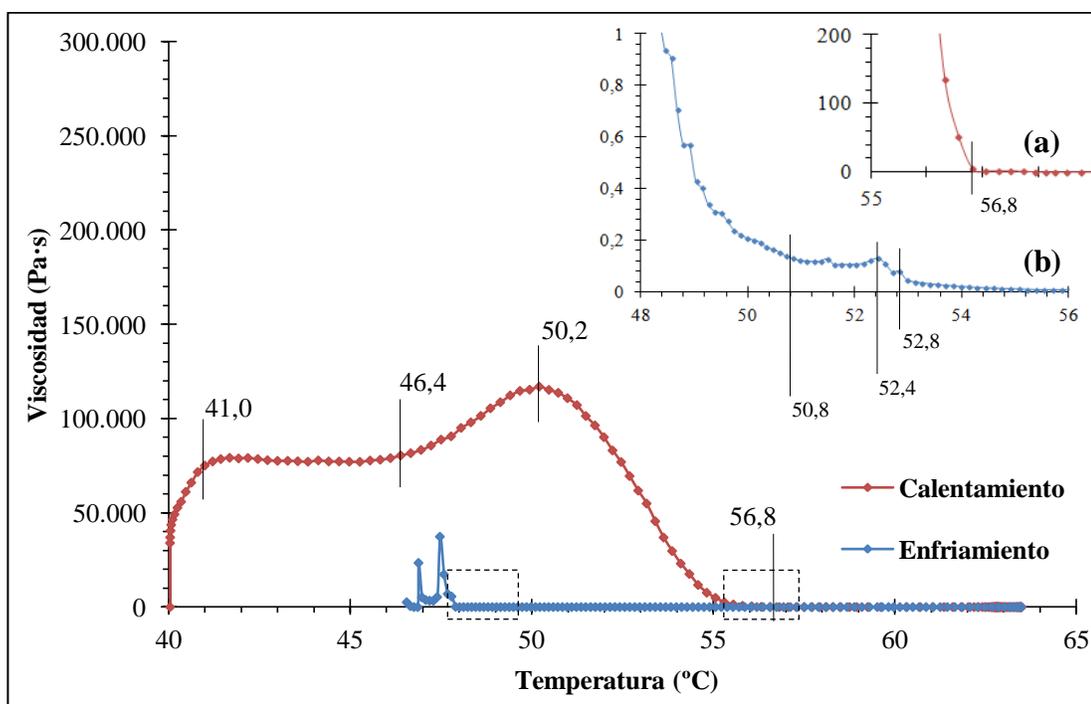


Fig. 14 - Curva de η vs. T correspondiente a la parafina Paraplast: (a) Ampliación de la curva de calentamiento en la región de los 56 °C, (b) Ampliación de la curva de enfriamiento en la región de los 48 °C.

En el primer segmento, ubicado entre los 40-41 °C se observa una pendiente positiva, lo cual está asociado a la compactación y adherencia de las partículas al sensor (rotor) del equipo como consecuencia de la fuerza y rotación ejercida por el mismo, lo que produce un esfuerzo que provoca un aumento en la viscosidad hasta el punto de cedencia, este comportamiento se ilustra en la Figura 15a. En el segundo segmento (41-46,4 °C), la viscosidad se mantiene prácticamente constante a pesar de que la temperatura continua en aumento, en esta etapa ocurre la fusión parcial de la parafina, en primer lugar funden las partículas más pequeñas, las aristas de los granos de mayor tamaño y los hidrocarburos de menor peso molecular, formando una película continua en la base portamuestra que se entremezcla con el aceite contenido en la parafina, transfiriendo calor a la misma hasta alcanzar el punto de fusión de los siguientes grupos de hidrocarburos, como bien se puede observar en la Figura 15b. El mecanismo descrito se incrementa debido a la fusión parcial (ablandamiento) de los granos más gruesos de parafina, y se comienza a formar una mezcla de consistencia pastosa que se adhiere al sensor y se intensifica por el movimiento del mismo, dando lugar a un aumento de la viscosidad, describiendo el comportamiento del tercer segmento (46,4-50,2 °C) de la curva. Aquí, el sistema o mezcla constituida por hidrocarburos pesados y fase líquida que se incrementa constantemente, forma una zona o capa límite entre la región de consistencia pastosa y el sensor, como se ilustra en la Figura 15c, etapa en la cual se incrementa aún más la viscosidad hasta alcanzar los 50,2 °C, a cuya temperatura el sistema está prácticamente constituido por líquido, quedando pequeñas partículas de parafina suspendidas correspondientes a los grupos de hidrocarburos más pesados que componen la parafina, como se ilustra en la Figura 15d. Finalmente, el sistema adquiere el comportamiento de un líquido donde las partículas sólidas remanentes en la suspensión continúan fundiendo, mostrando el comportamiento descrito en la curva la viscosidad en el intervalo de 50,2-55 °C, donde la pendiente negativa sigue disminuyendo progresivamente hasta el punto en el que toda la parafina se encuentra totalmente fundida (55-64 °C) y la viscosidad baja significativamente a valores menores a 1 Pa·s.

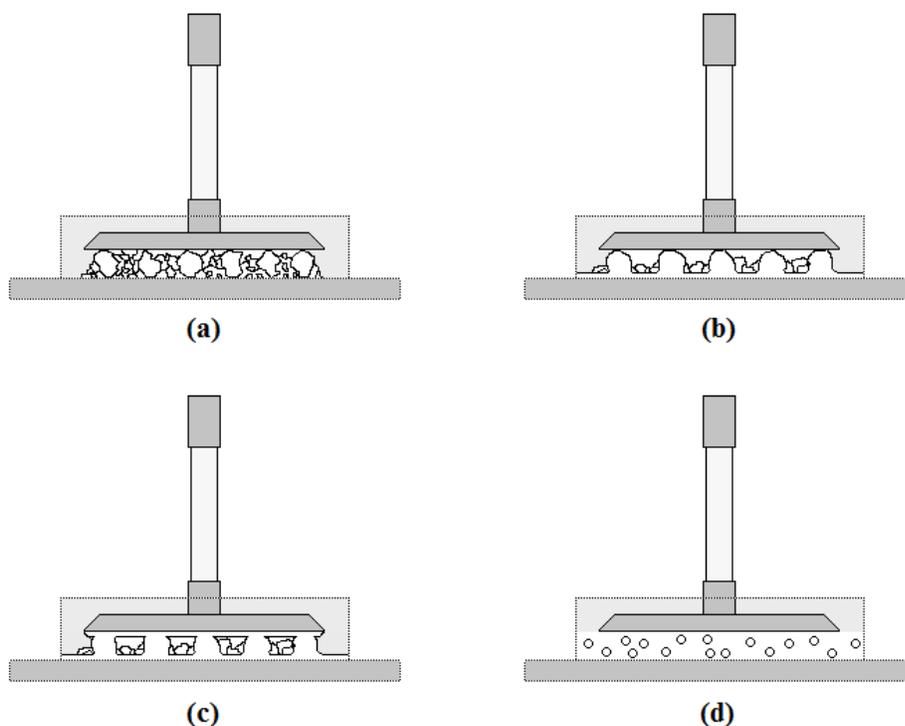


Fig. 15 - Fases que experimenta la parafina a medida que se incrementa la temperatura durante un ensayo de viscosidad en función de la temperatura: (a) Partículas sólidas compactadas entre el sensor y la base, (b) Formación de película de parafina fundida que se encuentra en contacto directo con la superficie de la base, (c) Las partículas comienzan a adquirir una consistencia pastosa formando una película de mayor espesor entre el sensor y la muestra, (d) La parafina se encuentra casi totalmente fundida con pequeñas partículas sólidas suspendidas en ella.

Debido a que las parafinas son mezclas de diferentes grupos de hidrocarburos éstas no presentan un punto de fusión definido, sino un intervalo de fusión. Sin embargo, en el presente trabajo se hará referencia al *punto de fusión de las parafinas* analizadas como la temperatura a la cual toda la parafina se encuentre en estado líquido.

En el caso de la parafina Paraplast se observa que a una temperatura de 50,2 °C presenta su valor máximo de viscosidad próxima a los 120.000 Pa·s, y una temperatura o punto de fusión de 56,8 °C a la cual se tiene una viscosidad de 2,7 Pa·s, alcanzando un valor mínimo de $4,8 \cdot 10^{-3}$ Pa·s a una temperatura máxima de ensayo de 63,5 °C.

En la etapa de enfriamiento y/o solidificación de la parafina (curva de color azul), se observa que al disminuir la temperatura el material comienza a pasar de estado líquido a estado sólido, donde los primeros compuestos en cambiar de estado son los hidrocarburos más pesados, ya que estos poseen una mayor entalpía de fusión. Las moléculas de éstos comienzan a reordenarse formando cristales, es decir, el material empieza a cristalizar hasta que la parafina vuelve a su estado sólido. En la gráfica ampliada (b), se observa como la pendiente comienza a aumentar progresivamente hasta que alcanza un máximo a una temperatura de 52,8 °C, la cual puede ser considerada como temperatura de congelación o solidificación, seguidamente tiende a disminuir, pero vuelve a alcanzar otro máximo en 52,4 °C. A partir de ésta temperatura y hasta los 50,8 °C existe una zona de relativa estabilidad, debido probablemente a la coexistencia e invariabilidad de las proporciones de sólido y líquido en ese rango. A temperaturas menores a los 50,8 °C el sólido empieza a solidificar masivamente, razón por la cual la viscosidad se incrementa rápidamente. Este comportamiento (incremento y disminución de la viscosidad) del material a temperaturas menores del punto de congelación, se debe al rompimiento de la estructura de la parafina causado por el movimiento del sensor.

De esta manera se toman éstos valores como parámetros de referencia comparativos al momento de realizar el producto que se ha considerado obtener en la presente investigación, debido a que dicha parafina es la que presenta mejores resultados durante su aplicación, siendo por ende la de mayor aceptación en el mercado como medio de inclusión.

V.2.1.2.- Parafina base alemana

En la Figura 16 se puede observar la gráfica obtenida del ensayo de viscosidad en función de la temperatura para la parafina base alemana. La curva de calentamiento presenta cuatro segmentos, cada uno es debido a reacciones similares a las descritas en el comportamiento experimentado por la parafina Paraplast. El primer segmento comprendido entre 40-43,8 °C corresponde a la fusión de los hidrocarburos más

livianos y las partículas más pequeñas que se encuentran en contacto directo con la base del portamuestra. A medida que se incrementa la temperatura, éstos componentes que se han fundido se mezclan con el aceite contenido en la parafina, el proceso de fusión continua otorgando una consistencia más pastosa al material y se incrementa constantemente su viscosidad, etapa comprendida entre los 43,8-49,1 °C.

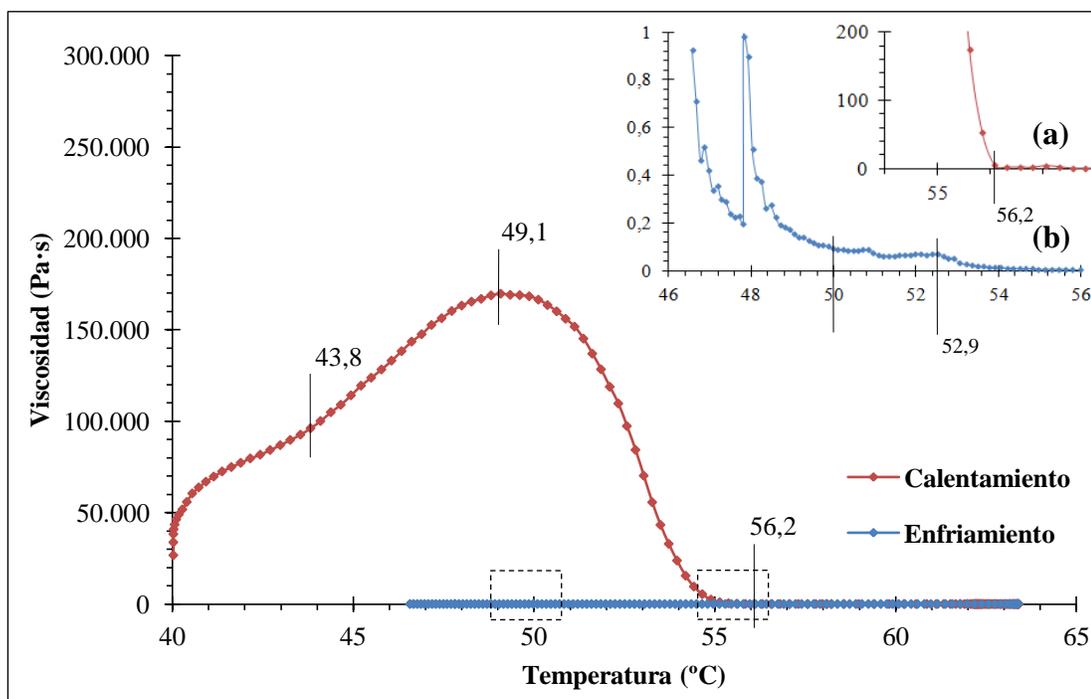


Fig. 16 - Curva de η vs. T correspondiente a la parafina base alemana: (a) Ampliación de la curva de calentamiento en la región de los 56 °C, (b) Ampliación de la curva de enfriamiento en la región de los 50 °C.

Seguidamente, la temperatura continúa en aumento y los hidrocarburos de mayor peso molecular comienzan a fundir hasta alcanzar un punto en que la parafina comienza a comportarse como un líquido, comportamiento descrito en la curva entre 49,1 y 56,2 °C, momento en el cual la viscosidad comienza a disminuir debido a la fusión de la mayoría de los componentes, hasta que la parafina alcanza su punto de fusión y todo el material se encuentra en estado líquido (56,2-64 °C). La temperatura de fusión que presenta esta parafina es de 56,2 °C la cual resulta ligeramente menor a

la obtenida para la Paraplast, a esta temperatura se tiene una viscosidad de 3,4 Pa·s. Sin embargo, se observa que presenta valores máximos de viscosidad un poco más elevados, alrededor de los 170.000 Pa·s para una temperatura de 49,1 °C. Por otra parte, presenta valores de viscosidad alrededor de los $4,5 \cdot 10^{-3}$ Pa·s cuando se encuentra a una temperatura máxima de ensayo de 63,5 °C. Durante el enfriamiento se observa que el primer máximo, es decir, el punto de solidificación ocurre a los 52,9 °C, similar al obtenido para la parafina Paraplast. A partir de ésta temperatura y hasta los 50 °C aproximadamente se observa la zona de estabilidad relativa en la etapa de solidificación de la parafina, hasta que el material comienza a solidificar rápidamente y la viscosidad se eleva significativamente, sin embargo la fuerza ejercida por el sensor rompe nuevamente la estructura formada y la viscosidad cae drásticamente debido a la ruptura ocasionada, este evento se puede observar en la curva a la temperatura de 48 °C. Estos resultados obtenidos indican que esta parafina puede ser seleccionada como materia prima para la elaboración del producto final.

V.2.1.3.- Parafina Parabiotest

El resultado del ensayo de viscosidad en función de la temperatura practicado a esta parafina se puede observar en la Figura 17. El caso de la parafina Parabiotest, la cual es procesada en el país, es muy similar al presenciado por la parafina base alemana. La curva de calentamiento presenta cuatro segmentos, donde los dos primeros corresponden a la etapa de fusión de los hidrocarburos de menor y mayor peso molecular respectivamente, y los dos últimos corresponden a la fusión de hidrocarburos más pesados, donde el sistema incrementa constantemente la proporción de líquido hasta la temperatura de fusión resultante (56,8 °C), a la cual la viscosidad es de 5,9 Pa·s. A su vez, presenta una viscosidad máxima de 200.000 Pa·s a una temperatura de 50,1 °C, y una mínima de $3,8 \cdot 10^{-3}$ Pa·s a una temperatura máxima de ensayo de 63,3 °C. La curva de enfriamiento muestra que el primer punto de ruptura, el cual representa el punto de solidificación, ocurre a una temperatura de 51,9 °C, un valor menor en comparación con las dos parafinas anteriormente analizadas. Seguidamente se observa el siguiente punto de ruptura a una temperatura

próxima a los 51 °C, donde la viscosidad decrece hasta una temperatura cercana a los 48 °C y se incrementa nuevamente debido a la solidificación de la parafina.

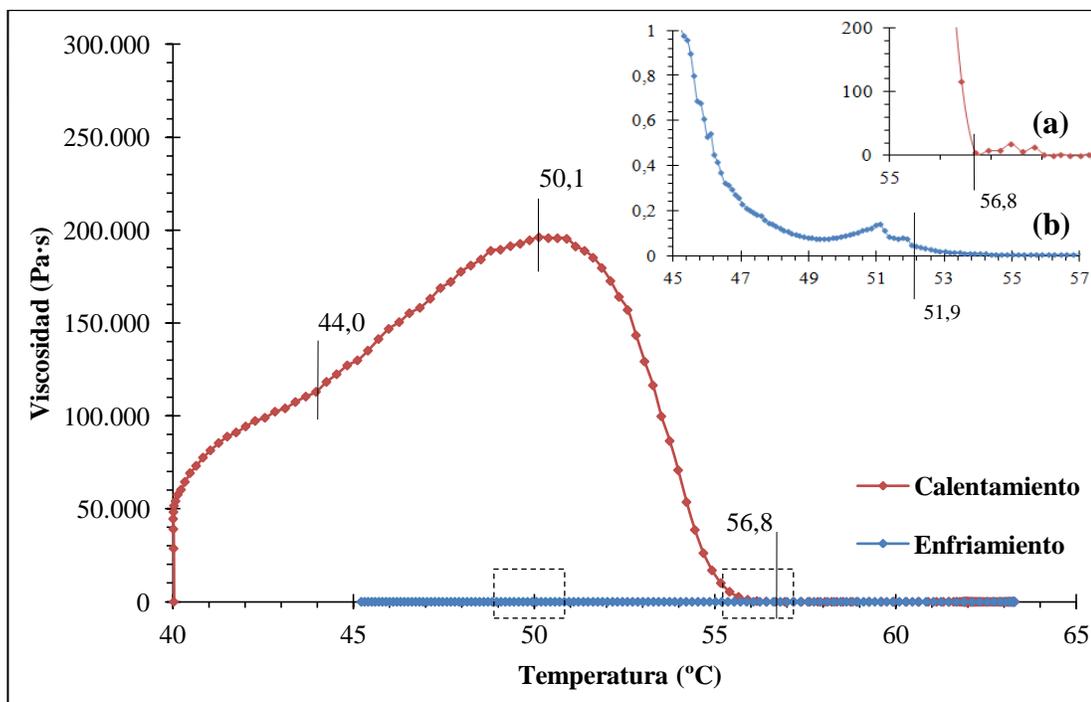


Fig. 17 - Curva de η vs. T correspondiente a la parafina Parabiotest: (a) Ampliación de la curva de calentamiento en la región de los 56 °C, (b) Ampliación de la curva de enfriamiento en la región de los 50 °C.

V.2.1.4.- Parafina HPS

La parafina de procedencia china presenta un comportamiento muy diferente a los observados con anterioridad, aunque las reacciones que ocurren durante el ensayo son similares. La Figura 18 corresponde a la gráfica obtenida del ensayo reológico de esta parafina, en la misma se pueden observar cinco diferentes segmentos bien definidos durante el calentamiento.

El primer segmento, comprendido entre 40-41,6 °C, corresponde a la fusión de las partículas de parafina de menor tamaño y de los hidrocarburos de menor peso molecular, temperatura a la cual se alcanza el valor máximo de viscosidad de 275.000 Pa·s. Seguidamente se tiene el segundo segmento entre 41,6-47,7 °C, en el cual la

viscosidad disminuye significativamente lo cual indica que la porción de material próxima a la superficie del sensor fundió rápidamente debido al incremento de temperatura. El proceso descrito continúa hasta los 47,7 °C, donde estos componentes que se encuentran en estado líquido comienzan a entremezclarse con los componentes de mayores pesos moleculares que aún permanecen en estado sólido, razón por la cual en el tercer segmento de la curva se forma una mezcla de consistencia pastosa y la viscosidad comienza a aumentar nuevamente debido a la adherencia del material a las superficies del sensor y de la base portamuestra como se ilustra la Figura 15c, sin embargo, ésta decrece finalmente en el penúltimo segmento de la curva (53,4-59,4 °C), hasta que todo el material se encuentra prácticamente en fase líquida, comportamiento que describe la curva entre los 59,4 y 64,2 °C.

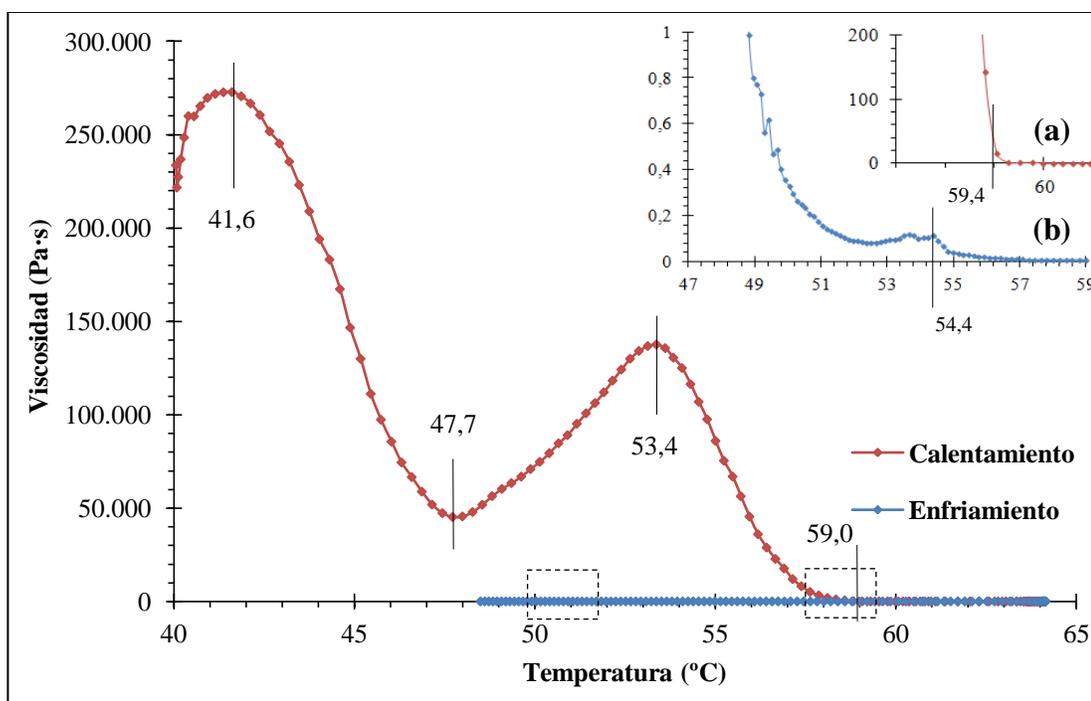


Fig. 18 - Curva de η vs. T correspondiente a la parafina HPS: (a) Ampliación de la curva de calentamiento en la región de los 60 °C, (b) Ampliación de la curva de enfriamiento en la región de los 55 °C.

Esta parafina presentó una temperatura de fusión 59,4 °C a la cual posee una viscosidad de 1,7 Pa·s, presentando un valor mínimo de viscosidad de $4,7 \cdot 10^{-3}$ Pa·s a

una temperatura de ensayo máxima de 64,2 °C. Por otra parte, en la curva de enfriamiento se observa un primer punto de ruptura a los 54,4 °C, temperatura correspondiente a su punto de solidificación. Hasta la temperatura de fusión esta parafina presenta valores más altos de viscosidad en comparación con las analizadas previamente, sin embargo, se observa que presenta valores de viscosidad inferiores a la referencia cuando se encuentra en su punto de fusión, menor aún al presentado por la Paraplast. Por otra parte, la desventaja de la misma yace en que funde a una temperatura un poco mayor de la parafina de referencia, no obstante, esto no excluye a esta parafina para ser seleccionada como materia prima para la elaboración del producto final, ya que posiblemente se pueda disminuir esta temperatura mediante el empleo de un aditivo.

V.2.1.5.- Parafina D-2395

Los resultados obtenidos del ensayo de viscosidad en función de la temperatura para la parafina de uso histológico D-2395 de procedencia mexicana, se muestran en la Figura 19. Se puede observar que esta parafina presenta un comportamiento bastante similar al presentado por la parafina HPS, sin embargo, aunque coinciden en el valor de su temperatura de fusión los valores obtenidos de viscosidad son muy diferentes. Al calentar, esta parafina presenta una viscosidad máxima de 200.000 Pa·s a una temperatura de 42,3 °C y una temperatura de fusión de 59,1 °C, a la cual la viscosidad es de 2,17 Pa·s, y a una temperatura máxima de ensayo de 63,9 °C la viscosidad se reduce a unos $5,5 \cdot 10^{-3}$ Pa·s. En la curva de enfriamiento se observa que la temperatura de solidificación es de 55,6 °C, evidenciándose un fuerte incremento de la viscosidad seguido de múltiples rupturas de la estructura de la parafina a medida que se solidifica debido al movimiento del sensor. Esta tendencia indica que en este material se promueve una fuerza de cohesión muy significativa entre las moléculas de los hidrocarburos que componen esta parafina, y por lo tanto presenta una menor tendencia a la fragilidad. Desde este punto de vista, estos resultados favorecen la aplicación de esta parafina en los ensayos histológicos, sin embargo, su elevada

temperatura de fusión puede afectar los tejidos muestra sometiéndolos a mayores cargas de caloríficas y posiblemente perjudicando sus posteriores diagnósticos.

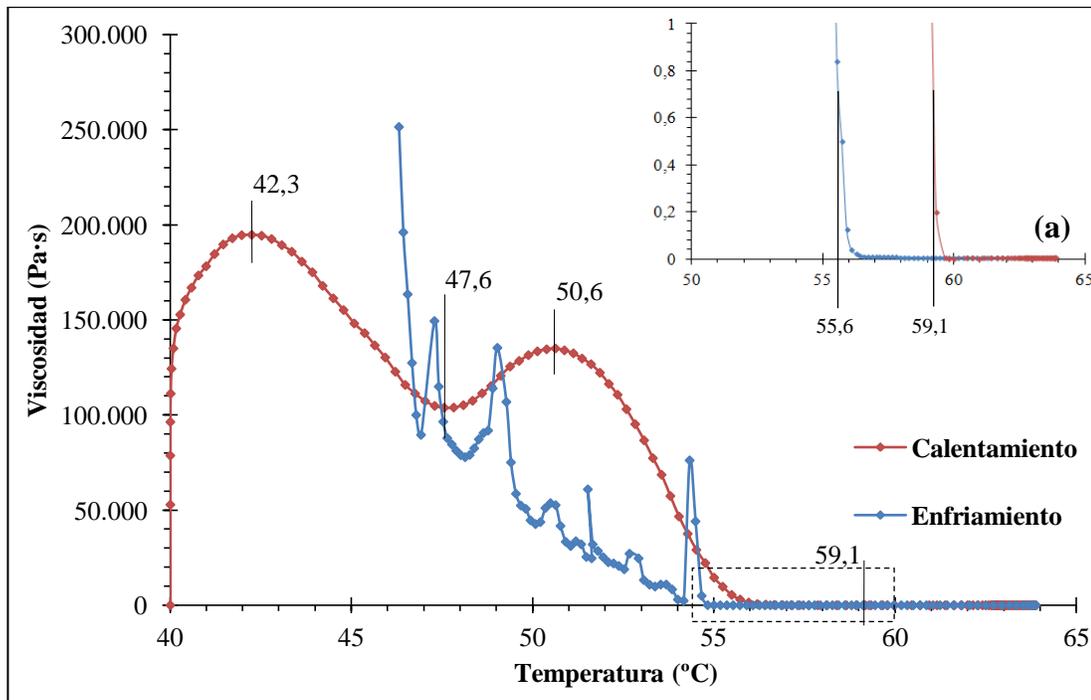


Fig. 19 - Curva de η vs. T correspondiente a la parafina D-2395: (a) Ampliación de la curva de calentamiento y enfriamiento en la región de los 60 y 55 °C respectivamente.

V.2.1.6.- Parafina para velas

En la Figura 20 se presenta la gráfica que muestra los resultados obtenidos del ensayo de viscosidad en función de la temperatura practicado a una parafina común, es decir, una parafina que no ha sido sometida a un proceso de refinación riguroso como las estudiadas anteriormente, y que comúnmente es empleada en la fabricación de velas.

Se nota claramente que durante el calentamiento esta parafina presenta el mismo comportamiento que la parafina de procedencia china y la mexicana D-2395. El primer segmento de la curva de calentamiento muestra que la mayor viscosidad que presenta esta parafina es a una temperatura de 42,2 °C con un valor aproximado de 190.000 Pa·s. Seguidamente, en el segundo segmento se observa como la viscosidad

desciende significativamente hasta una temperatura de 47,9 °C debido al efecto del incremento de la temperatura sobre el sistema sólido/líquido que permite la fusión de los hidrocarburos livianos. Luego, la mezcla de consistencia pastosa formada por los hidrocarburos ya fundidos junto con el aceite contenido en la parafina y los otros componentes próximos a fundir incrementan nuevamente la viscosidad, lo que corresponde a la etapa comprendida entre 47,9 y 53,1 °C, hasta que la proporción líquida en la muestra supera significativamente la proporción de sólidos (53,1-59,2 °C). Finalmente, la parafina alcanza su temperatura de fusión de 59,2 °C con un valor de viscosidad de 7,9 Pa·s, mientras que a la máxima temperatura en el ensayo (63,9 °C) se tiene una viscosidad de $4,6 \cdot 10^{-3}$ Pa·s.

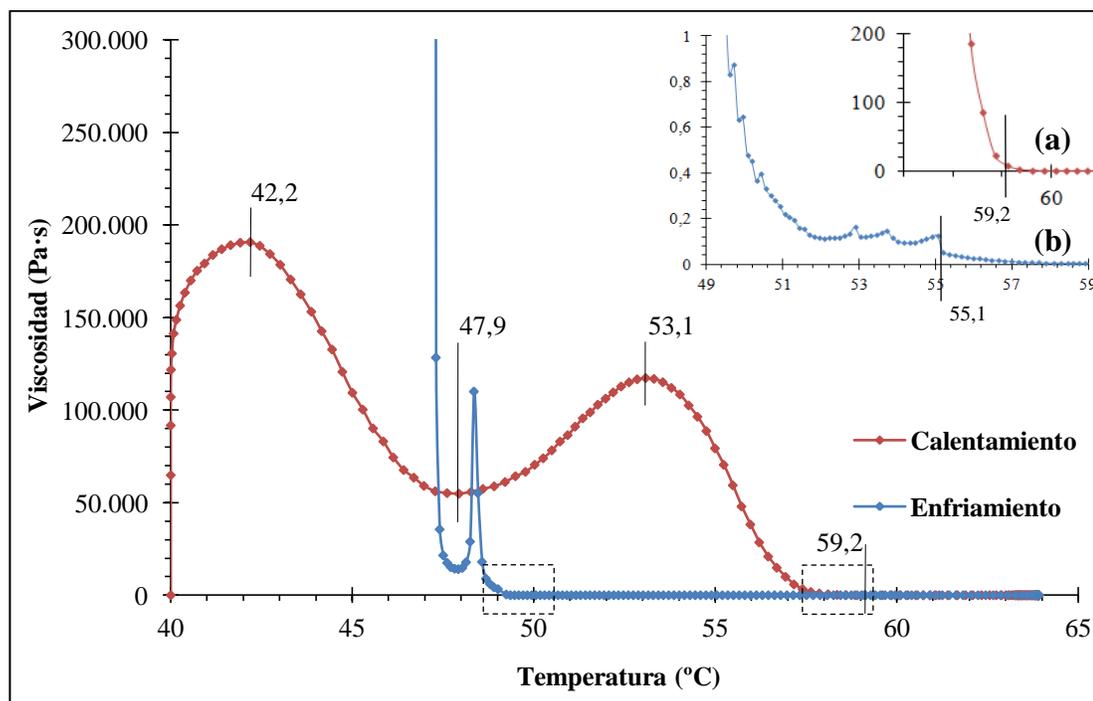


Fig. 20 - Curva de η vs. T correspondiente a la parafina para velas: (a) Ampliación de la curva de calentamiento en la región de los 60 °C, (b) Ampliación de la curva de enfriamiento en la región de los 55 °C.

Esta parafina presenta un punto de congelación a los 55,1 °C, el cual puede observarse en el primer punto de ruptura en la curva de enfriamiento, donde las

estrechas zonas de relativa estabilidad y consecutivos rompimientos en la estructura de la parafina indican la rapidez de solidificación que posee la misma. Indudablemente que debido al bajo grado de refinación que posee esta parafina y a su elevado contenido de aceite, la misma no se considera como materia prima para la elaboración del producto final que se desea obtener en esta investigación.

V.2.1.7.- Parafina Microcristalina

En la gráfica que se muestra en la Figura 21 se observa el comportamiento de una parafina de tipo microcristalina. Los resultados obtenidos permiten apreciar claramente las diferencias de ésta parafina con las analizadas previamente. Este material presenta una viscosidad máxima superior a los 5.000.000 Pa·s a una temperatura de 44 °C, una temperatura de fusión de 75 °C y una viscosidad de 7 Pa·s a dicha temperatura, y de $9 \cdot 10^{-3}$ Pa·s a la temperatura máxima de ensayo de 80,1°C, mostrando un punto de congelación a los 67,8 °C.

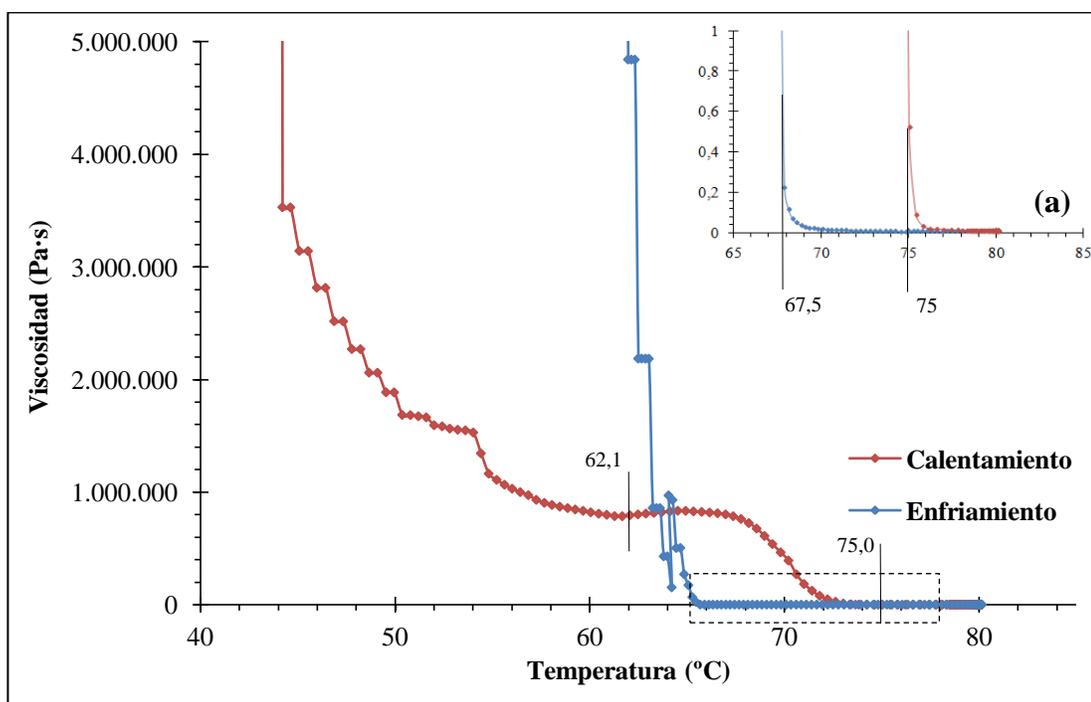


Fig. 21 - Curva de η vs. T correspondiente a la parafina Microcristalina: (a) Ampliación de la curva de calentamiento y enfriamiento en la región de los 75 y 67 °C respectivamente.

Estas características influyen negativamente en su aplicación para los ensayos histológicos, ya que una mayor temperatura de fusión implica someter a la muestra de tejido a mayores temperaturas, lo que acelera el proceso de degradación del mismo. Por otra parte, mientras mayor sea la viscosidad del medio de inclusión menor será la capacidad de éste para infiltrarse en el tejido, obteniendo como resultado una inclusión deficiente, lo que produce mayores dificultades al realizar cortes limpios y rápidos (Univ. de Vigo, 2011).

También se observa, que a diferencia de la mayoría de las otras parafinas analizadas, la curva de enfriamiento en esta parafina continúa ascendiendo a medida que transcurre el enfriamiento a pesar del movimiento del sensor, esto debido a que la fuerza intermolecular entre los compuestos de esta parafina es mayor a la experimentada por las otras estudiadas, consecuentemente esto se traduce en una parafina más consistente y menos frágil, sugiriendo una alta pureza y una escasa presencia de aceites, características importantes en las mezclas parafínicas para inclusión de tejidos, lo cual permite considerarla como posible material para los fines de este trabajo.

V.2.1.8.- Parafina GLP-5

La gráfica que describe el comportamiento del ensayo de viscosidad en función de la temperatura practicado a la parafina de procedencia mexicana GLP-5 se muestra en la Figura 22. Se puede observar que el resultado obtenido presenta una tendencia similar mostrada por las parafinas HPS y Microcristalina, por lo tanto las causas dicho comportamiento son análogas a las de estas parafinas. Sin embargo, los altos valores de viscosidad observados probablemente se deban a la presencia de parafina microcristalina. En este caso, la temperatura de fusión es de 59,5 °C, a la cual la viscosidad alcanza un valor de 11,7 Pa·s. El valor máximo de viscosidad se encuentra alrededor de los 580.000 Pa·s a una temperatura de 41,3 °C, y un valor mínimo de $4,5 \cdot 10^{-3}$ Pa·s para un temperatura máxima de ensayo de 64 °C, con un punto de congelación de 55,8 °C.

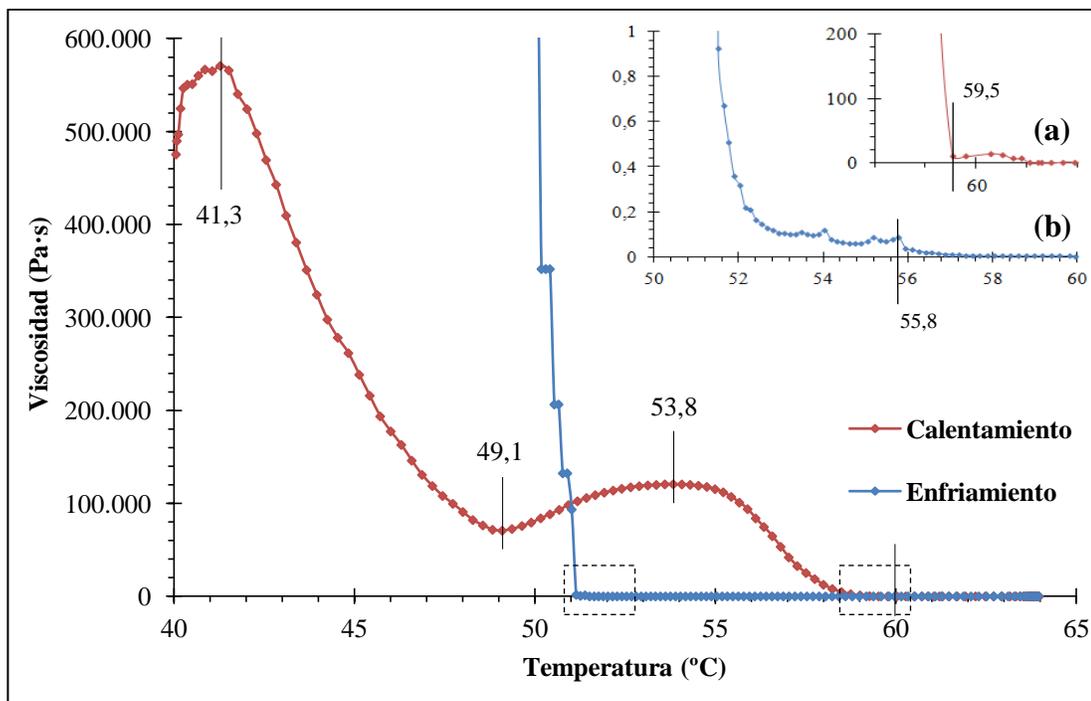


Fig. 22 - Curva de η vs. T correspondiente a la parafina GLP-5: (a) Ampliación de la curva de calentamiento en la región de los 60 °C, (b) Ampliación de la curva de enfriamiento en la región de los 55 °C.

Estos resultados se desvían significativamente de los obtenidos para el material de referencia, por lo tanto, este material no presenta características adecuadas como materia prima para ser empleada en la elaboración del producto que se quiere obtener en la presente investigación.

V.2.1.9.- Parafina Histowax

La gráfica de la Figura 23 describe el comportamiento que presenta la parafina Histowax de procedencia mexicana. Esta parafina también es empleada en el campo de la histología como medio de inclusión. En la misma se pueden notar dos características resaltantes, como lo son la alta viscosidad y el alto punto de fusión que presenta esta parafina, lo cual indica que probablemente haya sido formulada con una elevada proporción de parafina microcristalina. Se observa como los valores de viscosidad exceden los 1.000.000 Pa·s para una temperatura de 44,3 °C, y alcanza su punto de fusión a los 63,5 °C a la cual presenta una viscosidad de 64,2 Pa·s, y de

$45,5 \cdot 10^{-2}$ Pa·s cuando se encuentra a una temperatura máxima de ensayo de $65,1$ °C. Durante el enfriamiento se observa que presenta un punto de congelación de 56 °C, donde el rápido incremento de la viscosidad es significativo, y sugiere una fuerte cohesión y por tanto compactación, entre las moléculas de sus constituyentes al solidificar.

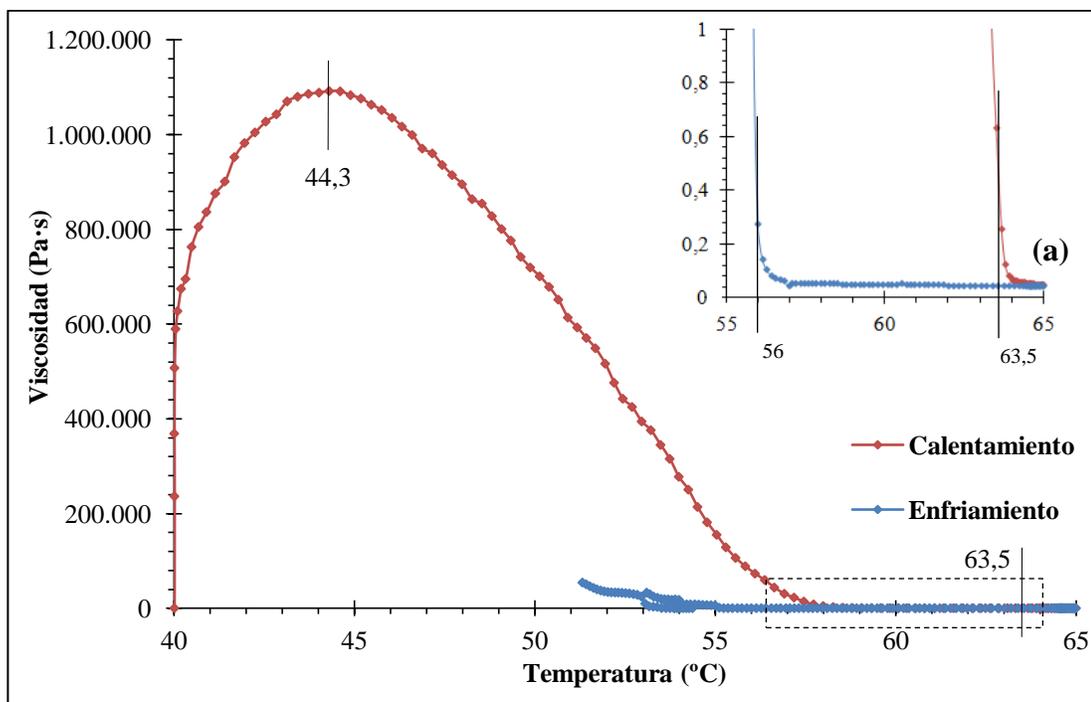


Fig. 23 - Curva de η vs. T correspondiente a la parafina Histowax: (a) Ampliación de la curva de calentamiento en la región de los 65 °C, (b) Ampliación de la curva de enfriamiento en la región de los 55 °C.

Debido a la diferencia significativa que presentan los valores de viscosidad y temperatura de fusión en comparación con la parafina Paraplast, no se tomará como material de referencia a pesar de ser empleada como medio de inclusión, así como tampoco se considerará inicialmente al momento de elaborar el producto final que se desea obtener en el presente trabajo.

Finalmente, y con fines comparativos, en la Figura 24 se muestran las gráficas correspondientes a todas las parafinas analizadas. De esta manera, se puede observar

con mayor facilidad la diferencia de comportamiento que presenta cada una, principalmente respecto a sus viscosidades y puntos de fusión.

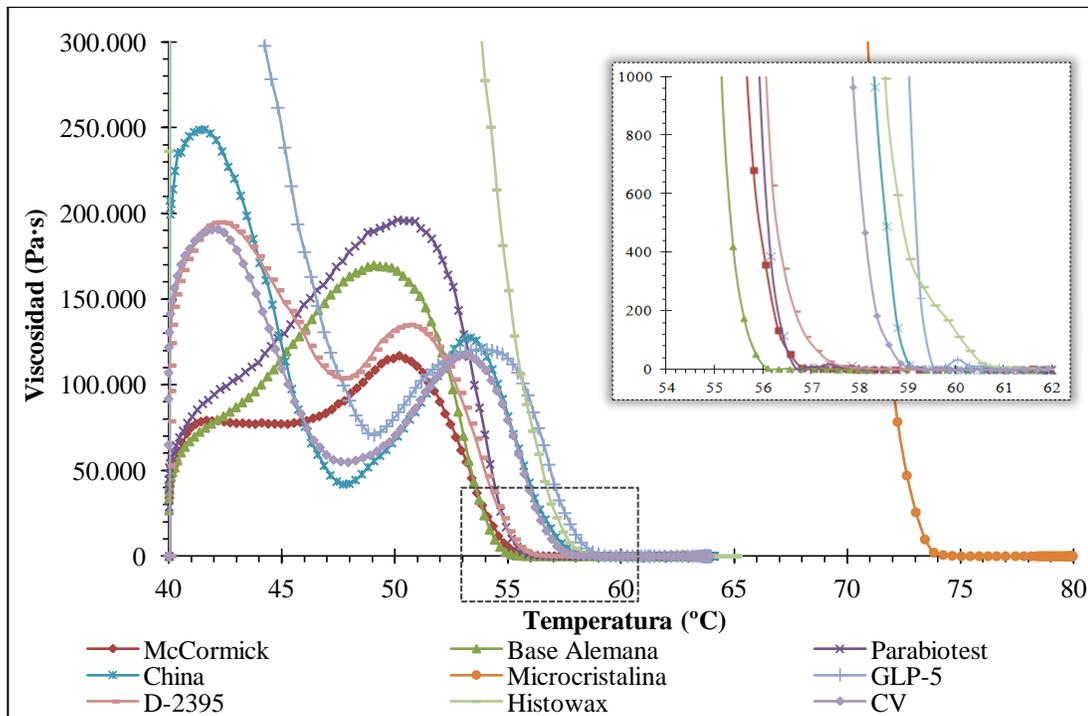


Fig. 24 - Curvas de η vs. T de todas las parafinas estudiadas. Nótese que la parafina microcristalina no se encuentra dentro de la región ampliada de la gráfica debido a la elevada temperatura de fusión que presentó mediante esta técnica.

De manera resumida, en la Tabla 5 se muestran las temperaturas de fusión, solidificación y la diferencia entre éstas, así como las temperaturas experimentales máximas de ensayo. La diferencia entre las temperaturas de fusión y solidificación es de considerable importancia, ya que aporta información acerca de los parámetros de trabajo y control de temperatura que se deben establecer al momento de diseñar el mecanismo que permitirá obtener los pellets de la parafina a elaborar. En la Tabla 5 también se puede observar que, a excepción de la parafina microcristalina, la temperatura máxima de ensayo no excede los 65 °C, ya que en la práctica diaria de los ensayos histológicos no se debe superar esta temperatura, protegiendo de esta manera los tejidos de calor excesivo.

Tabla 5 - Temperaturas de fusión, solidificación y máximas de ensayo de las parafinas estudiadas por medio de AR.

| Parafina | T_f (°C) | T_s (°C) | (T_f-T_s) (°C) | T_{máx. ens.} (°C) |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|---|-----------------------------------|
| <i>Paraplast</i> | 56,8 | 52,8 | 4,0 | 63,5 |
| <i>Base alemana</i> | 56,2 | 52,9 | 3,3 | 63,4 |
| <i>Parabiotest</i> | 56,8 | 51,9 | 4,9 | 63,3 |
| <i>HPS</i> | 59,4 | 54,4 | 4,6 | 64,1 |
| <i>D-2395</i> | 59,1 | 55,6 | 3,5 | 63,9 |
| <i>Parafina Vela</i> | 59,2 | 55,1 | 4,1 | 63,9 |
| <i>Microcristalina</i> | 75,0 | 67,8 | 7,2 | 80,1 |
| <i>GLP-5</i> | 59,5 | 55,8 | 3,7 | 63,9 |
| <i>Histowax</i> | 63,5 | 56,0 | 7,5 | 65,1 |

En la Tabla 6 se muestran de manera concisa los valores de las viscosidades que presentaron las parafinas durante los ensayos reológicos. Valores muy altos de viscosidad afectan negativamente el proceso de embutición del tejido, ya que menor será la capacidad o facilidad que tendrá la parafina de poder difundir en el mismo, por lo tanto, es necesario tomar en cuenta los valores que presentan estas parafinas al momento de elaborar el producto deseado.

Tabla 6 - Viscosidades a diferentes temperaturas de las parafinas estudiadas.

| Parafina | Viscosidad máxima aprox. (Pa·s) | Viscosidad a T_f (Pa·s) | Visc. a T_{máx} ensayo (Pa·s) |
|------------------------|--|--|--|
| <i>Paraplast</i> | 120.000 | 2,7 | 0,0050 |
| <i>Base alemana</i> | 170.000 | 3,4 | 0,0047 |
| <i>Parabiotest</i> | 200.000 | 5,9 | 0,0038 |
| <i>HPS</i> | 275.000 | 1,7 | 0,0047 |
| <i>D-2395</i> | 195.000 | 1,6 | 0,0055 |
| <i>Parafina Vela</i> | 190.000 | 4,9 | 0,0046 |
| <i>Microcristalina</i> | +5.000.000 | 7,2 | 0,0087 |
| <i>GLP-5</i> | 570.000 | 13,6 | 0,0045 |
| <i>Histowax</i> | 1.090.000 | 64,2 | 0,0455 |

V.2.2.- Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido

En esta sección se presentan los termogramas obtenidos de los ensayos por calorimetría diferencial de barrido practicados a cada muestra de parafinas según las condiciones indicadas en la metodología experimental.

V.2.2.1.- Parafina Paraplast

La Figura 25 corresponde al termograma obtenido del análisis por calorimetría diferencial de barrido realizado a la parafina Paraplast. En el mismo se pueden observar cuatro curvas, las cuales corresponden a los dos ciclos continuos de calentamiento-enfriamiento.

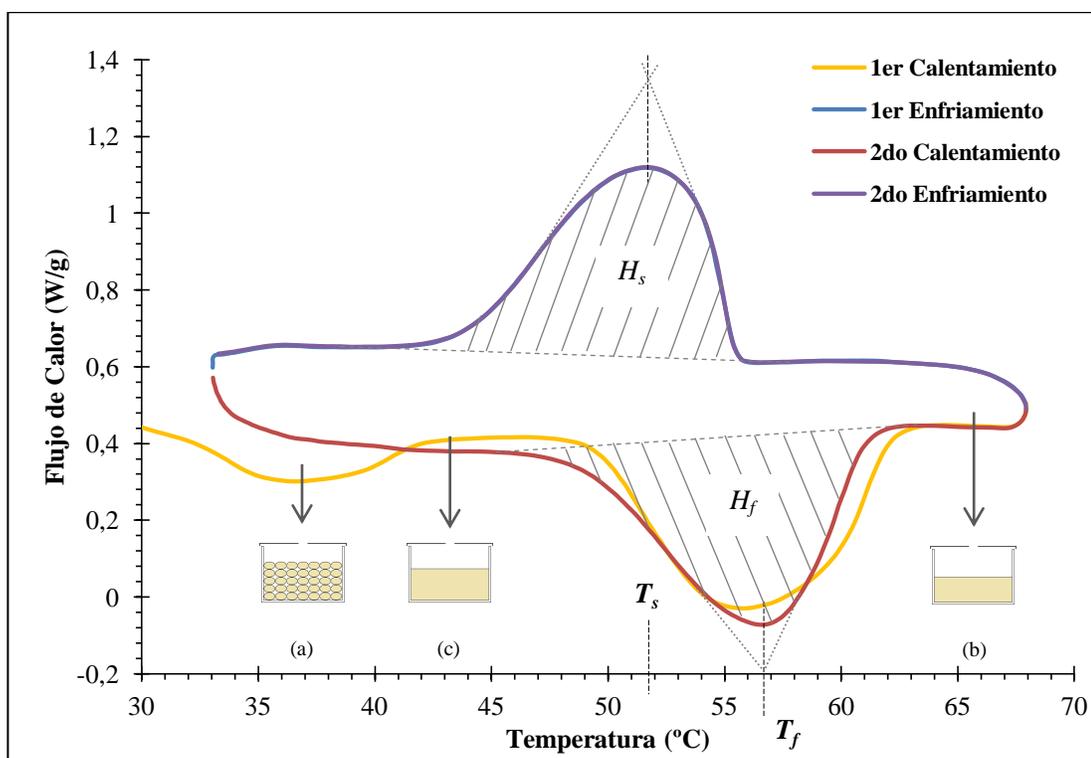


Fig. 25 - DSC de la parafina Paraplast: (a) Volumen y área de contacto de la muestra de parafina/crisol (partículas sólidas compactadas) durante el primer calentamiento, (b) Volumen y área de contacto de la muestra de parafina fundida/crisol, (c) Volumen y área de contacto de la muestra de parafina sólida/crisol durante el segundo calentamiento.

En ensayos de DSC/ATG la muestra es colocada en pequeños crisoles. Para obtener una curva aceptable, es decir, con picos bien definidos, es necesario que el área de transferencia de calor entre el crisol y la muestra sea óptima, lo cual ocurre cuando la muestra se encuentra en contacto con toda la superficie del crisol, condición que se cumple para muestras líquidas, ya que los líquidos siempre adoptan la forma del volumen del recipiente que los contiene y por ende no existen espacios vacíos entre la muestra y el crisol; sin embargo, en muestras sólidas esto no siempre es posible. Dependiendo de la muestra, a veces es necesario compactar la misma en el crisol para obtener la mayor superficie de contacto posible, empleando para ello un instrumento similar a un pilón.

En la Figura 26 se presenta un esquema que simula un corte longitudinal de un crisol con una carga de parafina, donde las partículas han sido compactadas antes de comenzar el ensayo.

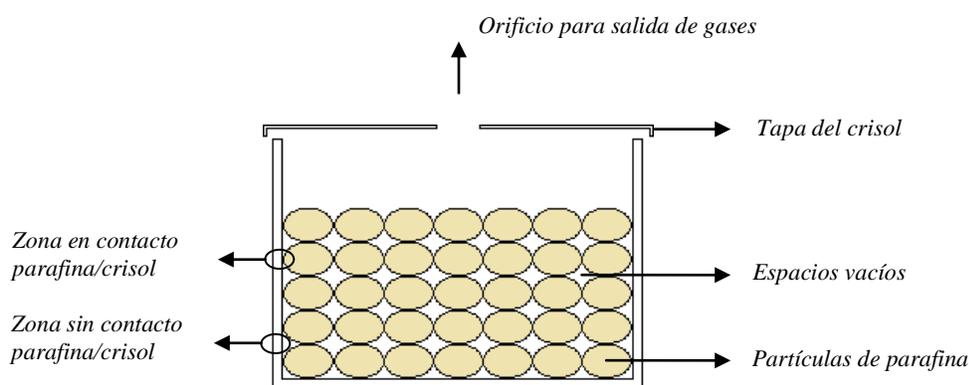


Fig. 26 - Crisol/portamuestra de un ensayo de DSC/ATG con carga de parafina sólida compactada.

Como en la muestra no todas las partículas de parafina sólida poseen el mismo tamaño, a medida que se incrementa la temperatura las más pequeñas se funden primero, generándose una mezcla sólido-líquido-aire; la condición descrita explica la razón de la forma de la curva del primer calentamiento y específicamente del pico endotérmico entre los 30-44 °C. Sin embargo, en la curva correspondiente al segundo

calentamiento no se observa la absorción de calor en el intervalo de temperatura señalado, también se puede observar que el pico de mayor tamaño posee una mayor definición que el obtenido en el primer calentamiento. Ambos comportamientos son consecuencia de las diferencias de áreas de contacto entre el crisol y la muestra en cada ciclo. Dependiendo del tipo de material de la muestra, al compactarla pueden quedar espacios vacíos entre las partículas de la misma y el crisol, donde el aire contenido en ellos actúa como aislante, impidiendo una efectiva transferencia de calor y afectando negativamente la lectura de datos del equipo. Una vez que la parafina se encuentra en estado líquido, el aire se separa y sale de la muestra fundida y los espacios vacíos desaparecen, así, el material entra en contacto íntimo con toda la superficie del crisol y el área de transferencia de calor se vuelve máxima y efectiva, razón por la cual las curvas de calentamiento después de los 63 °C, al igual que las curvas de enfriamiento, presentan una mayor definición y se superponen.

Esta situación se representa en la Figura 27, en la cual se ilustra la forma como se supone que la parafina fundida ocupa todos los espacios y está en contacto directo con la superficie del crisol y en toda su extensión.

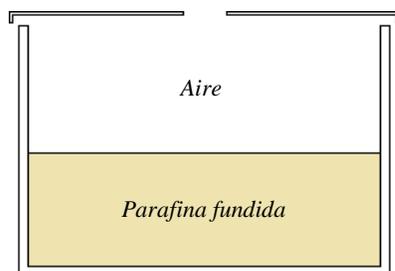


Fig. 27 - Crisol/portamuestra de un ensayo de DSC/ATG con carga de parafina sin espacios vacíos.

Es debido a esta condición que la curva de calentamiento correspondiente al segundo ciclo es más definida y uniforme que la primera. En consecuencia, el pico entre 30-45 °C no aparece, y el pico de mayor tamaño ahora se encuentra más definido.

Por otra parte, por medio de estos ensayos también se pueden determinar otras dos propiedades físicas importantes como lo son las temperaturas y entalpías de fusión y solidificación. El valor de estos parámetros se puede obtener manualmente mediante el método tangencial, donde el punto de corte corresponde a la temperatura de fusión/solidificación, y por aproximación de área para calcular el área bajo la curva del pico que determina los valores de las respectivas entalpías, como se ilustra en la Figura 25, o bien mediante el software del equipo, utilizado en este caso.

Consecuentemente, si los cálculos de entalpía y punto de fusión se realizan en base a la curva del primer calentamiento la temperatura de fusión resultaría 54 °C con una entalpía de 0,13 kJ/kg·K, mientras que realizando los cálculos en base a la segunda curva de calentamiento (la que se encuentra más definida), se obtiene que la entalpía de fusión de la parafina es de 0,48 kJ/kg·K, y la temperatura de fusión resulta 56,6 °C, valor que coincide con la obtenida en el ensayo de viscosidad en función de la temperatura, observándose una diferencia de 0,02 °C con una desviación del 0,36 % aproximadamente entre ambas técnicas, la cual es consecuencia de la diferencia de área de contacto entre el portamuestra y el material. De igual manera, se obtuvo que la temperatura de congelación de esta parafina resultó de 51,8 °C, valor similar al obtenido mediante el ensayo reológico (52,8 °C), observándose una diferencia de 1 °C con una desviación próxima al 2 %. Así, se puede precisar que el comportamiento térmico de la parafina debe ser analizado a partir de la curva correspondiente al segundo ciclo, lo que constituye otra razón por la cual deben realizarse dos ciclos continuos de calentamiento-enfriamiento.

V.2.2.2.- Parafina base alemana

El termograma obtenido como resultado del ensayo de DSC realizado a la parafina base alemana se muestra en la Figura 28. En la misma, al igual que en la parafina Paraplast, también se observan cuatro curvas, dos inferiores y dos superiores que describen el comportamiento endotérmico al calentar, y exotérmico al enfriar. En la gráfica se observa que la curva inferior correspondiente al segundo calentamiento

muestra un pico muy prominente entre los 45-62 °C, alcanzando una entalpía de fusión de 0,16 kJ/kg·K y una temperatura de fusión de 56,7 °C, mientras que al enfriar la temperatura de solidificación es de 52 °C. Los valores de temperatura de fusión y solidificación resultan muy similares a los obtenidos para la parafina Paraplast, sin embargo, posee un valor de entalpía significativamente inferior. Estas diferencias resultan una ventaja al momento de elaborar el producto final, ya que mientras menor sea el calor específico menor será el calor a suministrar al material para cambiar de estado (Incropera, 1999).

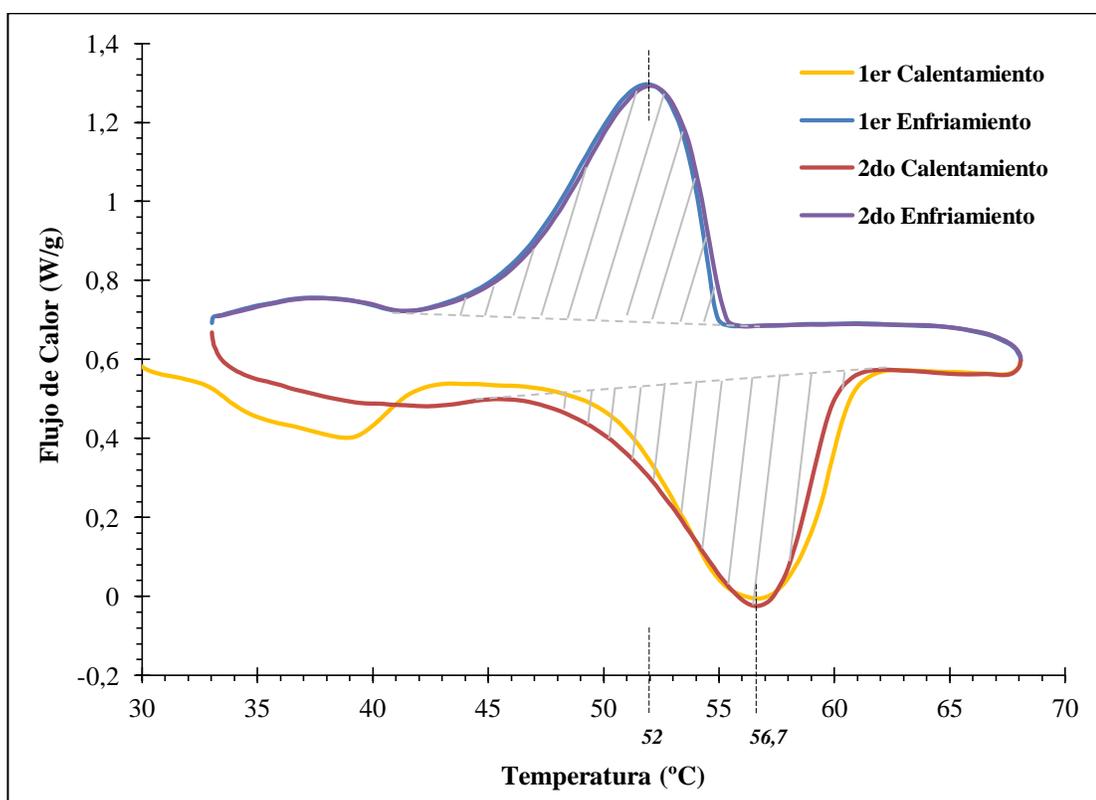


Fig. 28 - DSC de la parafina base alemana.

Por otra parte, se observa que dichos picos se encuentran más definidos que los de la parafina Paraplast, lo cual sugiere que se encuentra compuesta en mayor proporción por hidrocarburos C26, según la Tabla 1. En el DSC obtenido para esta parafina base, se puede observar que existe un leve seno en la curva de calentamiento en el intervalo

de 33-44 °C. En principio, esto es el resultado de la fusión de hidrocarburos menores que presentan bajos punto de fusión. De igual manera se observa una convexidad en el mismo intervalo en la curva de enfriamiento, lo cual corresponde a la solidificación de dichos grupos de hidrocarburos.

V.2.2.3.- Parafina Parabiotest

La parafina de producción nacional presenta un comportamiento similar a las parafinas Paraplast y Base alemana, como se puede observar en la Figura 29. El pico más pronunciado al calentar se observa entre los 47 y 63 °C, presentando un máximo a los 56,8 °C, valor que corresponde a la temperatura de fusión, con un valor de entalpía de 1,14 kJ/kg·K. Al enfriar se nota un pico exotérmico entre 55 y 42 °C, presentando un máximo a los 51,4 °C el cual corresponde a la temperatura de solidificación.

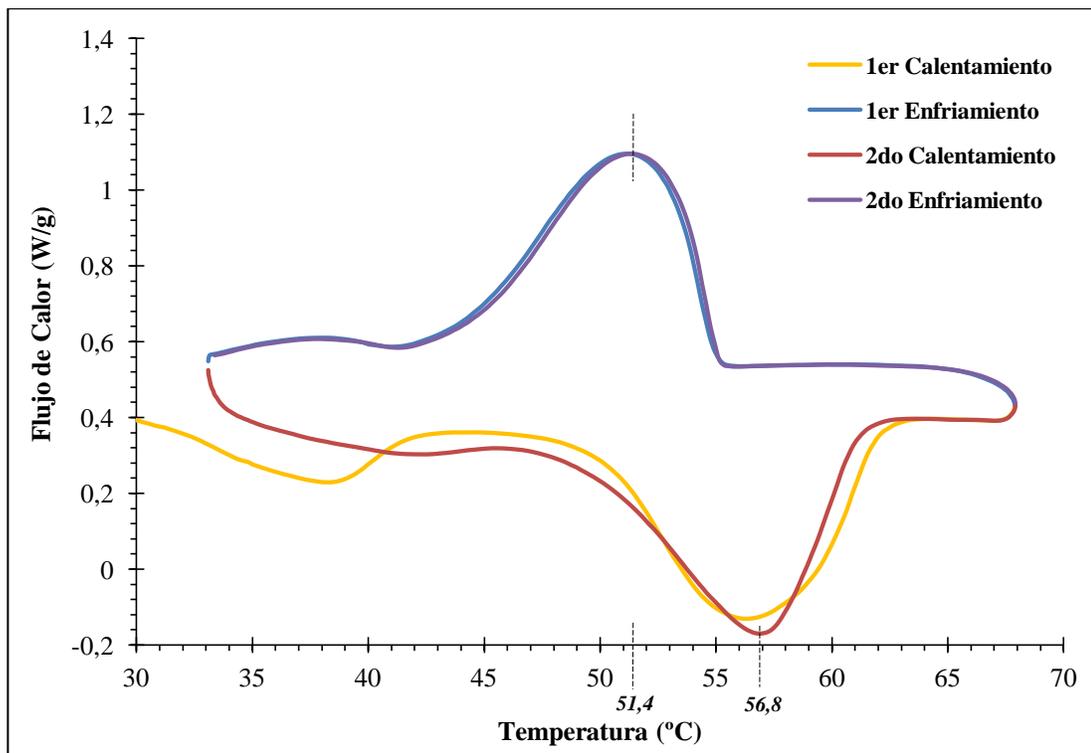


Fig. 29 - DSC de la parafina Parabiotest.

En esta gráfica se puede observar una leve depresión en la curva entre los 35-46 °C, lo cual indica la fusión de posibles hidrocarburos de menor peso molecular, es decir, hidrocarburos más livianos (entre C₁₉ y C₂₂) que forman parte de la parafina, ocurriendo lo contrario durante el enfriamiento en el mismo intervalo de temperatura, esto debido a la fusión y solidificación de los hidrocarburos más livianos que forman parte de la parafina. Vale destacar que si bien los diferentes parámetros presentan valores próximos a la Paraplast, sus características y comportamiento para embutición distan de la referencia, según opinan los histotecnólogos.

V.2.2.4.- Parafina HPS

El resultado obtenido del ensayo de DSC para la parafina de procedencia china, puede observarse en la Figura 30.

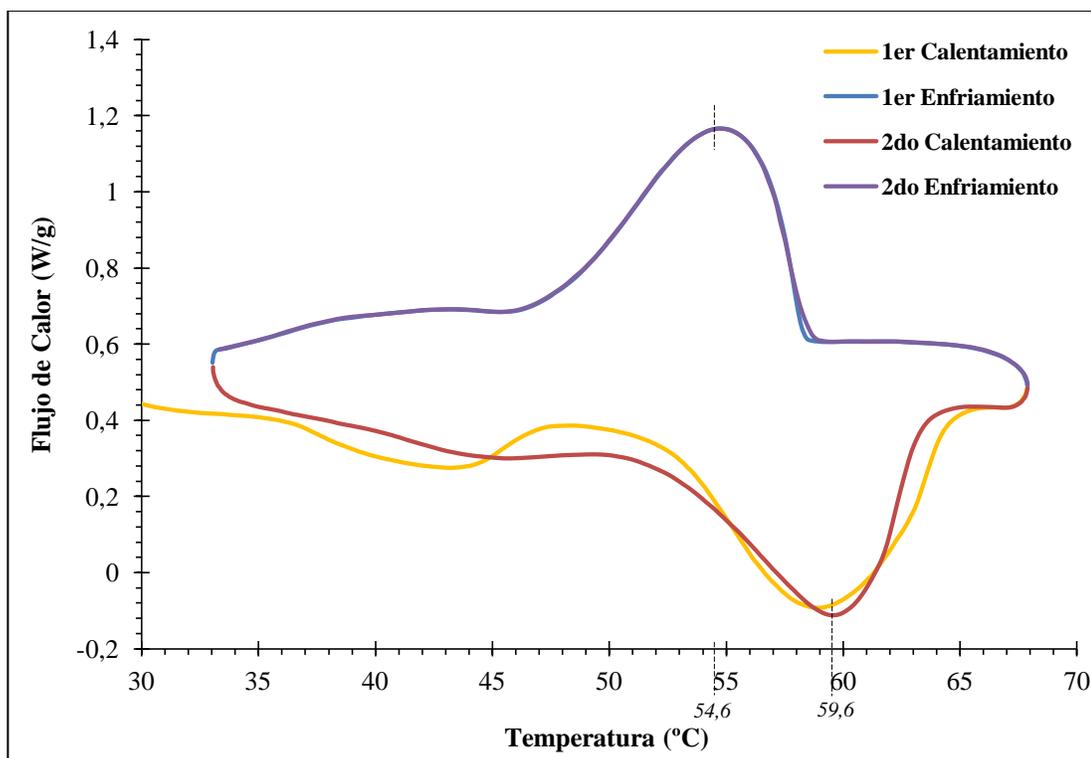


Fig. 30 - DSC de la parafina HPS.

Al igual que la parafina base alemana y la Parabiotest, se observa la fusión de hidrocarburos más livianos, lo cual se evidencia con el leve cambio de pendiente previo al pico endotérmico principal, es decir, entre los 35-46 °C, reflejándose lo contrario en la curva de enfriamiento en el mismo intervalo de temperatura cuando éstos solidifican. Los resultados obtenidos indican que esta parafina posee una temperatura de fusión de 59,6 °C, con un valor de entalpía de fusión de 0,76 kJ/kg·K, y una temperatura de solidificación de 54,6 °C. Debido a su mayor punto de fusión, esta parafina no se considera adecuada para la elaboración del producto principal.

V.2.2.5.- Parafina D-2395

El comportamiento que presenta esta parafina se puede observar en la gráfica mostrada en la Figura 31. Similar a la Parabiotest y Base alemana, en esta parafina existe la presencia de hidrocarburos livianos, los cuales funden y solidifican en el intervalo de 35-46 °C y 42-35 °C respectivamente.

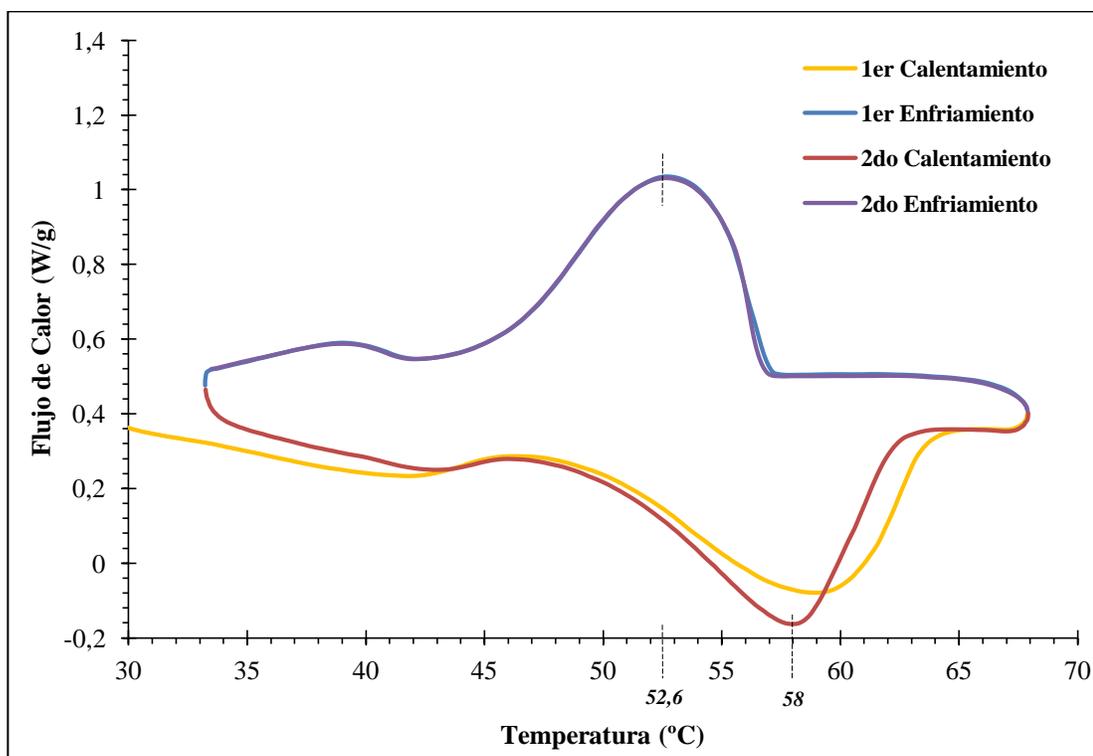


Fig. 31 - DSC de la parafina D-2395.

La entalpía de fusión es de 1,09 kJ/kg·K, mientras que la temperatura de fusión es de 58 °C y la temperatura de solidificación de 52,6 °C. Si bien estos valores se desvían un poco de los determinados para la Paraplast, no impiden su selección para los fines que se persiguen en este trabajo, ya que se encuentran dentro del rango permisible por las normas en aplicaciones patológicas.

V.2.2.6.- Parafina para Velas

En la gráfica de la Figura 32 se puede observar el resultado obtenido del DSC de una parafina típica empleada comúnmente para la fabricación de velas. Esta parafina presenta una entalpía de fusión de 0,27 kJ/kg·K, un valor bastante bajo en comparación con las demás parafinas anteriormente analizadas, una temperatura de fusión de 59,8 °C y un punto de congelación de 55 °C.

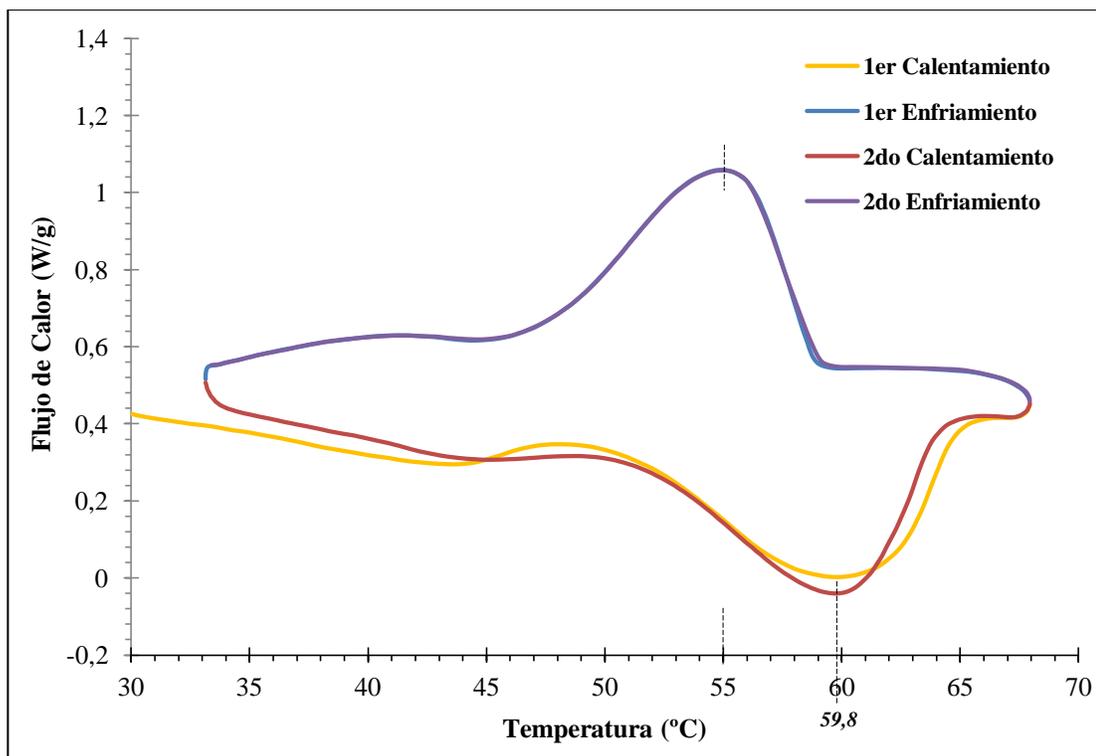


Fig. 32 - DSC de la parafina para velas.

De igual manera, y similar a las otras parafinas estudiadas, se observa un leve cambio de pendiente en los intervalos de 36-48 °C para el calentamiento y 45-35 °C para el enfriamiento, lo cual en principio es producto de la fusión y solidificación de pequeños grupos de hidrocarburos de bajo peso molecular que cambian de estado en estos intervalos de temperatura, generalmente compuestos que van desde C₁₉ hasta C₂₃.

V.2.2.7.- Parafina Microcristalina

En la Figura 33 se muestra el resultado del DSC de la parafina microcristalina. Al igual que en los ensayos reológicos, esta parafina presenta un comportamiento muy diferente a las parafinas anteriormente analizadas, con una temperatura de fusión de 61,7 °C y un valor de entalpía de fusión de 2,58 kJ/kg·K, mostrando un punto de congelación a los 58,3 °C.

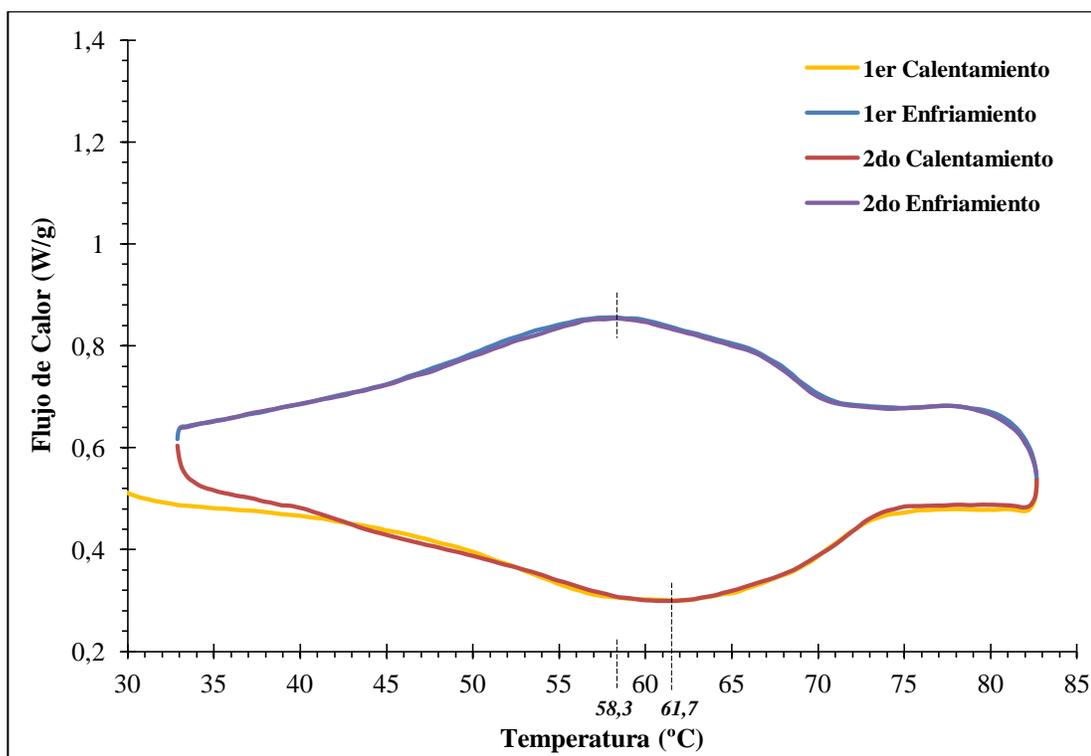


Fig. 33 - DSC de la parafina Microcristalina.

La constante variación de la pendiente a medida que se inicia el ensayo muestra que la parafina se está fundiendo constante y uniformemente a medida que transcurre el calentamiento, lo cual a su vez indica que está constituida por una mezcla homogénea de hidrocarburos, entre C_{18} y C_{28} principalmente. Por otra parte, se observa que las curvas correspondientes al primer y segundo calentamiento se encuentran solapadas, esta característica está asociada con el alto grado de penetración que presenta esta parafina, lo que se puede corroborar en la Tabla 4. La penetración con aguja es una técnica empleada para medir esta cualidad, ya que ésta puede tener un efecto significativo sobre las otras propiedades físicas del material. El valor que presenta la parafina Microcristalina sugiere una mayor maleabilidad y por ende facilita la compactación del material en el crisol, eliminando los espacios vacíos y obteniendo una mayor superficie de contacto.

V.2.2.8.- Parafina GLP-5

En la Figura 34 se muestra el DSC obtenido de la parafina GLP-5. Claramente se observan dos picos bien definidos, tanto en el calentamiento como en el enfriamiento. Durante el calentamiento se observa un primer pico ubicado entre los 35-48 °C, este refleja la presencia de hidrocarburos livianos que funden en este intervalo de temperatura, principalmente hidrocarburos del tipo C_{21-22} , mostrando un máximo a los 43,3 °C que corresponde a la temperatura de fusión y una entalpía de fusión de 0,23 kJ/kg·K. El segundo pico representa la fusión de los hidrocarburos más pesados, mayormente hidrocarburos C_{27} según la Tabla 1, con una entalpía de fusión de 4,83 kJ/kg·K y una temperatura de fusión de 59,5 °C. Seguidamente, en la curva de enfriamiento se observan los dos picos exotérmicos correspondientes a la solidificación de estos grupos de hidrocarburos, mostrando el punto de congelación a una temperatura de 54,5 °C y 39,8 °C. Debido a su elevada entalpía y temperatura de fusión, esta parafina no presenta características adecuadas para ser considerada como posible materia prima para la elaboración del producto final, ya que se tiene a disposición otras parafinas que presentan valores de entalpía y temperaturas de fusión más adecuados.

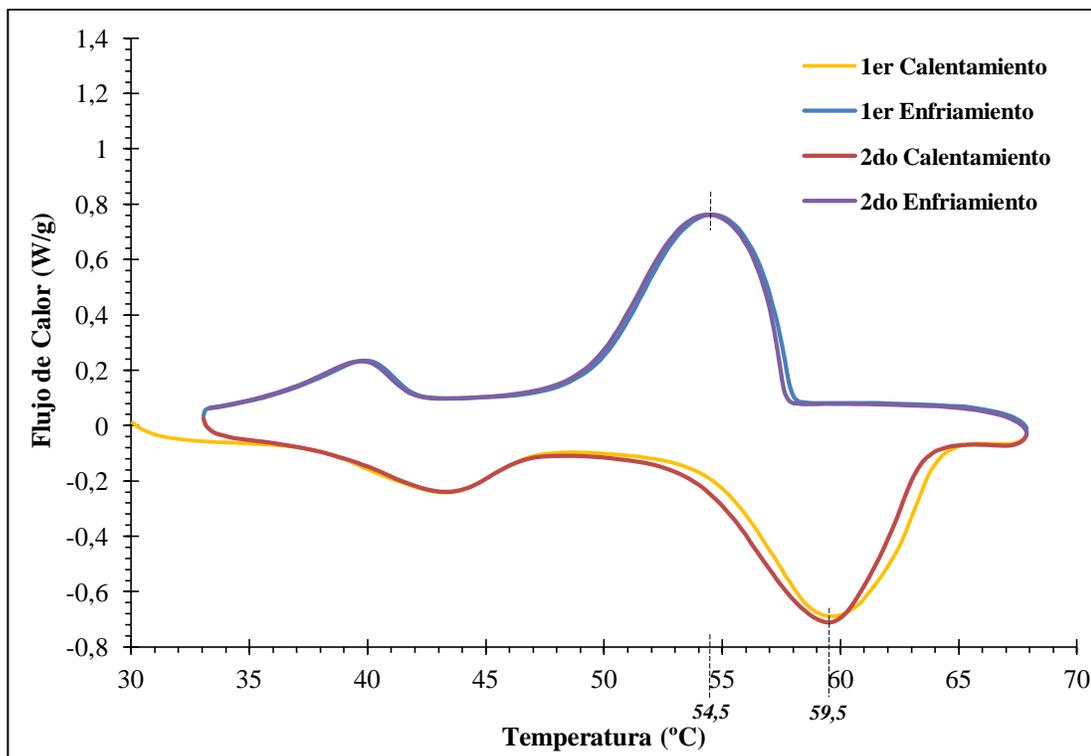


Fig. 34 - DSC de la parafina GLP-5.

V.2.2.9.- Parafina Histowax

El resultado obtenido del DSC realizado a la parafina de uso histológico Histowax, se puede observar en la Figura 35. La irregular curva que describe el comportamiento de esta parafina indica que posiblemente esté compuesta por una mezcla de varios tipos de parafinas, también se observa claramente la presencia de hidrocarburos livianos, comprendidos entre C_{18} - C_{21} lo cual queda en evidencia durante el calentamiento en el intervalo de 33-42 °C, y al enfriar en el intervalo de 38-33 °C. Esta parafina presenta una entalpía de fusión de 1,75 kJ/kg·K y una temperatura de fusión de 56,0 °C, mientras que la temperatura de solidificación es de 50,3 °C, lo cual indica que contiene cierta proporción de hidrocarburos que van desde C_{26} hasta C_{27} , según la Tabla 1. La temperatura de fusión es similar a la determinada para la parafina Paraplast, sin embargo posee un valor de entalpía 3,65 veces mayor al valor determinado para ésta última, lo cual indica que requiere una mayor carga energética para poder cambiar su estado de sólido a líquido, y por tanto se requiere mayor

tiempo para fundirla. Desde el punto de vista de la temperatura de fusión se puede decir que esta parafina es aceptable como medio de inclusión, sin embargo, los altos valores de viscosidad que presentó durante los ensayos reológicos demuestran que no es favorable para dichos fines, ya que ésta característica desfavorece la difusión del medio en el tejido, obteniendo con ellos inclusiones deficientes.

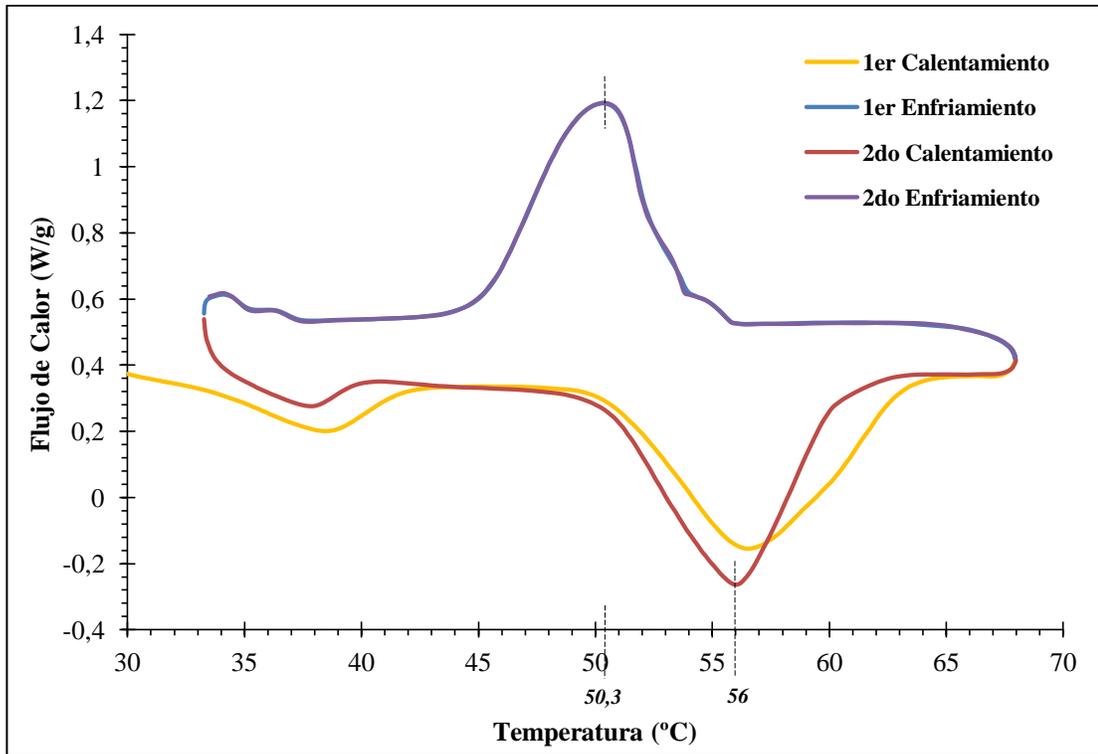


Fig. 35 - DSC de la parafina Histowax.

En la Tabla 7 se reporta un resumen con las temperaturas de fusión, solidificación y la diferencia entre éstas, así como las temperaturas máximas experimentadas durante los ensayos de DSC. La diferencia de temperaturas de fusión y solidificación resulta de gran importancia al momento de diseñar el mecanismo que permitirá obtener los pellets de la parafina a elaborar, ya que aporta información acerca de los parámetros de control de temperatura que se deben establecer. En la misma, también se puede observar que la temperatura máxima de los ensayos superan los 65 °C para los cuales

estaban programados, mostrando 3 °C por encima de la establecida, lo cual se debe a la diferencia en la sensibilidad a la inercia térmica que presentan ambos equipos.

Tabla 7 - Temperaturas de fusión, solidificación y máxima de ensayo de las parafinas estudiadas por medio de DSC.

| Parafina | T_f (°C) | T_s (°C) | (T_f-T_s) (°C) | T_{máx. ens.} (°C) |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|---|-----------------------------------|
| <i>Paraplast</i> | 56,6 | 51,8 | 4,8 | 67,9 |
| <i>Base alemana</i> | 56,7 | 52,0 | 4,7 | 68,1 |
| <i>Parabiotest</i> | 56,8 | 51,4 | 5,4 | 67,9 |
| <i>HPS</i> | 59,6 | 54,6 | 5,0 | 67,9 |
| <i>D-2395</i> | 58,0 | 52,6 | 5,4 | 67,9 |
| <i>Parafina Vela</i> | 59,8 | 55,0 | 4,8 | 67,9 |
| <i>Microcristalina</i> | 61,7 | 58,3 | 3,4 | 80,0 |
| <i>GLP-5</i> | 59,5 | 54,5 | 5,0 | 67,9 |
| <i>Histowax</i> | 56,0 | 50,3 | 5,7 | 68,0 |

Mediante la calorimetría diferencial de barrido, también es posible obtener los valores de las capacidades caloríficas específicas (o bien, calores específicos) de las parafinas estudiadas. Esta propiedad resulta de gran importancia, debido a que se encuentra íntimamente relacionada con la temperatura de fusión, ya que describe la facilidad o dificultad que posee el material para experimentar cambios de temperatura cuando se encuentra sometida a una fuente de calor. Los valores de las mismas se muestran de manera resumida en la Tabla 8.

Tabla 8 - Calores específicos de las parafinas estudiadas obtenidos mediante ensayos de DSC.

| Parafina | C_p (kJ/kg·K) |
|----------------------------|--------------------------------|
| <i>Paraplast</i> | 0,48 |
| <i>Base alemana</i> | 0,16 |
| <i>Parabiotest</i> | 1,14 |
| <i>HPS</i> | 0,76 |
| <i>D-2395</i> | 1,09 |
| <i>Parafina para velas</i> | 0,27 |
| <i>Microcristalina</i> | 2,58 |
| <i>GLP-5</i> | 4,83 |
| <i>Histowax</i> | 1,75 |

Debido a la analogía entre los valores obtenidos para las temperaturas de fusión y solidificación mediante los análisis reológicos y calorimetría diferencial de barrido, y que éstas, a diferencia de los análisis por DSC no son propiedades específicas previstas a determinar mediante análisis reológicos, en la Tabla 9 se presenta en resumen los valores de estos parámetros obtenidos por ambas técnicas, así como la desviación presente entre ellos.

Tabla 9 - Desviación entre las temperaturas de fusión y solidificación de las parafinas estudiadas mediante análisis reológicos y calorimetría diferencial de barrido.

| Parafina | T _f por AR (°C) | T _f por DSC (°C) | Desviación* (%) | T _s por AR (°C) | T _s por DSC (°C) | Desviación* (%) |
|------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| <i>Paraplast</i> | 56,9 | 56,6 | 0,5 | 52,8 | 51,8 | 1,9 |
| <i>Base alemana</i> | 56,2 | 56,7 | 0,9 | 52,9 | 52,0 | 1,7 |
| <i>Parabiotest</i> | 56,8 | 56,8 | 0 | 51,9 | 51,4 | 1,0 |
| <i>HPS</i> | 59,7 | 59,6 | 0,2 | 54,4 | 54,6 | 0,4 |
| <i>D-2395</i> | 59,1 | 58,0 | 1,9 | 55,6 | 52,6 | 5,7 |
| <i>Parafina Velas</i> | 59,2 | 59,8 | 1,0 | 55,1 | 55,0 | 0,2 |
| <i>Microcristalina</i> | 75,0 | 61,7 | 21,6 | 67,5 | 58,3 | 13,6 |
| <i>GLP-5</i> | 60,4 | 59,5 | 1,5 | 55,8 | 54,5 | 2,4 |
| <i>Histowax</i> | 60,9 | 56,0 | 8,8 | 56,0 | 50,3 | 11,3 |

*Desviación calculada respecto a los ensayos por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Se puede observar que la desviación que presentan los análisis reológicos respecto a los realizados mediante DSC se encuentran dentro un margen de error aceptable, exceptuando los resultados obtenidos para la parafina Microcristalina principalmente. Esta diferencia significativa que presentó esta parafina puede deberse a la alta viscosidad, consistencia y textura adherente que presenta la misma, las cuales son características que dificultan en gran medida el ensayo reológico y por ende, afecta de manera directa la lectura de datos por el equipo. Por otra parte, los análisis realizados a las otras parafinas sí mostraron resultados muy precisos, donde la desviación alcanza escasamente el 2 %, a excepción de la parafina Histowax la cual presentó una desviación promedio del 10 %. Estos resultados sugieren que los análisis reológicos son una técnica fiable para determinar puntos de fusión y congelación como técnica alternativa a los DSC.

V.2.3.- Análisis Termogravimétricos (ATG)

Mediante la técnica de ATG se estudia la variación de la masa cuando la muestra se encuentra sometida a un ciclo térmico. En la Figura 36 se presentan de forma resumida los resultados de los análisis termogravimétricos que se realizaron a las parafinas estudiadas en la presente investigación, las cuales fueron sometidas a dos ciclos continuos de calentamiento-enfriamiento, ya que éstos análisis se realizan simultáneamente con los DSC. Se puede observar claramente que no existe pérdida de masa alguna cuando el material es sometido a un ciclo térmico repetitivo, por lo que en lugar de curvas se obtienen prácticamente líneas rectas. Por lo tanto, se puede afirmar que no existe pérdida de ningún componente volátil que pueda modificar las propiedades de las parafinas cuando éstas se calientan hasta temperaturas de 68 °C. Estos resultados demuestran que los técnicos histológicos tienen una concepción equivocada en este sentido.

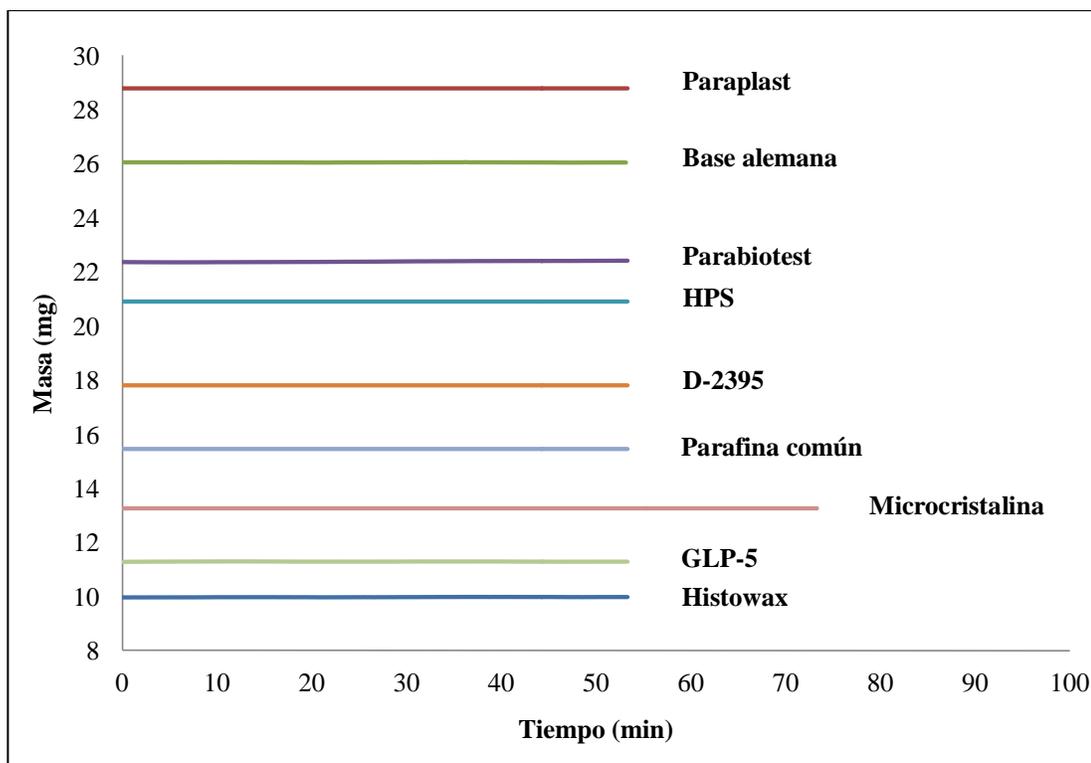


Fig. 36 – ATGs de las parafinas analizadas.

V.2.4.- Análisis por espectroscopia infrarroja (IR)

Las moléculas orgánicas, en este caso de la parafina, absorben la radiación infrarroja con frecuencias menores a 100 cm^{-1} y la convierten en energía de rotación molecular. Esta absorción puede ser cuantificada, así, un espectro de rotación molecular consiste en un conjunto de líneas discretas. Éstas moléculas orgánicas también absorben radiación infrarroja en un rango de $10000\text{-}100\text{ cm}^{-1}$ y la convierten en energía de vibración molecular, la cual también puede ser cuantificada, pero el espectro de vibración aparece como bandas y no como líneas, esto es debido a que un simple cambio de energía vibracional va acompañado de varios cambios de energía rotacional. Son estas bandas de energía vibracional-rotacional, particularmente las que se presentan entre 4000 cm^{-1} y 666 cm^{-1} las que son de interés en este caso. Las frecuencias o longitudes de onda de absorción dependen de la relativa masa de los átomos, las constantes fuerzas de los enlaces y de la geometría que presenten dichos átomos (Silverstein, 2005).

En la Figura 37 se pueden observar los espectros FTIR del primer grupo de las parafinas estudiadas, las cuales fueron analizadas en forma de película sobre celdas de bromuro de potasio (KBr) como se describió en la metodología experimental. En la misma se observa claramente las tres regiones que presentan las respectivas bandas, es decir, las zonas de alta, intermedia y baja frecuencia.

Los hidrocarburos saturados que contienen grupos metilos generalmente muestran bandas en aproximadamente 2962 y 2872 cm^{-1} (Silverstein, 2005). La zona de alta frecuencia muestra picos en la región comprendida entre $2955\text{-}2848\text{ cm}^{-1}$.

En esta región, los picos que se encuentran alrededor de los 2955 cm^{-1} se deben a la absorción que se origina por el alargamiento asimétrico de los enlaces C–H en los grupos metilo ($\nu_{as}\text{CH}_3$), los cercanos a los 2916 cm^{-1} son los referentes al alargamiento asimétrico de los grupos metileno ($\nu_{as}\text{CH}_2$) y los que se encuentran cerca de los 2848 cm^{-1} se refieren al estiramiento simétrico de los grupos metileno ($\nu_s\text{CH}_2$).

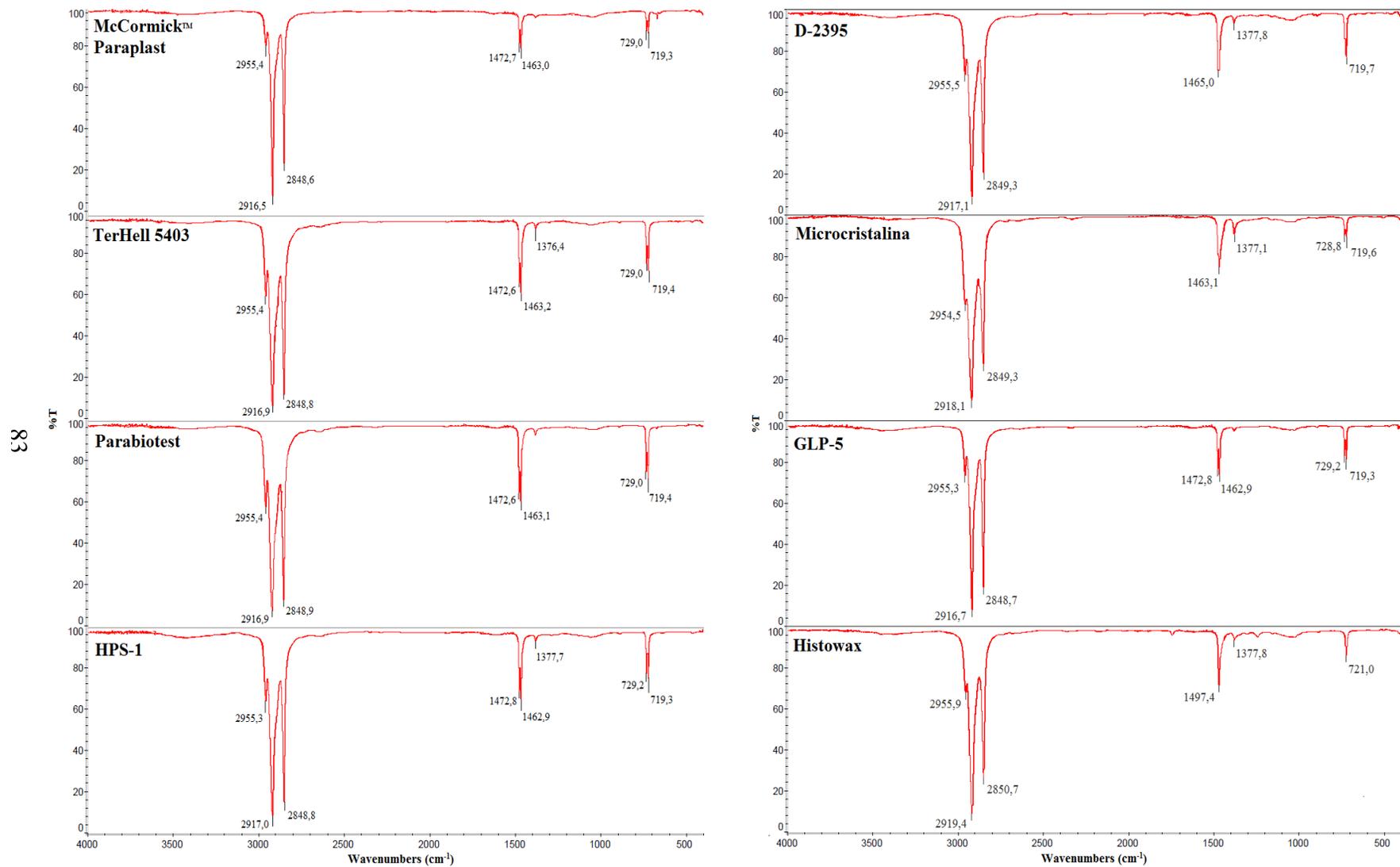


Fig. 37 - Espectros FTIR de las parafinas analizadas en forma de película sobre celdas de bromuro.

En la zona intermedia se observan picos entre los $1470\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$, los cuales generalmente se encuentran relacionados con las vibraciones de flexión en el plano, o *tijereteo*, de los enlaces C–H. Las bandas cercanas a los 1464 cm^{-1} usualmente representan las vibraciones de flexión simétrica de los grupos metileno ($\delta_s\text{CH}_2$), mientras que las bandas cercanas a los 1375 cm^{-1} se refieren las vibraciones de flexión simétricas de los grupos metilo ($\delta_s\text{CH}_3$) (Silverstein, 2005).

Por último, en la zona de baja frecuencia se observan picos entre los $729\text{-}719\text{ cm}^{-1}$. Estas bandas resultan de las vibraciones de balanceo en el plano de los grupos metileno (ρCH_2).

La Figura 38 muestra el espectro FTIR de la parafina típica para velas. El resultado de este ensayo se coloca aparte debido a que fue realizado empleando la técnica de disco prensado según las condiciones descritas en la metodología experimental.

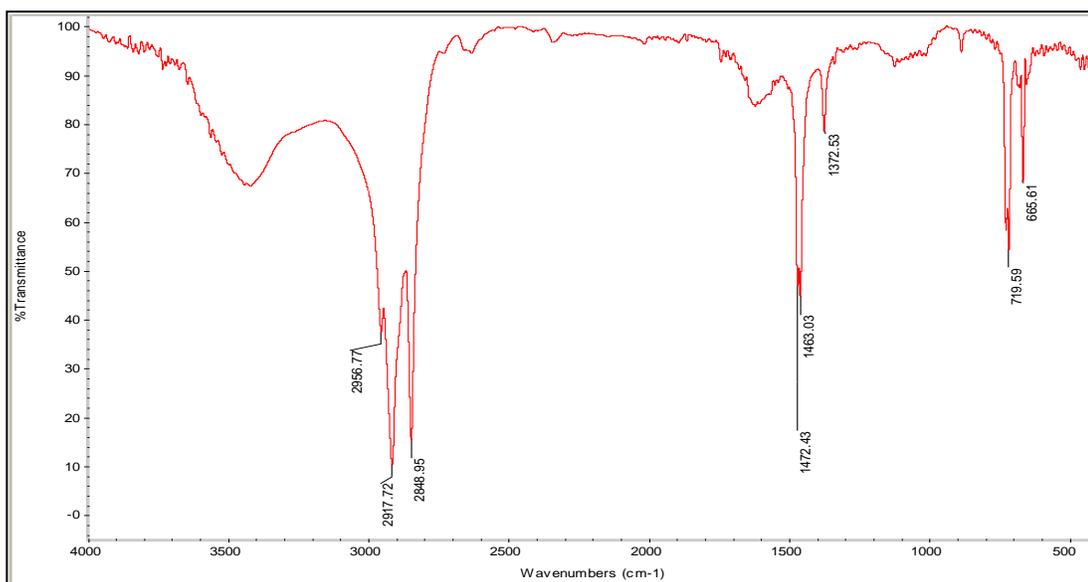


Fig. 38 - Espectro FTIR de la parafina típica para velas analizada mediante la técnica de disco prensado.

De igual manera, se observan las bandas que aparecen en el intervalo de $2956\text{-}2848\text{ cm}^{-1}$ en la zona de alta frecuencia, las cuales corresponden a los estiramientos simétricos y asimétricos de los enlaces C–H de los grupos metilo y metileno. Así

como también las bandas en la zona intermedia, entre los 1470-1370 cm^{-1} correspondientes al tijeo de los enlaces C–H de dichos grupos, y las bandas alrededor de los 720 cm^{-1} referentes a las vibraciones de balanceo de los grupos metileno. Sin embargo, se observa una diferencia respecto a los ensayos anteriores, la aparición de picos en torno a los 3500 y 1600 cm^{-1} , estos picos son producto de la humedad adquirida en la muestra por medio de la técnica de discos prensados (Silverstein, 2005).

De esta manera, las bandas de las parafinas entre los 2900, 1400 y 720 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de alargamiento o estiramiento (ν), flexionamiento (δ) y balanceo (ρ) de los enlaces carbono-hidrógeno de los grupos metilo y metileno (CH_3 , CH_2).

Como se puede observar, según los análisis realizados por espectroscopia infrarroja, todas las parafinas estudiadas presentan los mismos grupos funcionales, lo que sugiere que no existe la presencia de componentes contaminantes que puedan perjudicar los tejidos durante el empleo de las mismas como medio de inclusión en los ensayos histológicos.

V.3.- PRODUCTO FINAL Y OBTENCIÓN DE PELLETS

En este apartado se presentan y describen las diferentes condiciones y parámetros bajo los cuales fue posible la elaboración y obtención del producto elaborado y los pellets del mismo.

V.3.1.- Obtención del producto final

Con el objetivo de seleccionar la materia prima más adecuada para la elaboración del producto, en la Tabla 10 se presenta un cuadro comparativo entre las características que presentaron las parafinas estudiadas respecto a la Paraplast, donde las características marcadas con "✓" corresponden a valores similares a la referencia.

Tabla 10 - Cuadro comparativo para selección de la materia prima.

| PARAFINAS | CARACTERÍSTICAS | | | | |
|------------------------|----------------------|----------------------|---------------|--------------------|----------------|
| | T _f (DSC) | T _s (DSC) | η máx. aprox. | η a T _f | C _p |
| <i>Base alemana</i> | ✓ | ✓ | X | ✓ | ✓ |
| <i>Parabiotest</i> | ✓ | ✓ | X | X | X |
| <i>HPS</i> | X | X | X | ✓ | ✓ |
| <i>D-2395</i> | X | ✓ | X | ✓ | X |
| <i>Parafina velas</i> | X | X | X | X | ✓ |
| <i>Microcristalina</i> | X | X | X | X | X |
| <i>GLP-5</i> | X | X | X | X | X |
| <i>Histowax</i> | ✓ | ✓ | X | X | X |

Así, la mezcla parafínica elaborada y denominada *producto final* es una composición formulada con parafina base alemana, parafina microcristalina, histowax, poliisobutileno (PIB) y etileno etilacrilato (E/EA). La parafina base de origen alemana es el componente principal, o parafina macrocristalina base de dicha mezcla, a partir de la cual se agregan las proporciones adecuadas de aditivos (microcristalina y PIB) que otorgan características específicas a la mezcla. Así, se tiene que por cada unidad de masa de parafina base se tendrá 12 % en masa de parafina microcristalina, 3 % en masa de histowax, 3,5 % en volumen de PIB y 1 % en volumen de E/EA.

V.3.2.- Caracterización del producto final

En la Figura 39 se muestran las gráficas obtenidas como resultado de un ensayo reológico de viscosidad en función de la temperatura para la parafina elaborada y seleccionada como producto definitivo, junto con las otras parafinas de uso histológico y la parafina Paraplast, la cual representa el material de referencia. Se puede observar que en el intervalo de temperatura más importante ($T > 50$ °C) para el proceso de inclusión, que tiene un comportamiento similar a la parafina Parabiotest, sin embargo, sus valores de viscosidad y puntos de fusión son diferentes.

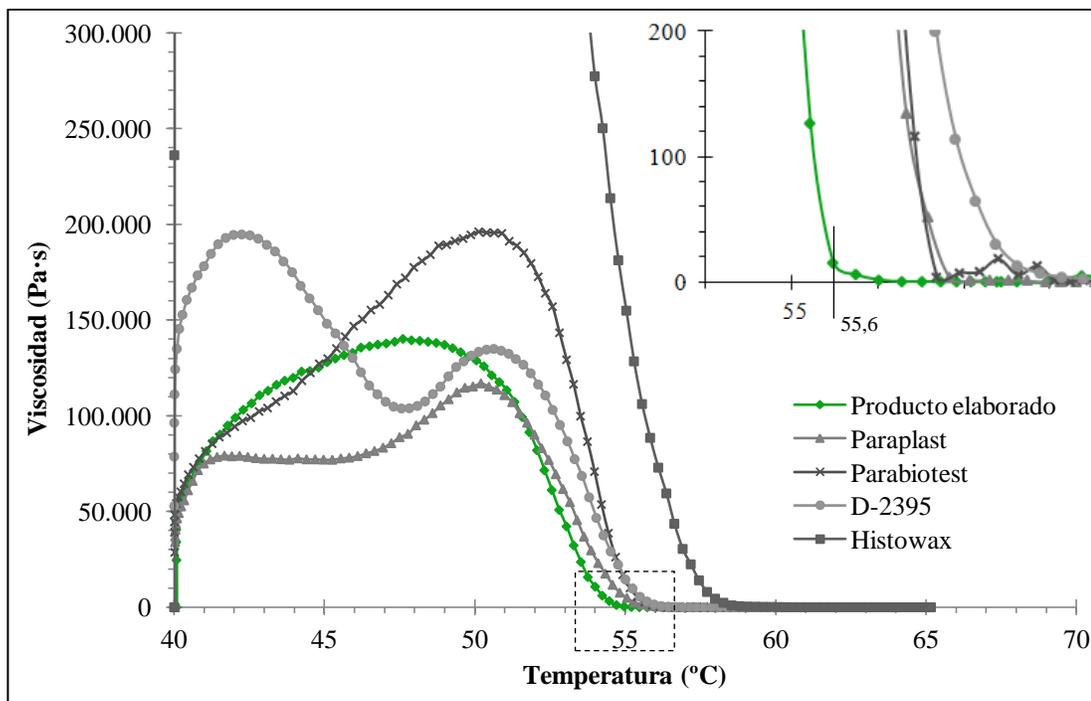


Fig. 39 - Curva de η vs. T del Producto elaborado y de las parafinas de uso histológico. Nótese que la parafina Histowax no se encuentra dentro de la región ampliada de la gráfica debido a la elevada temperatura de fusión.

Esta mezcla parafínica al ser calentada presentó una viscosidad máxima próxima a los 140.000 Pa·s a una temperatura de 47,9 °C, siendo el valor más bajo después de la Paraplast, con un punto de fusión de 55,6 °C a la cual la viscosidad alcanzó un valor de 2,8 Pa·s, y a la temperatura máxima de ensayo de 63,2 °C se logra un valor mínimo de ésta de $4 \cdot 10^{-3}$ Pa·s. Como puede observarse, la mezcla parafínica obtenida presenta el punto de fusión más bajo en comparación con las otras parafinas de uso histológico, así como el valor más bajo de todas las parafinas estudiadas en esta investigación, con más de 1 °C de diferencia respecto a la Paraplast, y una viscosidad a la temperatura de fusión muy similar a ésta última, con una diferencia de 0,1 Pa·s, es decir, una desviación de 3,7%, lo que indica que el producto elaborado tendrá la misma capacidad de difusión en el tejido que la parafina señalada como el material de referencia.

De igual manera, en la Figura 40 se presenta la ampliación de las curvas de enfriamiento que presentó el producto elaborado en comparación con las otras parafinas de uso histológico que actualmente se comercializan en el mercado.

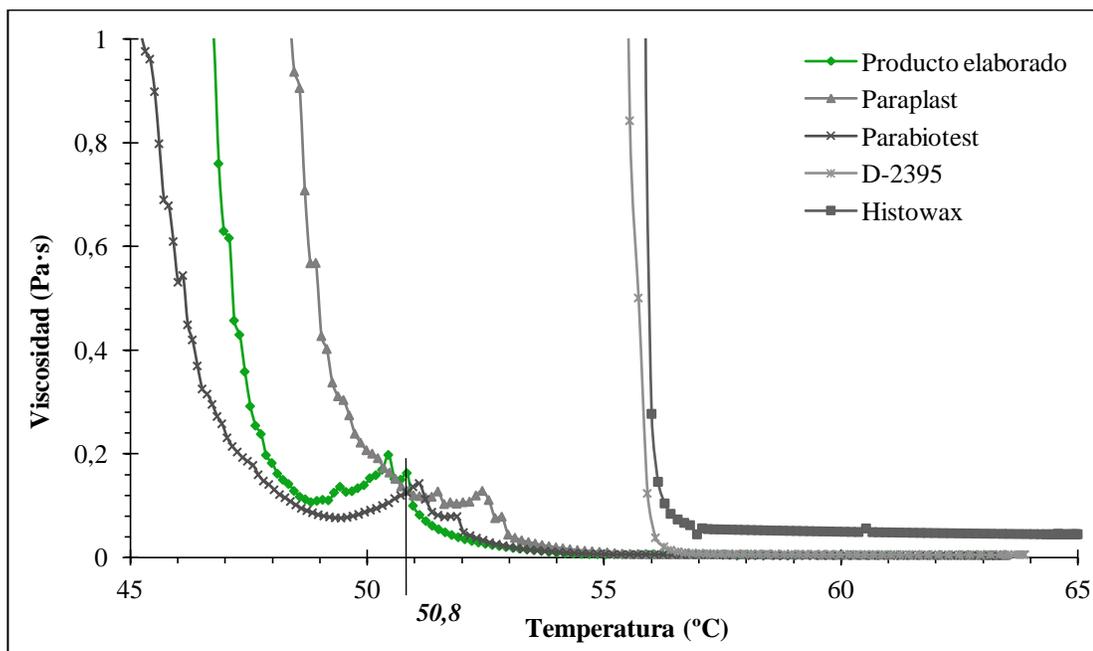


Fig. 40 - Ampliación de las curvas de enfriamiento de un ensayo de η vs. T del Producto elaborado y de las parafinas de uso histológico.

En estas curvas de enfriamiento se puede observar que el punto de ruptura obtenido para la mezcla parafínica elaborada, es decir, el punto de congelación o solidificación, comienza a los 50,8 °C, aproximadamente 5 °C de diferencia con respecto a su temperatura de fusión, lo cual representa una ventaja al momento de elaborar los pellets de la misma, ya que si la diferencia entre estas temperaturas es muy estrecha se dificultaría el control de temperatura en el sistema, pudiendo tener como consecuencia la obstrucción del mismo.

Por otra parte, se observa que la curva de viscosidad en función de la temperatura del producto elaborado en la etapa de calentamiento presenta una forma de domo muy regular. Esto posiblemente se deba a la homogeneización lograda durante la mezcla, ya que de existir una mezcla irregular se presentarían pequeños cúmulos o *clusters* de

crisales de parafina como se observa en la fotografía de la Figura 41, los cuales afectarían negativamente la lectura de datos en el equipo, y el material presentaría un comportamiento anisotrópico.

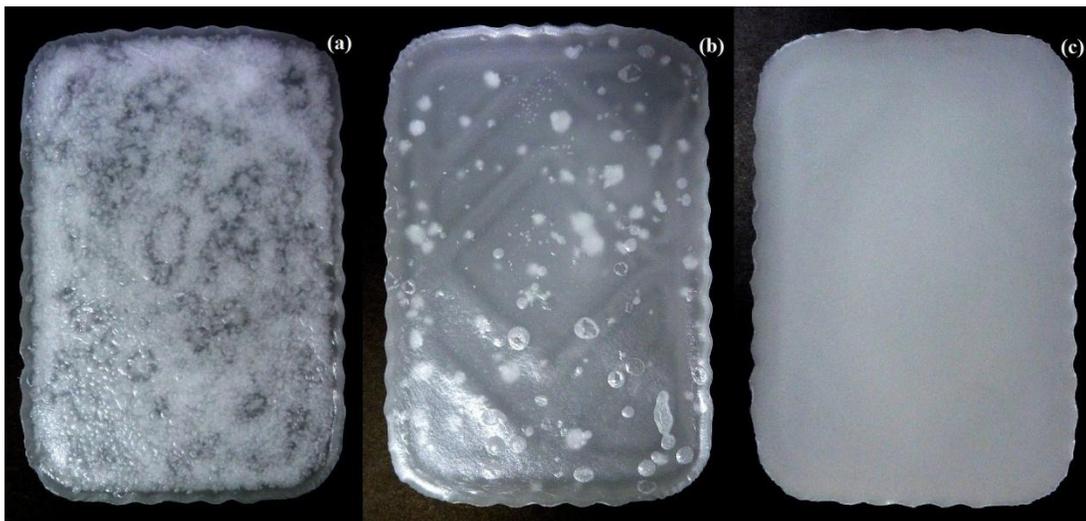


Fig. 41 - Efecto de la agitación en las parafinas: (a) Mezcla parafínica agitada en un tiempo de 5 min a 600 rpm, (b) Mezcla parafínica agitada durante 10 min a 600 rpm, (c) Mezcla parafínica agitada durante 25 min a 600 rpm.

Con la finalidad de corroborar la homogeneidad del producto final (Fig. 41c), se realizaron dos ensayos de viscosidad en función de la temperatura bajo las mismas condiciones de operación sobre muestras diferentes de este material. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 42, donde se puede observar la misma tendencia en el comportamiento de la mezcla parafínica en cada uno de los ensayos, lo cual deber ser atribuido a la homogeneización lograda en la mezcla elaborada.

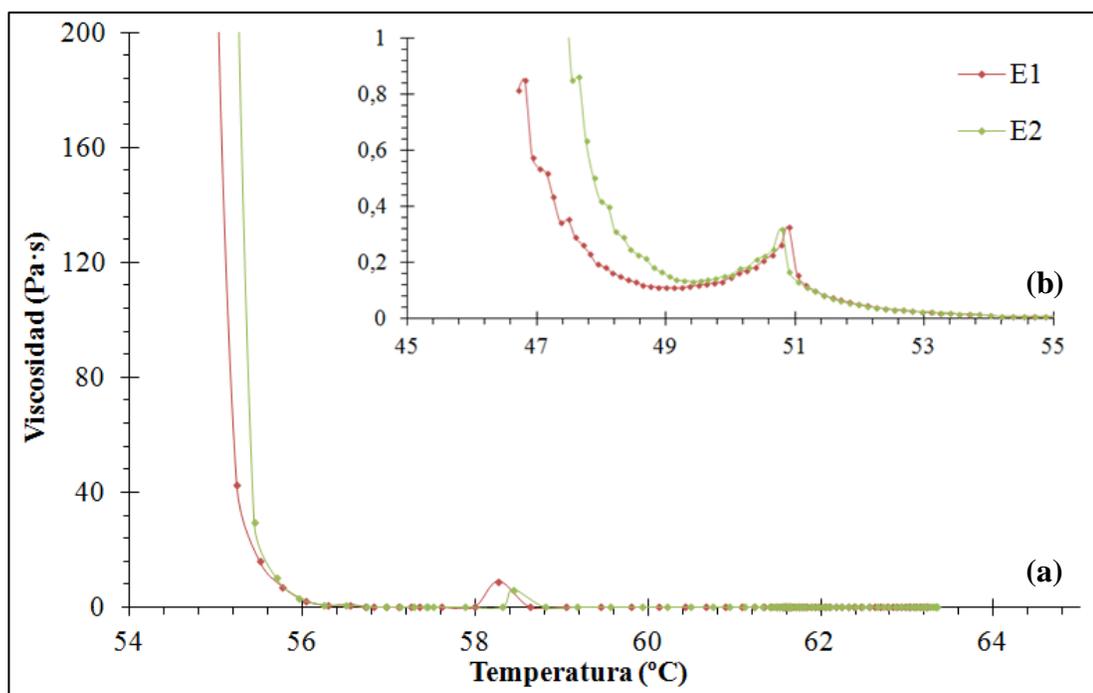


Fig. 42 - Curvas de η vs. T correspondientes al producto elaborado: (a) Ampliación de las curvas de calentamiento en la región del punto de fusión, (b) Ampliación de las curvas de enfriamiento en la región de los 50 °C.

Así, se observa que las condiciones de agitación son determinantes para obtener un producto homogéneo. Para lograr al resultado obtenido, se determinó que la mezcla se debe agitar por un período de 25 min a una velocidad de 600 rpm para un volumen de mezcla aproximado de 500 mL a una temperatura máxima de 105 °C, para ayudar a disolver los aditivos y evitar el deterioro de la parafina, la cual no debe ser calentada a temperaturas superiores a los 140 °C (Freund, 1982).

Por otra parte, en la gráfica de la Figura 43 se presenta el resultado obtenido de un ensayo por calorimetría diferencial de barrido realizado a la mezcla parafínica elaborada, observándose claramente los picos endotérmicos y exotérmicos correspondientes a las etapas de calentamiento y enfriamiento respectivamente.

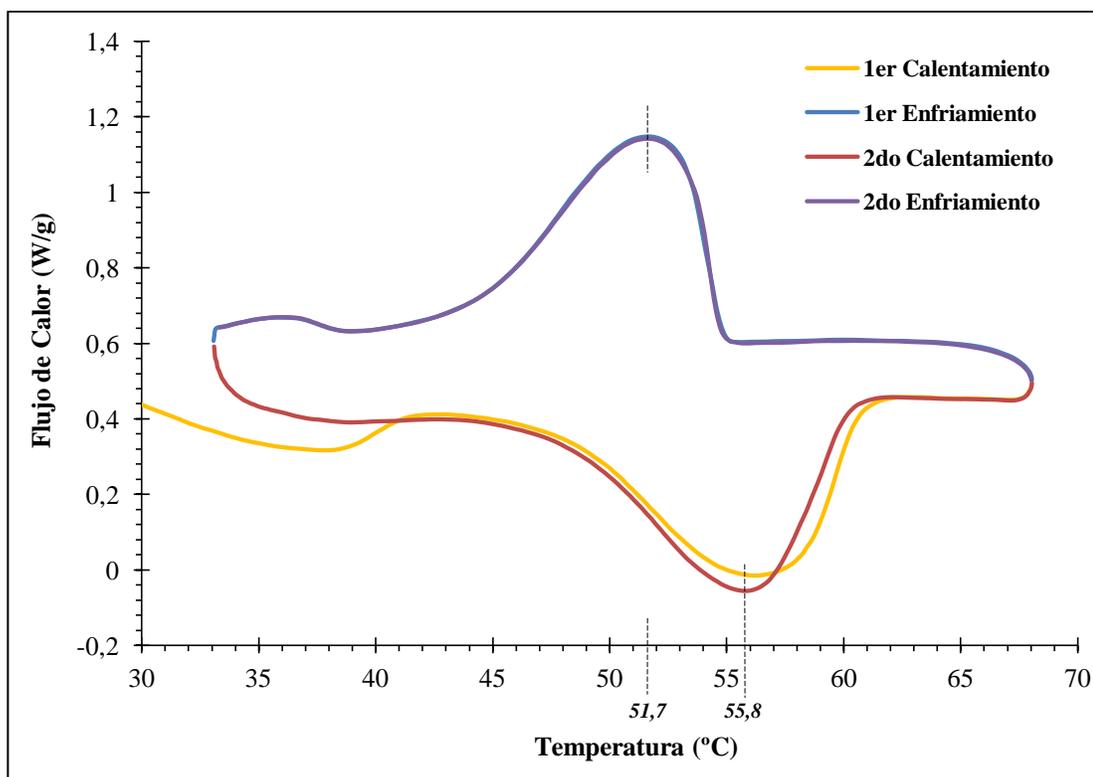


Fig. 43 - DSC del Producto elaborado.

Mediante este ensayo se determinó que esta composición tiene una temperatura de fusión de 55,8 °C, una entalpía de fusión de 0,37 kJ/kg·K y un punto de congelación a los 51,7 °C, valores que se encuentran por debajo de los correspondientes a la parafina de referencia, lo cual representa una ventaja, ya que al fundir a una temperatura más baja el tejido muestra recibe una menor carga de calor disminuyendo con ello el riesgo de deterioro del mismo y asegura un diagnóstico preciso. Así, la Figura 44 muestra la gráfica que describe el comportamiento de la parafina elaborada y la Paraplast durante el segundo calentamiento.

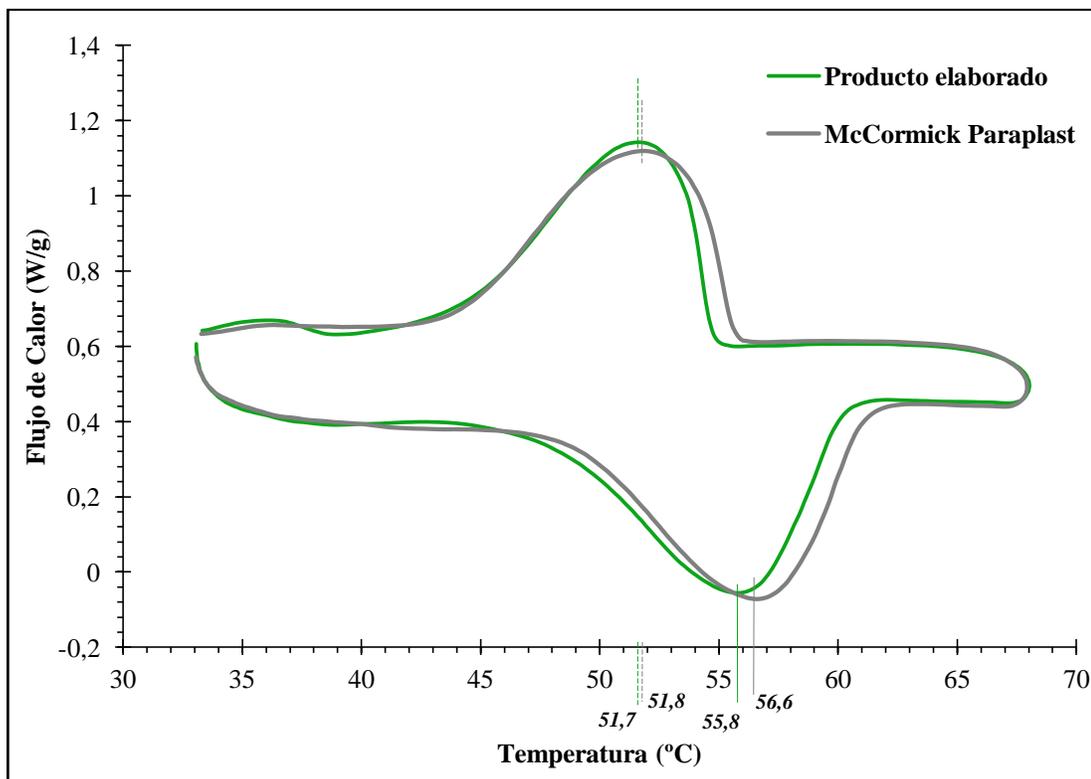


Fig. 44 - DSC del producto elaborado y de la parafina Paraplast.

Se observa como ambos comportamientos son muy similares, donde el resultado obtenido de la composición elaborada muestra un comportamiento más aceptable en comparación con la parafina de Paraplast, ya que presenta tanto una temperatura de fusión como un calor específico menor, lo que se traduce en menos calor y menos tiempo necesario para la fusión de la misma. Por tal motivo y con fines comparativos en la Tabla 11 se presentan los resultados de los valores obtenidos para los diferentes parámetros tanto para la parafina Paraplast como para el producto final elaborado, así como la desviación de los resultados obtenidos que éste presentó respecto al material de referencia.

Tabla 11 - Valores de diferentes parámetros de las parafinas Paraplast y la elaborada como Producto Final según técnicas de AR y DSC.

| Características | Paraplast | Producto Final | Desviación* (%) |
|---|-----------|----------------|-----------------|
| <i>T de fusión mediante AR (°C)</i> | 56,9 | 55,6 | -2,3 |
| <i>T de fusión mediante DSC (°C)</i> | 56,6 | 55,8 | -1,4 |
| <i>T de congelación mediante AR (°C)</i> | 52,8 | 50,8 | -3,9 |
| <i>T de congelación mediante DSC (°C)</i> | 51,8 | 51,7 | -0,2 |
| <i>Viscosidad máx. aprox. (Pa·s)</i> | 120.000 | 140.000 | 16,7 |
| <i>Viscosidad a T de fusión (Pa·s)</i> | 2,7 | 2,8 | 3,7 |
| <i>Viscosidad a T máx. de ensayo (Pa·s)</i> | 0,0050 | 0,0042 | -19 |
| <i>C_p (kJ/kg·K)</i> | 0,48 | 0,37 | -29,7 |

*Desviación calculada respecto al material de referencia.

Estas desviaciones negativas señalan que los valores determinados de éstos parámetros se encuentran por debajo de los obtenidos para el material de referencia, lo cual representa una ventaja ya que indica que el producto elaborado presenta características más favorables para su aplicación en los ensayos histológicos.

Por otra parte, en la Figura 45 se presenta el resultado del ensayo termogravimétrico practicado al producto elaborado. En el mismo se observa claramente que no existe variación de la masa durante los dos ciclos continuos de calentamiento y enfriamiento a los cuales fue sometida en este ensayo, comportamiento muy similar al presentado por las parafinas estudiadas anteriormente.

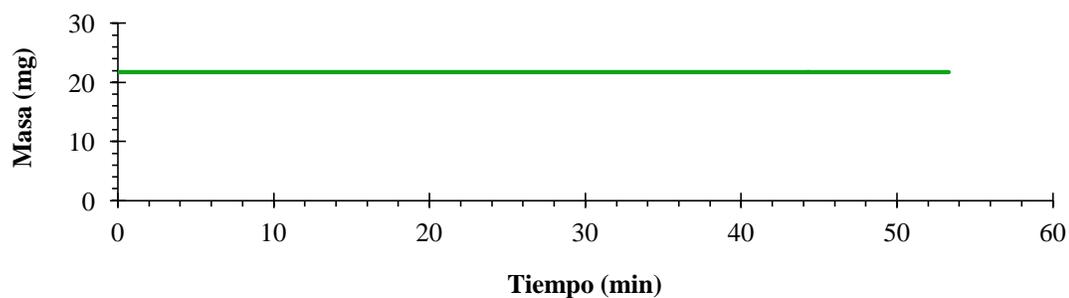


Fig. 45 - ATG del producto elaborado.

El producto obtenido también fue analizado mediante la técnica de espectroscopia infrarroja. En la Figura 46 se pueden observar los espectros FTIR del aditivo polimérico PIB y el correspondiente al producto final, los cuales se realizaron empleando la técnica de disco prensado según las condiciones descritas en la metodología experimental. El ensayo practicado al PIB se realizó con el objetivo de mostrar que es un aditivo compuesto por los mismos componentes que constituyen la parafina, es decir, compuestos formados por elementos de carbono e hidrógeno, en otras palabras, un hidrocarburo. Con esto se garantiza que la parafina no experimentará ningún cambio químico en su composición que pueda perjudicar los tejidos orgánicos a embutir o incluir.

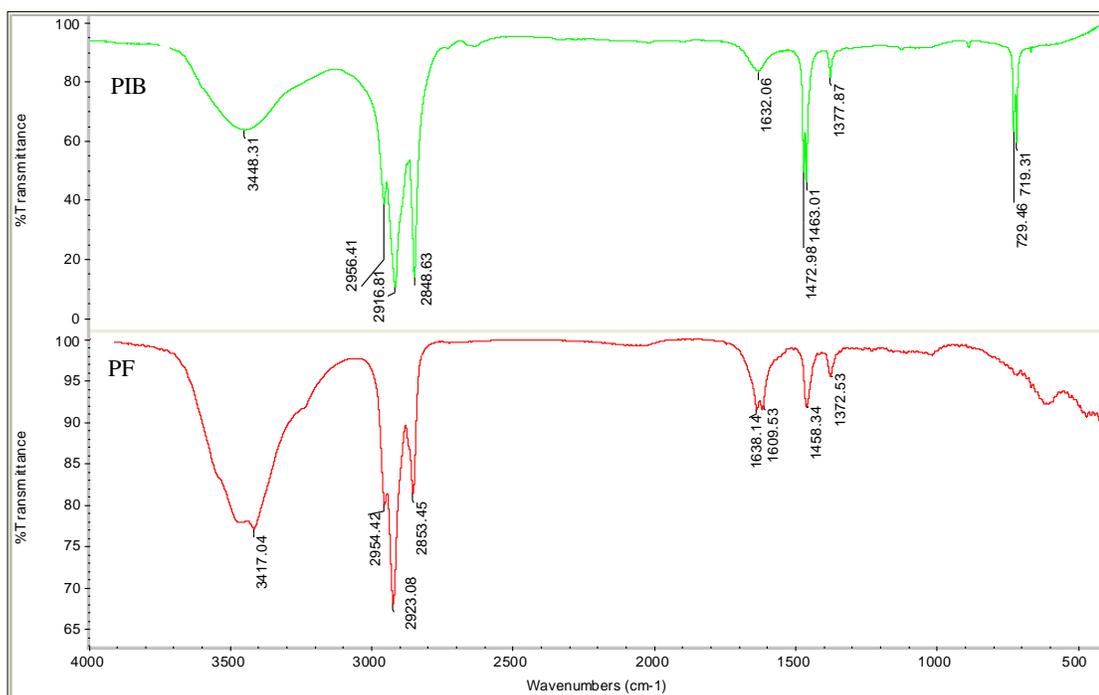


Fig. 46 - Espectros FTIR del Poliisobutileno (PIB) y del Producto Final elaborado (PF).

En ambos compuestos se puede observar la absorción que se origina por el alargamiento de los hidrocarburos alifáticos en la región de $3000\text{--}2840\text{ cm}^{-1}$, correspondientes al alargamiento asimétrico de los enlaces C–H en los grupos metilo ($\nu_{as}\text{CH}_3$) ($\sim 2955\text{ cm}^{-1}$), al alargamiento asimétrico de los grupos metileno ($\nu_{as}\text{CH}_2$)

($\sim 2920\text{ cm}^{-1}$) y al estiramiento simétrico de los grupos metileno ($\nu_s\text{CH}_2$) alrededor de los 2850 cm^{-1} . También se pueden observar las bandas de absorción de tijeo de los enlaces C–H de los grupos metileno ($\delta_s\text{CH}_2$) alrededor de los 1464 cm^{-1} , así como las bandas referentes a las vibraciones de flexión simétricas de los grupos metilo ($\delta_s\text{CH}_3$) cercanas a los 1375 cm^{-1} , sin embargo, la bandas características de las vibraciones de balanceo en el plano de los grupos metileno (ρCH_2), ubicadas alrededor de los 720 cm^{-1} , sólo aparecen para el aditivo polimérico. Por otra parte, se puede observar que aparecen nuevamente las bandas cercanas a los 3448 y 1630 cm^{-1} , las cuales son el resultado de humedad obtenida por la técnica de disco prensado, bajo las condiciones de operación descritas en la metodología experimental.

V.3.3.- Elaboración y Obtención de pellets

Para obtener la parafina en forma de pellets se elaboró un dispositivo a partir del esquema mostrado en las Figuras 11 y 13, el cual, aunque bastante rudimentario, permitió manipular y controlar un número de variables para lograr el objetivo planteado. Así, finalmente se estableció que para obtener pellets el dispositivo debe tener las siguientes dimensiones y/o valores:

- Longitud de la cinta transportadora: 230 cm
- Material de la cinta transportadora: acetato
- Ancho de la cinta transportadora: 13 cm
- Material del sistema de carga, descarga y mantenimiento de la parafina: cobre
- Temperatura del aire frío: $16\text{ }^\circ\text{C}$
- Velocidad del motor que moviliza la cinta transportadora: 6 rpm
- Distancia de caída de la gota (desde las boquillas de descarga hasta la cinta transportadora): $\sim 1\text{ cm}$
- Número de boquillas de descarga: 6
- Diámetro de las boquillas de descarga: 0,6 mm
- Temperatura de descarga de la parafina: $62\text{ }^\circ\text{C}$
- Intervalo de descarga entre gota y gota: 0,5 s

Con fines referenciales, en la Figura 47 se presenta una fotografía donde se pueden observar las diferentes presentaciones de las parafinas empleadas como medio de inclusión disponibles en el mercado, así como los tipos de presentación obtenidos de la parafina elaborada como producto final.

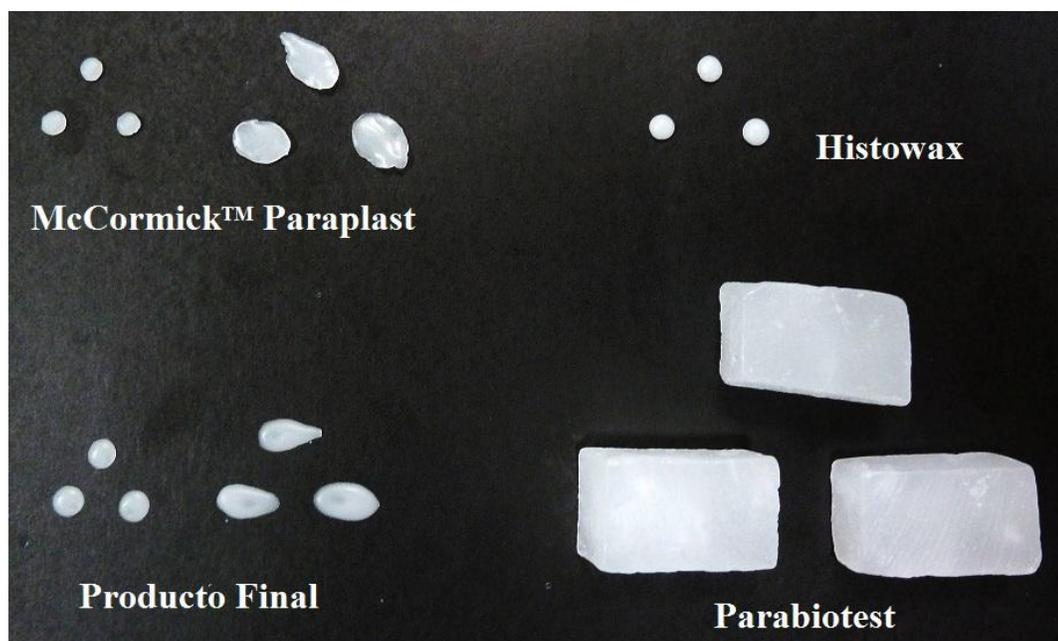


Fig. 47 - Tipos de presentación de parafinas empleadas como medio de inclusión y el producto final.

V.3.4.- Pruebas clínicas con el material obtenido

Todas las mezclas parafínicas elaboradas en esta investigación fueron probadas y evaluadas por histotecnólogos en tres laboratorios reconocidos a nivel capital, sin embargo, la mezcla parafínica seleccionada como producto final es la que presentó un comportamiento y características de mayor semejanza a la parafina de referencia.

Los resultados de las evaluaciones realizadas a la mezcla parafínica elaborada por los técnicos puede ser observada en los Apéndices.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este capítulo se presentan las conclusiones del presente trabajo, así como las sugerencias más importantes a considerar en investigaciones futuras, para la caracterización y preparación de parafinas como medio de inclusión de tejidos.

VI.1.- CONCLUSIONES

- El proceso de rayado, como método reductor de tamaño de la materia prima para la realización de los ensayos reológicos, resultó más favorable que la técnica de cortado, ya que permite obtener partículas con tamaño y forma más adecuados y además elimina de manera significativa los bordes puntiagudos en las partículas del material que dificultan la lectura de datos en el equipo.
- El comportamiento térmico de las parafinas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), debe observarse en el segundo ciclo de calentamiento-enfriamiento debido a la mayor definición que presenta la curva.
- La parafina base alemana presentó el menor calor específico de acuerdo a los ensayos mediante DSC.
- La desviación de los resultados de temperaturas de fusión y congelación obtenidos mediante análisis reológicos (AR), respecto a los obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC), se encuentran dentro de un margen de error aceptable, por lo que ambas técnicas son fiables para determinar éstos parámetros.
- Los análisis termogravimétricos (ATG) demostraron que las parafinas no presentaron ninguna variación en la masa durante los dos ciclos continuos de

calentamiento-enfriamiento. Por lo tanto, no existe pérdida de componentes volátiles que pueda afectar o modificar las propiedades de las parafinas cuando éstas se calientan a temperaturas de hasta 68 °C.

- Los espectros IR demostraron que todas las parafinas estudiadas presentan los mismos grupos funcionales, y por tanto sus constituyentes son semejantes.
- La parafina elaborada presentó un punto de fusión y una capacidad calorífica menores a los obtenidos para el material de referencia, lo que resulta una ventaja para el procesamiento.
- El ATG practicado al producto elaborado mostró que no existe pérdida de masa alguna durante ciclos continuos de calentamiento-enfriamiento cuando es calentado hasta 68 °C.
- Los espectros IR del aditivo polimérico PIB y del producto elaborado demostraron que ambos materiales presentan los mismos grupos funcionales que el material de referencia, al igual que las otras parafinas estudiadas, por lo que el material elaborado puede ser usado para inclusión de tejidos sin temor a causar alteraciones.
- Las condiciones de agitación son fundamentales en la elaboración de la mezcla del producto elaborado, ya que garantiza la homogeneidad en todo su volumen y por tanto el material obtenido tendrá un comportamiento isotrópico.
- Se logró obtener pellets semejantes a los importados con las condiciones de trabajo y el sistema diseñado.

- Mediante ensayos por AR se determinó que el primer punto de ruptura en la curva de viscosidad en función de la temperatura en la etapa de enfriamiento representa el punto de congelación del material, los cuales coinciden con los ensayos mediante DSC.
- Se logró obtener un producto con propiedades similares al material de referencia, es decir, a la parafina de uso comercial, la cual fue evaluada *in situ* en laboratorios histológicos por técnicos patológicos de reconocida trayectoria.

VI.2.- RECOMENDACIONES

- Reducir al máximo el tamaño de partícula de la parafina para obtener mejores resultados en los ensayos reológicos.
- Se sugiere emplear crisoles de aluminio en los ensayos por DSC en lugar de alúmina, ya que son mejores conductores de calor y por ende se pueden obtener resultados aún más precisos.
- Es recomendable realizar un estudio técnico-económico que permita evaluar la viabilidad de la producción a nivel industrial.

BIBLIOGRAFÍA

Agencia Venezolana de Noticias (AVN), (21 de Noviembre de 2011). Refinería San Roque produce 52,7 toneladas de parafina por día. Correo del Orinoco. Consultado el 14 de Marzo de 2012 en: <http://www.correodelorinoco.gob.ve>

Barzilla, Janet. (2005). Histology and Immunohistochemistry. Institute of Biosciences and Bioengineering, RICE University, NIH Biotechnology Research Training Program. Consultado en Mayo de 2011 en: <http://www-bioc.rice.edu/bios576/immuno/immuno.html>

Dean, John A. (1999). Lange's Handbook of Chemistry, 15th Edition, McGraw-Hill Inc. U.S.A. 1291 p.

Derrick R. Michele, Stulik Dusan and Landry James M. (1999). Scientific Tools for Conservation - Infrared Spectroscopy in Conservation Science, The Getty Conservation Institute, U.S.A. 236 p.

Facchetti Riccardo, Cadoppi Andrea. (2004). Simulated Distillation of Petroleum Products (ASTM D2887) by GC in less than two minutes. Thermo Electron Corporation. Milan, Italy.

Freund, M. *et ál.* (1982). Paraffin Products. Developments in Petroleum Science; 14, Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam-Oxford-New York. 337 p.

Heidcamp, William H. (1995). Cell Biology Laboratory Manual. Biology Department, Gustavus Adolphus College. Saint Peter, Minnesota, USA. Consultado en Abril de 2011 en: <http://homepages.gac.edu/~cellab/index-1.html>

Incropera Frank P. y DeWitt David P. (1999). Fundamentos de Transferencia de Calor, 4^{ta} Edición, Prentice-Hall. México. 888 p.

Klatt MD, Edward C. WebPath: The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. Hosted by The University of Utah Eccles Health Sciences Library, Mercer University School of Medicine at Savannah, Georgia, USA. Consultado en Junio de 2011 en: <http://library.med.utah.edu/WebPath/webpath.html#MENU>

Moreno B. Rodrigo. (2005). Reología De Suspensiones Cerámicas. Vol. 17. Consejo Superior De Investigaciones Científicas. Madrid, España. 327 p.

Read John, Whiteoak David. (2003). The Shell Bitumen Handbook, 5th Edition, Thomas Telford Publishing. London, UK. 461 p.

Rosales M. Ennayaileth. (2010). Evaluación del proceso de refinación de la parafina cristalina nacional con el fin de incrementar su valor agregado en aplicaciones patológicas. Trabajo especial de grado, Universidad Central de Venezuela.

Schawe, Jürgen E.K. (2002). Collected Applications Thermal Analysis. Vol. 1, Mettler-Toledo GmbH. Switzerland.

Schramm Gebhard. (1994). A Practical Approach to Rheology and Rheometry. Gebrueder HAAKE GmbH, Karlsruhe. Germany. 290 p.

Settle, Frank A. (1997). Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Prentice Hall. U.S.A. 995 p.

Silverstein, Robert M. *et ál.* (2005). Spectrometric Identification of Organic Compounds, 7th Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, U.S.A. 502 p.

Universidad de Vigo, Facultad de Biología, Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Consultado en Julio de 2011 en: <http://webs.uvigo.es/mmegias/inicio.html>

APÉNDICES

APÉNDICE 1: Cuadro de observaciones.

El siguiente cuadro de observaciones fue realizado por el histotecnólogo Eduardo Szurba Acevedo perteneciente al Laboratorio de Anatomía Patológica N&G.

| OBSERVACIONES DEL PRODUCTO FINAL | | | | | | |
|----------------------------------|--------------|---|---|---|---|--|
| <i>Características</i> | <i>Valor</i> | | | | | |
| Dureza | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Fragilidad | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Facilidad de corte | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Transparencia (sólida) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Transparencia (líquida) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Adherencia | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Plasticidad | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Sensación al tacto* | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |

[1: Muy baja ----- 5: Muy alta]

[1: Aceitosa ----- 5: Seca]*

APÉNDICE 2: Cuadro de observaciones.

El siguiente cuadro de observaciones fue realizado por la histotecnóloga Marbella Sivira perteneciente al Centro Médico de Caracas.

| OBSERVACIONES DEL PRODUCTO FINAL | | | | | |
|----------------------------------|--------------|---|---|---|---|
| <i>Características</i> | <i>Valor</i> | | | | |
| Dureza | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Fragilidad | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Facilidad de corte | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Transparencia (sólida) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Transparencia (líquida) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Adherencia | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Plasticidad | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Sensación al tacto * | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

[1: Muy baja ----- 5: Muy alta]

[1: Aceitosa ----- 5: Seca]*