

# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**Facultad de Química**

**POSGRADO DE ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA**

## **Evaluación de tensoactivos y fracciones de aislado de proteína de amaranto para la formación de fibras con la técnica de electroestirado**

**TESIS**

**Que como parte de los requisitos que para obtener el grado de:**

**MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A:**

***Q. en A. ETZULY TERESA HERRERA MARTÍNEZ***

**DIRIGIDA POR:**

**DRA. SANDRA O. MENDOZA DÍAZ**

**Santiago de Querétaro, Enero 2015.**



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Evaluación de tensoactivos y fracciones de aislado de proteína de amaranto para la  
formación de fibras con la técnica de electroestirado

### TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el diploma/grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

#### Presenta:

Q. en A. Etzuly Teresa Herrera Martínez

#### Dirigido por:

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz

#### SINODALES

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz  
Presidente





Dra. Minerva Ramos Gómez  
Secretario

Dr. Eduardo Castaño Tostado  
Vocal

Dr. Eleazar Escamilla Silva  
Suplente

Dra. Marcela Gaytán Martínez  
Suplente

  
Nombre y Firma  
Director de la Facultad

  
Firma  
  
Firma  
  
Firma  
  
Firma

  
Firma  
  
Nombre y Firma  
Director de Investigación y  
Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
26 de enero de 2015  
México

## RESUMEN

El electroestirado es una técnica que produce fibras de diámetro nanométrico, a partir de soluciones poliméricas. La morfología de las nanofibras se ve afectada por las propiedades de la solución (principalmente por la viscosidad, la tensión superficial y la conductividad) y por los parámetros del proceso (el voltaje, la velocidad de flujo y la distancia de la punta al colector). Una de las formas para mejorar la capacidad de hilado de las soluciones poliméricas es la adición de tensoactivos, los cuales puede reducir la tensión superficial durante el proceso de electroestirado y los defectos de la nanofibras.

En el presente trabajo, se obtuvieron nanofibras electroestiradas a partir de aislado proteico de amaranto en combinación con tensoactivos no iónicos a concentraciones de 30% p/p (Span 20, Tergitol, Tritón X-100 y Tween 80). A las soluciones poliméricas se midieron viscosidad, conductividad y tensión superficial. La adición de tensoactivos a las mezclas poliméricas facilitó la disolución de la proteína como del otro polímero utilizado (pululano). Los tensoactivos adicionados modificaron las propiedades reológicas, se observó disminución de la conductividad y tensión superficial, y aumento de la viscosidad. La caracterización morfológica de las nanofibras obtenidas de aislado proteico de amaranto en combinación con pululano y 30% de tensoactivo, se realizó por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), donde se observaron morfologías lisas, homogéneas con diámetros nanométricos (~200-400 nm). La espectroscopía de Infrarrojo demostró que se mantienen las estructuras de los polímeros electroestirados (proteína de amaranto y pululano). La adición de tensoactivos no iónicos mejoró las propiedades fisicoquímicas de la solución polimérica, facilitando el proceso de electroestirado.

**Palabras clave:** Electroestirado, nanofibras, proteína de amaranto, tensoactivos

## SUMMARY

The electrospinning is a technique to produce polymer fibers from solutions with diameters of nanometric range. The electrospun nanostructure morphology is affected by the solution properties (mainly by the viscosity, surface tension and conductivity of the polymer solution) and by the process parameters (voltage, flow rate of the solution, tip-to-collector distance). To improve the spinnability of biopolymer solutions different surfactants have been added. In addition, the reduction in the surface tension of the polymeric solution decreases fiber defects. In this work, electrospun nanofibers were obtained from amaranth protein combined with nonionic surfactants at 30 and 40% w/w (Span 20, Tergitol, Triton X-100 and Tween 80). The viscosity, conductivity and superficial tension of the solutions were determined. The addition of surfactants to polymeric solutions facilitated the dissolution of amaranth protein and the other polymer (pullulan). A decrease of conductivity and surface tension, and an increase of viscosity were observed. The nanofibers from amaranth protein, pullulan and surfactant at 30%, were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Atomic Force Microscopy (AFM), and the microphotographs showed smooth surface and homogenous morphologies with diameters between 200-400 nm. Infrared spectroscopy showed that the native structures of polymers (amaranth protein and pullulan) were maintained. The addition of nonionic surfactants improved the physicochemical properties of the biopolymer solution, facilitating electrospinning process.

**Keywords:** Electrospining, nanofibers, amaranth protein, surfactants

*Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.*

Albert Einstein (1879-1955)

*Con todo mi cariño y amor para las personas  
que hicieron todo en la vida para que yo pudiera  
lograr mis sueños.*

*A mis padres y hermanos*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, por su apoyo, orientación y por darme ánimos siempre, son mis héroes. A mis hermanos que siempre estuvieron al pendiente de mí, siempre me hacen reír y son mis mejores amigos.

A aquellos que a pesar de que están lejos, ni la distancia ni los años nos separan, mis amigos.

Agradecida de encontrar amistades tan buenas y geniales en tierras queretanas, gracias por apoyarme en todo.

A la doctora Sandra, por confiar en mí, y darme la oportunidad de pertenecer en su grupo de trabajo.

A mis compañeras de laboratorio, que vivimos muchas aventuras dentro de él e hicieron que las cosas fueran amenas y divertidas.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	i
SUMMARY .....	ii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 AMARANTO .....	2
2.1.1 Características y valor nutricional.....	2
2.1.2 Aislados proteicos .....	4
2.1.3 Métodos de extracción.....	6
2.2 PULULANO .....	9
2.3 ELECTROESTIRADO.....	10
2.3.1 Técnica de electroestirado .....	10
2.3.2 Parámetros a considerar .....	12
2.4 TENSOACTIVOS.....	15
2.4.1 Clasificación .....	15
2.4.2 Características .....	16
2.4.3 Acción de los tensoactivos en el electroestirado.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS .....	22
5. OBJETIVOS .....	23
5.1 General.....	23
5.2 Específicos .....	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
6.1 MATERIALES .....	24
6.2 ACONDICIONAMIENTO DE LA HARINA DE AMARANTO.....	24
6.3 OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES PROTEICAS POR PUNTO ISOELÉCTRICO.....	24



6.4	ELECTROFORESIS .....	26
6.5	DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES.....	27
6.6	PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN POLIMÉRICA .....	28
6.6.1	Diseño experimental .....	28
6.7	CARACTERIZACIÓN DE LAS SOLUCIONES .....	30
6.8	TÉCNICA DE ELECTROESTIRADO .....	31
6.9	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS NANOFIBRAS.....	31
6.9.1	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	31
6.9.2	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	32
6.9.3	Espectroscopía Infrarroja con Reflectancia Difusa (DRIFTS) .....	32
6.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	32
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
7.1	CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES Y DEL AISLADO PROTEICO .....	33
7.1.1	Proteína.....	33
7.1.2	Carbohidratos.....	35
7.2	CARACTERIZACIÓN DE LA SOLUCIÓN POLIMÉRICA .....	37
7.2.1	Viscosidad.....	37
7.2.2	Conductividad.....	45
7.2.3	Tensión superficial.....	48
7.3	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS NANOFIBRAS.....	54
7.3.1	Morfología, diámetro y topografía de las fibras .....	54
7.3.2	Caracterización molecular de las fibras mediante Espectroscopía Infrarroja con Reflectancia Difusa (DRIFTS).....	62
8.	CONCLUSIONES.....	68
9.	REFERENCIAS .....	69
10.	APÉNDICE .....	78

## ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro		
1	Composición proximal del grano de amaranto y algunos cereales (g/100).	3
2	Composición de aminoácidos de la proteína total de amaranto y de otros alimentos (g/100g de proteína).	4
3	Proteínas de reserva y sus agentes extractantes.	7
4	Gel concentrador al 4% de acrilamida en solución amortiguadora Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8.	23
5	Gel separador al 15% de acrilamida en solución amortiguadora Tris.HCl 1.5 M, pH 8.8.	23
6	Solución amortiguadora de la muestra.	24
7	Diseño experimental de las mezclas de las soluciones poliméricas de la fracción 2.	26
8	Diseño experimental de las mezclas de las soluciones poliméricas de los aislados proteicos.	27
9	Concentración de azúcares totales en las muestras analizadas.	33
10	Mediciones de viscosidad y conductividad de las soluciones poliméricas de los aislados proteicos.	35
11	Análisis de interacciones significativas de los aislados proteicos en la variable Viscosidad.	37
12	Análisis de interacciones significativas de las fracciones proteicas en la variable Viscosidad.	38
13	Mediciones de viscosidad y conductividad de las soluciones poliméricas de las fracciones proteicas	41
14	Análisis de interacciones significativas de las fracciones proteicas en la variable Conductividad.	42
15	Análisis de interacciones significativas de los aislados proteicos en la variable Conductividad.	44
16	Tensión superficial de los aislados proteicos de amaranto.	46
17	Análisis de interacciones significativas de los aislados proteicos en la variable Tensión superficial.	47

18	Tensión superficial de las fracciones proteicas de amaranto.	48
19	Análisis de interacciones significativas de las fracciones proteicas en la variable Tensión superficial.	49

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura		
1	Estructura del pululano.	9
2	Equipo de electroestirado.	11
3	Estructuras obtenidas en la técnica de electroestirado.	11
4	SEM de imágenes de nanofibras en solución de óxido de polietileno (PEO)/ polímero HASE.	19
5	Extracción de proteínas.	22
6	Gel representativo de electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras.	31
7	Gráfica de interacción triple de la solución polimérica (APA COPRAM, APA HA) y sus efectos sobre la variable Viscosidad.	37
8	Gráfica de interacción triple de la solución polimérica (Frac2 COPRAM, Frac2 HA) y sus efectos sobre la variable Viscosidad.	39
9	Gráfica de interacción triple de la solución polimérica (Frac2 COPRAM, Frac2 HA) y sus efectos sobre la variable Conductividad.	43
10	Gráfica de interacción triple de la solución polimérica (APA COPRAM, APA HA) y sus efectos sobre la variable Conductividad.	44
11	Gráfica de interacción triple de la solución polimérica (APA COPRAM, APA HA) y sus efectos sobre la variable Tensión Superficial.	47
12	Gráfica de interacción triple de la solución polimérica (Frac2 COPRAM, Frac2 HA) y sus efectos sobre la variable Tensión Superficial.	50
13	Micrografías obtenidas por Microscopía electrónica de barrido a una concentración de 30% de tensoactivo.	53
14	Micrografías obtenidas por Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) de APA-HA a una concentración de 30% de tensoactivo.	55
15	Espectro del aislado proteico de amaranto analizado por DRIFT.	60
16	Espectros obtenidos por DRIFT. Aislado proteico de amaranto (línea verde), Pululano (línea azul) y Ácido fórmico (línea rosa).	61
17	Espectros de las bandas características del pululano.	62
18	Espectros IR de las fibras obtenidas por la adición de tensoactivos no iónicos, aislado proteico de amaranto y pululano.	63

# 1. INTRODUCCIÓN

El *Amaranthus hypochondriacus* es una de las dos especies de amaranto originarias en México, y la composición proximal de la harina de estas semillas muestra que el contenido de proteína varía entre 13 a 18%, grasa de 6.3 a 8.1%, fibra de 2.2 a 5.8% y el contenido de cenizas de 2.8 a 4.4%. Las proteínas de amaranto se han caracterizado con base en la clasificación de Osborne, aunque aún existe discrepancia sobre cuál es la fracción mayoritaria, esto principalmente debido a los diferentes métodos y solventes de extracción empleados por diferentes autores. En general el contenido de albúminas en la proteína varía del 19 al 45%, el de globulinas (11S y 7S), del 16 al 35%, el de prolaminas de 0.7 a 1.3%, y el de glutelinas de 22 a 41% (Huerta y De la Rosa, 2012).

En la actualidad, el interés en la industria alimentaria por desarrollar nuevos vehículos de encapsulación de activos dentro de una matriz alimentaria utilizando polímeros de origen natural como las proteínas, ha cobrado importancia. Una de las técnicas que se utiliza para desarrollar matrices encapsulantes es el electroestirado, donde con ayuda de un alto voltaje, se atraen las partículas de un fluido polimérico desde un inyector hasta una superficie, en dicha superficie las soluciones poliméricas acaban solidificándose formando nanofibras (Gamboa *et al.*, 2007). Las nanofibras pueden utilizarse para formar películas o encapsulados, y que a posteriori podrían emplearse para recubrir otras sustancias químicas o preservar/encapsular proteínas, enzimas, macrófagos y otros compuestos de interés alimentario como antioxidantes.

Hay que destacar que sólo se utilizan polímeros porque estos son los únicos que tienen las propiedades físicas y químicas necesarias para formar fibras más resistentes, duraderas y elásticas. La proteína de amaranto en recientes estudios se ha demostrado como uno de los ingredientes potenciales para la formación de nanofibras.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 AMARANTO

El amaranto es un pseudocereal de cultivo anual. La familia Amaranthacea comprende más de 60 géneros e incluye aproximadamente 800 especies de plantas herbáceas anuales o perennes, de las cuales tres son las principales productoras de grano: *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, que son las cultivadas en México (Hernández and Herrería, 1998). Siendo los estados de Puebla, Estado de México, Morelos, Tlaxcala, Distrito Federal, Jalisco y Oaxaca donde más se cultiva y consume (SAGARPA, 2010).

La palabra amaranto significa “inmarcesible”, es decir, que no se marchita. Viene del griego *Amarantón*, de *a* (sin) y *marainein* (marchiar, palidecer) (Hernández and Herrería, 1998). El amaranto tiene una serie de aplicaciones análogas al de los cultivos básicos, principalmente del maíz, que van desde dulces artesanales “alegrías”, granola, harinas integrales, alimentos extruidos (frituras), panificados, pastas; hasta productos más sofisticados como aceites comestibles, papillas para bebés, concentrados proteicos, barras energéticas, y alimentos nutracéuticos especiales para enfermos diabéticos o con cáncer (Escalante, 2010).

#### 2.1.1 Características y valor nutrimental

El amaranto puede consumirse casi desde la siembra, en forma de germinado, de hojas tiernas en ensalada, o molidas para servirse en forma de sopa. Su digestibilidad es muy alta, alcanzando entre el 80 y 92% (Hernández and Herrería, 1998). La semilla tiene una composición química atractiva y un valor nutritivo superior cuando se compara con otros cultivos (Lozoya, 1994). La semilla de amaranto es muy pequeña, lisa brillante, de un milímetro de diámetro, y sus colores varían del negro al blanco aunque también hay amarillentos, cafés, dorados, rojos, rosados y púrpuras (Morales *et al.*, 2009).

A pesar de que la semilla de amaranto es muy pequeña, los análisis proximales indican que los contenidos de proteína, grasa, fibra y minerales son generalmente más altos que los cereales como el maíz, arroz y trigo. En el Cuadro 1, se observa que la harina de amaranto posee una concentración alta de proteínas (17.9%) a comparación de los demás cereales (8.5 a 14%) (Segura *et al.*, 1994).

**Cuadro 1.** Composición proximal del grano de amaranto y algunos cereales (g/100)

<b>Análisis</b>	<b>Amaranto</b>	<b>Maíz</b>	<b>Arroz</b>	<b>Trigo</b>
<b>Humedad</b>	11.1	13.8	11.7	12.5
<b>Grasa</b>	7.7	4.5	2.1	2.1
<b>Fibra</b>	2.2	2.3	0.9	2.6
<b>Cenizas</b>	4.1	1.4	1.4	1.9
<b>Carbohidratos</b>	57.0	67.7	75.4	66.9
<b>Proteína cruda</b>	17.9	10.3	8.5	14.0

Factor de conversión a proteína (Nx) para amaranto 5.85, maíz 6.25, arroz 6.25, trigo 5.7 (Segura *et al.*, 1994).

La proteína del amaranto es de excelente calidad ya que posee un balance casi perfecto de aminoácidos, siendo también un excelente alimento de complemento proteínico, pues su valor nutritivo es similar a la proteína de la leche. Se caracteriza por ser rico en lisina, que es el aminoácido más escaso en otros cereales como maíz, arroz y trigo (Cuadro 2), por lo que, al combinar un poco de amaranto con estos, la lisina excedente complementa la proteína de los otros cereales, permitiendo que se asimilen elementos que por falta de lisina se hubieran desechado, logrando una importante mejoría en la nutrición (Paredes *et al.*, 1990).

**Cuadro 2.** Composición de aminoácidos de la proteína total de amaranto y de otros alimentos (g/100g de proteína)

Aminoácido Cereal	Patrón					
	Amaranto	Maíz	Trigo	Frijol	Adultos	Niños
Isoleucina	4.0	3.5	3.9	6.2	1.3	4.6
Leucina	6.2	12.4	7.3	7.9	1.9	9.3
Lisina	6.1	3.0	3.0	8.0	1.6	6.6
Metionina	-	2.0	1.7	1.0	-	-
Cisteína	3.9	2.3	2.6	0.7	1.7	4.2
Fenilalanina	4.8	4.4	4.8	5.5	-	-
Tirosina	4.3	3.3	2.5	2.6	1.9	7.2
Treonina	4.6	3.3	2.8	4.2	0.9	4.3
Valina	4.4	4.9	4.9	6.1	1.3	5.5
Triptofano	1.3	0.7	1.2	-	0.5	1.7

(Paredes *et al.*, 1990).

### 2.1.2 Aislados proteicos

Los aislados proteicos son ingredientes alimentarios de gran importancia por su disponibilidad, funcionalidad, valor nutricional y costo. Estos se caracterizan por su alto contenido de proteína, llegando a tener hasta un 95% en base seca (Paredes *et al.*, 1994). El uso de los aislados proteicos dentro de la industria alimentaria, depende de las propiedades funcionales de las proteínas que lo componen, que a su vez están directamente relacionados con sus características estructurales. Las propiedades funcionales de los aislados pueden ir desde una adecuada solubilidad en agua, absorción de grasa, coagulación por calor, gelificación, emulsionante y propiedades espumantes (Avanza *et al.*, 2005).

La aplicación de proteínas vegetales dentro de la industria alimentaria ha ido en aumento como consecuencia de la calidad funcional y nutricional de los mismos. Estos aislados presentan un alto valor nutritivo, y pueden representar una alternativa de suplemento para mejorar la calidad nutricional de las dietas basadas en cultivos tradicionales, como el maíz, trigo y frijol. Dentro de la diversidad de los recursos agrícolas que son fáciles de explotar en México, se encuentra el amaranto, ya que como se había mencionado anteriormente, este se caracteriza por su alto contenido de proteínas a diferencia de otros granos (Osuna *et al.*,



2000). La harina de amaranto por su alto contenido proteico se utiliza para complementar otras harinas de cereales y/o leguminosas, como en las tortillas, panes, galletas, pastas y cereales de desayuno. Debido a su composición, propiedades y aplicaciones actuales, el cultivo de amaranto presenta un alto potencial infrutilizado dentro de la industria de los alimentos (Avanza *et al.*, 2005). Los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de amaranto, se caracterizan por tener aminoácidos de los que los demás cereales carecen, convirtiéndose en un suplemento de alimentos elaborados a base de granos o derivados vegetales.

### **2.1.2.1 Características de los aislados proteínicos de amaranto**

Los aislados proteicos obtenidos a partir del grano de amaranto, son una mezcla de proteínas con varios pesos moleculares de entre 30-80 KDa (Martínez and Añón, 1996). Siendo la globulina, albúmina, y glutelina las principales fracciones de proteína en las semillas de amaranto, las cuales difieren en sus solubilidades. La globulina se compone principalmente de globulina 11S, y 7S pero en menor cantidad. La globulina 11S y glutelina del amaranto difieren en su solubilidad en solventes acuosos (Abugoch *et al.*, 2003). Hoy en día existen varios procesos de extracción de concentrados proteínicos de amaranto, donde el principal interés es obtener productos con alto valor proteico y estos pueden ser modificados en función del pH (Tömösközi *et al.*, 2008). Por otra parte, una disminución en el valor nutricional de las proteínas se puede observar (Salcedo *et al.*, 2002). Las globulinas son una de las fracciones proteicas más importantes en las semillas de amaranto, junto con las albúminas tienen entre un 40 y 67% de la proteína total, mientras que las glutelinas un 44% y las prolaminas un 2%. Dentro de las albúminas sobresale la lisina, mientras que en las globulinas el ácido glutámico, metionina y la cistina. A diferencia de la prolaminas, donde presentan elevados valores la lisina y triptófano (Bressani and García, 1990).

De acuerdo al método de separación, y a las diferentes solubilidades de las proteínas presente en los cereales, se obtienen fracciones con propiedades funcionales y nutricionales particulares (Martínez and Añón, 1996). Bressani y

García (1990) evaluaron la extracción de las fracciones proteicas de tres especies de amaranto más comunes (*A. caudatus*, *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*). Cuando se utilizó una solución de NaCl como primer solvente de extracción y luego agua, la fracción de globulinas fue predominante en el grano, siendo 41 % del total de proteínas, seguida de glutelinas (31 %), prolaminas (10 %) y albúminas (8.4 %). En tanto, si el orden de extracción fuera invertido, la fracción albúmina pasa a ser un 20 % de las proteínas y las globulinas un 19 %.

Resultados parecidos demostraron Srivastava y Roy (2011), donde extrajeron las diferentes fracciones proteicas a diferentes pH's, a un pH 8 se extraen albúmina-1 y globulina principalmente, mientras que a un pH superior de 8, está presente albúmina-2, pequeñas fracciones de globulina, y glutelina. El aumento del pH para la extracción puede inducir cambios conformacionales en las proteínas. Mientras que variando el pH de precipitación la composición de los aislados proteicos de amaranto se pueden modificar. A pH's 6 y 7, hay una precipitación selectiva de la albúmina-2 y de algunas de las globulinas, mientras que a valores de pH 4 y 5, todas las fracciones de proteínas precipitan. Una acidificación menor de pH 5 causa cambios conformacionales en las proteínas, que parcialmente se invierten cuando el pH vuelve a 7. La composición y las características estructurales de la proteína de amaranto extraído a diversos valores de pH alcalinos y ácidos dependen de los solventes utilizados en la extracción

### **2.1.3 Métodos de extracción**

Los aislados proteicos son la forma comercial más purificada, se logran eliminando polisacáridos, oligosacáridos y algunos otros componentes ya sea por: hidrólisis y posterior precipitación, por adición de ácidos minerales, controlando los diferentes parámetros como: el pH, temperatura, solubilidad y otros, que permiten el enriquecimiento de la proteína requerida.

Se han publicado varios estudios sobre distintos procedimientos para obtener concentrados y aislados proteicos de amaranto y sobre la obtención de distintas fracciones proteicas y el efecto de las condiciones utilizadas en la preparación

sobre las propiedades funcionales, fisiológicas y tecnológicas de los aislados (Martínez and Añón, 1996; Salcedo *et al.*, 2002).

Dentro de la harina de amaranto, las proteínas se clasifican por su solubilidad en albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. En el Cuadro 3 se muestran las proteínas de reserva y los agentes extractantes que se utilizan para la obtención de estas.

**Cuadro 3.** Proteínas de reserva y agentes extractantes

<b>Clasificación</b>	<b>Solubilidad</b>
<b>Albúminas</b>	Soluciones salinas
<b>globulinas</b>	
<b>Prolaminas</b>	Soluciones alcohólicas al 70%
<b>Glutelinas (trigo)</b>	1% de ácido acético + propanol
<b>Residuo</b>	Agentes reductores

(Romero, 1995)

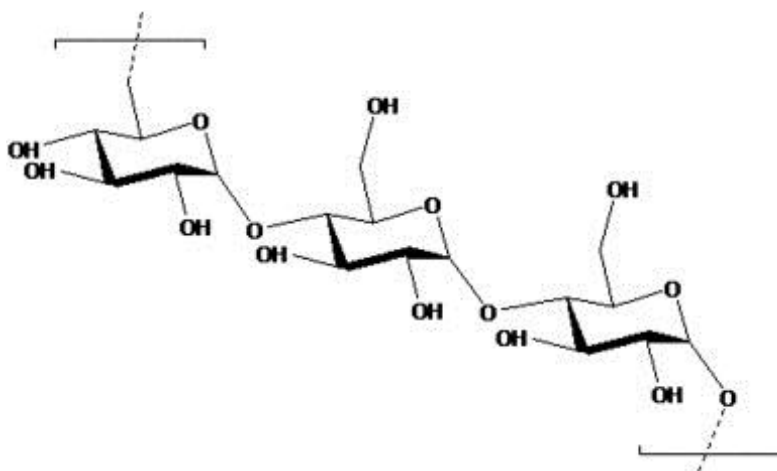
El proceso de aislamiento de las proteínas, se basa en las diferencias de solubilidad de las fracciones de globulina con respecto al pH. Existen varios métodos de extracción de aislados proteínicos, donde cada método se ve diferenciado por el rendimiento y las características que tiene cada concentrado. Actualmente se utilizan los siguientes métodos: (1) una extracción a pH 9 (convencional), (2) el empleo de un ácido de lavado previo a la extracción de proteínas, con el objetivo de reducir el contenido de compuesto fenólicos y disminuir así las interacciones proteína-fenol; y (3) un proceso térmico realizado con calentamiento moderado dirigido a contribuir al desarrollo de la proteína (Bejarano y Netto, 2010). El método que se encuentra ya estandarizado es el proceso convencional donde se obtienen aislados de proteína por una precipitación isoeléctrica, este método consiste en una extracción de proteína de la harina de semilla desgrasada con álcali diluido (pH 8-11), seguido por la precipitación de las principales fracciones de proteína en el punto isoeléctrico, que va desde pH 4.5 a 5.0. Es importante destacar que tanto la extracción alcalina y los procesos de precipitación ácidas pueden inducir cambios fisicoquímicos y

afectar las propiedades funcionales de una manera positiva o negativa. Al usar un pH mayor de 10 aumenta el rendimiento de la extracción (Bejosano y Corke, 1998) pero puede conducir a reacciones indeseables como la formación de lisinoalanina, lo que resulta en una reducción de la digestibilidad y valor biológico de la proteína (Finot, 1997). Por otro lado, la presencia de otros componentes, como los compuestos fenólicos, pueden interferir en la extracción de la proteína y limitar su uso en la industria alimentaria (Gamel *et al.*, 2006). Si se utiliza un pH 8, las proteínas no presentan buenas propiedades emulsionantes por lo que dificulta la formación de espuma (Tömösközi *et al.*, 2008). Se ha demostrado, que la albúmina de amaranto, que es la fracción principal, tiene una actividad emulsionante superior a pH 5, mientras que las globulinas tienen propiedades emulsionantes superiores a pH 7 (Silva *et al.*, 2004). Llegando a la conclusión que el uso de los aislados proteicos de amaranto en los alimentos se ve condicionada por el pH.

En recientes años se ha estudiado la posibilidad de electroestirar proteínas de origen vegetal y animal. Las proteínas, por su naturaleza son difíciles de electroestirar, debido principalmente a su estructura secundaria y terciaria, y a su interacción con el disolvente. Por lo que se han utilizado polímeros sintéticos que son capaces de electroestirar, de los que sobresalen el PVA (alcohol polivinílico) y PEO (óxido de polietileno), estos en combinación con proteínas como colágeno, seda, gelatina, zeína, proteína de soya, quitosano y queratina han logrado producir nanofibras por electroestirado (Nieuwland *et al.*, 2013). El pululano es uno de los polisacáridos de origen natural que se ha demostrado que forma nanofibras. Aceituno (2012) propuso el uso de aislados proteicos de amaranto en combinación con el pululano, para producir estructuras de nanofibras por la técnica de electroestirado, estas estructuras se contemplan como posibles nuevas morfologías dentro del procesamiento de fabricación y texturas para la proteína o las matrices de encapsulación como bioactivos para futuras aplicaciones en los alimentos funcionales.

## 2.2 PULULANO

El pululano es un polisacárido de origen microbiano (*Aerobasidium pullulans*) que es producido por la fermentación del almidón. Es un glucano lineal que consiste en unidades de maltotriosa (3 moléculas de glucosa unidas por enlace  $\alpha$  1-4) unidas por enlaces  $\alpha$  1-6 (Figura 1) (Kachawa *et al* 2003; Yuen 1974). Su patrón único de enlaces, le confieren al polímero propiedades adhesivas, capacidad para formar fibras y películas impermeables al oxígeno. Debido a sus excelentes propiedades, el pululano se utiliza como un ingrediente bajo en calorías en los alimentos, como agente gelificante, de revestimiento en envases para alimentos y medicamentos, aglutinante para fertilizantes y como agente para prevenir la oxidación en fármacos. Es soluble en agua, insoluble en disolventes orgánicos y no higroscópico. Sus soluciones acuosas son estables y muestran una viscosidad relativamente baja en comparación con otros polisacáridos. Se descompone a 250-280°C. No es tóxico, es comestible y biodegradable (Rezaul *et al*, 2009).



**Figura 1.** Estructura del pululano

El uso de pululano para fabricar fibras por electroestirado apareció recientemente (Sun *et al.*, 2013). Stijnman *et al.*, 2011 estudiaron las propiedades reológicas de una serie de polisacáridos incluyendo pululano. Las fibras de pululano se obtuvieron mediante el uso de dispersiones acuosas, y se lograron obtener nanofibras de escala nano y micrométrica. Por sus características para

electroestirar y por ser un polímero de origen natural, tiene una amplia aplicación para usarse en mezclas y formar nanofibras.

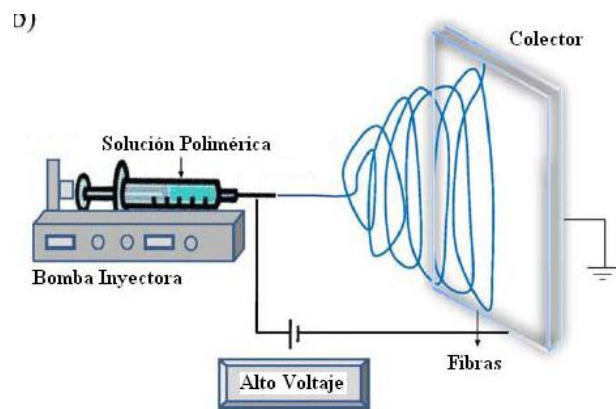
## **2.3 ELECTROESTIRADO**

En el desarrollo de estructuras ultrafinas poliméricas, una de las tecnologías que está despertando un enorme interés es la técnica basada en la aplicación de fuertes campos eléctricos, conocida como electroestirado. Entre las ventajas de esta técnica se menciona que es un proceso que se lleva a cabo en condiciones ambientales, permitiendo la encapsulación de agentes activos térmicamente inestables. El proceso de electroestirado es conocido por muchos años en la industria textil y en la ciencia de los polímeros orgánicos, y recientemente ha reaparecido como una nueva herramienta para la generación de nanocápsulas o nanofibras a base de biopolímeros, que pueden ser utilizados como vehículos de ciertas sustancias, estos biopolímeros pueden estar hechos ya sea de polímeros sintéticos o proteínas principalmente. La técnica de electroestirado utiliza un campo eléctrico de alta tensión para formar fibras sólidas de una corriente de fluido polimérico (solución o masa fundida) formando un jet que sale a través de una boquilla a escala de milímetro, de una jeringa. Obteniendo nanofibras con diámetros menores a 10 nm. Dependiendo del polímero que se utiliza, se puede obtener una amplia gama de propiedades tales como la resistencia, el peso, porosidad y la funcionalidad de la superficie principalmente. Esta novedosa técnica de electroestirado proporciona la capacidad de adicionar partículas insolubles, tales como agentes bacterianos o fármacos, a la solución de polímero para su encapsulación (Frenot and Chronakis, 2003).

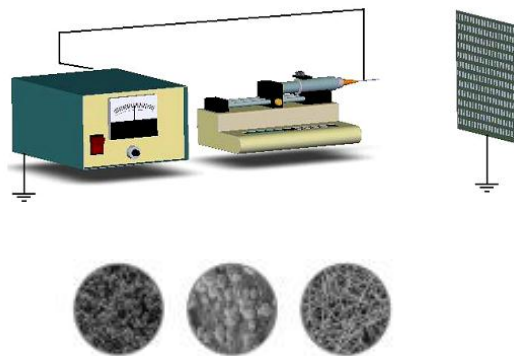
### **2.3.1 Técnica de electroestirado**

La técnica de electroestirado (Figura 2) se basa en la aplicación de un diferencial de potencial entre dos polos opuestos, conformados por una aguja o sistema de inyección y una placa metálica o colector, donde se depositan las estructuras

electroestiradas, que pueden ser fibras o capsulas, formando un tejido (Figura 3). Una disolución de polímero, que es previamente preparada, se carga en una jeringa de inyección que está conectada a una aguja. Una bomba de infusión o perfusión unida al émbolo de la jeringuilla genera una presión y produce un flujo constante de la disolución del polímero a través de la jeringa hasta la aguja. Por efecto de la polarización y de las cargas que son originadas por el campo eléctrico, la solución sale en forma de jet hacia una superficie conductora conectada con tierra, una placa metálica, que se encuentra entre 5 y 30 cm de distancia (Marín and Martínez, 2009).



**Figura 2.** Equipo de electroestirado (Frenot and Chronakis, 2003).



**Figura 3.** Estructuras obtenidas en la técnica de electroestirado (Aceituno *et al.*, 2012).

Las cargas en la superficie de la disolución que salen por la aguja, aumentan al incrementar el campo eléctrico hasta un valor umbral en el cual se desestabiliza la

forma de la gota, que pasa parcialmente de esférica a cónica, formando el llamado cono de Taylor. Durante el proceso, existen dos fuerzas que ejercen un papel antagonista, por una parte, la repulsión electrostática entre las cargas de la superficie generadas por la aplicación del alto voltaje, que tienden a romper las gotas de la disolución polimérica a la salida del proceso, y por otra parte, la atracción producida por la propia tensión superficial. Al momento de alcanzar un voltaje crítico, la generación del jet se produce cuando la fuerza de repulsión supera la tensión superficial. Durante la creación del jet, el solvente se va evaporando gradualmente, y el producto obtenido se deposita en forma de red de fibras, con un diámetro que se encuentra entre 50 nm y 10  $\mu$ m. Dependiendo de la disolución polimérica utilizada y las condiciones del procesos de electroestirado, tales como el voltaje aplicado y la distancia entre la aguja y el colector; se pueden obtener tanto fibras como cápsulas (electroatomizado) (Marín and Martínez, 2009).

### **2.3.2 Parámetros a considerar**

La técnica de electroestirado es un método eficaz y flexible para la producción de nanofibras, pero está influenciada por parámetros del sistema, proceso, y ambientales que son los que predominan en la morfología de las nanofibras (Pelipenko *et al*, 2013).

Existen parámetros que se deben de controlar en la técnica del electroestirado (Frenot and Chronakis, 2003), tales como:

- (i) Parámetros del sistema: el peso molecular y la estructura (ramificada, lineal, etc.) del polímero y la viscosidad, conductividad y la tensión superficial del disolvente.
- (ii) Parámetros del proceso: el potencial eléctrico, la tasa de flujo y la concentración, la distancia entre la aguja y la placa,
- (iii) Parámetros ambientales (temperatura, humedad y velocidad del aire en la cámara) y el movimiento de la placa colectora.



Si uno de los parámetros no se controla, en las fibras aparecen la formación de defectos o “beads”. La formación de perlas está relacionada con la inestabilidad del chorro de la solución de polímero, que a su vez depende de la corriente eléctrica. La viscosidad de la solución, la densidad de carga neta transportada por el chorro y la tensión superficial de la solución son los principales factores (Fong *et al.*, 1999).

Cabe mencionar que dentro de las características del disolvente este debe permitir una disolución completa del polímero. Los polímeros se clasifican de acuerdo a su hidrofiliidad. Los polímeros hidrofílicos, como los polisacáridos y algunas proteínas, han sido solubilizados en agua, ácidos fuertes o mezclas de agua con solventes orgánicos polares. Mientras que los polímeros hidrófobos, como la policaprolactona, son disueltos en solventes orgánicos (Chakraborty *et al.*, 2009).

Dentro de las disoluciones poliméricas, la viscosidad es un parámetro importante, ya que si la viscosidad de la disolución es muy baja (<800cP), durante el proceso de electroestirado en vez de nanofibras se obtienen partículas, debido al entrelazamiento de las cadenas moleculares lo que impide que el flujo sea continuo (Chakraborty *et al.*, 2009). A mayor viscosidad en la solución polimérica se favorece la formación de fibras lisas. Si la concentración del polímero cambia, puede variar la viscosidad de la solución (Fong *et al.*, 1999). Otro factor que influye es el peso molecular, ya que la longitud de la cadena es lo determina el entrecruzamiento con el disolvente.

Valores altos de tensión superficial conducen hacia la formación de defectos, por lo tanto, reducir la tensión superficial favorece la formación de fibras lisas. El coeficiente de tensión superficial depende del polímero y el disolvente. La densidad de carga neta transportada por el chorro en el proceso de electroestirado se ve afectada principalmente por el campo electrostático aplicado y en menor medida por la conductividad de la solución (Fong *et al.*, 1999).

Dentro de los parámetros del proceso, el voltaje aplicado definirá si se forman cápsulas o fibras, ya que a mayor voltaje aumenta la probabilidad de formación de

cápsulas, alterando la apariencia física de las fibras así como su cristalinidad, mientras a voltajes entre 6 y 20 kV se favorece la formación del cono de Taylor, esencial para la formación de fibras (Kriegel *et al.*, 2008). La velocidad de flujo tiene relación directa con el voltaje aplicado, cuando la velocidad de flujo aumenta, se incrementa el diámetro de la fibra o cápsula. Por lo que bajos flujos de alimentación son los deseables permitiendo la evaporación del disolvente y así evitando residuos de éste, que pueden ocasionar fusión entre las fibras (Ramakrishna *et al.*, 2005).

Pelipenko *et al.* (2013) en un estudio demostraron que el diámetro de las nanofibras se puede regular mediante el control de la humedad relativa durante el proceso de electroestirado. Valores bajos de humedad relativa provocan la rápida evaporación del disolvente provocando nanofibras más gruesas, mientras a valores altos de humedad relativa la evaporación del disolvente es lenta, resultando nanofibras más delgadas.

Actualmente el uso de la técnica de electroestirado se utiliza con una mezcla de polímeros de polisacáridos y proteínas. El electroestirado de proteínas es un reto, debido a su compleja composición química, su estructura tridimensional y su carácter polielectrolítico, lo cual incrementa el número de interacciones inter e intra moleculares. Sin embargo, proteínas de origen vegetal, como la zeína y la proteína del gluten han sido sometidas al proceso de electroestirado, obteniendo resultados favorables (Jiang *et al.*, 2007). No todos los polímeros son aptos para el electroestirado, en general las soluciones poliméricas que presentan un peso molecular muy alto o muy bajo no son aptas para ser sometidas al proceso de electroestirado. Como ya se ha mencionado el proceso depende de la viscosidad, el uso de un agente tensoactivo no iónico mejora el proceso de electroestirado y la morfología de las nanofibras. Estudios han demostrado que la relación polímero/tensoactivo puede ayudar a eliminar los granos o defectos en nanofibras y mejorar las propiedades mecánicas de estas junto con la adición de alcohol de polivinilo (Qiang *et al.*, 2008).

## 2.4 TENSOACTIVOS

Son sustancias que, añadidas en pequeña cantidad, disminuyen en gran medida la tensión superficial de la interfase agua-sustancia grasa. Los tensoactivos son moléculas orgánicas, constituidas por una parte hidrófoba y otra hidrofílica. La parte hidrófoba es una cadena hidrocarbonada alifática, y la parte hidrofílica va en función al tipo de tensoactivo, si la cadena lleva un grupo aniónico (sulfato o sulfonato) es un tensoactivo aniónico; un grupo catiónico, como un amonio cuaternario, es un tensoactivo catiónico; y si lleva un grupo sin carga iónica, como una amida o una cadena oxietilenada, son tensoactivos no iónicos. Los tensoactivos anfotéricos, normalmente llevan en su cadena una betaína o sulfobetaína (Mencías and Mayer, 2000).

La mayoría de los tensoactivos son líquidos viscosos, suspensiones o soluciones; pero hay algunos sólidos en forma de cristales, hojuelas o ceras (Fuentes and Román, 1980).

### 2.4.1 Clasificación

Como ya se había mencionado, según sea su ionización, en el agua, es decir, la hidrofiliidad (Fuentes and Román, 1980), los tensoactivos pertenecen a uno de los tres grupos:

(i) Iónicos:

**Aniónicos** (si su carga es negativa). Pueden ser sulfonatos alquilaromáticos, ésteres sulfúricos o alquilsulfonatos. Y los grupos hidrofílicos asociados a estos tensoactivos son un grupo sulfo ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ), grupo éster sulfúrico ( $-\text{OSO}_3\text{H}$ ) o grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ). Cada grupo hidrofílico está unido a una porción lipofílica.

**Catiónicos** (con carga positiva). Son derivados del amonio ( $\text{NH}_3$ ), y se conocen como sales cuaternarias de amonio

(ii) Anfotéricos, actúan como tensoactivos iónicos o no iónicos, según sea la acidez de la solución.

(iii) No iónicos, no se ionizan en soluciones acuosas. Son principalmente derivados de polioxietileno (polioxietileno alquil fenoles) y polioxipropileno. Estos tensoactivos están constituidos por una cadena hidrocarbonada lipofílica (alquilfenoles y ácidos grasos) con su alcohol unida a una segunda cadena que es hidrofílica y compuesta de grupo oxietilenos ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ). En solución acuosa las moléculas de agua forma puentes de hidrógeno con el oxígeno éter ( $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$ ) del grupo oxietileno. Entre más grupos de oxietileno estén formando la cadena, mayor será la afinidad con el agua, por lo tanto mayor solubilidad.

Este tipo de surfactantes se puede identificar por la relación entre la longitud de las cadenas hidrofílicas y lipofílicas, conocida como Balance Hidrofílico/Lipofílico (HLB) (Fuentes and Román, 1980).

#### **2.4.2 Características**

Los agentes tensoactivos tienen aplicaciones prácticas como agentes humectantes, dispersantes, defloculantes, detergentes, emulsificadores, suspensores y solubilizantes. Cualquier tensoactivo presenta todas estas propiedades en algún grado, pero, en general, domina una de ellas sobre las demás, lo cual hace que se restrinja el empleo de cada agente a una aplicación determinada.

- Agente humectante

Es un tensoactivo que, cuando se disuelve en el agua, hace disminuir el ángulo de contacto y ayuda a desplazar la fase aérea de la superficie, reemplazándola por otra líquida. La acción más importante de un agente humectante es la de disminuir el ángulo de contacto entre el líquido y la superficie en que se apoya, entendiendo por ángulo de contacto el ángulo que existe entre la superficie de una gotita líquida y la superficie sobre la cual se encuentra. El ángulo de contacto entre un líquido y un sólido puede variar desde  $0^\circ$ , señal de que el líquido moja completamente al sólido, hasta aproximarse a  $180^\circ$ , cuando la acción humectante es insignificante; pudiendo también presentar cualquier valor intermedio entre estos límites. Para

que un agente humectante actúe con eficacia, es decir, para que presente un ángulo de contacto pequeño, deberá tener un valor HLB alrededor de 6 a 9.

- Agentes solubilizantes

Los agentes solubilizantes son compuestos anfifílicos que permiten preparar disoluciones acuosas, de concentración un tanto elevada, de sustancias inmiscibles o parcialmente miscibles con el agua.

- Agentes espumantes y antiespumantes.

Muchas disoluciones de agentes tensoactivos producen espumas estables cuando se mezclan íntimamente con el aire. La espuma es una estructura relativamente estable formada por bolsas o burbujas de aire encerradas en el interior de películas delgadas de líquido, es decir, una dispersión de un gas en un líquido que se estabiliza por medio de un agente espumante. La espuma se disipa o deshace a medida que se va eliminando el líquido de la zona que rodea a las burbujas de aire, pues finalmente la película líquida colapsa. Los agentes antiespumantes, como el alcohol, éter y aceite de ricino pueden emplearse para destruir la espuma.

- Detergentes.

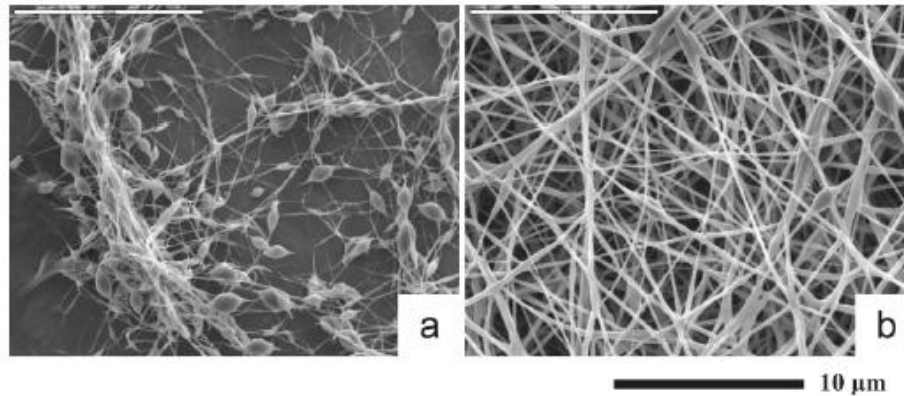
Los detergentes son agentes tensoactivos que se emplean para separar la suciedad de cualquier tipo de superficie. La detergencia es un proceso complejo, por el cual se separan las sustancias extrañas de las superficies, en el que están incluidas muchas de las acciones características de los agentes tensoactivos específicos, como el mojar, inicialmente, la suciedad y la superficie que va a ser limpiada, la defloculación y suspensión, la emulsificación o solubilización de las partículas de suciedad y, algunas veces, la formación de la espuma para extraer y eliminar las partículas extrañas.

- Acción antibacteriana de los agentes tensoactivos.

La actividad antibacteriana de los agentes tensoactivos, en particular la de los compuestos cuaternarios, que es bien conocida, depende no sólo de los fenómenos interfaciales, sino también de otros importantes factores. Estos agentes son adsorbidos sobre la superficie celular, y se supone que produce la destrucción de las células al aumentar la permeabilidad de la membrana celular lipóidea. Por tanto, la muerte de los microorganismos es debida a la pérdida de sustancias esenciales para la vida celular. Tanto los microbios Gram positivos como los Gram negativos son sensibles a la acción de los compuestos cuaternarios catiónicos; sin embargo, las bacterias Gram positivas son atacadas con más facilidad por los agentes aniónicos que las Gram negativas. Los tensoactivos no iónicos son los agentes antibacterianos menos eficaces, ya que, en realidad, éstos favorecen, en lugar de inhibir, el crecimiento de las bacterias, posiblemente por proporcionar los ácidos grasos de cadena larga en una forma tal que son metabolizados con facilidad por el microorganismo.

### **2.4.3 Acción de los tensoactivos en el electroestirado**

Estudios anteriores mencionan el uso de tensoactivos en la solución polimérica para disminuir la presencia de defectos en las fibras, como se observa en la Figura 4 (Talwar *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2008; Wongsasulak *et al.*, 2010; Aceituno *et al.*, 2012). El empleo de tensoactivos está relacionado con el efecto que causa la unión de estos monómeros al esqueleto de la cadena proteica en la disminución de su carácter polielectrolítico y la tensión superficial (Kriegel *et al.*, 2009).



**Figura 4.** SEM de imágenes de nanofibras en solución de óxido de polietileno (PEO)/polímero HASE. A) Sin tensoactivo B) Con NP15 tensoactivo no iónico (Talwar *et al.*, 2010).

Diversos autores sugieren el uso de tensoactivos no iónicos (Talwar *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2008; Wongsasulak *et al.*, 2010; Aceituno *et al.*, 2012; Kriegel *et al.*, 2009), ya que tienen una importante influencia en las interacciones hidrófobas con los polímeros. La adición de tensoactivos a las soluciones de polímero conduce a una ligera mejora en la conductividad que se puede atribuir a la existencia de grupos polares existentes en la estructura de los tensoactivos. También tiene una influencia en la reología del polímero, como en las propiedades viscoelásticas (Talwar *et al.*, 2010). La mezcla de un tensoactivo no cargado y un polímero cargado (proteína con ácido fórmico) posibilita la formación de complejos que pueden retener su carga total y mantener interacciones intra e intermoleculares del tipo puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas. Así mismo, estos tensoactivos pueden generar cambios en la conformación del polímero, el cual puede asumir una estructura más abierta que podría afectar la concentración crítica para lograr el entrecruzamiento entre las cadenas y facilitar el proceso de electroestirado (Aceituno, 2012).

Wang *et al.*, (2008) concluyen que la tensión superficial es otro de los factores importantes que afecta a la morfología de las nanofibras y su proceso de electroestirado, por lo que sugieren el uso de tensoactivos, con la finalidad de reducir significativamente la tensión superficial, obteniendo nanofibras más pequeñas.

Es bien conocido que una alta tensión superficial de la solución de polímero puede favorecer la formación de perlas. Aceituno *et al.* (2012) en un estudio realizado para la elaboración de nanofibras a base de proteína de amaranto mencionan que la alta tensión superficial de las soluciones de aislado proteico junto con ácido fórmico podría contrarrestar las fuerzas eléctricas, evitando así la expulsión con éxito de un chorro constante de la solución polimérica desde la punta de la jeringa hasta la placa recolectora, teniendo la formación de perlas. Con el fin de reducir la tensión superficial de la solución de proteína de amaranto con ácido fórmico, adicionaron Tween 80, un tensoactivo de grado alimentario no iónico, mejorando significativamente así la morfología de las estructuras de electroestirado, la cual parece estar relacionada con la disminución de la conductividad de las soluciones. La reducción en la conductividad puede ser explicada por la unión de monómeros de tensoactivo a la cadena principal del aislado proteico de amaranto, reduciendo de este modo su carácter polielectrolítico (Kriegel *et al.*, 2009).

En el mismo estudio se realizó una evaluación del efecto de electroestirado con un tensoactivo aniónico, estearoil lactato de sodio, donde observaron que éste no era solubilizado en la solución de ácido fórmico con aislado proteico (Aceituno *et al.*, 2012). Esto podría ser atribuido a las interacciones entre las cargas negativas de los tensoactivos con las cargas positivas de la proteína, generando complejos insolubles entre el polímero y el surfactante separándose rápidamente de la solución. También observaron que la conductividad se redujo significativamente, lo que parece ser un factor clave para explicar la mejora morfológica de los materiales obtenidos por electroestirado. La reducción en conductividad podría explicarse por la unión de monómeros del tensoactivo a la estructura del aislado proteico de amaranto, reduciendo de este modo el carácter polielectrolítico (Kriegel *et al.*, 2009).



### **3. JUSTIFICACIÓN**

La búsqueda de nuevas aplicaciones tecnológicas para la industria alimentaria a partir de un producto mexicano, como el amaranto, ha permitido hoy en día el desarrollo de nuevos productos que incluyan a su proteína como un ingrediente de alto valor nutricional. La técnica de electroestirado recientemente ha cobrado importancia dentro de la industria farmacéutica y alimentaria ya que permite la formación de nanofibras que se pueden utilizar como vehículos de encapsulación de activos, tales como antioxidantes, vitaminas, entre otros, convirtiéndose en sistemas acarreadores estables, seguros y de liberación controlada dentro de un alimento o fármaco, ayudando así a retardar, prevenir o inhibir reacciones de oxidación. Estudios recientes mencionan el uso del aislado proteico de amaranto como un ingrediente potencial para formar nanofibras mediante la técnica de electroestirado. Sin embargo la obtención de este aislado resulta ser un método costoso y tardado. En este proyecto se propone el poder usar fracciones previas a la obtención del aislado proteico de amaranto, así como dos asilados proteicos, uno obtenido de la harina de amaranto y el otro proporcionado por un distribuidor, como material para la formación de nanofibras. Estos en combinación de tensoactivos, se propone el desarrollo de nanofibras estables y seguras, que en un futuro permitan ser aplicadas como sistemas encapsulantes, películas que proporcionen protección a los alimentos o como empaques que permitan desempeñar varias funciones (barrera, conservador, antimicrobiano, etc).

## **4. HIPÓTESIS**

Las soluciones con las fracciones previas a la obtención del aislado proteico de amaranto, pululano y tensoactivos no iónicos presentarán propiedades fisicoquímicas adecuadas para ser electroestiradas generando nanofibras.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 General**

Evaluar el potencial de las fracciones proteicas de amaranto y el uso de tensoactivos para la formación de nanofibras mediante la técnica de electroestirado.

### **5.2 Específicos**

1. Obtención de las diferentes fracciones proteicas de la harina de amaranto, mediante el método de precipitación isoeléctrica.
2. Evaluar las diferentes fracciones proteicas de la harina de amaranto aptas para el proceso de electroestirado.
3. Evaluar el uso de tensoactivos no iónicos en las fracciones proteicas seleccionadas.
4. Caracterizar fisicoquímicamente los sistemas formadores de nanofibras.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 MATERIALES**

Ácido fórmico con 95% de pureza. Tensoactivos no iónicos: Tween 80 (Monooelato de polioxietileno sorbitán), Span 20 (Monolaurato sorbitan), Tergitol NP-10 (nonil fenol polietilen glicol eter), Triton X-100 (octil fenol etoxilato) y pululano, fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

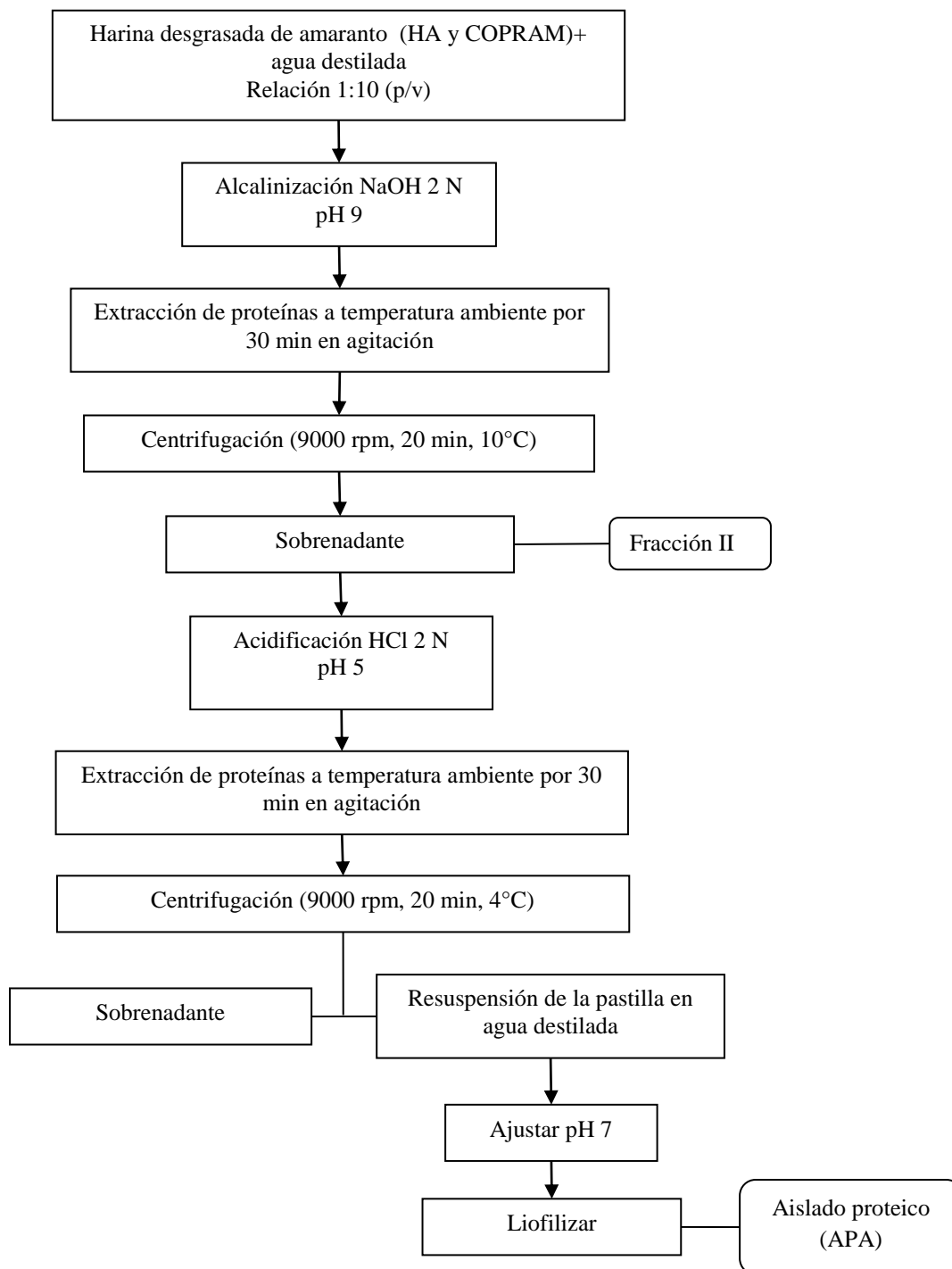
### **6.2 ACONDICIONAMIENTO DE LA HARINA DE AMARANTO**

El concentrado proteico fue obtenido de Nutrisol, San Miguel de Proyectos Agropecuarios S.P.R. de R.S. (SMPA). El grano de amaranto (*A. hypochondriacus*) fue proporcionado por el INIFAP unidad Querétaro. El grano de amaranto se molió con un molino de cuchillas y se pasó por una malla no. 40. La harina se secó en un horno de convección (ShellLab, modelo 1600 HAFO Series) a 50°C por 40 min para eliminar la mayor parte de humedad. Tanto el COPRAM como la harina se desengrasaron con hexano en proporción 1:10 (p/v) por 8 h mediante Soxhlet. Trascurrido ese tiempo las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron a 4°C hasta su futuro uso.

### **6.3 OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES PROTEICAS POR PUNTO ISOELÉCTRICO**

En el esquema mostrado en la Figura 5, se muestra el tratamiento al que se sometió la harina de amaranto (HA) y el concentrado proteico (COPRAM), ambos desengrasados. El objetivo de realizar extracciones a diferente pH fue observar el perfil de solubilidad de las proteínas de harina de amaranto. Al realizar una precipitación con pH 9 se tiene una máxima solubilidad de las proteínas, las globulinas se encuentran presentes entre el 70 y 80% en la harina de amaranto, el residuo (pastilla) contiene principalmente polisacáridos insolubles que se eliminan por centrifugación, incluyendo la fibra. Mientras que el extracto obtenido (sobrenadante) se llevó una precipitación ácida a pH 5 obteniéndose una

solubilidad entre el 15 y 50 %. Cabe mencionar que el punto isoeléctrico de las proteínas de amaranto se encuentra entre 5 y 6 donde existe una menor solubilidad de estas (Marccone and Kakuba, 1990 & Salcedo 2004). Como tratamiento final la proteína se lava y neutraliza obteniéndose el aislado proteico.



**Figura 5.** Extracción de proteínas (Martínez and Añón, 1996).

## 6.4 ELECTROFORESIS

El peso molecular del polímero (fracción proteica) es uno de los principales factores que intervienen en el proceso de electroestirado (Aceituno, 2012). Por lo que se realizó una electroforesis SDS-PAGE tanto en condiciones reductoras y no reductoras. Se busca la obtención de proteínas con pesos moleculares de 10 a 83 kDa para ser utilizadas en la técnica de electroestirado. Se prepararon dos minigeles de 0.75 mm de espesor, cada uno con un gel concentrado de 2 cm de longitud, con sus respectivos pocillos y un gel separador de 6 cm. Las cantidades que se prepararon el gel concentrador y separador se muestran en los Cuadros 5 y 6, respectivamente. 10 mg de cada fracción proteica se disolvieron en una solución amortiguadora (Cuadro 7) y se agregó 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol a la solución amortiguadora donde se disuelven las muestras. Estas muestras se calentaron por 1 minuto a 100°C en un baño seco. Las bandas de proteína se visualizaron por tinción con azul de Coomasie.

**Cuadro 4.** Gel concentrador al 4% de acrilamida en solución amortiguadora

Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8

	10 ml
0.5M Tris-HCl pH 6.8	2.5 ml
SDS 10%	0.1 ml
Acrilamida/bisacrilamida 30%	1 ml
APS 10%	0.100 ml
TEMED	0.005 ml
Agua destilada	Hasta completar los 10 ml

**Cuadro 5.** Gel separador al 15% de acrilamida en solución amortiguadora

Tris HCl 1.5 M, pH 8.8

	10 ml
0.5M Tris-HCl pH 8.8	2.5 ml
SDS 10%	0.1 ml
Acrilamida/bisacrilamida 30%	4.3 ml
APS 10%	0.05 ml
TEMED	0.005 ml
Agua destilada	Hasta completar los 10 ml

**Cuadro 6.** Solución amortiguadora de la muestra

	10 ml
0.5M Tris-HCl pH 6.8	1 ml
Glicerol	0.8 ml
SDS 10%	1.6 ml
Azul de bromofenol 1%	0.4 ml
$\beta$ -mercaptoetanol (condiciones reductoras)	0.34 ml
Agua destilada	3 ml

## 6.5 DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES

La determinación de los carbohidratos totales se realizó por el método de Dubois (1958). Debido a que las fracciones como los aislados proteicos no se solubilizan totalmente en agua, las muestras sufrieron un proceso de filtración. Posteriormente las muestras se diluyeron a 2000x. Se calculó la cantidad de carbohidratos totales presentes en las muestras a partir de la curva patrón de glucosa, el intervalo del método 5-300  $\mu\text{g/ml}$ . Una vez realizada la curva patrón se

tomaron las absorbancias obtenidas a la longitud de onda de 490 nm (Spectra Max 602) y se estableció la ecuación para el cálculo de las concentraciones.

## **6.6 PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN POLIMÉRICA**

Para la obtención de nanofibras se preparó la disolución polimérica, que consistió de una mezcla del aislado proteico de amaranto (APA) y pululano (Pul) en una relación 75:25(APA:Pul) respectivamente, y otra de Fracción 2 (Frac 2) y pululano (Pul) 50:50 (Frac2:Pul) utilizando ácido fórmico como solvente . Se adicionó un tensoactivo no iónico (Ta) al 30 y 40% (Tween 80, Tergitol NP-10, Tritón X-100, Span 20) en función de la proteína, para obtener una mejora en la morfología de los encapsulados y en la capacidad de electroestirado (Aceituno, 2012).

### **6.6.1 Diseño experimental**

Se utilizó un diseño experimental en mezclas con proporciones variables de APA HA, APA COPRAM, Frac 2 HA, Frac 2 COPRAM, Pululano, tensoactivos no iónicos (Tween 80, Tergitol NP 10, Tritón X-100, Span 20), en proporciones de APA:Pul:Ta (75:25:30 y 40%) y Frac2:Pul:Ta (50:50:30 y 40%). Considerando los objetivos de la investigación se construyó el diseño experimental de tal manera que permitiera la estimación de efectos triples, obteniéndose un total de 16 mezclas experimentales, las cuales fueron realizadas por triplicado (Cuadros 7 y 8).



---

**Cuadro 7.** Diseño experimental de las mezclas de soluciones poliméricas de la fracción 2.

---

Mezcla	Fracción 2	Tensoactivo	Concentración de tensoactivo
1	HA	Tween 80	30
2	HA	Tween 80	40
3	COPRAM	Tween 80	30
4	COPRAM	Tween 80	40
5	HA	Tergitol	30
6	HA	Tergitol	40
7	COPRAM	Tergitol	30
8	COPRAM	Tergitol	40
9	HA	Tritón	30
10	HA	Tritón	40
11	COPRAM	Tritón	30
12	COPRAM	Tritón	40
13	HA	Span	30
14	HA	Span	40
15	COPRAM	Span	30
16	COPRAM	Span	40

---

---

**Cuadro 8.** Diseño experimental de las mezclas de soluciones poliméricas del aislado proteico.

---

Mezcla	APA	Tensoactivo	Concentración de tensoactivo
1	COPRAM	Tween 80	30
2	COPRAM	Tween 80	40
3	HA	Tween 80	30
4	HA	Tween 80	40
5	COPRAM	Tergitol	30
6	COPRAM	Tergitol	40
7	HA	Tergitol	30
8	HA	Tergitol	40
9	COPRAM	Tritón	30
10	COPRAM	Tritón	40
11	HA	Tritón	30
12	HA	Tritón	40
13	COPRAM	Span	30
14	COPRAM	Span	40
15	HA	Span	30
16	HA	Span	40

---

## 6.7 CARACTERIZACIÓN DE LAS SOLUCIONES

La viscosidad, conductividad y tensión superficial de las soluciones poliméricas tienen un papel determinante en el tamaño de la fibra y morfología durante el proceso de electroestirado. La viscosidad de las soluciones se determinó utilizando un reómetro modelo Physica MCR 101 (Anton Para). Las mediciones de

conductividad se realizaron utilizando un conductímetro marca Orion Star A212 (Thermo Scientific). Para la tensión superficial se utilizó un tensiómetro marca Sigma modelo 703 (KSV Instruments Ltd., Helsinki, Finland).

## **6.8 TÉCNICA DE ELECTROESTIRADO**

El aparato de electroestirado está equipado con una fuente de alto voltaje, que proporciona un voltaje variable entre 0-30 kV marca Acopian, modelo PO30HP1-230, el cual corresponde al ánodo, éste se une a una aguja de acero inoxidable con un diámetro interior de 0.9 mm que conecta mediante un cable de PTFE a las disoluciones de bipolímeros contenidas en una jeringa de plástico de 5 ml. La jeringa se conectó al electrodo de polaridad positiva, que a su vez se encuentra conectado a la fuente de alto voltaje. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Las condiciones de voltaje fueron a 22 kV, a una distancia de la aguja al colector de 10 cm y con un flujo de alimentación de 0.4 ml/h.

## **6.9 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS NANOFIBRAS**

### **6.9.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

La capacidad de detectar el tamaño de diámetros y la morfología de las fibras electroestiradas se examinó utilizando la microscopía electrónica de barrido (SEM; Modelo EVO-50, Marca Carlo Zeiss) para obtener mejores condiciones de imagen se recubrieron las nanofibras con una capa de oro, utilizando vacío. Todos los experimentos se realizaron a 10 kV. El diámetro de las estructuras se obtuvo del promedio de 100 mediciones empleando el software ImageJ.

### **6.9.2 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)**

La topografía y la superficie se observaron mediante el Microscopio de Fuerza Atómica (Nanoscope IV Dimension 3100 de Digital Instruments-Bruker), en modo Tapping, con una punta corta de DLC, a una frecuencia de trabajo de 298 kHz y 256 de resolución, con un Scan Rate de 0.5 Hz y un drive amplitud de 2583 mV. Las imágenes obtenidas por AFM se analizaron por medio del software Gwyddion y, se obtuvo un promedio de 10 mediciones por muestra.

### **6.9.3 Espectroscopía Infrarroja con Reflectancia Difusa (DRIFTS)**

Esta técnica permite la obtención de espectros en muestras difíciles como polvos, fibras, adhesivos, entre otros, y nos permite la caracterización de la estructura molecular. Como tratamiento previo, las muestras se molieron con nitrógeno líquido para facilitar la medición. Los espectros de reflectancia difusa se tomaron en un espectrofotómetro de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) Spectrum GX de Perkin Elmer con microscopio acoplado AutoIMAGE. Para la obtención de los espectros se formaron pastillas con 12 mg de muestras y 202 mg de KBr. Los espectros obtenidos fueron analizados mediante el software Oppus.

## **6.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó un análisis de varianza con 95% de nivel de confianza. Para el diseño estadístico experimental de las mezclas se realizaron la estimación de efectos triples, así como la comparación de medias a través del estadístico de prueba de Tukey. Los resultados obtenidos se analizaron en el software JMP 8.0

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **7.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES Y DEL AISLADO PROTEICO**

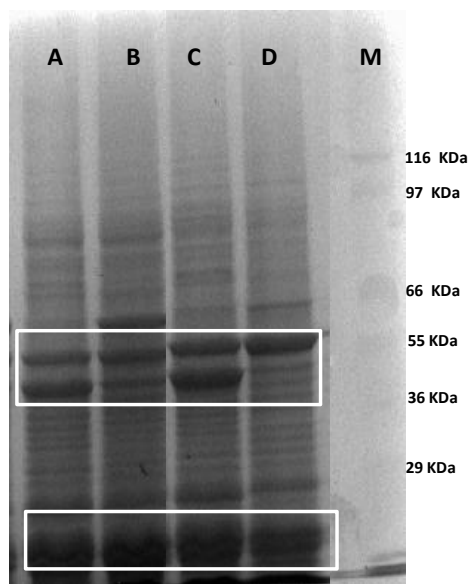
#### **7.1.1 Proteína**

El contenido de proteína reportado en la harina de amaranto se encuentra entre 12 y 18% (Martínez and Añón, 1996). En el presente trabajo, el contenido de proteína de las fracciones proteicas, tanto para COPRAM como para HA, fueron de 22.37% y 26.35%, respectivamente. Estos valores son mayores al contenido de proteínas presentes en la harina de amaranto, esto era de esperarse ya que durante el proceso de extracción se eliminan otros componentes como algunos carbohidratos y fibra, facilitando la solubilidad de la proteína.

Para los aislados proteicos, el contenido de proteína de APA-COPRAM y APA-HA fue de 70% y 68%, respectivamente. Estos resultados son menores a lo reportado por Aceituno (2012), quien reportó un 85% de proteína para los aislados; mientras que, Abugoch *et al* (2010) y Martínez y Añón (1996) reportaron valores entre el 80 y 90% de proteína. Estas diferencias puede deberse que durante el proceso de purificación, las proteínas no se lograron solubilizar adecuadamente.

Tomando en cuenta que el peso molecular del polímero es uno de los factores principales que interviene en la obtención de fibras, se determinaron los pesos moleculares de las fracciones y del aislado proteico por gel de electroforesis en condiciones reductoras (Figura 6). Las columnas C y D corresponden a los aislados proteicos, APA-COPRAM y APA-HA respectivamente, y las columnas A y B corresponden a las fracciones Frac2-COPRAM y Frac2-HA, respectivamente. En general, los aislados proteicos y las fracciones presentan pesos moleculares semejantes entre 10 y 90 kDa. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Aceituno (2012) y Martínez y Añón (1996) quienes evaluaron los pesos

moleculares de aislado proteico de amaranto utilizando la misma técnica, obteniendo pesos que van de 10 a 80 kDa.



**Figura 6.** Gel representativo de electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras: M) Marcador de peso molecular; A) Fracción-COPRAM; B) Fracción2-HA; C) Aislado proteico de amaranto-COPRAM; D) Aislado proteico-HA

Las proteínas de la harina de amaranto se han caracterizado con base en la clasificación de Osborne, aunque existe discrepancia sobre cuál es la fracción mayoritaria, esto debido a los diferentes métodos y solventes de extracción empleados. En general, el contenido de albúminas varía del 19 al 45%, el de globulinas (11S y 7S) del 16 al 35%, de prolaminas de 0.7 a 1.3%, y el de glutelinas de 22 a 41% (de la Rosa *et al.*, 1992a). En el perfil electroforético, tanto para las fracciones como para los aislados, se observan bandas de 36 a 55 kDa, que corresponden a las albúminas (35 kDa) y globulina 11s. Las albúminas representan una fracción importante de las proteínas de reserva. En el amaranto existen dos clases de globulinas, 7s y 11s, siendo la 7s la que tiene mayor peso (141-170 kDa). Mientras que la 11s consiste de dos subunidades ácidas (35-37 kDa) y básicas (18-20 kDa) (Konishi *et al.*, 1985). También se observan bandas menores de 20 kDa; éstas pueden corresponder a las glutelinas, ya que éstas

tienen un perfil electroforético similar al de las globulinas 11s mostrando bandas principales entre 50, 30 y 20 kDa.

Se puede decir que las fracciones y los aislados se encuentran presentes proteínas con pesos moleculares que van de 10 a 90 kDa, y corresponden a la fracciones de albúminas, globulinas 11S y glutelinas. Fue importante conocer el peso molecular de las fracciones y de los aislados, ya que tienen una gran influencia en el proceso de electroestirado. Generalmente, polímeros con pesos moleculares altos aumentan la resistencia para ser solubilizadas. Se ha encontrado que el peso de los polímeros tiene una relación directa con la viscosidad, puesto que la longitud de polímero determina la cantidad de redes de las cadenas de polímero en el disolvente (Ramakrishna *et al.*, 2005). Las proteínas son difíciles de someterse al proceso de electroestirado, debido a su compleja estructura secundaria y terciaria. Para que las proteínas sean formadoras de fibras, su forma espiral se debe de disolver al azar alterando las interacciones inter e intra moleculares. Las proteínas globulares se caracterizan por tener muy poca interacción una con otra; por lo tanto, en el proceso de electroestirado es difícil formar una estructura enredada (van den Heuvel *et al.*, 2013).

### **7.1.2 Carbohidratos**

El método fenol-sulfúrico propuesto por Dubois *et al* (1956) se fundamenta en que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas. Bajo estas condiciones, una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con una deshidratación simple, se continúa el calentamiento y la catálisis ácida produce varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos coloridos, producto de la condensación de compuestos fenólicos. Todos los azúcares, como oligosacáridos y polisacáridos, pueden determinarse, recordando que éstos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos (Nielsen, 1998).

La harina de amaranto tiene aproximadamente un 60% de carbohidratos, de los cuales el almidón es el componente mayoritario. El contenido de almidón de los granos del género *Amaranthus* varía entre 55 y 60g/100g de su peso, siendo la amilosa (97%) la que se encuentra en mayor proporción a comparación de la amilopectina (3%) (Villareal *et al.*, 2013; Paredes *et al.*, 1989).

Los cálculos realizados para la curva de calibración y para las concentraciones de las muestras se presentan en el apartado Anexo 1. La curva de calibración obtenida arrojó una R de 0.993 (Ver Anexo 1). En el Cuadro 9 se muestran las concentraciones de azúcares totales que contienen las muestras.

<b>Cuadro 9.</b> Concentración de azúcares totales en las muestras	
Muestra	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )
APA-HA	131.74
APA-COPRAM	122.42
F2-HA	141.70
F2-COPRAM	127.56

El valor representa la media de repetición  $\pm$  su error estándar.

Existen estudios, que utilizan condiciones alcalinas con NaOH para extraer el almidón presente en la semilla y harina de amaranto (Villareal *et al.*, 2013). Durante el proceso de extracción proteica en el presente trabajo, se comenzó con una extracción alcalina, lo cual aseguró extraer la mayor parte del almidón presente. Las concentraciones de glucosa que se observan en el Cuadro 9, pueden derivar de azúcares no tan complejos, como pueden ser oligosacáridos o azúcares



simples. Existe la posibilidad que no haya una completa extracción del almidón al momento de obtener los aislados y fracciones.

Algunos estudios mencionan el uso de almidones para producir nanofibras (Kong and Ziegler, 2014; Sunthornvarabhas *et al.*, 2011; Stijnman *et al.*, 2011), al igual que polisacáridos como la celulosa, el alginato, quitosano, gelatina, pululano, entre otros (Stijnman *et al.*, 2011; Wongsasulak *et al.*, 2010; Yong *et al.*, 2009). Kong *et al* (2009) señalan la importancia de un buen disolvente para formar fibras electroestiradas a partir de carbohidratos, el cual debe de ser capaz de disolver el almidón y otros carbohidratos, por ejemplo, la estructura de la amilosa en el solvente adecuado cambia de una conformación de espiral al azar a una forma extendida, lo que facilita el entrelazamiento en el proceso de electroestirado.

Por lo anterior, se puede sugerir que la presencia de pequeñas concentraciones carbohidratos dentro de las fracciones y de los aislados en las mezclas realizadas puede favorecer el proceso de electroestirado.

## **7.2 CARACTERIZACIÓN DE LA SOLUCIÓN POLIMÉRICA**

El proceso de electroestirado se ve afectado por varios parámetros, entre ellos los parámetros de la solución, los del proceso y ambientales. Dentro de los parámetros de la solución se incluyen la viscosidad, la tensión superficial y la conductividad. Estos parámetros afectan significativamente las morfologías de las fibras. En los Cuadros 10 y 13 se presentan los resultados de la caracterización fisicoquímica de las soluciones poliméricas tanto para las fracciones como para los aislados proteicos.

### **7.2.1 Viscosidad**

La viscosidad de la solución tiene un papel importante en la determinación del tamaño y morfología de la fibra. Se ha reportado que a viscosidades bajas no hay

formación de fibra continua, y a viscosidades altas es difícil la formación del cono de Taylor durante el proceso de electroestirado.

**Cuadro 10.** Mediciones de viscosidad y conductividad de las soluciones poliméricas de los aislados proteicos

	Tensoactivo	Concentración de tensoactivo (%)	Viscosidad (cP)	Conductividad (mS/cm)
APA COPRAM	Tween	30	39.32 ± 3.01 <sup>e</sup>	1.59 ± 0.01 <sup>b</sup>
		40	63.33 ± 1.47 <sup>bc</sup>	1.14 ± 0.18 <sup>c</sup>
	Tergitol	30	73.59 ± 3.84 <sup>ab</sup>	4.35 ± 0.07 <sup>a</sup>
		40	67.64 ± 2.45 <sup>bc</sup>	1.38 ± 0.06 <sup>bc</sup>
	Tritón	30	74.71 ± 0.77 <sup>ab</sup>	4.69 ± 0.34 <sup>a</sup>
		40	73.51 ± 3.54 <sup>ab</sup>	1.56 ± 0.08 <sup>bc</sup>
	Span	30	76.86 ± 6.32 <sup>ab</sup>	4.56 ± 0.07 <sup>a</sup>
		40	64.74 ± 2.47 <sup>bc</sup>	1.36 ± 0.07 <sup>bc</sup>
APA HA	Tween	30	82.3 ± 0.61 <sup>a</sup>	4.49 ± 0.01 <sup>a</sup>
		40	76.76 ± 7.48 <sup>ab</sup>	4.61 ± 0.05 <sup>a</sup>
	Tergitol	30	65.74 ± 4.05 <sup>bc</sup>	4.48 ± 0.02 <sup>a</sup>
		40	57.60 ± 0.96 <sup>cd</sup>	4.68 ± 0.03 <sup>a</sup>
	Tritón	30	58.45 ± 4.54 <sup>cd</sup>	4.50 ± 0.05 <sup>a</sup>
		40	46.68 ± 0.042 <sup>de</sup>	4.32 ± 0.1 <sup>a</sup>
	Span	30	56.9 ± 1.25 <sup>cd</sup>	4.50 ± 0.03 <sup>a</sup>
		40	54.59 ± 1.15 <sup>cd</sup>	4.68 ± 0.01 <sup>a</sup>

El valor representa la media de al menos tres repeticiones ± su error estándar. Superíndices con diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas (p < 0.05) mediante la prueba de Tukey.

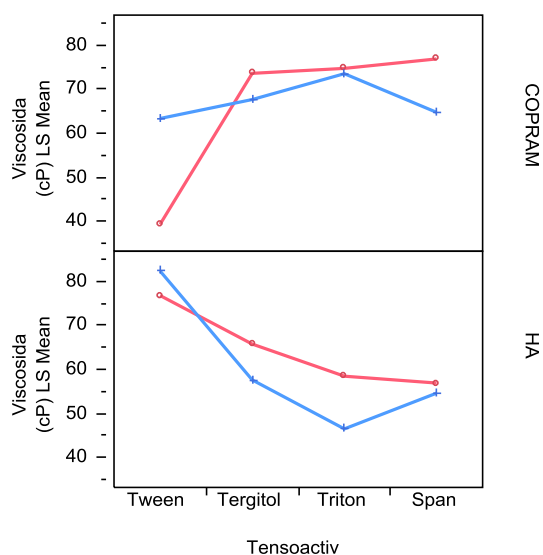
Para los valores de viscosidad obtenidos (Cuadro 10) se observa que la fuente de los aislados proteicos, la concentración y tipo de tensoactivo tienen un efecto significativo para la formación de fibras. La prueba de Tukey señala que no existe diferencia significativa. La solución con 40% de Tween 80 con APA-HA presentó el mayor valor de viscosidad (82.32 cP), más del doble en comparación con la solución que presentó menor viscosidad (39.32 cP, Tween 30%, APA-COPRAM). Los tensoactivos Tritón, Tergitol y Span en ambas concentraciones presentaron viscosidades de 46 a 77 cP. Se observa que al aumentar la concentración de tensoactivos (40%) disminuye la viscosidad, aunque el análisis estadístico no señala que existe una diferencia significativa.

El análisis estadístico arrojó que existen efectos de dobles y triples interacciones entre los factores de concentración de tensoactivo, tipo de tensoactivo y fuente de proteína (Cuadro 11). Como se puede observar en la Figura 7, se muestran las medias obtenidas de viscosidad de las soluciones poliméricas. En el gráfico de COPRAM, se observa que a una concentración de 30% de tensoactivo, los tensoactivos Tergitol, Tritón y Span presentan un comportamiento semejante en cuanto a valores de viscosidad, mientras que el tensoactivo Tween, a la misma concentración la viscosidad es mucho menor (39.32cP). También se ve que existen diferencias entre cada concentración (30 y 40%) de los tensoactivos Tergitol y Span, y mayoritariamente en Tween. Mientras que el tensoactivo Tritón no parece existir diferencia entre las dos concentraciones (30 y 40%).

En el gráfico de HA, se observa que en ambas concentraciones (30 y 40%) el tensoactivo Span no presenta una diferencia tan grande, a comparación de los demás tensoactivos, donde Tween y Tergitol presentan diferencia de viscosidades, seguidas por Tritón es el que presenta mayor diferencia.

**Cuadro 11.** Análisis de interacciones significativas de los aislados proteicos en la variable Viscosidad

	Estimado	Error Std	t Ratio	Prob  t
APA	-3.2881	0.95488	-3.44	0.0088*
Concentración	-1.8943	0.95488	-1.98	0.0826
Tensoactivo	1.0818	0.95488	1.13	0.2900
APA*Concentración	-1.0781	0.95488	-1.13	0.2916
APA* Tensoactivo	-10.8193	0.95488	-11.33	<.0001*
Concentración*Tensoactivo	-5.5006	0.95488	-5.76	0.0004
APA*Concentración*Tensoactivo	-3.5343	0.95488	-3.70	0.0060*



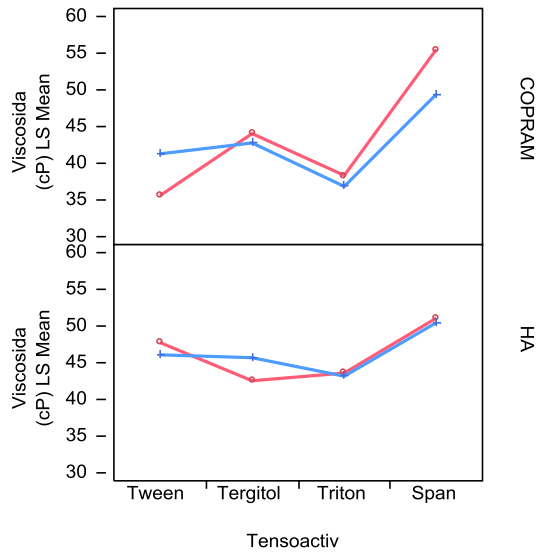
**Figura 7.** Gráfica de interacción triple de la solución polimérica (APA COPRAM, APA HA) y sus efectos sobre la variable Viscosidad. Línea roja: 30% y línea azul: 40%.

El Cuadro 11, muestra los valores de viscosidad para la fracción 2. El tensoactivo Span 20, al 30% es el que presenta una mayor viscosidad (55.52 cP) a diferencia de los demás, y Tween 80 a una concentración de 30% es el que presenta menor

viscosidad (35.59 cP). En general los valores de viscosidad de los demás tensoactivos en ambas concentraciones se encuentran entre valores de 35 a 55 cP. Los resultados indican que existe un efecto significativo del tipo de tensoactivo adicionado para la formación de fibras en la fracción 2 (Cuadro 12). En el gráfico COPRAM (Figura 8) se muestra que los tensoactivos Tergitol y Tritón parecen no haber diferencias entre las dos concentraciones (30 y 40%). Mientras que en los tensoactivos Span y Tween parece ser más evidente las diferencias entre las dos concentraciones. Para el gráfico HA sucede algo semejante respecto a la poca diferencia que hay entre las concentraciones de tensoactivo, pero esta vez es para Tritón y Span. Tween tiene mayor diferencia de viscosidad de una concentración a otra, y todavía mayor el tensoactivo Tergitol.

**Cuadro 12.** Análisis de interacciones significativas de las fracciones proteicas en la variable Viscosidad

	Estimado	Error Std	t Ratio	Prob  t
Frac2	-1.69625	1.444001	-1.17	0.2739
Concentración	0.33875	1.444001	0.23	0.8204
Tensoactivo	-4.4725	1.444001	-3.10	0.0147*
Frac2*Concentración	-0.23375	1.444001	-0.16	0.8754
Frac2* Tensoactivo	-2.5425	1.444001	-1.76	0.1163
Concentración*Tensoactivo	-1.3425	1.444001	-0.93	0.3797
Frac2*Concentración*Tensoactivo	-1.6075	1.444001	-1.11	0.2979



**Figura 8.** Gráfica de interacción triple de la solución polimérica (Frac2 COPRAM, Frac2 HA) y sus efectos sobre la variable Viscosidad. Línea roja: 30% y línea azul: 40%.

Las viscosidades obtenidas son menores a lo reportado por Aceituno (2012), quien reportó viscosidades de 362cP (70:30:20) y 366cP (80:20:20) en mezclas poliméricas a partir de APA:Pul:Tween 80, respectivamente. Las viscosidades obtenidas son menores debido a la concentración del polímero, se ha reportado que viscosidades altas están relacionadas con el aumento de la concentración del polímero o mezcla de polímeros, caso similar sucede en el aumento del peso molecular (Ramakrishna *et al.*, 2005). En el presente trabajo se disminuyó la concentración de la mezcla de polímeros (75:25 APA:Pul) a un 10%, por lo que se obtuvieron viscosidades menores. Se disminuyó la concentración con el objetivo de facilitar el proceso de electroestirado, proporcionando un mayor número de enredos de la cadena de proteína dentro de la solución, que es necesario para mantener la continuidad del chorro durante electroestirado (Ramakrishna *et al.*, 2005).

Cabe mencionar que la adición de tensoactivos no iónicos a diferencia de los tensoactivos iónicos, no aumentan de manera importante la viscosidad de las muestras, sin embargo se observa que existe un ligero aumento de la viscosidad, lo que puede deberse a la capacidad de asociación que tienen los polímeros, en este caso la proteína y el pululano, con los tensoactivos (Aceituno, 2012).

La viscosidad de las soluciones poliméricas juega un papel importante en el tamaño y morfología de la fibra. Diversos autores han reportado valores de viscosidades de 1 a 215 cP dependiendo del tipo de polímero a electroestirar (Sukigara *et al.*, 2003; Deitzel *et al.*, 2002; Buchko *et al.*, 1999; Doshi y Reneker, 1995). Como ya se ha mencionado, la viscosidad tiene una relación directa con la concentración y peso molecular del polímero, por lo que no existe un valor óptimo que asegure que una solución puede ser electroestirable o no.

El distinto comportamiento de las soluciones poliméricas puede deberse a las interacciones polímero-polímero moduladas por tensoactivos no iónico y por la concentración del disolvente (ácido) en el que se encuentran disueltos los polímeros. Se esperaba que la adición de tensoactivos no iónicos no tuvieran interacción electrostática alguna y solo actuaran con los polímeros por medio de interacciones hidrofóbicas (Ziani *et al.*, 2010). El hecho es que la adición de dichos tensoactivos a las soluciones poliméricas cambió muy poco la viscosidad de éstas, sugiriendo que no afectó las interacciones entre las moléculas del polímero.

**Cuadro 13.** Mediciones de viscosidad y conductividad de las soluciones poliméricas de los aislados proteicos

	Tensoactivo	Concentración de tensoactivo	Viscosidad (cP)	Conductividad (mS/cm)
F2 COPRAM	Tween	30	35.59 ± 1.30 <sup>c</sup>	1.77 ± 0.03 <sup>e</sup>
		40	46.26 ± 4.73 <sup>abc</sup>	1.65 ± 0.01 <sup>e</sup>
	Tergitol	30	44.04 ± 0.88 <sup>abc</sup>	4.65 ± 0.33 <sup>a</sup>
		40	41.21 ± 1.97 <sup>bc</sup>	1.89 ± 0.19 <sup>de</sup>
	Tritón	30	38.34 ± 1.59 <sup>bc</sup>	4.69 ± 0.34 <sup>a</sup>
		40	36.85 ± 0.51 <sup>bc</sup>	1.74 ± 0.08 <sup>e</sup>
	Span	30	55.52 ± 3.61 <sup>a</sup>	4.83 ± 0.30 <sup>a</sup>
		40	49.41 ± 6.51 <sup>abc</sup>	1.68 ± 0.11 <sup>e</sup>
F2 HA	Tween	30	47.75 ± 1.29 <sup>abc</sup>	2.64 ± 0.08 <sup>cd</sup>
		40	46.08 ± 0.46 <sup>abc</sup>	3.72 ± 0.23 <sup>b</sup>
	Tergitol	30	42.54 ± 2.96 <sup>abc</sup>	2.91 ± 0.18 <sup>bc</sup>
		40	45.69 ± 0.07 <sup>abc</sup>	2.60 ± 0.10 <sup>cd</sup>
	Tritón	30	43.59 ± 4.58 <sup>abc</sup>	2.75 ± 0.32 <sup>c</sup>
		40	43.17 ± 3.98 <sup>abc</sup>	2.64 ± 0.19 <sup>cd</sup>
	Span	30	51.08 ± 6.28 <sup>ab</sup>	2.80 ± 0.13 <sup>c</sup>
		40	50.47 ± 5.38 <sup>ab</sup>	2.72 ± 0.05 <sup>c</sup>

El valor representa la media de al menos tres repeticiones  $\pm$  su error estándar. Superíndices con diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) mediante la prueba de Tukey.



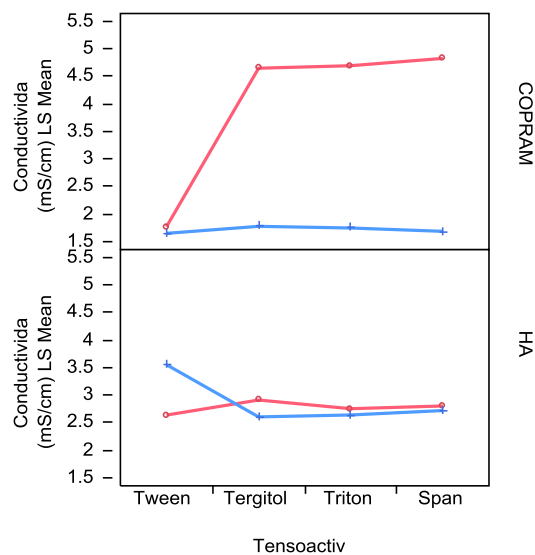
## 7.2.2 Conductividad

El proceso de electroestirado requiere de transferencia de cargas eléctricas desde el electrodo a la gotita de hilatura. Por lo tanto, una conductividad eléctrica mínima es esencial para la formación de nanofibras. Soluciones con la conductividad cero no se pueden electroestirar, por lo tanto, no son formadoras de nanofibras. La conductividad eléctrica, al igual que la viscosidad, se ve afectada por el polímero y el tipo de disolvente, la disponibilidad de sales ionizables, la concentración de polímero y la temperatura. Cuando el polímero tiene características iónicas, la conductividad de la solución depende de la concentración (Okutan *et al.*, 2014).

La conductividad en las fracciones 2 tanto de COPRAM como de HA se muestran en el Cuadro 13, donde se observa que la concentración y tipo de tensoactivo, así como el tipo de fracción tienen un efecto significativo en la formación de las fibras. La prueba de Tukey señala que hay 5 grupos donde los valores de conductividad tienen diferencias significativas entre si. Siendo F2-COPRAM con 30% Span quien presenta mayor conductividad (4.83 mS/cm), en comparación con 1.65 mS/cm de conductividad de la mezcla F2-COPRAM con 40% de Tween.

**Cuadro 14.** Análisis de interacciones significativas de las fracciones proteicas en la variable Conductividad

Estimado	Error Std	t Ratio	Prob  t	
Frac2	-0.22275	0.03203	-6.95	0.0001
Concentración	0.30375	0.03203	9.48	<.0001*
Tensoactivo	-0.3035	0.03203	-9.47	<.0001*
Frac2*Concentración	0.51175	0.03203	15.98	<.0001*
Frac2* Tensoactivo	-0.47025	0.03203	-14.68	<.0001*
Concentración*Tensoactivo	-0.5025	0.03203	-15.69	<.0001*
Frac2*Concentración*Tensoactivo	-0.253	0.03203	-7.9	<.0001*



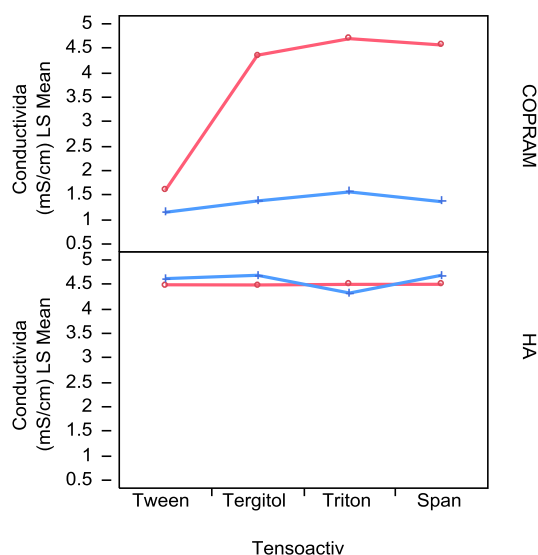
**Figura 9.** Gráfica de interacción triple de la solución polimérica (Frac2 COPRAM, Frac2 HA) y sus efectos sobre la variable Conductividad. Línea roja: 30% y línea azul: 40%

Factores como el tipo y concentración y tensoactivo, así como el tipo de fuente proteica presentan un efecto significativo en la formación de fibras (Cuadro 14). En el gráfico COPRAM (Figura 9) se observa que solo actuó la variable “concentración de tensoactivo” para los tensoactivos Tergitol, Tritón y Span, ya que el tipo de tensoactivo no generó algún otro cambio en la conductividad. A excepción del tensoactivo Tween, donde se observa un efecto casi nulo para las dos concentraciones. En el gráfico HA los tensoactivos Tritón y Span no parece existir diferencia entre las dos concentraciones, el Tergitol presenta una diferencia más notoria, seguida del tensoactivo Tween, quien presenta la mayor diferencia en las conductividades.

En el caso de los aislados proteicos, el análisis de varianza (Cuadro 10) señala que todos los factores tienen un efecto significativo para la formación de fibras. En el análisis de Tukey se observan 3 grupos de mezclas que son estadísticamente diferentes, siendo APA-COPRAM con tritón al 30% quien tiene mayor conductividad de 4.69 mS/cm, y la que presenta menor conductividad es APA-COPRAM con Tween al 40% (1.14 mS/cm).

**Cuadro 15.** Análisis de interacciones significativas de los aislados proteicos en la variable Conductividad

	Estimado	Error Std	t Ratio	Prob  t
APA	-1.2033	0.01913	-62.90	<.0001*
Concentración	0.41737	0.01913	21.81	<.0001*
Tensoactivo	-0.40825	0.01913	-21.34	<.0001*
APA*Concentración	0.49537	0.01913	25.89	<.0001*
APA* Tensoactivo	-0.38825	0.01913	-20.29	<.0001*
Concentración*Tensoactivo	-0.33675	0.01913	-17.60	<.0001*
APA*Concentración*Tensoactivo	-0.35175	0.01913	-18.38	<.0001*



**Figura 10.** Gráfica de interacción triple de la solución polimérica (APA COPRAM, APA HA) y sus efectos sobre la variable Conductividad. Línea roja: 30% y línea azul: 40%

Como ya se mencionó existen efectos entre los factores de concentración y tipo de tensoactivo, así como en la fuente de proteína (Cuadro 15). En la gráfico COPRAM (Fig. 10) la variación de conductividad es diferente en función a la concentración y tipo de los tensoactivos (Tergitol, Tritón y Span). El tensoactivo

Tween es quien muestra menor diferencia de conductividad en función a la concentración de tensoactivo. Para HA no se observa un efecto significativo, es decir, tanto la concentración y tipo de tensoactivo no produce un efecto tan importante en la conductividad, para este tipo de fuente proteica.

El propósito de adicionar los tensoactivos no iónicos a las mezclas fue mejorar la producción de nanofibras. Los tensoactivos no iónicos, como lo indica su nombre, no aportan una carga importante a las soluciones; sin embargo, en el Cuadro 13 se observa que al aumentar la concentración de tensoactivo en las mezclas, la conductividad disminuye y en algunos casos, de forma significativa. Los polímeros naturales, como las proteínas, son de naturaleza polielectrolítica, los iones que se encuentran presentes, aumentan la carga del jet facilitando la formación de las nanofibras, por lo cual tienen un efecto sobre el proceso de electroestirado (Okutan *et al.*, 2014; Bhardwaj, Kundu, 2010). Es posible el efecto del surfactante y del pululano reduzca las cargas de la proteína y en consecuencia disminuyan la conductividad eléctrica de la solución. De manera general, si la conductividad aumenta se reduce la necesidad de utilizar altos voltajes (Ramakrishna, 2005). En el presente estudio las conductividades obtenidas fueron bajas, por lo cual no fue posible disminuir el voltaje. A pesar de las bajas conductividades de las mezclas poliméricas, se continuó manejando corriente de 22kV, que fue el voltaje reportado por Aceituno (2012).

### **7.2.3 Tensión superficial**

En base a los resultados obtenidos de viscosidad y conductividad, se decidió seleccionar las muestras que mostraron mayor diferencia significativa para la medición de tensión superficial, las cuales fueron aquellas con 30 y 40% de Tween y Span, tanto para APA como para Frac 2. La tensión superficial es otro parámetro que se toma en cuenta en el proceso de electroestirado. Dentro de la solución polimérica se debe de tener una tensión superficial baja para evitar que el

jet, durante el electroestirado, se colapse en gotitas antes de que el disolvente se ha evaporado y se produzcan defectos.

En los Cuadros 16 y 18 se muestran los valores de tensión superficial se observa de manera general que al aumentar la concentración de tensoactivo aumenta la tensión superficial. Las mezclas poliméricas presentan valores de tensión entre 32.6 y 37.6 mN/m. Estudios muestran que la adición de tensoactivos mejora la capacidad de formación de fibras en soluciones que no son fácilmente electroestirables, que es una consecuencia de la reducción de la tensión superficial (Bonino *et al.*, 2011; Aceituno *et al.*, 2013). La reducción de la tensión superficial de la mezcla promovió la obtención de nanofibras sin defectos. Wang *et al* (2008), al desarrollar nanofibras de alginato y celulosa con la adición de tensoactivo no iónico (Tritón), observaron que al aumentar la concentración de tensoactivo disminuyó la tensión superficial y facilitó el proceso de electroestirado, disminuyendo el diámetro de las fibras y sin defectos.

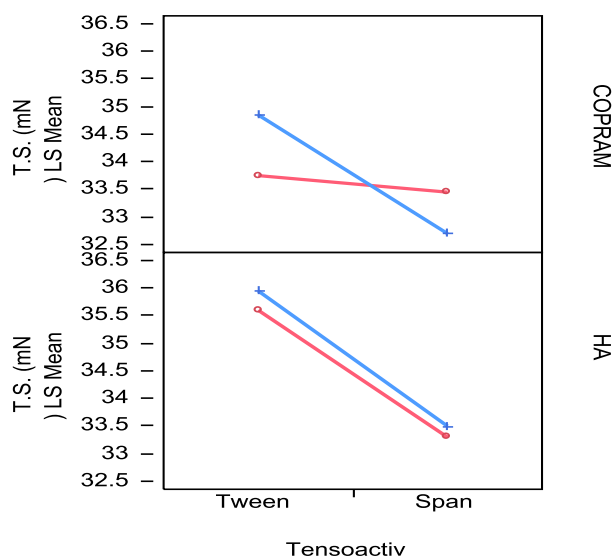
**Cuadro 16.** Tensión superficial de los aislados de amaranto

Tensoactivo	Concentración de tensoactivo	Tensión superficial(mN/m)	
APA COPRAM	Tween	30	33.75 ± 0.05 <sup>c</sup>
		40	34.85 ± 0.15 <sup>b</sup>
	Span	30	33.45 ± 0.10 <sup>c</sup>
		40	32.7 ± 0.15 <sup>d</sup>
APA HA	Tween	30	35.6 ± 0.11 <sup>a</sup>
		40	35.95 ± 0.15 <sup>a</sup>
	Span	30	33.3 ± 0.17 <sup>c</sup>
		40	33.5 ± 0.15 <sup>c</sup>

El valor representa la media de al menos tres repeticiones  $\pm$  su error estándar. Superíndices con diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) mediante la prueba de Tukey.

**Cuadro 17.** Análisis de interacciones significativas de los aislados proteicos en la variable Tensión Superficial

	Estimado	Error Std	t Ratio	Prob  t
APA	-0.45	0.03535	-12.73	<.0001*
Concentración	-0.1125	0.03535	-3.18	0.0130*
Tensoactivo	0.9	0.03535	25.46	<.0001*
APA*Concentración	0.025	0.03535	0.71	0.4996
APA* Tensoactivo	-0.2875	0.03535	-8.13	<.0001*
Concentración*Tensoactivo	-0.25	0.03535	-7.07	0.0001*
APA*Concentración*Tensoactivo	-0.2125	0.03535	-6.01	0.0003*



**Figura 11.** Gráfica de interacción triple de la solución polimérica (APA COPRAM, APA HA) y sus efectos sobre la variable Tensión Superficial. Línea roja: 30% y línea azul: 40%.

Para el Gráfico COPRAM (Fig. 11), se observa que solo está actuando la interacción “tipo de tensoactivo:concentración de tensoactivo” al cambiar de tensoactivo Tween a Span los valores de tensión superficial disminuyen. La

pendiente se vuelve más pronunciada para la concentración al 40%, lo que nos indica que existe un mayor efecto en la tensión superficial. En el gráfico HA se observa que solo actúa la variable “tipo de tensoactivo”, es decir que ésta variable está ejerciendo un efecto en la tensión superficial sin importar la concentración de los tensoactivos. Dentro de las mezclas de aislado proteico, APA-HA con Tween 80 demostró la mayor tensión superficial (35.6 mN/m), mientras que la mezcla APA-COPRAM con Span 20 al 40% presentó el menor valor de tensión superficial (32.7 mN/m). La prueba de Tukey señala que existen cuatro grupos que son diferentes entre sí, y que se ven afectados por la concentración y tipo de tensoactivo así como en la fuente de aislado proteico; los aislados proteicos obtenidos de la harina de amaranto (HA) presentan mayor tensión superficial a comparación de las mezclas hechas con APA-COMPRAM.

**Cuadro 18.** Tensión superficial de las fracciones de amaranto

	Tensoactivo	Concentración de tensoactivo	Tensión superficial(mN/m)
Frac 2	Tween	30	36.2± 0.15 <sup>b</sup>
		40	36.55 ± 0.288 <sup>ab</sup>
COPRAM	Span	30	33.45 ±0.152 <sup>d</sup>
		40	33.55 ± 0.15 <sup>d</sup>
Frac 2	Tween	30	35.35± 0.1 <sup>bc</sup>
		40	37.6 ± 0.2 <sup>a</sup>
HA	Span	30	33.35± 0.15 <sup>d</sup>
		40	34.45 ± 0.28 <sup>cd</sup>

El valor representa la media de al menos tres repeticiones  $\pm$  su error estándar. Superíndices con diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) mediante la prueba de Tukey.

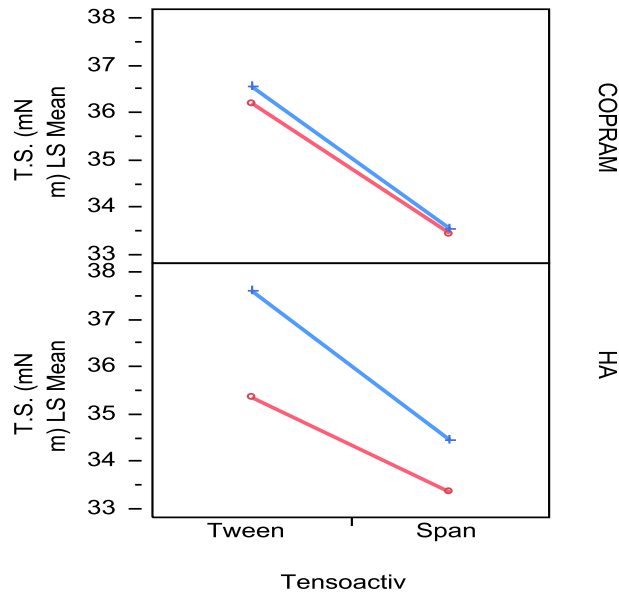
En cuanto a los resultados de las fracciones, al igual que las mezclas con aislado proteico, la prueba de Tukey arrojó que existen cuatro grupos que son diferentes y tienen efectos principales sobre el tipo de fracción (COPRAM y HA) y el tipo de tensoactivo. La menor concentración de Span 20 (30%) reduce la tensión superficial en todas la mezclas poliméricas.

En la Figura 12, ambos gráficos se observa que está actuando el tipo de tensoactivo, ya que al cambiar el tipo de tensoactivo, la tensión superficial se ve modificada. Para el grafico COPRAM la concentración de tensoactivo no juega un papel importante, ya que ambas pendientes son casi iguales. Mientras que para el gráfico HA no solo el tipo de tensoactivo tiene un efecto en los valores de tensión superficial, sino que además la concentración de estos. La concentración al 40% presenta un efecto más pronunciado que la concentración 30%.

**Cuadro 19.** Análisis de interacciones significativas de las fracciones proteicas en la variable Tensión Superficial

	Estimado	Error Std	t Ratio	Prob  t
Frac2	-0.125	0.07654	-1.63	0.1411
Concentración	-0.475	0.07654	-6.21	0.0003*
Tensoactivo	1.3625	0.07654	17.80	<.0001*
Frac2*Concentración	0.3625	0.07654	4.74	0.0015*
Frac2* Tensoactivo	0.075	0.07654	0.98	0.3559
Concentración*Tensoactivo	-0.175	0.07654	-2.29	0.0516
Frac2*Concentración*Tensoactivo	0.1125	0.07654	1.47	0.1798





**Figura 12.** Gráfica de interacción triple de la solución polimérica (Frac2 COPRAM, Frac2 HA) y sus efectos sobre la variable Tensión Superficial. Línea roja: 30% y línea azul: 40%

Los resultados muestran claramente que la tensión superficial de las mezclas se mantuvo casi sin cambios, independientemente de la composición de la solución. Los valores obtenidos coinciden con lo reportado por Ramakrishna *et al* (2005), donde se muestra que valores mayores a 30 mN/m pueden favorecer la formación de fibras.

En resumen los tensoactivos Tritón X-100 y Tergitol mostraron comportamiento semejante al tensoactivo Tween 80, mientras que el tensoactivo Span 20 mostró un comportamiento diferente, modificando de manera importante las propiedades de la solución.

La adición de tensoactivos no iónicos a las mezclas poliméricas en ambas concentraciones facilitan la disolución de los polímeros utilizados. Esto puede ser debido a la capacidad que tienen los tensoactivos de asociarse a los polímeros, formando una interacción estable entre éstos y con el ácido fórmico. Las interacciones entre los componentes pueden afectar las propiedades reológicas de las mezclas, como se observan en los resultados obtenidos, donde al disminuir las concentraciones de tensoactivo, disminuye la conductividad y tensión superficial, y

hay un ligero aumento en la viscosidad, características adecuadas para la producción de nanofibras.

Después de dos meses de haberse formado las fibras, las fibras obtenidas con las fracciones proteicas mostraron deterioro, en cuanto a la apariencia, cambio de color y textura. Por lo cual, se decidió trabajar para las siguientes pruebas con las fibras obtenidas con APA.

### **7.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS NANOFIBRAS**

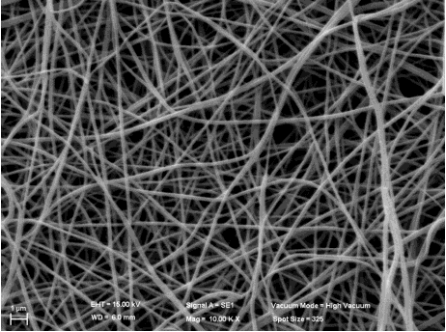
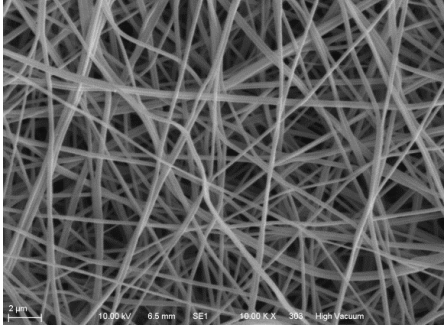
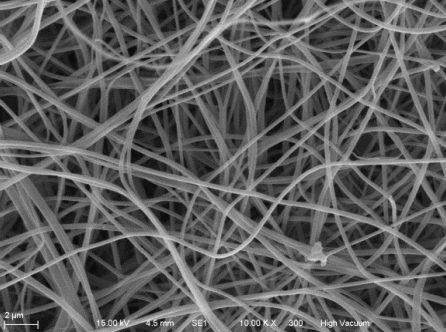
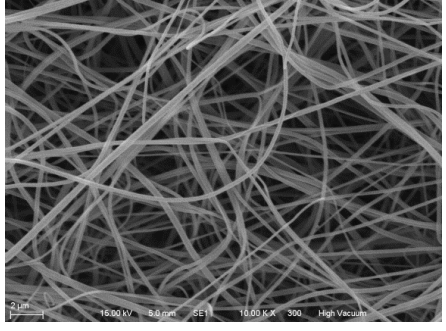
Existen varios factores que pueden modificar la morfología de las nanofibras, como viscosidad, tensión superficial y conductividad, las cuales pueden modificarse con la adición de tensoactivos. Pero también existen otros parámetros que pueden alterar la formación de fibras como el voltaje aplicado, la distancia de la aguja al colector y el flujo con el que se forma el jet, independientemente de la concentración del polímero. En el presente trabajo, a pesar de que hubo una modificación en la formulación de las mezclas poliméricas y las propiedades de la solución variaron, no se cambiaron los parámetros del equipo establecidas por Aceituno (2012).

#### **7.3.1 Morfología, diámetro y topografía de las fibras**

La caracterización física está asociada con la estructura y la morfología de las nanofibras, y son las que básicamente determina las propiedades físicas y mecánicas. Las propiedades geométricas de nanofibras incluyen diámetro de la fibra, la distribución de diámetro, orientación de las fibras y la morfología de la fibra

(por ejemplo, si es transversal u horizontal y rugosidad de la superficie). De las técnicas que más se utilizan para la caracterización de las propiedades geométricas es la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) (Bhardwaj y Kundu, 2010).

El diámetro de las fibras se ve relacionado con la concentración de sólidos dentro de la solución. En la Figura 13 se muestran las micrografías obtenidas por SEM de las nanofibras a partir de APA- COPRAM con 30% de concentración de cada tensoactivo. Los diámetros obtenidos se encuentran entre 230 a 287 nm, éstos son diámetros menores a lo reportado por Aceituno (2012). Era de esperarse que los diámetros fueran menores, ya que se disminuyó la concentración de sólidos para poder facilitar la formación de las nanofibras.

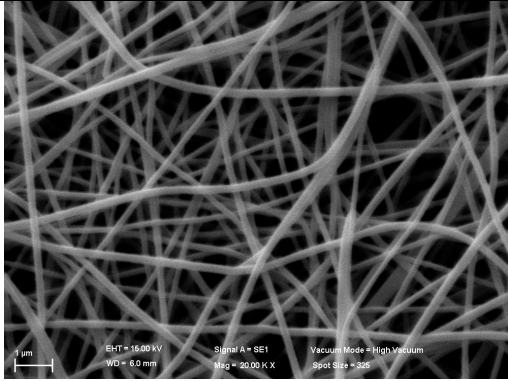
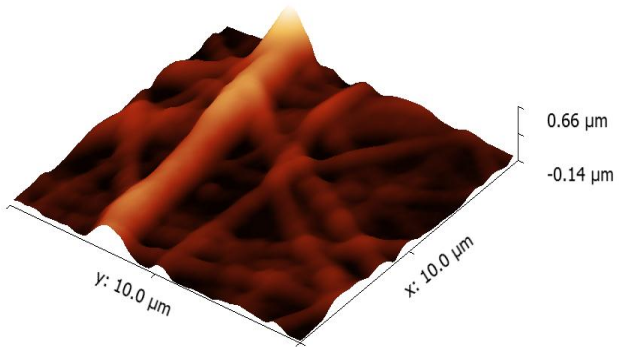
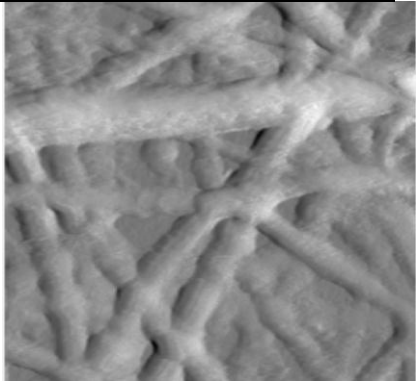
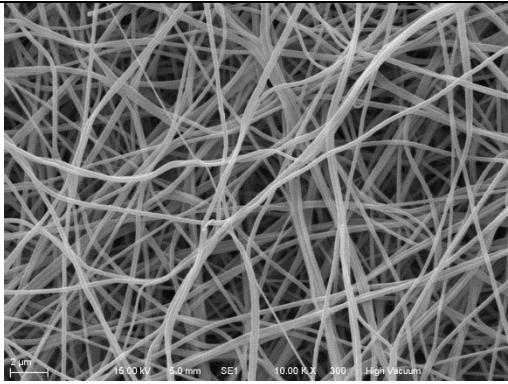
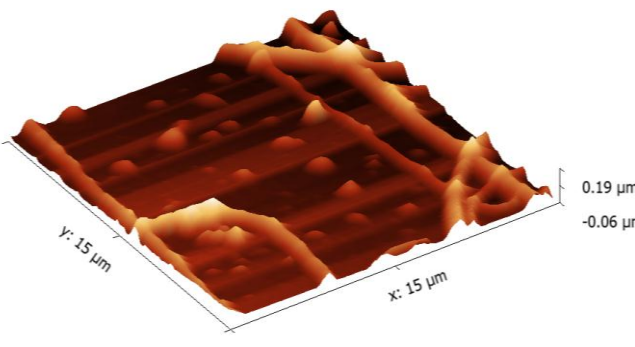
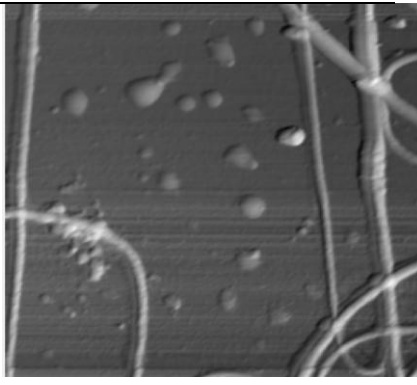
Tensoactivo	Micrografía	Diámetro (nm)
Tween 80		287 ± 102.7
Tergitol		270 ± 56.83
Tritón X-100		230 ± 98.6
Span 20		250± 62.7

**Figura 13.** Micrografías obtenidas por Microscopía electrónica de barrido (SEM) APA COPRAM: Pul: Tensoactivo (75:25:30).

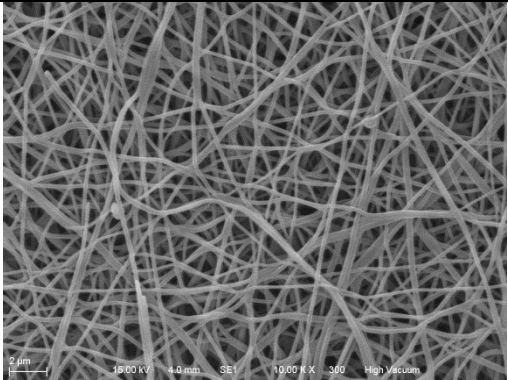
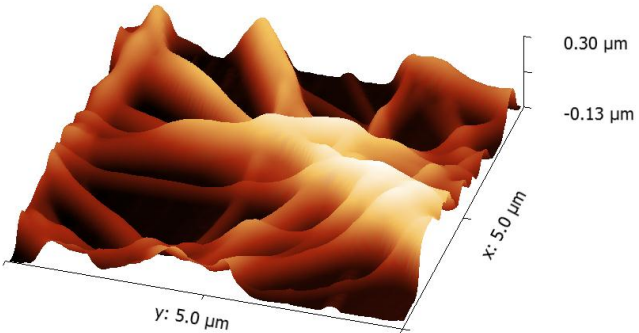
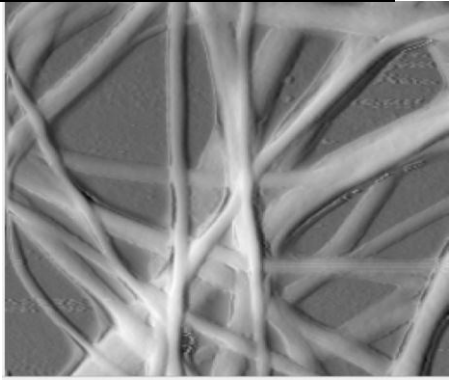
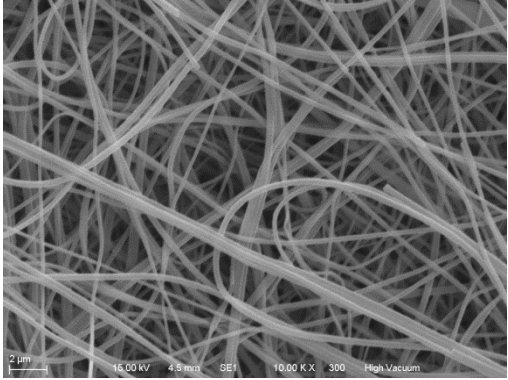
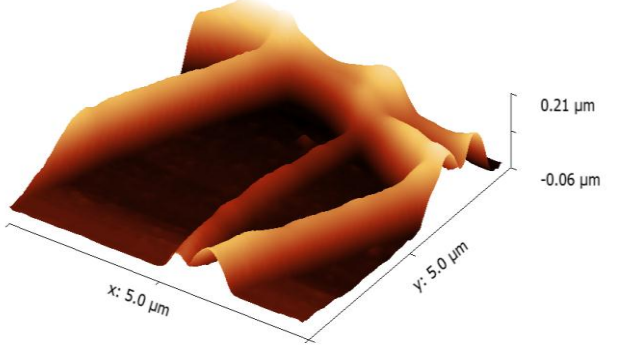
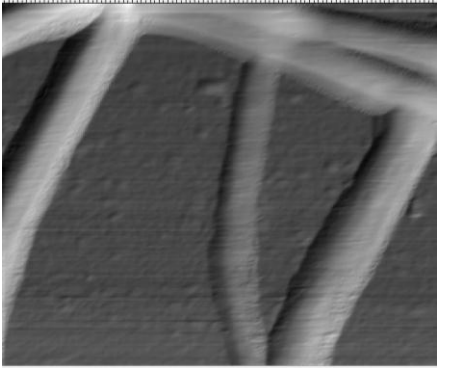
En general, se observan nanofibras lisas y homogéneas, con pocos defectos. Dependiendo del tipo de tensoactivo, las nanofibras pueden ser más delgadas o gruesas, al igual que la uniformidad de tamaño. Se ha demostrado que la adición de tensoactivo mejora variables de la solución en el caso de la viscosidad, con un aumento de ésta se obtienen nanofibras más gruesas; también los tensoactivos pueden disminuir la tensión superficial, obteniendo nanofibras más lisas y uniformes y pueden modificar la conductividad, si ésta aumenta se obtienen nanofibras delgadas y si disminuye son gruesas (Ramakrishna *et al.*, 2006). Las nanofibras obtenidas con Tritón ( $230 \text{ nm} \pm 98.6$ ) fueron las más delgadas, y las más gruesas fueron las que se formaron con Tween 80 ( $287 \text{ nm} \pm 102.7$ ). Existen estudios donde ya se han utilizado estos tensoactivos en combinación con diferentes polímeros (PVA, PEO, alginato, celulosa) obteniendo nanofibras más delgadas (Talwar *et al.*, 2010; Bonino *et al.*, 2010; Vasita *et al.*, 2010).

Se puede decir que los tensoactivos no iónicos son adecuados para la formación de estructuras de fibras a partir de polímeros de proteína de amaranto en combinación con carbohidratos (pululano) de bajo peso molecular, y que el tamaño y distribución puede ser modificado por el tipo y cantidad de tensoactivo añadido.

Las nanofibras obtenidas a partir de APA-HA con 30% de tensoactivo presentaron mayor interés en el presente estudio, una de las razones principales es la facilidad de obtención de la semilla de amaranto para convertirla en aislado proteico sin tener que recurrir a un proveedor, también el uso de los tensoactivos a una menor concentración aumenta el rendimiento de la producción de las fibras, y en cuestiones económicas se hace una menor inversión en los materiales que componen a las fibras, produciendo fibras de calidad y aptas como encapsulantes y/o de barrera. Con los resultados obtenidos se logra la optimización del proceso de electroestirado, y las topografías de las fibras APA-HA al 30% se muestran en la Figura 14, donde se observan las micrografías de SEM y en AFM.

Tenso-activo	SEM	AFM	
Tween 80	 <p data-bbox="415 719 747 748">Diámetro: 350 nm ± 83.8</p>		
Tergitol	 <p data-bbox="415 1141 747 1170">Diámetro: 248nm ± 67.1</p>		

**Figura 14.** Micrografías obtenidas por Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) APA-HA a una concentración de 30% de tensoactivo.

Tenso-activo	SEM	AFM	
Tritón X-100	 <p data-bbox="422 756 743 789">Diámetro: 230nm ± 74.9</p>		
Span 20	 <p data-bbox="422 1203 743 1235">Diámetro: 350nm ± 81.03</p>		

**Figura 14** (Continuación). Micrografías obtenidas por Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) APA-HA a una concentración de 30% de tensoactivo.

De manera general, las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (Figura 14) para APA-HA a 30% de tensoactivo, muestran nanofibras homogéneas y con pocos defectos. Las nanofibras que presentan mayor diámetro son las que tienen Tween 80 y Span 20 ( $350 \pm 83.8$  nm y  $350 \pm 81.03$  nm respectivamente), y las que presentan menor diámetro son las nanofibras con Tritón X-100 ( $230 \pm 74.9$  nm). Los diámetros obtenidos concuerdan con lo reportado por Aceituno (2012) diámetros entre 309 a 321 nm, de dos mezclas de APA:Pul (70:30 y 80:20). Las nanofibras obtenidas de APA-HA presentaron un comportamiento semejante a las obtenidas con APA-COPRAM tanto en la homogeneidad como en los diámetros. Los diámetros obtenidos en las nanofibras APA-COPRAM son menores a los diámetros de APA-HA, esto puede ser debido a una mejor distribución de la proteína dentro de la solución polimérica. El aislado proteico obtenido de COPRAM es más puro a diferencia del aislado proteico obtenido de HA; por lo cual, APA-COPRAM presenta una mayor facilidad para disolverse y favorecer la formación de estructuras entrecruzadas, formadoras de nanofibras.

A fin de mejorar la topografía de la superficie de las fibras, se llevó a cabo Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), técnica que se utiliza para observar cualquier tipo de morfología de la superficie y descripciones más exactas de la superficie de la fibra (Bhardwaj and Kundu, 2010). Las micrografías obtenidas por AFM (Figura 14) muestran imágenes topográficas de las nanofibras de una forma más detallada. Con una mejor resolución se pueden observar los defectos de las fibras y que tan uniformes están, tal como se observa en las micrografías de Tergitol, las cuales muestran defectos; en la imagen hay zonas donde no se forman fibras y lo que ve son pequeñas gotas, conocidas como defectos o beads, el tamaño de estas es semejante al diámetro de las fibras ( $\Delta x: 490 \pm 282$  nm,  $\Delta y: 698 \pm 112$  nm,  $\Delta z: 27.64 \pm 32.55$  nm). Los beads pueden formarse por una mala disolución de los componentes, ya que en cuanto a las características propias de la solución (viscosidad y conductividad) no se observaron efectos significativos. O bien por cuestiones propias del equipo, donde la corriente no es continua y puede



haber una inestabilidad del jet, formando perlas o pequeñas gotas (beads) (Fong *et al*, 1999).

El AFM permite poder ver de manera tridimensional las nanofibras formadas y conocer las dimensiones de éstas en 3 ejes (X, Y, Z) (Tan and Lim, 2006). Las nanofibras obtenidas con Tween 80 ( $\Delta x$ :  $746 \pm 425$  nm,  $\Delta y$ :  $565.4 \pm 307$  nm,  $\Delta z$ :  $56.1 \pm 21.24$  nm) son las que tienen mayor tamaño y no son totalmente lisas. Las nanofibras obtenidas con Tritón ( $\Delta x$ :  $180 \pm 78.02$  nm,  $\Delta y$ :  $256.3 \pm 126.6$  nm,  $\Delta z$ :  $45.2 \pm 30.9$  nm) se ven más definidas y presentan mayor variación en el diámetro. Las nanofibras obtenidas con Span se observan más definidas y más homogéneas ( $\Delta x$ :  $410 \pm 229.8$  nm,  $\Delta y$ :  $400 \pm 197.9$  nm,  $\Delta z$ :  $51.4 \pm 38.9$  nm). Mientras que las nanofibras obtenidas con Tergitol, además de presentar beads, son escasas y de diferentes tamaños ( $\Delta x$ :  $259 \pm 183.1$  nm,  $\Delta y$ :  $373 \pm 244.9$  nm,  $\Delta z$ :  $18.96 \pm 11.3$  nm). Vasita *et al* (2010) mencionan el uso de diferentes concentraciones de tensoactivo no iónico puede modificar las propiedades superficiales de las nanofibras. En el presente estudio, el tipo de tensoactivo de naturaleza no iónica modifica las propiedades superficiales de las nanofibras, sin influir de forma significativa en las características generales de éstas.

Se puede concluir que las nanofibras no son totalmente homogéneas y tubulares, algunas no son tan lisas (las estructuras obtenidas con Tween presentan rugosidad) y en el caso de Tween y Tritón presentan mayor número de entrecruzamientos. Los principales factores que determinan la forma de las fibras son los efectos mecánicos, tales como, la carga eléctrica ejercida en el jet y la capacidad del disolvente en evaporarse. En este contexto, se cree que las fibras circulares o tubulares se forman por una buena evaporación del disolvente y un voltaje continuo. La formación de ramificaciones dentro de las fibras, puede ser deberse a un flujo poco constante y un voltaje mal aplicado durante el proceso de electroestirado. Durante este proceso se forma un jet primario, pero por ciertas variaciones, puede haber una separación del jet primario en varios jets secundarios, colectándose en la placa fibras con varias ramificaciones (Torres-Giner *et al*, 2007; Koombhongs *et al.*, 2001), como se observan en las

micrografías obtenidas por SEM (Figuras 13 y 14) y de manera más detallada en AFM (Figura 14). En las micrografías se observan la rugosidad y la forma ovalada o elíptica de las fibras, Torres-Giner *et al.*, (2007) mencionan que podría deberse que durante el proceso de la formación de la fibra, se queda atrapado disolvente dentro de ella y, por efecto de la presión atmosférica, hay un colapso en el tubo formado, modificando la estructura de la fibra.

### **7.3.2 Caracterización molecular de las fibras mediante Espectroscopía Infrarroja con Reflectancia Difusa (DRIFTS)**

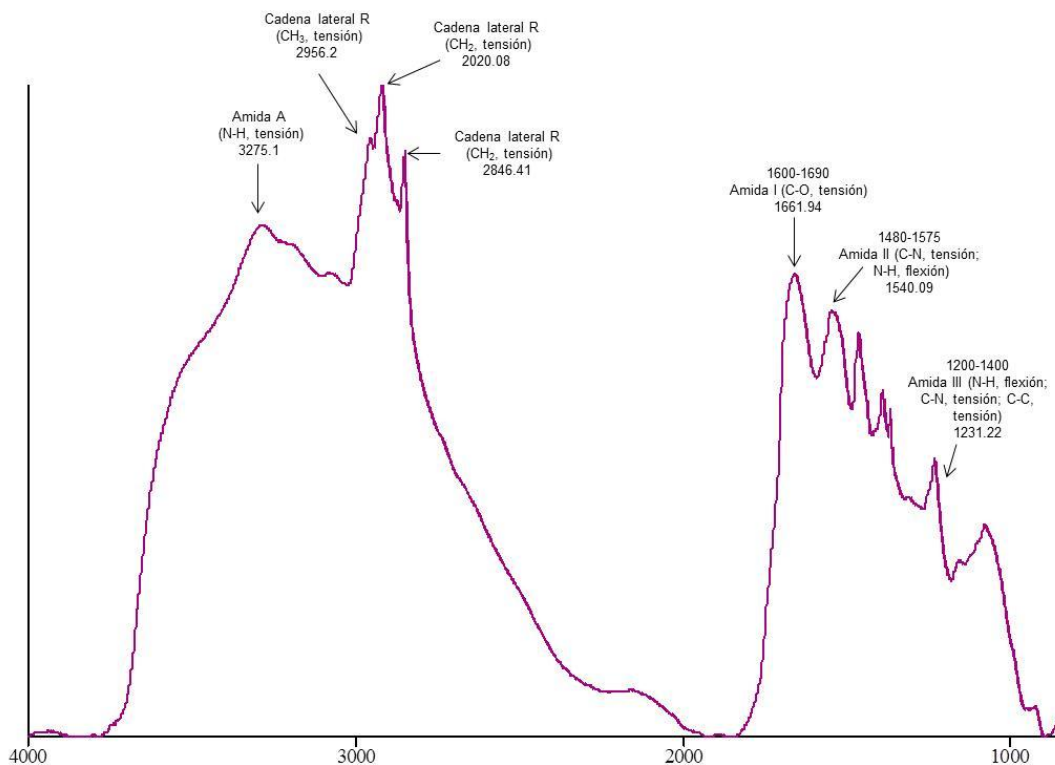
La espectroscopía de infrarroja ha utilizado como un método para investigar la estructura secundaria de las proteínas. En general, las  $\alpha$ -hélices y las hojas  $\beta$  representan el principal orden estructural de las proteínas que conforman el grano de amaranto. Una de las técnicas para la caracterización de la estructura molecular de las fibras es por Espectroscopía Infrarroja con Reflectancia Difusa. Esta técnica es una forma eficaz de obtener espectros en el infrarrojo directamente sobre muestras pulverizadas con un mínimo de preparación de la misma. Además de ahorrar tiempo en la preparación de la muestra, el método permite la obtención de datos de la región espectral del infrarrojo convencional de muestras que no han sufrido una alteración apreciable de su estado original. Esta técnica permite detectar interacciones intermoleculares entre biopolímeros principalmente.

En la Figura 15, se muestran las posiciones de las bandas características de IR del aislado proteico liofilizado de amaranto, y se observan las bandas características de la proteína que corresponden a lo reportado por Aceituno (2012). Las principales bandas de interés de la proteína de amaranto son la Amida A ( $3275\text{ cm}^{-1}$ ), Amida I ( $1600\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$ ) y Amida II ( $1480\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$ ). Como se observa en la figura, existe un ensanchamiento de la banda Amida A, lo que se puede atribuir a los enlaces formados (-OH y -NH) entre las proteínas y los carbohidratos que se encuentran presentes, y también se pueden ver afectados

por la presencia de disolventes polares, como el agua (Shevkani *et al.*, 2014; Tapia *et al.*, 2010).

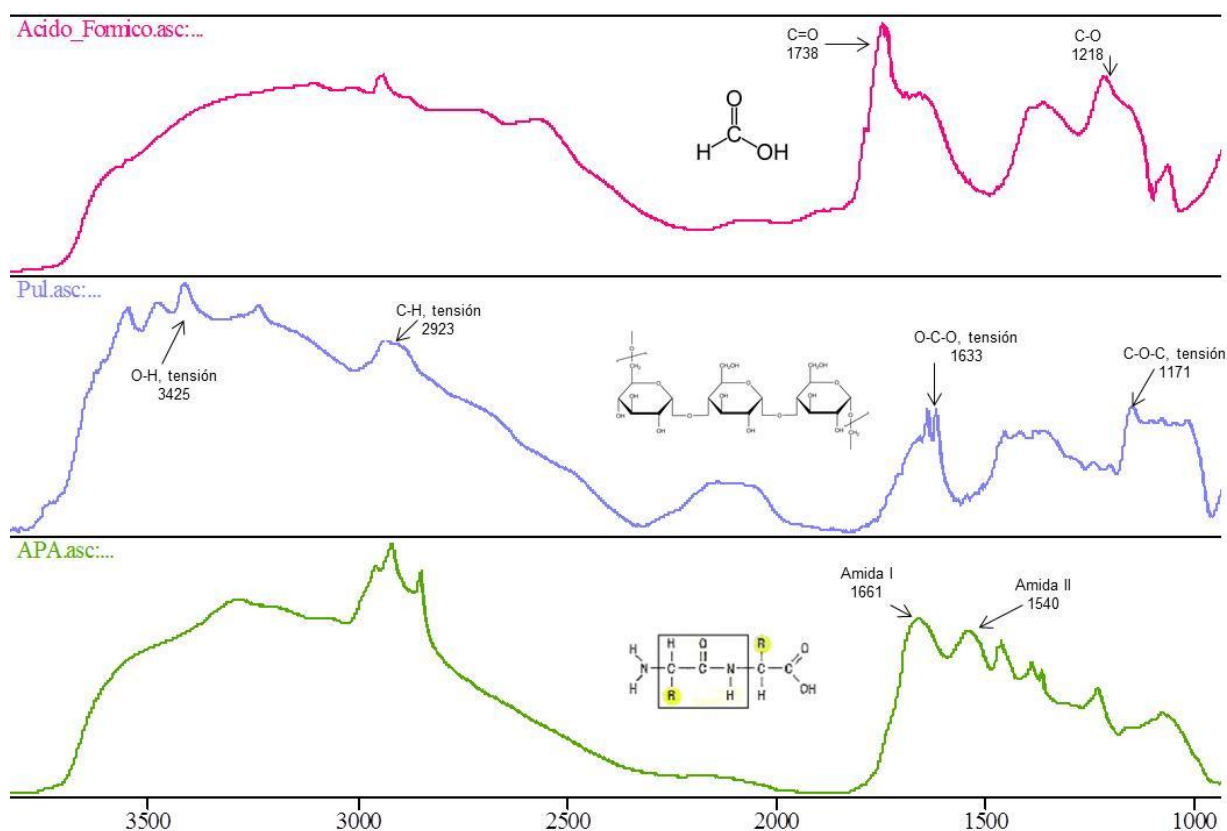
La banda Amida I se corresponde a la tensión de los enlaces C=O de los péptidos y es sensible a diferentes conformaciones de la estructura secundaria de las proteínas. En la Figura 16 se observa la presencia de esta banda, lo cual nos indica que la estructura secundaria es principalmente por hojas  $\beta$ . La banda Amida II se debe a las vibraciones de flexión del enlace N-H, que se ven afectadas junto con las vibraciones de tensión de los enlaces C-N.

A número de onda menor de  $1300\text{ cm}^{-1}$  se observan una variedad de picos. Estos picos pueden corresponder a enlaces relacionados con  $\text{CH}_2\text{OH}$  ( $1240\text{ cm}^{-1}$ ), C-OH de deformación ( $1206\text{ cm}^{-1}$ ), C-O-C de vibración ( $1150\text{ cm}^{-1}$ ), C-OH de estiramiento ( $1100\text{ cm}^{-1}$ ) y C-OH de solvatación ( $1010\text{ cm}^{-1}$ ); estas bandas son pertenecientes a carbohidratos que aún se encuentran en el aislado proteico (Shevkani *et al.*, 2014; Tapia *et al.*, 2010).



**Figura 15.** Espectro del aislado proteico de amaranto analizado por DRIFT.

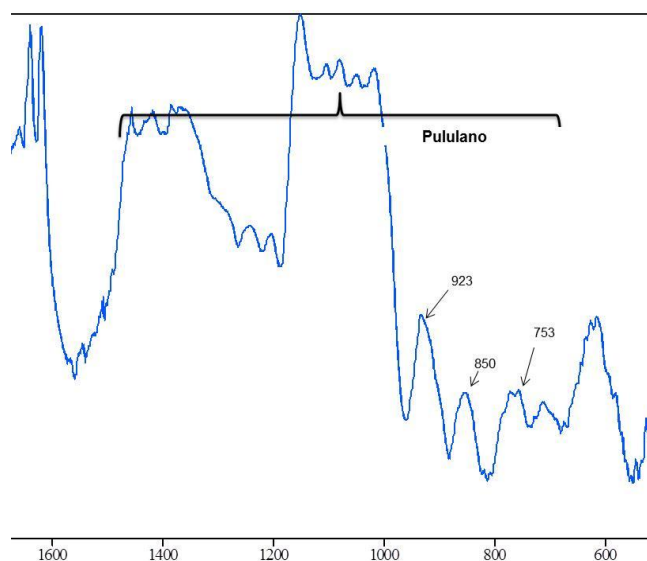
La Figura 16 muestra los espectros obtenidos por Espectroscopía Infrarroja con Reflectancia Difusa característicos de la proteína de amaranto, pululano y ácido fórmico. La banda característica del ácido fórmico se encuentra alrededor de 1700  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a C=O y la segunda banda en 1200  $\text{cm}^{-1}$  pertenece a enlace C-O y esto concuerda a lo reportado por Bennett *et al* (2011). Los espectros del pululano muestra una amplia banda ubicada a 3425  $\text{cm}^{-1}$  que pertenece al enlace –OH, el cual nos indica unidades repetidas de azúcares. La banda 2923  $\text{cm}^{-1}$  es un enlace C-H que son los enlaces característicos de los alcanos (Thirumavalavan *et al.*, 2009). El espectro del aislado proteico las bandas de principal interés son las amidas I y II, ya que si existe algún desplazamiento o ensanchamiento de las bandas y, nos indica posibles interacciones que puede haber con otros polímeros o compuestos.



**Figura 16.** Espectros obtenidos por DRIFT. Aislado proteico (línea verde), Pululano (línea azul) y Ácido fórmico (línea rosa)

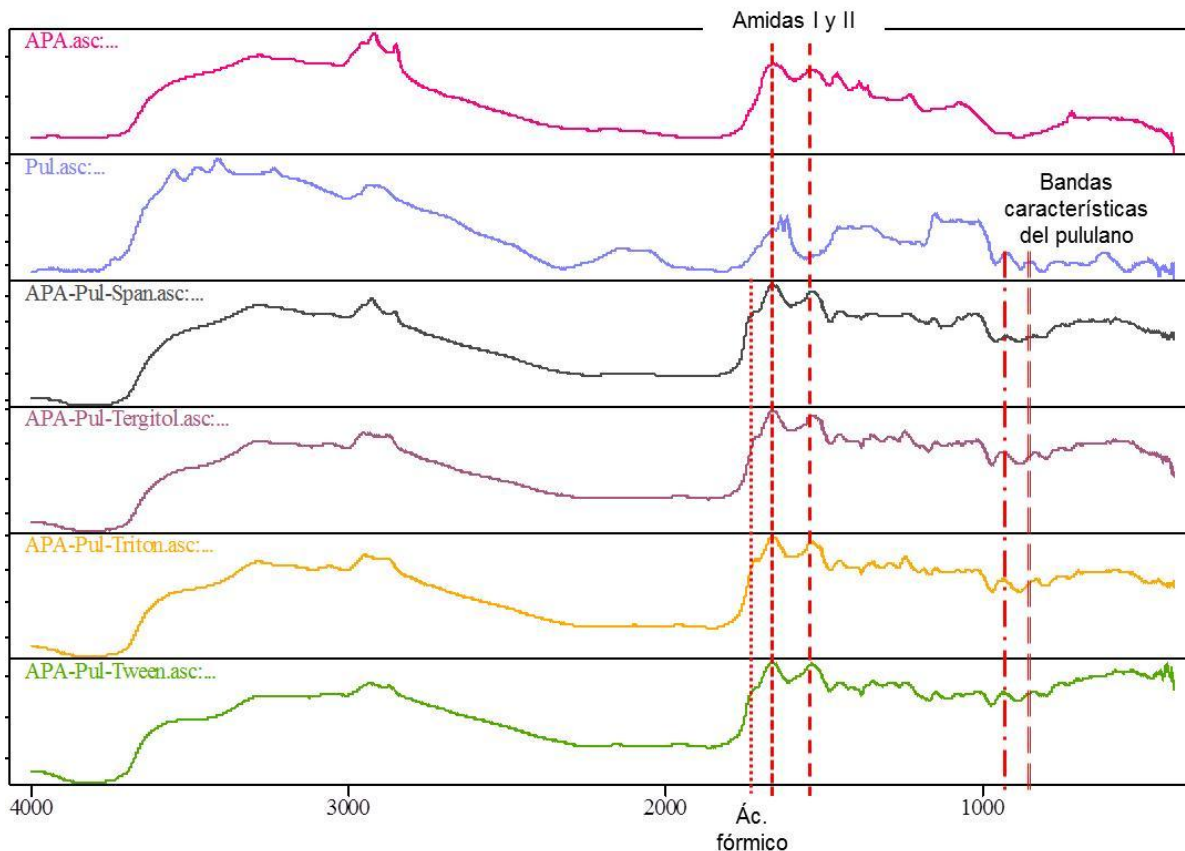
El área específica comprendida entre 1500-650  $\text{cm}^{-1}$  es característica de la molécula de pululano (Figura 17). La banda ubicada a 850  $\text{cm}^{-1}$  es representativa de las unidades de  $\alpha$ -glucopiranosido. La banda 753  $\text{cm}^{-1}$  pertenece al enlace glucosídico ( $\alpha$ -1,4) y la banda 923  $\text{cm}^{-1}$  es característica del enlace  $\alpha$ -1,6 (Aceituno, 2012; Thirumavalavan *et al.*, 2009).

Las bandas correspondientes a la amida II de la proteína de amaranto (Figura 15) y la banda perteneciente al enlace glucosídico ( $\alpha$ -1,4) a 753  $\text{cm}^{-1}$  para el pululano (Figura 17), además de ser huellas digitales de ambos polímeros, son fáciles de visualizar ya que no se solapan con otras bandas (Aceituno, 2012).



**Figura 17.** Espectro de las bandas características del pululano.

El análisis de espectroscopia IR se realizó con el fin de caracterizar la organización molecular de las estructuras, así como para confirmar la presencia de los tensoactivos en las estructuras de proteína:carbohidrato. En la Figura 18 se observan los espectros de IR para las fibras APA:Pul (75:25) con 30% de tensoactivo (Tween, Tergitol, Tritón y Span), comprobándose que todos los espectros muestran señales características de los componentes, así como la disminución de bandas ubicadas entre 1000 y 1500  $\text{cm}^{-1}$



**Figura 18.** Espectroscopía IR de fibras obtenidas con la adición de tensoactivos no iónicos, aislado proteico de amaranto y pululano.

A pesar de que las fibras fueron secadas para eliminar restos del disolvente, en los espectros de las fibras se observa una banda a  $1738\text{cm}^{-1}$  característica del ácido fórmico que corresponde al enlace  $\text{C}=\text{O}$ . Esto se puede relacionar por la dificultad de evaporación del disolvente, debido al alto punto de ebullición ( $100.8^\circ\text{C}$ ). Sin embargo, la banda no interfiere con las demás interpretaciones de los espectros.

Por otro lado, no se observaron desplazamientos para las bandas características de la proteína de amaranto (amida I y amida II), lo cual indica que la incorporación de los diferentes tensoactivos no iónicos no causa cambios en la estructura secundaria de la proteína. Sin embargo la adición de los tensoactivos aumentó la intensidad de las bandas amida I y II.

También se observa que las bandas que corresponden al grupo R ( $2956\text{cm}^{-1}$   $\text{CH}_3$  tensión,  $2020\text{ cm}^{-1}$   $\text{CH}_2$  tensión) de la cadena lateral del aislado proteico tuvieron un ensanchamiento. El ensanchamiento de las bandas nos indica que la adición de tensoactivos puede favorecer la formación de puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas entre las moléculas la proteína y del pululano.

Se observó el ensanchamiento de una banda característica del pululano por la adición de los tensoactivos. Esta banda está ubicada  $3425\text{ cm}^{-1}$  y pertenece al enlace  $-\text{OH}$ . El ensanchamiento de la banda en las fibras realizadas corresponde a la tensión del grupo  $-\text{OH}$ , lo cual está relacionado con la formación de puentes de hidrógeno.

Las intensidades de las bandas aumentan cuando mayor cantidad de activo es incorporado a la solución. Como se observa en la Figura 19, la adición de tensoactivos aumentó la intensidad de las bandas en la región espectral de  $1400$  a  $800\text{ cm}^{-1}$ . Como ya se mencionó antes, algunas bandas pueden estar relacionadas con enlaces  $\text{CH}_2\text{-OH}$ ,  $\text{C=OH}$ ,  $\text{C-O-C}$ , pertenecientes al aislado proteico (Shevkani *et al.*, 2014; Tapia *et al.*, 2010).

## 8. CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que la adición de tensoactivos mejoró las propiedades de las soluciones poliméricas y todas las soluciones fueron capaces de formar nanofibras. La adición de tensoactivos no iónicos redujo la tensión superficial, mejorando el proceso de electroestirado.

En general, la adición de tensoactivos no iónicos fueron los adecuados para la formación de nanofibras, en especial para las fibras de APA-HA:Pul.

También se demostró que la adición de éstos tiene un efecto sobre la morfología y el diámetro de las fibras. La morfología obtenida de las nanofibras de los aislados proteicos se observaron lisas, homogéneas y con pocos defectos, esto se comprobó con la microscopía electrónica de barrido y microscopía de fuerza atómica. Resultados de FTIR muestra que la adición de tensoactivos no iónicos no afectó la estructura secundaria de la proteína, conservando sus propiedades biológicas.

Las nanofibras obtenidas a partir del aislado proteico de la harina de amaranto tienen ventaja en cuestiones de rendimiento y disponibilidad de la materia prima. Los resultados obtenidos son de gran interés para el desarrollo de material de encapsulación y con capacidad protección de compuestos activos para aplicaciones relacionadas dentro de la industria de los alimentos.



## 9. REFERENCIAS

- Abugoch L E, E N Martínez, M C Añón. 2003. Influence of the extracting solvent upon the structural properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) glutelin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4060-4065.
- Aceituno M., Lopez R., Mendoza D., Lagaron J. 2012. Development of novel ultrathin structures based in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolate through electrospinning. *Food Hydrocolloids* 31: 289-298.
- Aceituno M. 2012. Desarrollo y caracterización de nanofibras electroestiradas basadas en proteína aislada de amaranto como vehículos para la encapsulación de compuestos antioxidantes. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Avaza M., Puppo M. and Añón M. 2005. Structural characterization of amaranth protein gels. *Journal of Food Science*. (70) 3: 223-229.
- Barba de la Rosa A P, J Gueguen, O ParedesLópez, G Viroben. 1992. Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 931-936.
- Barba de la Rosa A., Paredes-López O., Gueguen J. 1992. Characterization of amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatographic techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 937-940.
- Barba de la Rosa A., Herrera-Estrella A., Utsumi S., Paredes-López O. 1996. Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *Journal of Plant Physiology* 149: 527-532.
- Bejarano L., Netto F. 2010. Effect of alternative processes on the yield and physicochemical characterization of protein concentrates from *Amaranthus cruentus*. *Food Science and Technology* 43: 736-743.

- Bejosano F.P., Corke H. N. 1999. Properties of protein concentrates and hydrolysates from amaranth and buckwheat. *Industrial crops and products*. 10: 175-183.
- Bhardwaj N., Kundu S. 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* 28: 325-347.
- Bennett C., Hama T., Kim Y., Kawasaki M., Kaiser R. 2011. Laboratory studies on the formation of formic acid (HCOOH) in interstellar and cometary ices. *The Astrophysical Journal*, 27: 1-15.
- Bonino C., Krebs M., Saquing C., Jeong S., Shearer K, Alsberg E., Khan S. 2011. Electrospinning alginate-based nanofibers: From blends to crosslinked low molecular weight alginate-only systems. *Carbohydrate Polymers*. 85:111–119.
- Bressani R., García V. 1990. Protein fractions in amaranth grain and their chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38: 1205-1209.
- Castel M. 2010. Estudio de las propiedades funcionales, tecnológicas y fisiológicas de las proteínas de amaranto. Tesis de maestría. Universidad Nacional del Litoral. Disponible en <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8180/tesis/bitstream/1/212/1/tesis.pdf> (25-04-2013).
- Chakraborty S., Liao I., Adler A., Leong, K. 2009. Electrohydrodynamics: a facile technique to fabricate drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61: 1043-1054.
- Escalante E. 2010. Rescate y revaloración del cultivo de amaranto. Programa Elaboración de casos de éxito de innovación en el sector agroalimentario. Disponible en <http://www.siac.org.mx/fichas/44%20D.F.%20Amaranto.pdf>. (26-04-2013)

- Finot, P. 1997. Effects of processing and storage on the nutritional value of food proteins. In Food Proteins and Their Applications. Damodaran, S., Paraf, A., (eds.) Dekker: New York: 551-577.
- Fong H., Chun I., Reneker D. 1999. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* 40: 4585- 4592.
- Frenot A., Chronakis S. 2003. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current opinion in colloid and interface science*. 8:64-7.
- Fuentes P., Román L. 1980. Los surfactantes, clases, propiedades y uso con herbicidas. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 7-14.
- Gamboa W., Mantilla O., Castillo V. 2007. Producción de micro y nanofibras a partir de la técnica de “electrospinning” para aplicaciones farmacológicas. VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería. La Habana, Cuba.
- Hernández G. y Herrerías G. 1998. Amaranto: historia y promesa. Tehuacán: Horizonte del Tiempo Vol. 1. Patrimonio Histórico de Tehuacán A. C. p 529. Disponible en <http://www.quali.com.mx/Amaranto.pdf>
- Huerta O., Barba de la Rosa. 2012. Caracterización bioquímica y estructural de las proteínas de reserva de amaranto. En: Espitia Rangel E. (ed). Amaranto: Ciencia y Tecnología. Libro Científico No. 2. INIFAP/SINAREFI. México, pp 293-302.
- Jiang H., Zhao P., Zhu K. 2007. Fabrication and characterization of zein based nanofibrous scaffolds by an electrospinning method. *Macromolecular Bioscience*. 7: 517-521.
- Kong L., Ziegler G. 2014. Formation of starch-guest inclusion complexes in electrospun starch fibers. *Food Hydrocolloids* 38: 211-219.
- Konishi Y, N Yoshimito. 1989. Amaranth globulin as a heat-stable emulsifying agent. *Agricultural and Biological Chemistry* 53: 3327-3328.

- Konishi Y, O Y Horikawa, J Azumaya, N Nakatani. 1991. Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: comparison of some physicochemical properties and the putative localization in the grain. *Agricultural and Biological Chemistry* 55: 1745-1750.
- Konishi Y, Fumita Y., Ikedo K, Okuno K, Fuwa H. 1985. Isolation and characterization of globulin from seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Agricultural and Biological Chemistry* 49: 1453-1459.
- Koombhongse S., Liu W., Reneker D. 2001. Flat Polymer Ribbons and Other Shapes by Electrospinning. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*. 39: 2598-2606.
- Kriegel C. Arrechi A., Kit K., Mc Clements, D. J., Weiss J. 2008. Fabrication, functionalization and application of electrospun biopolymer nanofibers. *Critical Reviews in food science and nutrition*. 48:775-797.
- Kriegel C., Kit K., Mc Clements, D. y Weiss J. 2009. Electrospinning of chitosan-poly(ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solutions. *Polymer*. 50: 189-200.
- Lozoya G. 1994. Biotechnology for an ancient crop: Amaranth. Paredes-López O. (ed.) CRC Press: Boca Ratón. FL, p 17.
- van den Heuvel M., Geerdink P., Brier, P. van den Eijnden, Jolanda T., Henket., Langelaan, N., Henk C., van Deventer, Anneke H. 2013. Food-grade electrospinning of proteins. Inside Food Symposium, Leuven, Belgium.
- Marcone, M., Yada R. 1992. Study of the charge profile and covalent subunit association of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 385-389.
- Marín M., Martínez T. 2009. Diseño y estudio de una máquina de electrospinning. Tesis de maestría. Universidad Politécnica de Cataluña.

- Martínez, E., Añón M. 1996. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 2523-2530.
- Mencías R., Mayero F. 2000. Manual de toxicología básica. Ediciones Díaz de Santos. España, p 337-340
- Morales G., Vázquez M. 2009. El Amaranto, Características físicas, químicas, taxológicas y funcionales y aporte nutricional. México: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran.
- Nielsen S. (ed), 1998; Food Analysis Second Edition; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland, pp 28.
- Nieuwland M., Geerdink P., Brier P., van den Eijnden P., Henket J., Langelaan M., Stroeks N., van Deventer H., Martin A. 2013. Food-grade electrospinning of proteins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 20: 24-158.
- Okutan N., Terzi P., Altay F. 2014. Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloids* 39: 19-26.
- Osuna-Castro, J.; Rascón-Cruz, Q.; Napier, J.; Fido, R.; Shewry, P., Paredes-López, O. 2000. Over expression, purification, and in Vitro refolding of the 11S globulin from amaranth seed in *Escherichia coli*. *Journal of. Agriculture and Food Chemistry*. 48, 5249-5255.
- Paredes L. Schevenin M., Herández D., Cárebez A. 1989. Amaranth Starch-Isolation and partial characterization. *Starch/Starke*. 41: 205-207.
- Paredes L., De la Rosa B., Hernández L., Carabez T. 1990. Amaranto: características alimentarias y aprovechamiento agroindustrial. Monografía. Organización de Estados Americano, Washington D. C. y CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato, México.

- Pelipenko J., Kristl J., Jankovi B., Baumgartner S., Kocbek P. 2013. The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics* 456: 125-134.
- Qiang W., He J. and Xu L. 2008. Non-ionic surfactants for enhancing electrospinnability and for the preparation of electrospun nanofibers. *Polymer International*. 57: 1079-1082.
- Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W-E., Lim T-C., Ma, Z. 2006. Electrospun nanofibers: solving global issues. *Materials Today*. 3: 40-50.
- Rezaul M., Woo H., Kim R., Chul B., Won T., Oh W., Hyu J. 2009. Preparation and characterization of electrospun pullulan/montmorillonite nanofiber mats in aqueous solution. 78: 336–342.
- Romero Z. 1995. Extracción y caracterización bioquímica de la fracción 11S de las globulinas de amaranto. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.
- SAGARPA-SIAP, 2010. Servicio de información Agroalimentaria de consulta.
- Salcedo C. 2004. Optimización y caracterización de aislados proteínicos de amaranto (*Amaranthus cruentus*) obtenidos por precipitación isoeléctrica. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Salcedo-Chávez B., Osuna-Castro J., Guevara-Lara F., Domínguez-Domínguez J., Paredes-López O. 2002. Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seed. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50: 6515-6520.
- Segura-Nieto M., Barba de la Rosa, A., Paredes-López O. 1994. Biochemistry of amaranth proteins. In *Amaranth Biology, Chemistry and Technology*; Paredes-López, O. (ed). CRC Press Boca Raton, FL. p 76-95.
- Shevkani K., Singh N., Rana J., Kaur A. 2013. Relationship between physicochemical and functional properties of amaranth (*Amaranthus*

- hypochondriacus*) protein isolates. International Journal of Food Science and Technology, 49: 541–550.
- Shu-Qiang W., Ji-Huan H., Lan X. 2008. Non-ionic surfactants for enhancing electrospinnability and for the preparation of electrospun nanofibers. Polymer International. 57: 1079-1082.
- Silva-Sánchez, C., Barba de la Rosa A., León-Galván M., De Lumen B., De León-Rodríguez, A., González-Mejía. 2008. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56: 1233-1240.
- Silva-Sánchez, C., González-Castañeda, J., León-Rodríguez A., Barba de la Rosa A. 2004. Functional and rheological properties of amaranth albumins extracted from two mexican varieties. Plan Foods for Human Nutrition. 59: 169-174.
- Srivastava R., Roy B. 2011. Effect of varying pH on protein composition and yield of amaranth seed (*Amaranthus blitum*). Journal of Environmental Biology. 32: 629-634.
- Stijnman A., Bodnar I., Tromp H. 2011. Electrospinning of food-grade polysaccharides. Food Hydrocolloids 25:1393-1398.
- Sunthornvarabhas J., Chatakanonda P., Piyachomkwan K., Sriroth K. 2011. Electrospun polylactic acid and cassava starch fiber by conjugated solvent technique. Materials Letters 65: 985-987.
- Sun X., Jia D., Kang W., Cheng B., Li Y. 2013. Research on electrospinning process of pullulan nanofibers. Applied Mechanics and Materials, 268: 198-201.
- Tan E., Lim C. 2006. Mechanical characterization of nanofibers – A review. Composites Science and Technology. 6: 1102–1111.
- Tapia B., Sbral P., Menegalli F. 2010. Potential of *Amaranthus cruentus* BRS Alegria in the production of flour, starch and protein concentrate: chemical,

- thermal and rheological characterization. *Journal Science Food Agriculture*. 90: 1185–1193.
- Talwar S., Krishnan A., Hinestroza P., Pourdeyhimi B., Khan S. 2010. Electrospun nanofibers with associative polymer-surfactant systems. *Macromolecules*. 43: 7650-7656.
- Thirumavalavan K., Manikkadan T., Dhanasekar R. 2009. Pullulan production from coconut by-products by *Aureobasidium pullulans*. *African Journal of Biotechnology*. 2: 254-258
- Tmösközi, S., Lásztity, R., Haraski, R., Baticz, O. 2008. Isolation and study of the functional properties of pea proteins. *Nahrung*. 45: 399-401.
- Torres-Giner S., Gimenez E., Lagaron J. 2008. Characterization of the morphology and thermal properties of Zein Prolamine nanostructures obtained by electrospinning. *Food Hydrocolloids* 22: 601–614.
- Vasita R., Mani G., Agrawal C., Katti S. 2010. Surface hydrophilization of electrospun PLGA micro-/nano-fibers by blending with Pluronic ®F-108. *Polymer*. 51: 3706- 3714.
- Villareal M., Ribotta P., Iturriaga L. 2013. Comparing methods for extracting amaranthus starch and the properties of the isolated starches. *Food Science and Technology* 51: 441-447.
- Wang H., Yin L., Padua G. 2008. Effect of hydrophilic and lipophilic compounds on zein microstructures. *Food Biophysics*. 3: 174-81.
- Wang S., He J. Y Xu I. 2008. Non-ionic surfactants for enhancing electrospinnability and for the preparation of electrospun nanofibers. *Polymers International*. 57: 1079-1082.
- Wongsasulak S., Patapeejumruswong M., Weiss J., Supaphol P., Yoovidhya T. 2010. Electrospinning of food-grade nanofibers from cellulose acetate and egg albumen blends. *Journal of Food Engineering*. 98: 370-376.



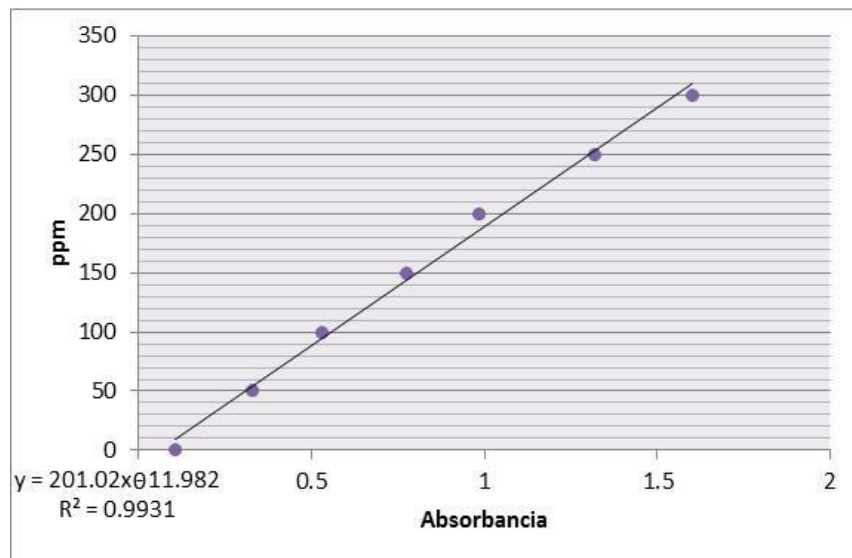
Yong K., Jeong L., Ok Y., Jin S., Ho W. 2009. Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61: 1020-1032.

Ziani K., Henrist C., Jerome C., Aqil A. Maté J., Cloots R. 2010. Effect of nonionic surfactant and acidity on chitosan nanofibers with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*. 83: 1-7.

## 10. APÉNDICE

### ANEXO 1

- Curva de calibración de glucosa



ppm (g/ $\mu$ L)	Absorbancia a 490 nm
0	0.106 $\pm$ 0.009
50	0.329 $\pm$ 0.007
100	0.5285 $\pm$ 0.020
150	0.776 $\pm$ 0.007
200	0.983 $\pm$ 0.004
250	1.3165 $\pm$ 0.007
300	1.6015 .003

- Ecuación de la recta

$$y = 201.02x - 11.982$$

$$R^2 = 0.9931$$

- Análisis de las muestras

Muestra	Absorbancia (nm)	X (conc.)	Concentración* (g/ $\mu$ L)
APA-HA	1.259 $\pm$ 0.088	0.0658	131.74
APA-COPRAM	0.335 $\pm$ 0.013	0.0612	122.56
Frac2-HA	2.265 $\pm$ 0.132	0.0708	141.702
Frac2-COPRAM	0.825 $\pm$ 0.067	0.0637	127.42

\*Se ajusta la concentración final al factor de dilución (2000x).